



T.C.

TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PTERJİUMDA KONNEKSİN 43 GEN EKSPRESYONUNUN
ve PROTEİN DÜZEYİNİN ANALİZİ**

Hazırlayan

Saime SEZER SONDAŞ

Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı

Doktora Tezi

Danışman

Prof. Dr. Hacı Ömer ATEŞ

TOKAT – 2018



T.C.

TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PTERJİUMDA KONNEKSİN 43 GEN EKSPRESYONUNUN
ve PROTEİN DÜZEYİNİN ANALİZİ**

Hazırlayan

Saime SEZER SONDAŞ

Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı

Doktora Tezi

Danışman

Prof. Dr. Hacı Ömer ATEŞ

TOKAT – 2018

Her hakkı saklıdır

**PTERJİUMDA KONNEKSİN 43 GEN EKSPRESYONUNUN
ve PROTEİN DÜZEYİNİN ANALİZİ**

Tezin Kabul Ediliş Tarihi: 19.11.2014

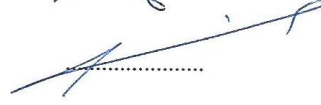
Jüri Üyeleri (Unvanı, Adı Soyadı)

İmzası

Başkan : Prof. Dr. Hamiyet ALTUNTAŞ



Üye : Prof. Dr. H. ÖmerATEŞ



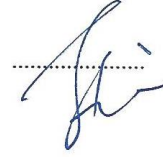
Üye : Doç. Dr. Aydın RÜSTEMOĞLU



Üye : Doç. Dr. Akın TEKCAN



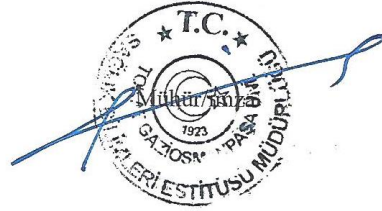
Üye : Dr. Öğr. Üyesi Sait ALİM



Bu tez, Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim

Kurulu'nun 19/09/2014 tarih ve 20/05 sayılı oturumunda belirlenen jüri tarafından kabul edilmiştir.

Enstitü Müdürü : Prof. Dr. H. Ömer ATEŞ



T.C.
GAZIOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

Sayı : 83116987 - 632 11.12.2014
Konu : Etik Kurul Kararı
Toplantı Tarihi : 09.12.2014
Toplantı No : 2014/21
Proje No : 14-KAEK-229

Sayın, Doç.Dr. Hacı Ömer ATEŞ

Etik Kurulumuzun 09.12.2014 tarihli toplantısında görüşülen 14-KAEK-229 numaralı **“Pterijunda Konneksin 43 Gen Ekspresyonu ve Protein Düzeyinin Analizi”** başlıklı çalışmanızın yapılmasında sakınca olmadığına karar verilmiştir.

Bilgilerinizi rica ederim.

Doç. Dr. Ahmet EYİBİLEN
Başkan

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.

Saime SEZER SONDAŞ

İTHAF

Annem'e ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nın ilk lisansüstü öğrencilerinden biri olarak başladığım bu yolda, 9 senelik eğitimim boyunca bana yol gösteren değerli Danışman Hocam, *Prof. Dr. H. Ömer ATEŞ'e*,

Katkılarından dolayı Anabilim Dalı Hocalarımız, *Doç. Dr. Aydın RÜSTEMOĞLU, Doç. Dr. Nevin KARAKUŞ ve Doç. Dr. Serbülent YiĞİT'e*,

Doktora Tezimde çalışma kriterlerine uygun hastaların toplanmasındaki yardımlarından dolayı Gaziosmanpaşa Üniversitesi Göz Hastalıkları Anabilim Dalı Hocalarına ve *Dr. Hüseyin ORTAK'a*,

Lisansüstü eğitimim boyunca desteğini benden esirgemeyen, iyi günümde kötü günümde hep yanımda olan, birçok soruna ortak çözüm bulduğumuz, beraber çalışmaktan büyük keyif aldığım *Arş. Gör. Nihan BOZKURT'a, Arş. Gör. Emel ENSARİ'ye*,

Çalışma süresince yardımlarından dolayı, *MSc. Bio Sümeyya Deniz ÇELİK'e*,

Tüm Yüksek Lisans ve Doktora *Arkadaşlarıma*,

Atlas Biyoteknoloji'ye, (Atlas Biyoteknoloji Laboratuvar Malzemeleri San. Ve Tic. Ltd. Şti.)

Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Personeli'ne,

Ve aileme... Hayatımın her anında yanıbaşımdayken olan, anlayışla sabırla desteklerini benden esirgemeyen, üzüntümü, sevincimi paylaştığım, varlıklarına hep şükür ettiğim, *Canım Eşime, Canım Ablam ve Abime*, canımınıçi bitanecik yiğenim *Masal'a*, eğitimimin her aşamasında hep yanımda hep destek olan *Canım Anneme* ve yanımda olamasa da sevgisini hep kalbimin en güzel yerinde hissettiğim *Canım Babama...*

Sonsuz Teşekkürler

Bu çalışma, Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi ve TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir.

Proje No: 2015/26 (Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi)

Proje No: 215S692 (TÜBİTAK)

Saime SEZER SONDAŞ



ÖZET

Sondaş Sezer, S. (2018). Pterjiumda Konneksin 43 Gen Ekspresyonunun ve Protein Düzeyinin Analizi. Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji ABD. Doktora Tezi. Tokat

Pterjium, limbustan korneaya doğru konjonktivanın kanat şeklinde anormal, epitelyal ve fibrovasküler büyümesidir. Aynı zamanda, proliferatif, invaziv ve oldukça vaskularize bir doku olduğu da söylenebilir. Pterjium, kanser benzeri özelliklere sahiptir. Bu özellikler, hücre proliferasyonu, invazyonu ve rezeksiyon sonrası tekrarlama şekilde sıralanabilir. Hastalığın en yaygın olarak bilinen faktörü ultraviyole radyasyon olmasına rağmen, patogenezi hala açık değildir.

Son yıllardaki çalışmalar pterjiyumlarda moleküler değişikliklerin tümör hücrelerine benzer bir mekanizmaya sahip olabileceğini desteklemektedir. Konneksinlerin hücre döngüsünün ve apoptozun düzenlenmesinde rol alan proteinlerle direkt etkileşim halinde olduğu ve bu yolla hücre büyümesini düzenleyebildiği yönünde çalışmalar mevcuttur. Konneksinler (CX), hücreler arası bağlantı birimlerinden olan gap junction kanallarının oluşumundan sorumlu olarak işlev görürler. Bu bağlantılar hücreler arasında iyonların ikincil mesajcılarının ve küçük sinyal moleküllerinin doğrudan değişiminde, doku homeostazında, büyüme, farklılaşma ve gelişmenin düzenlenmesinde önemli rol oynarlar. Neredeyse her memeli hücre tipinde görülen bu bağlantı bölgelerinin en önemli özelliği hücreler arası iletişimi sağlamalarıdır.

Çalışmada, 26 pterjiumlu olgunun gözüne ait pterjium ve normal konjonktiva dokularında Konneksin 43 (CX43) gen ifade düzeyi Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PZR) yöntemi ile CX43 protein miktarı ise Western Blot yöntemi kullanılarak araştırılmıştır.

Sonuçlarımıza göre, pterjium ve normal konjonktiva dokularında CX43 gen ifade düzeyi ve protein miktarı bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ($p>0.05$).

Pterjiyumda, CX43 gen ifadesinin bir risk etmeni olamayacağı sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelime: Gen Ekspresyonu, Konneksin 43, Western Blot

ABSTRACT

Sondas Sezer, S. (2018). Analysis of Connexin 43 Gene Expression and Protein Levels in Pterygium. Tokat Gaziosmanpaşa University, Institute of Health Science, Department of Medical Biology Ph.D Thesis. Tokat.

Pterygium is a wing-shaped abnormal epithelial and fibrovascular growth of the conjunctiva across the limbus onto the cornea. At the same time, It can be said that, a pterygium is a proliferative, invasive, and highly vascularized tissue pathologically. Pterygium also has cancer like properties. These properties can be listed as follows; cell proliferation, invasion, and recurrence after resection. The pathogenesis of this disease remains unclear, although the most widely recognized originating factor is ultraviolet radiation.

Recent studies have suggested that molecular changes in pterygiums may have a mechanism similar to tumor cells. There are studies in which adnexin interacts directly with proteins involved in the regulation of cell cycle and apoptosis, and in this way regulates cell growth. Connexins (CX) function as responsible for the formation of gap junction channels, which are inter-cell junction units. These connections play an important role in the direct exchange of ions between secondary messengers and small signal molecules between cells, in the regulation of growth, differentiation and development in tissue homeostasis. The most important feature of these junctional regions seen in almost every mammalian cell type is the intercellular communication.

In our study, In pterygium and normal conjunctival tissues of 26 pterygium cases connexin 43 (CX43) gene expression and CX43 protein level were investigated with Real-Time PCR (RT-PCR) and Western Blotting, respectively.

According to our results, there were no statistically significant differences in CX43 gene expression level and protein content between pterygium and normal conjunctiva tissues ($p > 0.05$).

In pterygium, the CX43 gene expression can't a risk factor.

Key Words: Connexin 43, Gene expression, Western Blotting

İÇİNDEKİLER

ETİK SÖZLEŞME.....	i
BEYAN.....	ii
İTHAF.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
ÖZET.....	vi
ABSTRACT.....	vii
İÇİNDEKİLER.....	viii
TABLolar LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xi
KISALTMA ve SİMGE LİSTESİ.....	xii
1.GİRİŞ ve AMAÇ.....	1
2.GENEL BİLGİLER.....	4
2.1.Pterjium Tanımı.....	4
2.2.Etiyolojisi ve Epidemiyolojisi.....	6
2.3.Pterjium Oluşumu ile İlgili Faktörler.....	7
2.3.1.UV Radyasyon.....	7
2.3.2.Viral Enfeksiyonlar.....	13
2.3.3.Kalıtım Modelleri.....	13
2.4.Pterjium Patogenezi ile İlişkili Moleküler Mekanizmalar.....	14
2.4.1.Epigenetik Faktörler.....	15
2.4.2.Hücre Proliferasyon Faktörleri ve Apoptoz.....	16
2.4.3.Anti-Apoptoz.....	18
2.4.4.Tümör Supresör p53 ve İlişkili Proteinler.....	18
2.4.5.İnflamatuar Mediatörler ve Büyüme Faktörleri.....	22
2.4.6.Anjiyogenez ve Lenfanjiyogenez.....	25
2.4.7.İmmünolojik Mekanizmalar.....	26
2.4.8.Kolesterol Metabolizmasındaki Değişiklikler.....	27
2.4.9.Epityal-Mezenkimal Geçiş (EMG/EMT).....	28
2.5.Gap Junctionlar.....	31
2.5.1.Konneksinlerin Moleküler Yapısı ve Konneksin 43 Geni.....	33
2.5.2.Konneksin İfade Çeşitliliği.....	37
2.5.3.Konneksinlerin Biyosentezi.....	38
2.5.4.Konneksinin Yaşam Döngüsü.....	39
2.5.5.Konneksinlerin Hücre Yüzeyine Taşınması.....	41
2.5.6.Konneksin Yıkımı.....	43
2.5.7.Gap Junctionların Stabilesini Düzenleyen Konneksin Bağlayıcı Proteinler.....	43
3.GEREÇ VE YÖNTEM.....	47
3.1.GEREÇ.....	47
3.1.1.Çalışma Grubu.....	47
3.1.2.Dokuların Saklanması.....	47
3.1.3.Çalışmada Kullanılan Alet ve Cihazlar.....	48
3.1.4.Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Kitler.....	49
3.1.5.Tampon ve Çözeltiler.....	51
3.1.5.1. RNA eldesinde kullanılan tampon ve çözeltiler.....	51

3.1.5.2.SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi Tamponları.....	51
3.1.5.3.Western Blot Tamponlar.....	51
3.1.5.4.Gerçek Zamanlı PZR’de Kullanılan Taqman Prob.....	51
3.2.YÖNTEM.....	52
3.2.1.Dokudan RNA İzolasyonu.....	52
3.2.2.RNA Miktarının Ölçümü.....	53
3.2.3.RNA’dan cDNA Sentezi.....	53
3.2.4.cDNA Konsantrasyon Ölçümleri.....	54
3.2.5.Konneksin 43 mRNA İfadesi.....	54
3.2.5.1.Gerçek Zamanlı (Real-Time, RT-PZR) PZR.....	55
3.2.6.Konneksin 43 Geni RT-PZR Sonuçlarının Analizi.....	58
3.2.7.Protein izolasyonu.....	58
3.2.8.Protein Miktarının Ölçümü.....	59
3.2.9.Konneksin 43 Geni Protein Analizi.....	59
3.2.9.1.Protein Örneklerinin Hazırlanması.....	60
3.2.9.2.SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi.....	61
3.2.9.3.Blotma.....	61
3.2.10.Verilerin İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi.....	63
4.BULGULAR.....	64
4.1.CX43 mRNA İfade Analiz Sonuçları.....	65
4.2.Western Blot Analiz Sonuçları.....	69
5.TARTIŞMA.....	71
6.KAYNAKLAR.....	81
ÖZGEÇMİŞ.....	88

TABLolar LİSTESİ

Tablo 3.1	: Gerçek zamanlı PZR’de kullanılan Taqman prob dizisi.....	51
Tablo 3.2	: cDNA sentezinde kullanılan 1. aşama bileşenler ve miktarları.....	53
Tablo 3.3	: cDNA sentezinde kullanılan 2. aşama bileşenler ve miktarları.....	54
Tablo 3.4	: RT-PZR’de kullanılacak tepkime karışımının miktarları.....	57
Tablo 3.5	: RT- PZR protokolü.....	57
Tablo 3.6	: Protein örneklerinin hazırlanmasında kullanılan reaktifler ve miktarları.....	60
Tablo 4.1	: Pterjiumlu hastaların demografik ve klinik özellikleri.....	64
Tablo 4.2	: Pterjium ve normal dokulara ait CX43 ve β -Aktin(Referans Gen) Ct değerleri.....	67
Tablo 4.3	: CX43 ve β -Aktin genlerine ait Ct, Δ ct, $2^{-\Delta\Delta CT}$ ve p değeri.....	68
Tablo 4.4	: CX43 ve GAPDH genlerine ait p değeri.....	69

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1	: Yetişkin insan gözünün yakın eksenel (yakın yatay) bölümü.....	4
Şekil 2.2	: Limbus kornea, yatay kesit (a) ve gözün ön görünümünde (b).....	5
Şekil 2.3	: (A) Pterjium ve (B) Cerrahi sırasında pterjiumun boynunun altından geçen ameliyat aleti	6
Şekil 2.4	: Pterjium gelişiminde birikmiş UV radyasyon maruziyetinin rolü..	8
Şekil 2.5	: Pterjium gelişmesini ile ilgili moleküler faktörler.....	14
Şekil 2.6	: Bir Gap junctionda düzenlenmiş kavşak kompleksleri.....	31
Şekil 2.7	: Gap junctionların yapısı.....	32
Şekil 2.8	: Gap junctionların konneksin montajı.....	35
Şekil 2.9	: CX43'ün kromozom üzerindeki yeri.....	37
Şekil 2.10	: Konneksin yaşam döngüsü.....	39
Şekil 2.11	: CX43'e bağlanan proteinler.....	46
Şekil 3.1	: Pterjium dokusuna ait histopatolojik kesit.....	48
Şekil 3.2	: RT- PZR şeması.....	56
Şekil 4.1	: Çalışmaya dahil edilen pterjiumlu hastaların cinsiyet dağılımı.....	64
Şekil 4.2	: Çalışmada kullanılan pterjium ve normal konjonktiva dokularının alındığı göz.....	65
Şekil 4.3	: Pterjium dokusunda CX43 genine ait RT- PZR görüntüsü.....	66
Şekil 4.4	: Pterjium dokusunda β -Aktin genine ait RT- PZR görüntüsü.....	66
Şekil 4.5	: Konneksin 43 ve β -Aktin genine ait ortalama $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri.....	68
Şekil 4.6	: Pterjium ve konjonktiva dokularına ait membran görüntüsü.....	69
Şekil 4.7	: Dokulardaki CX43 proteinine ait artış azalış oranları.....	70

KISALTMA ve SİMGE LİSTESİ

°C	: Santigrat Derece
µL	: Mikro Litre
4-HHE	: 4-Hidroksiheksenal
4-HNE	: 4-Hidroksinonenal
6-4PPs	: 6-4 Fotoprodüktörleri
8-OHdG	: 8-Hidroksi-2'-Deoksiguanozin
ADP	: Adenozin Di Fosfat
AP-1	: Aktivatör Protein 1
Arg72Pro	: Arjinin Aminoasitinin Prolin Aminoasitine Dönüşümüne
a-Sma	: A-Düz Kas Aktini
ATP	: Adenozin Tri Fosfat
BaP	: Benzo (A) Piren
bFGF	: Temel Fibroblast Büyüme Faktörü
BMSC	: Lösemide Kemik İliği Stromal Hücreleri
BPDE	: Bap 7,8-Diol 9,10-Epoksit
CAM	: Hücre-Hücre Yapışma Molekülleri
cAMP	: Siklik Adenozin Monofosfat
cdc2 kinaz	: Siklin Bağımlı Kinaz
cDNA	: Tamamlayıcı DNA
c-Fos	: Fos Proto-Onkogen
CIP85 (SGSM3)	: Küçük G Protein Sinyali Modülatör 3
c-Jun	: Jun Proto-Onkogen
CMV	: Sitomegalovirüs
COX-2	: Siklooksigenaz-2
CPD	: Siklobütan Pirimidin Dimerleri
CTGF	: Bağ Dokusu Büyüme Faktörü
CX43	: Konneksin 43
CXCR-4	: Stromal Türevli Faktörün Reseptörünün
CYP1A1	: Sitokrom P450 Ailesi 1A1
dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
DNMT3b	: DNA Metiltransferaz 3b
Dsh proteini	: Dishevelled Proteinin
E-kaderinin	: Epitelyal Kaderin
EMT	: Epitelyal Mezenkimal Geçiş
ER	: Endoplazmik Retikulum
ERAD	: Endoplazmik Retikulum İlişkili Protein Yıkımı (ERAD)
ERGIC	: ER-Golgi Ara Bölmesi
Ets	: Eritroblast Transformasyon-Spesifik Transkripsiyon Faktörleri Ailesi
FGF	: Fibroblast Büyüme Faktörleri
GAPDH	: Gliseraldehit-3-Fosfat Dehidrogenaz
GJA1	: Gap Junction Protein Alfa 1
GJIC	: Gap Junction Hücrelerarası İletişim
GPx	: Glutasyon Peroksidaz

HB-EGF	: Heparin Bağlayıcı Epidermal Büyüme Faktörü
HLA-DR	: İnsan Lökosit Antijeni-Dr
hOGG1	: İnsan 8-Oxoguanin Glikolaz I
HPV	: İnsan Papilloma Virüsü
Hsp (90)	: Isı Şok Proteinleri (90)
HSV	: Herpes Simpleks Virüs
hUCSC	: İnsan Göbek Kordonu Kök Hücreleri
ICAM-1	: İnterselüler (Hücreiçi) Adezyon Molekülü-1
Ig	: İmmüoglobulin
IGFBP-2	: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü Bağlama Proteini-2'de
IL-1,6,8	: İnterlökin 1,6,8
InsP3	: İnositol 1,4,5-Trisfosfat
iNOS	: İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz
JNK	: C-Jun N-Terminal Kinase
kDa	: Kilodalton
ki67	: Çoğalma Belirteci Ki-67
LEF	: Lenfoid Arttırıcı Faktör
LOH	: Heterozigotluk Kaybı
LSC	: Limbal Kök Hücrelerinin
MAP	: Mitojen-Aktive Protein Kinazların
MAPK	: Mitojen İle Aktive Protein Kinaz
MBG	: Minör Groove Bağlama
MDA	: Malondialdehitte
MI	: Mikrosatellit İnstabilitesi
ml	: Mililitre
MMP	: Matriks Metaloproteinazları
NF-kb	: Nükleer Faktör Kb
ng	: Nanogram
NOV	: Nefroblastom Aşırı İfade
NSCLC	: Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanseri
OCP2	: Corti Protein 2 Organı
PCNA	: Çoğalma Hücreleri Nükleer Antijeni
PDGF	: Trombosit Türevli Büyüme Faktörü
PDGF	: Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü
PEDF	: Pigment Epitelinde Türetilmiş Faktörde
PUFA	: Reaktif Aldehitler
RNA	: Ribonükleik Asit
ROS	: Reaktif Oksijen Türlerinin
rpm	: Dakikadaki Devir Sayısı
RT-PZR	: Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
S100	: S100 Kalsiyum Bağlama Proteini
SAT1	: N1-Asetiltransferaz 1
SDF-1	: Stromal Türevli Faktörü
Ser326Cys	: Serin 326 Sistein
sn	: Saniye
SNP	: Tek Nükleotid Polimorfizmi
SOD	: Süperosit Dismutas Katalaz
Src	: Proto-Onkogen Tirozin-Protein Kinaz

SSPS	: Sosyal Bilimler İçin İstatistik Paketi
TCF	: T Hücre Faktörü
TGF-b	: Transforme Edici Büyüme Faktörü-Beta
TGFβ	: Dönüştürücü Büyüme Faktörü Beta 1
TGM2	: Transglutaminaz-2
TGN	: Trans-Golgi Ağı
TIMPs	: Mmps İnhibitörlerinin
TNFa	: Tümör Nekroz Faktör Alfa
Tsp-1	: Trombospondin-1
µg	: Mikrogram
uPA	: Plazminojen Aktivatörü
UV	: Ultraviyole
V	: Volt
VCAM-1	: Vasküler Hücresel Adezyon Molekülü 1
VEGF	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
Wnt	: Wnt Gen Ailesi
ZEB1 / ZEB2	: Zeb Transkripsiyon Faktörlerinin
ZO-1	: Zonula Occludens 1
β-katenin	: Beta Katenin
B-Aktin(β -act)	: Beta Aktin

1.GİRİŞ ve AMAÇ

Pterjium; inflamasyon, anjiyojenez ve hücre proliferasyonu ile karakterize sık görülen oküler yüzey lezyonudur. Kornea üzerinden konjonktivanın kanat şeklinde fibrovasküler büyümesiyle oluşmaktadır (Kase ve ark., 2007; Anguria ve ark., 2014). Pterjium erkeklerde kadınlardan iki kat daha sık görülmektedir. İki üç kuşak boyunca geçiş gösteren pterjiumda, düşük penetrasyonlu otozomal dominant kalıtım gösteren vakalar tanımlanmıştır (Anguria ve ark., 2014).

Epidemiyolojik çalışmalar; pterjiumun insidansının güneş ışığına maruz kalma (ultraviyole radyasyon) ile ilişkili ve iyi huylu bir tümör olabileceğini göstermektedir. UV radyasyonu, normal büyüme kontrolünde kayıp ile DNA hasarlı hücrelerde karsinojenik etki göstermektedir (Kato ve ark., 2007; Maxia ve ark., 2008). Çeşitli çalışmalar sonucunda pterjium ile UV ışığı arasındaki önemli ilişkiyi destekler nitelikte veriler elde edilmiştir. Işığın gözün ön bölgesinde 20 kat daha yoğun kırılması ile özellikle nasal yönde pterjium gelişebilmektedir. UV ışığın, etiyolojik olarak melonama ve bazal hücreli karsinoma ile de ilişkili olduğu bilinmektedir. UV ışığın bu mekanizmasında, sitokinler ve büyüme faktörlerinin de rol oynayabileceği güncel çalışmalar ile desteklenmiştir (Nolan ve ark., 2003).

Pterjiumun patogenezi tam olarak bilinmemesine rağmen, pterjial epitelyum hücrelerinin (PECs) çoğalması ve apoptoz arasındaki dengenin değiştirilmiş olduğuna inanılmakla birlikte; anti-apoptotik mekanizmalar, sitokinler, anjiyogenetik faktörler, immünolojik mekanizmalar, viral enfeksiyonlar, hücre dışı matrikstekki bozukluklar, p53 ve tümör baskılayıcı genler hastalık ile ilişkili faktörler arasındadır (Kato ve ark., 2007; Maxia ve ark., 2008; Engelsvold ve ark., 2013). Ayrıca pterjiumun patogenezinde

epitelyal mezenkimal geçiş (EMT) hücresleri de rol oynamaktadır. EMT'ler, iyileşme ve doku yenileme gibi her iki gelişme sürecinde de kritik öneme sahiptir. Tümör metastazı ve epitel hücresleri arasındaki hücre-hücre temasını kaybederek, mezenkimal özellikleri kazanması sırasında meydana gelen olayların geri dönüşümü ile ilgilidir (Engelsvold ve ark., 2013). Ayrıca son zamanlarda hücre döngüsü ile ilişkili moleküllerin pterjium epitel hücrelerindeki proliferasyonda potansiyel rol oynayabileceğini gösteren çalışmalar da mevcuttur. Bu veriler ışığında pterjium dokusunda hücre proliferasyonu ve adezyon moleküllerinin çalışılması önemlidir. Doku yapısını koruyan kaderin, hücre-hücre adezyon molekülleri (CAM), selektin ve integrin dahil olmak üzere birçok adezyon molekülü vardır. Bir transmembran protein olan E-kaderin, organ morfogenezinde, doku oluşumunda ve embriyogenez sırasında rol oynamaktadır. Birçok alışma, E-kaderin ilişkili protein ifadesinin birçok tümörde ve pterjiumda azaldığını ortaya koymuştur. Bu durum E-kaderinin hem tümör metastazı hem de prognozda bir belirteç olabileceğini göstermektedir. Ayrıca birçok çalışmada da, E-kaderinin; akciğer ve kolorektal kanser gibi pek çok kanserde ve pterjiumda ifadesinin azaldığı ortaya konulmaktadır (Kase ve ark., 2007; Young ve ark., 2010; Ismail ve ark., 2014).

Konneksinler, gap junctionların ara membran kanalı homolog proteinlerinin bir grubudur. Ayrıca bunlar hem yüksek olarak korunmuş hem de son derece farklı tanımlanmış bir gen ailesinin üyesidirler. Gap junctionların fonksiyonel özelliklerinin genişliği çalışmalara katkı sağlamaktadır. Anormal konneksin ifade ve dağılımı tümör oluşumu ile ilgilidir. Konneksin genleri tümör büyümesini inhibe edebilmekte ve tümör hücrelerinin normal büyüme özelliğini geri kazandıracak şekilde hücrelerarası haberleşmeyi düzenlemektedirler. Bu durum konneksin genlerinin tümör baskılayıcı bir ailenin üyesi olduğu görüşünü desteklemektedir (Zhao ve ark., 2013).

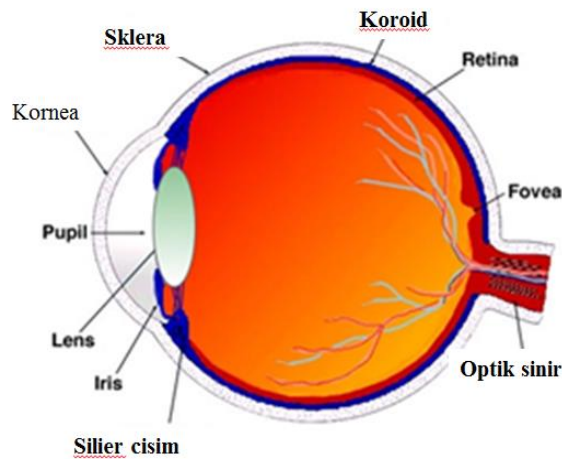
Konneksinler, neredeyse tüm memeli hücre tiplerinde görülür ve bu proteinlerin adlandırılmaları ağırlıklarına (kilodalton, (KDa) denk gelen sayılar yanlarına yazılarak yapılmaktadır. Örneğin doku ve organlarda en fazla rastlanılan konneksin 43 (Cx43) 43 kilodaltona karşılık gelir. Konneksin-43 hücre döngüsünün düzenlenmesinde oldukça önemlidir. Bu da tıpkı E-kaderin gibi kanserde ifadesinin baskılanması ya da fonksiyon bozukluğunun olması ile ilişkilendirilmektedir. Ayrıca E-kaderin'in konneksin 43 ifadesini ve fonksiyonunu düzenleyebileceği de belirtilmiştir (Xu ve ark., 2008; Tuzcu ve ark., 2010; Ismail ve ark., 2014).

Literatürde, pterjiumla bağlantılı olabileceği düşünülen proteinlerle ilgili gen ifade analizi çalışmaları sınırlı sayıda bulunmaktadır. Ancak, pterjiumda CX43 gen ifadesinin ve protein düzeyinin araştırıldığı herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmada; pterjium tanısı almış 26 hastanın pterjium ve normal konjonktiva dokularında tümör supressör bir gen olduğu son çalışmalarla desteklenen Konneksin 43 (CX43)'ün gen ifade düzeyi ve protein miktarı arasındaki olası ilişkinin belirlenmesiyle hastalığın patogeneze katkı sağlamayı amaçlıyoruz. Bu sonuçların, literatürdeki boşluğu dolduracağı ve sonraki çalışmalara ışık tutacağı kanaatindeyiz.

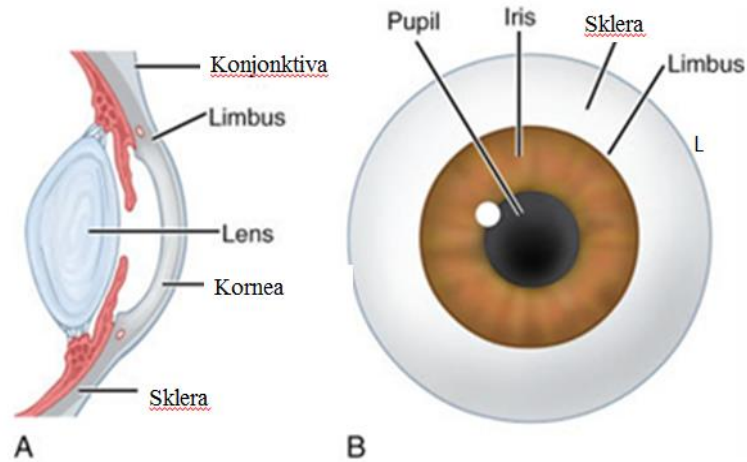
2.GENEL BİLGİLER

2.1.Pterjium Tanımı

Pterjium, yüzyıllar önce Hipokrat, Galen, Celcus tarafından açıklanmış olmasına rağmen genel anlamda ilk kez Winter tarafından 1876'da tanımlanmıştır. Yunanca'da ptergion, kanat anlamına gelmektedir. Pterjium, konjonktivaya bitişik oküler yüzey üzerindeki bir epitelyal ve fibrovasküler konfigürasyonu temsil eden bulber konjonktivanın kanserli olmayan benign büyümesiyle karakterize bir lezyondur. Doku, görme kaybına neden olan kanat benzeri bir şekil oluşturarak kornea merkezine doğru ilerler ve korneayı istila eder. Pterjium patolojik olarak da, proliferatif, invaziv ve vaskülarize bir dokudur. Ayrıca, pterjiyal dokuda, tümör fenotipinin özelliklerinden biri olan transforme hücreler vardır. Pterjiyal epitelde proliferasyon aktivitesinin normal konjonktiva ile karşılaştırıldığında yüksek olduğu teyit edilmiştir (Şekil 2.1; 2.2) (Aslankurt ve ark., 2003; Kase ve ark., 2007; Kato ve ark., 2007; Ando ve ark., 2011).



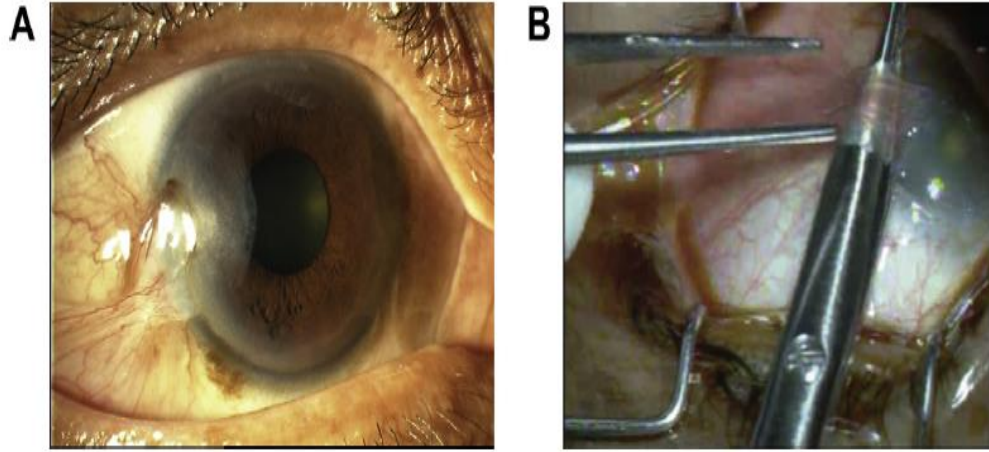
Şekil 2.1: Yetişkin insan gözünün yakın eksenel (yakın yatay) bölümü.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK11534/>



Şekil 2.2: Limbus kornea, yatay kesit (A) ve gözün ön görünümünde (B).
https://medicine.academic.ru/137051/limbus_corneae

Hastalığın ilerlemesi ilk önce gri sınırlandırılmış noktaların oluşumu ile başlamaktadır ve bu oluşumu daha sonra kornea merkezine doğru ilerleme izler. Kornea merkezine ilerleyen pterjium epiteli skuamöz metaplazi ve goblet hücre hiperplazisi göstermektedir. Fibroblastların ve kan dolaşımının stromal olarak büyümesine, inflamatuvar hücre infiltratı, elastin ve kollajenden oluşan anormal bir hücre dışı matriks birikimi eşlik etmektedir. Kornea şeffaf alanının aksine, görülen gergin konjonktiva ile birlikte limbusa yakın korneada deri katlanmaktadır. Daha sonra, bulber konjonktivanın etli büyümesi kanat şeklindeki uzantıyla korneaya ulaşmaktadır ve tam gelişmiş bir pterjium, baş, vücut ve boyun kısımlarından oluşmaktadır (Di Girolamo ve ark., 2004; Kase ve ark., 2007; Kato ve ark., 2007; Ando ve ark., 2011; Chui ve ark., 2011; Liu ve ark., 2013; Tong ve ark., 2013; Cárdenas-Cantú ve ark., 2016). Doku büyüyüp, görme alanını etki etmeye başlayınca cerrahi olarak çıkarılması gerekmektedir. Ancak bu süreç daha sonra tekrarlayabilmektedir. İlginç olan, pterjium başının veya tepesinin korneaya sıkıca bağlı olmasına karşılık proksimalde pterjium dokusunun altında bulunan dokuya

yapışık olmamasıdır. Bu durum da, ameliyat esnasında kolaylık sağlamaktadır (Şekil 2.3) (Kato ve ark., 2007; Tong ve ark., 2013).



Şekil 2.3: (A) Pterjium ve (B) Cerrahi sırasında pterjiumun boynunun altından geçen ameliyat aleti (Tong ve ark., 2013)

2.2.Etiyolojisi ve Epidemiyolojisi

Pterjiumun etiyolojisi kesin olarak bilinmemektedir. Genellikle, ekvatora yakın bölgelerde yaşayan populasyonlarda yaygın olarak görülmekte ve genel popülasyonun yaklaşık % 22'sinin pterjium olduğu tahmin edilmektedir. Epidemiyolojik çalışmalar, pterjium gelişiminde çevresel faktörlerin etkili olduğunu göstermektedir. Hatta, güneş ışığındaki ultraviyole radyasyonunun (UV), pterjium gelişiminde en büyük çevresel faktör olduğu düşünülmektedir. Pterjium, çoğunlukla güneş ışığına maruz kalan bireyleri etkilemesi ve bu durumun, erkeklerde kadınlara oranla 2 kat fazla olma ihtimalinin erkeklerin daha fazla güneş ışığına maruz kalmasından kaynaklanabileceğini göstermektedir (Liu ve ark., 2013; Cárdenas-Cantú ve ark., 2016). Kum, rüzgar ve insan papilloma virüsü (HPV) enfeksiyonu gibi çevresel faktörler de pterjium gelişiminde rol

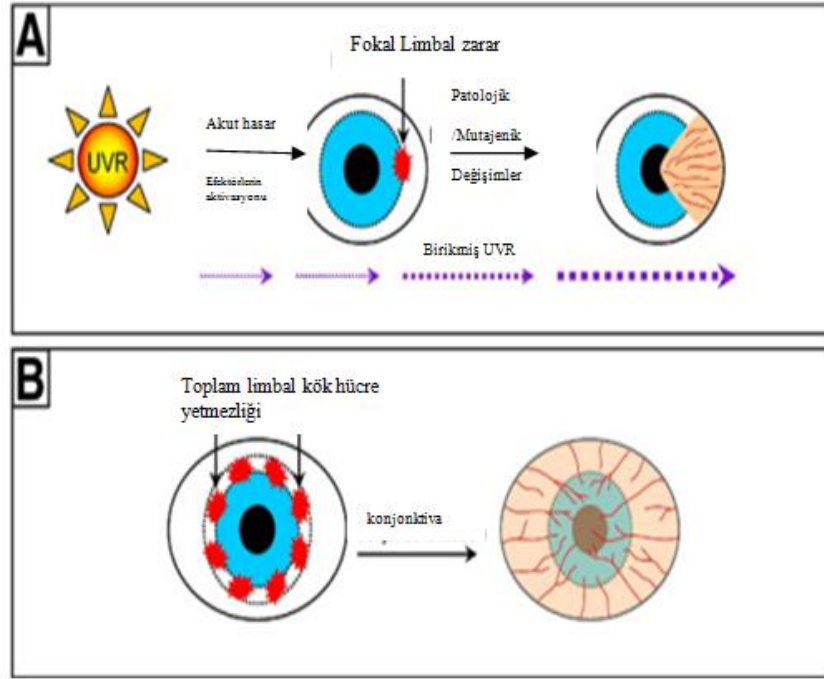
oynayabilmektedir. Öte yandan, ailevi pterjium oluşumları, genetik faktörlerin pterjium patogeneziyle bütünleştiğini göstermektedir. Tüm bu bilgiler ışığında, pterjium etiyojisi hala bir sır olarak kalmaktadır. Son yıllarda, hastaların doku örneklerinin moleküler analiz teknikleri kullanarak araştırılması ile pterjium patogenezinde önemli gelişmeler elde edilmeye başlanmıştır (Liu ve ark., 2013).

2.3.Pterjium Oluşumu ile İlgili Faktörler

2.3.1.UV Radyasyon

Ultraviyole (UV) ışınları pterjium oluşumuyla bağlantılıdır ve güneşe maruz kalma ile pterjium yaygınlığı arasında açık bir ilişki olduğu gözlemlenmektedir (Cárdenas-Cantú ve ark., 2016). Coroneo ve ark., tarafından yapılan bir çalışmada, UV aracılı limbal hasarın pterjium patogenezinde tetikleyici bir rol oynadığı ve bu epidemiyolojik verilerin pterjium ile güneş ışığına maruz kalma arasında pozitif bir bağlantıya sebep olduğunu göstermektedir (Coroneo ve ark., 1999). Pterjiumun yeri, güneş ışığının medial limbus üzerinde korneaya ulaşması ile açıklanabilir. Bu odaklanma etkisinin distal limbusta en az 20 kat daha fazla ışık oluşturduğu tahmin edilmektedir. Bu ışık, epitel hücrelere arkadan vurduğundan ve korneanın daha yüzeysel katmanları tarafından korunmadığı için de zararlı olabilir. Odaklanmanın bu etkisiyle limbustaki hücrelerin harekete geçirebileceği düşünülmektedir. Ek olarak limbal kök hücrelerinin (LSC), sitokeratin profili ve vimentin ekspresyonu (ifadesi) ile benzer özelliklere sahip oldukları için pterjium oluşturduğu da düşünülmektedir (Şekil 2.4). Pterjiumun histolojik kesitleri konjonktival bölgede sıklıkla elastik dejenerasyona neden olabilmektedir. Değişiklikler arasında epidermal çoğalma, inflamatuvar infiltrat, aktive

olmuş fibroblastlar, ekstrasellüler matriks değişiklikleri, örneğin elastin birikimi, glikozaminoglikanlar ve değiştirilmiş kollajen döngüsü de sayılabilmektedir (Coroneo ve ark., 1999; Di Girolamo ve ark., 2004).



Şekil 2.4: Pterijum gelişiminde birikmiş UV radyasyon maruziyetinin rolü.

A: UV radyasyonu kaynaklı fokal limbal hasar, değiştirilmiş LSC'lerin merkezi korneaya doğru göçünü tetiklemektedir.

B: Toplam LSC eksikliğinde, limbal niş hasarında veya kök hücre rezervlerinin tükenmesi, korneanın her yönden konjonktivalizasyonu ile sonuçlanmaktadır (Chui ve ark., 2011).

UV radyasyonunun hücelere zarar verme potansiyeline sahip olduğunu gösteren iki mekanizma üzerinde durulmaktadır. Bunlardan; ilki hücresel DNA üzerinde fototoksik etki; ikincisi ise; hücresel DNA, protein ve lipitlere zarar veren Reaktif Oksijen türlerinin (ROS) üretimi şeklindedir. UV radyasyonun küçük dalga boyları (300

nm altında) biyolojik açıdan en aktif formdur ve çoğunlukla kornea tarafından absorbe edildiği bilinmektedir (Cárdenas-Cantú ve ark., 2016).

280-315 nm arasında değişen UV-B radyasyon dalga boyları, oküler yüzeyi etkiler ve doğrudan UV'ye maruz kalma düzeyi ile ilişkili olabilmektedir. UV radyasyonun pterjiüma neden olan kesin moleküler mekanizma olduğunun üzerinde durulmaktadır. Ancak, bu konuyla ilgili araştırmalar devam etmekte ve çeşitli alternatifler önerilmektedir (Cárdenas-Cantú ve ark., 2016). UV-B ışınımı, oksidatif strese neden olma kapasitesinden dolayı pterjiüm oluşumundan sorumlu ana faktör olarak düşünülmektedir. Yüksek mutajenik potansiyele sahip, oksidatif stresin yaygın bulunan markırı, 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OHdG) molekülü, primer pterjiümün baş epitelinde ortalama olarak sağlıklı konjonktivanınkinden yaklaşık 4.7 kat yüksek olduğu bulunmuştur (Cárdenas-Cantú ve ark., 2016). Antioksidan fonksiyonuna ek olarak, bu molekölün üretilmesi oksidatif stres kaynaklı iltihaba karşı hücrelerin savunma mekanizmasından biri olabilmektedir. Hücresel DNA'da 8-OHdG'nin varlığı, pterjiüm dokusunda aşırı eksprese edildiği bilinen hOGG1 (insan 8-oxoguanin glikolaz I) enzimi ile azaltılabilir. 8-OHdG'nin artışı hOGG1'in ifadesindeki azalma ile ilişkili olmadığından, bu enzimin aktivite kaybını açıklayabilecek modifikasyonlara geçip geçmediğini belirleyebilmek için daha ileri analizler yapılmıştır. hOGG1 geninin ekzon 7'sinde 1245 nükleotid pozisyonundaki C'nin G'ye geçişinin Ser326Cys amino asit yer değiştirmesi ile sonuçlanması ve bu polimorfizme sahip hastaların pterjiüm oluşumuna daha duyarlı olduklarını göstermektedir. Ancak, bu bulgular da hala tartışılmaktadır (Kau ve ark., 2004; Kau ve ark., 2006; Cárdenas-Cantú ve ark., 2016). Örneğin, Chen ve ark., yapmış oldukları bir çalışmada bu polimorfizm ve pterjiüm gelişimi arasında bir bağlantı bulamamışlardır (Chen ve ark., 2010).

Oksidatif stres aynı zamanda yağlar ve proteinlerdeki değişimlerden de sorumludur. UV-B radyasyonun bir sonucu olarak oluşan ROS, hücrel membranda lipid peroksidasyonuna sebep olma potansiyeline sahiptir. Böylece çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA'lar), reaktif aldehytler (4-hidroksiheksenal (4-HHE) ve 4-hidroksinonenal (4-HNE)) de dahil olmak üzere çeşitli bileşikler halinde dejenerasyonu teşvik etmektedirler. Bu moleküller, pterjiumun ön kısmında kornea göçünün meydana geldiği baş kısmı ve subepitelyal bağ dokularının aktif proliferasyonunun gerçekleştiği kısımda dahil olmak üzere, pterjium dokuları arasında artmış seviyelerde bulunmuşlardır. 4-HHE ve 4-HNE, histidin, sistein ve lizin artıklarıyla reaksiyona girerek proteinleri değiştirme ve onların normal fonksiyonlarını da etkileme potansiyeline sahiptirler. Bu protein modifikasyonlarının, normal konjonktivaya karşı pterjium dokusunda önemli olduğu bulunmuştur. Aynı zamanda, UV-B radyasyonunun sebep olduğu lipid peroksidasyonun bir diğer belirteci olan Malondialdehitte (MDA) önemli artış, süperoksit dismutaz (SOD) katalaz ve glutatyon peroksidaz (GPx) gibi antioksidan enzim aktivitelerinin pterjium dokularında azalması ve DNA hasarına sebep olan ROS birikimine neden olduğu gözlemlenmiştir (Cárdenas-Cantú ve ark., 2016). Bununla birlikte bir başka çalışmada, peroksit ve oksijeni düşüren antioksidan bir enzim olan peroxiredoxin 2 enziminin, pterjium epitelinde aşırı miktarda artmış olduğu bulunmuştur. Bu aşırı miktar artışı, peroksit ile indüklenen apoptoz inhibisyonu ile ilişkilendirilmiştir. Analizin bu sonucu, yalnızca peroksit ve hidroperoksiti düşük seviyelerde tutulduğu için, pterjiumda belirli ROS'a karşı seçicilik oluşturabileceğini göstermektedir (Bautista-de Lucio ve ark., 2013).

Ayrıca, pterjium epitelinde protein katlanma ve parçalanmasına katılan şaperon bir protein olan Hsp90'nın aşırı ifade edildiği bildirilmiştir. Hsp90, tümör büyümesi için

gerekli olan anjiyogenez için önemli vasküler endotelial büyüme faktörünün (VEGF) indüksiyonu için gerekli olabilmektedir. Hsp90 aşırı ifadesinin, oksidatif strese kaynaklanan modifiye protein artışına karşı doğal hücrel yanıtın bir sonucu olduğu düşünülmektedir (Sebastiá ve ark., 2013).

UV radyasyonun fototoksik etkileri aynı zamanda doğrudan DNA'ya zarar verebilmektedir. Cimpean ve ark., primer pterijum fibroblast, endotel hücreler ve tekrarlayan pterijum fibroblastlarında timin dimerlerini incelemiştir. Birincil pterijumdan alınan epitelin bazal kısmında daha yüksek miktarda timin dimerleri bulunan hücre yığınları bulmuşlardır. UV ışınımı ile modifiye edilen bazal epitel hücrelerinin, insan pterijum ile ilişkisinden sorumlu olabileceği düşünülmektedir (Cimpean ve ark., 2013; Cárdenas-Cantú ve ark., 2016).

Bununla birlikte, tekrarlayan pterijumda, kusurlu bir DNA tamir mekanizmasına bağlı olarak bazal hücre miktarlarının azaldığı, bunun da, timin dimer varlığının bir sonucu olarak daha yüksek bir mutasyon oranının meydana gelmesine izin verdiğini göstermektedir. Ayrıca UV-B radyasyonunun doğrudan DNA tarafından absorbe edilmesi, iki tip heliks-diziliş fotolüsyonu üretir: Siklobütan pirimidin dimerleri (CPD'ler) ve 6-4 fotoprodüktörleri (6-4PPs). DNA replikasyonu sırasında C'nin T'ye ve CC'den TT'ye dönüşmesine sebep olan bitişik primidinler arasında oluşur. İki durumdan, CPD'ler, memeli hücrelerinin UV-B ışınlanmasıyla üretilen mutasyonların yarısından fazlasında ilişkilidir ve sadece UV ışığına maruz kaldıktan sonra gözün ön bölmelerinin yapısında bulunurlar. Bu DNA lezyonları transkripsiyon ve replikasyon gibi temel hücrel metabolik süreçlerini etkileyebilirler (Cárdenas-Cantú ve ark., 2016).

Epidermal keratinositler, erken safhalarda akut UV-B'ye yanıt olarak aktive edilirken, ara aşamada, kemokinler, sitokinler ve büyüme faktörleri gibi salgılanan proteinler indüklenirler. Bu proteinlerin varlığı inflamatuvar hücrelerin akınına tahrip eder. Daha sonra, keratinositlerin terminal farklılaşması meydana gelir ve hasar gören hücreleri ortadan kaldırır. UV ayrıca aktin hücre iskeleti montajını etkiler ve adherans moleküllerinin regülasyonunu azaltır ve keratinosit hareketini kolaylaştırır. Son zamanlarda, UV ışınlanması ile aktive edilen moleküler yolların bazıları, mitojen-aktive protein (MAP) kinazların indüksiyonu ve c-Jun, c-Fos ve AP-1 transkripsiyon faktörlerinin aşağı akış aktivasyonu da dahil olmak üzere aydınlatılmıştır. Benzer olaylar pterjiumda da görülmektedir (Di Girolamo ve ark., 2004; Cárdenas-Cantú ve ark., 2016).

Tüm bunların yanında; UV-A'nın da pterjium üzerine etkileri ele alınmıştır. Kornea UV-A'nın % 45'ini absorbe etmektedir (Cárdenas-Cantú ve ark., 2016). Chao ve ark.'larının yapmış oldukları bir çalışmada kültür pterjium fibroblastlarında UV-A'nın etkileri araştırılmıştır. Urokinaz tipi plazminojen aktivatörü (uPA), doku yeniden biçimlendirme ve hücre göçünde rol oynayan bir proteaz olup, pterjiumda seviyeleri artmaktadır. UV-A ışınlanması, pterjium fibroblastlarında uPA mRNA düzeylerini ve kültür ortamında uPA aktivitelerini arttırdığı; buna, fosforile ERK ve JNK'da bir artış da eşlik etmektedir. ERK ve JNK inhibitörleri UV-A ile indüklenen uPA ifadesi pterjium fibroblastları ile anlamlı şekilde azalmaktadır. Normal konjonktival fibroblastlar pterjium fibroblastlarına kıyasla UV-A ışınlamaya karşı daha az duyarlı olduğu düşünülmektedir (Chao ve ark., 2013). Ayrıca UV-A, Matriks metaloproteinazları (MMP'leri) etkinleştirebilir ve doku bozunumu ile tümör hücresi istilasından da sorumlu olabilmektedir. Pterjium hücreleriyle yapılan çalışmalar arasında hem epitelyal hem de

stromal fibroblastların MMP-1 ve MMP-2'nin bağ dokusu bozunması ve yeniden şekillendirilmesi ile ilgili molekülleri ifade ettiği gösterilmiştir (Cárdenas-Cantú ve ark., 2016).

2.3.2. Viral Enfeksiyonlar

Pterjium oluşumu, çevresel faktörler, genetik yatkınlık ve viral enfeksiyonlarla ilişkili çok basamaklı süreçleri içermektedir. Bu durum, pterjium örneklerinde insan papilloma virüs (HPV), sitomegalovirüs (CMV) ve herpes simpleks virüs (HSV) de dahil olmak üzere çeşitli onkogenik virüslerin saptanması ile desteklenmiştir. HPV virüsü, p53'ü inaktive eden proteinleri kodlar, kromozomal istikrarsızlığa yol açar ve maligniteye doğru hücrenin çoğalma olasılığını artırır. Önceki çalışmalarda, pterjium patogeneğinde virüslerin etkisi araştırılmıştır. Bu raporlardan HPV'nin pterjiumda en sık görülen virüs olduğu ve prevalans hızlarının çok düşükten %100'e kadar değiştiği sonucuna varılmıştır. Buna göre, pterjium örneklerinde HPV'in düşük prevalansı, Japon % 4.8 ve Ekvatora yakın bölgelerde % 21 iken; yüksek prevalansı, İtalya % 100, Brezilya % 58.3 ve İngiliz hastalarda ise % 50 olarak rapor edilmiştir. Prevalans oranlarındaki farklılıklar etnik ve coğrafi faktörlerin yanı sıra, kullanılan laboratuvar teknikleri ve çalışma yöntemlerindeki farklılıklardan da kaynaklanabildiği düşünülmektedir (Piras ve ark., 2003; Cárdenas-Cantú ve ark., 2016).

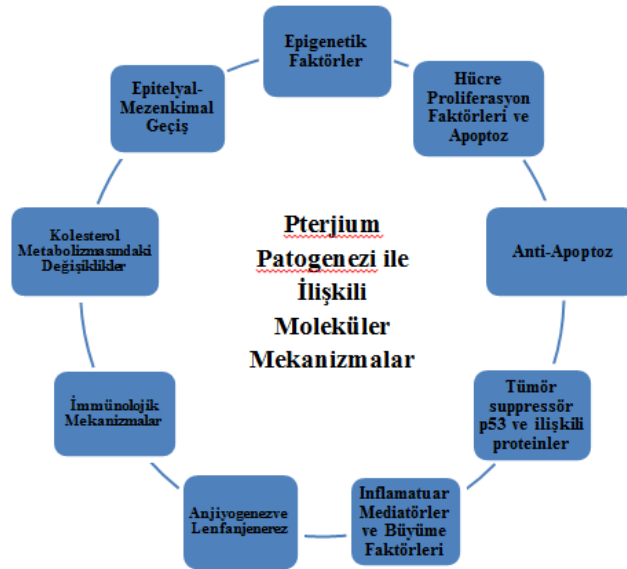
2.3.3. Kalıtım Modelleri

Pterjium gelişiminde kalıtsal yatkınlığın rolü olduğu da kabul edilmekle birlikte, yapılan çalışmalar oldukça sınırlıdır. Bu sınırlı sayıda aile çalışmalarına dayanılarak kalıtım modeli otozomal dominant olarak bildirilmiştir. Ancak güvenilirliğini artırmak için daha büyük grup örnekleme ile çalışılması gerektiği düşünülmektedir. Bununla

birlikte, otozomal resesif geçiş modu da mümkün olabilir. Pterjium hastalarının etkilenmeyen bireylerle karşılaştırılması veya kaç pedigri veya hasta dikkate alınması gerektiğini saptamak zordur. Daha ileri çalışmalarla, kalıtım bilgisinin araştırılması, pterjium gelişiminin muhtemel mekanizmasının belirlenmesini kolaylaştıracadı düşünülmektedir (Anguria ve ark., 2014).

2.4.Pterjium Patogenezi ile İlişkili Moleküler Mekanizmalar

Pterjium patogenezi ile ilişkili olduğu düşünülen birçok faktör vardır. Bunların arasında; epigenetik faktörler, hücre proliferasyon faktörleri, inflamasyon modlatrleri, büyüme faktörleri, ekstraseller matris modlatrleri, anjiogenik ve lenfanjiyonik faktörler, immünolojik mekanizmalar, epitelyal-mezenkimal geçiş ve kolesterol mekanizmasındaki değişimler vardır (şekil 2.5) (Crdenas-Cant ve ark., 2016).



şekil 2.5: Pterjium gelişmesi ile ilgili moleküler faktörler

(Crdenas-Cant ve ark., 2016).

2.4.1.Epigenetik Faktörler

Pterjium, hücre proliferasyonu, invazyon ve rezeksiyon sonrası tekrarlama gibi özellikleriyle kansere benzerlik göstermektedir. Proliferatif aktivitenin artması ile ilişkili proteinler (ki67, çoğalan hücre nükleer antijeni (PCNA) ve eritroprotein), düşük hücre apoptoz (Bcl-2 ve p53) ve malignite (Hsp90) sağlıklı konjonktiva ile karşılaştırıldığında pterjiumun, epitel hücre yüzeyinde aşırı derecede eksprese olduğu bulunmuştur. Bu proteinlerin farklı kanser tiplerinde arttığı ve bir tümörün proliferatif aktivitesinin değerlendirilmesinde kullanıldığı düşünülmektedir (Tan ve ark., 2000; Sebastia ve ark., 2013; Cárdenas-Cantú ve ark., 2016). Birçok araştırmacı, p53'ün anormal ifadesini veya mutasyonunu, tümör baskılayıcı özelliklere sahip bir DNA bağlama proteini ve çoğalma markır ki67'nin artmış ifadesi ile ilişkilendirilmiştir (Kato ve ark., 2007). DNA metilasyon modellerindeki değişimler pek çok kanser tipinde görülmektedir. Kanser ve pterjium arasında var olan benzerlikten dolayı, pterjiumun metilasyon modelleri ile ilgili de bazı çalışmalar yapılmıştır. Matriks yeniden yapılanma ve hücre adezyonu ile ilişkili genlerin anormal metilasyonu ve tümör supressör gen ekspresyonları pterjium oluşumuyla ilişkilidirler. Bu epigenetik modifikasyonlar, pterjiumun patogenezi ile ilişkili önemli genlerin baskılanması veya kontrolsüz ifadesine sebep olan DNA mutasyonlarına alternatif olabilmektedirler. UV radyasyonuna neden olan oksidatif stresin, bu anormal metilasyon kalıplarından sorumlu olabileceği de düşünülmektedir (Riau ve ark., 2011; Cárdenas-Cantú ve ark., 2016).

2.4.2.Hücre Proliferasyon Faktörleri ve Apoptoz

Bazal epitel hücrelerinin artmış proliferasyon oranları ve apoptoz ile ilişkili olan moleküler markırlar da pterjium oluşumunda anahtar rol oynamaktadır. Biyolojik süreçleri modüle etmek için diğer proteinlerle etkileşen dimerik kalsiyum bağlayıcı S100 protein ailesinin de pterjium patogenezi ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Oküler yüzey üzerinde, yapısal proteinler, transkripsiyon faktörleri ve immün modülatörlere S100 proteininin bağlanması bağışıklık hücrelerinin kornea bazal membranlar üzerindeki göçünü etkilemektedir. Aynı zamanda bu etkileşim, matriks metalloproteinazların (MMPs) ekspresyonunu da indükleyebilmektedir. İmmün saptama ile ilgili önceki çalışmalarda, insan pterjium epitel örneklerinde S100A6, S100A8, S100A9 ve S100A11 proteinlerindeki artış, normal konjonktiva ile ilişkili olarak belirlenmektedir. Pterjium numunesi ile yapılan bir çalışmada, Poliamin metabolizmasında hız sınırlayıcı enzim olan N1-asetiltransferaz 1 (SAT1); MMP-9 aktivitesinin uyarılmasında rol oynayan anneksin A2; ve hücre göçünün kontrolünde yer alan S100A9 proteini gibi birkaç proteinin yüksek ekspresyona sahip olduğu bildirilmektedir. Bu çalışmada, pterjium gövdesinin ön kenarında SAT1 ve S100A9'un mevcut olduğu immünofloresans analiz ile gösterilmiştir (Hou ve ark., 2014). Son bir deneyde aynı zamanda S100A8 ve S100A92'nin mikroarray kullanılarak analiz edildiğinde insan pterjium örneklerinde ifadesinin arttığı rapor edilmiştir. Diğer bir araştırma da aynı hastalardan pterjium ve sağlıklı konjonktiva örnekleri kullanılarak yapılmıştır. Son olarak, S100A8 ve S100A9, pterjiumlu gözlerden gelen gözyaşlarında daha yüksek konsantrasyonlarda bulunduğu tespit edilmiştir. S100A8 ve S100A9, terminal epidermal farklılaşma sırasında kodlanan keratin filamentlerine bağlandığından, bu proteinler için hiperproliferatif pterjium gibi oküler yüzey hastalığı

sırasında hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesinde işlevsel bir rol oynadığını düşündürmektedir. S100A8 ve S100A9 proteinlerinin rolü ile ilgili araştırmalar, pterjium progresyonunu özetlemek için gösterge olarak kullanılabilir. İki pro-apoptotik markır olan TUNEL ve Bax sadece pterjium epiteli bazal tabakasında belirgin olarak bulunurken, anti-apoptotik protein Bcl-2'nin tüm pterjium dokusunda yaygın olarak bulunduğu gözlemlenmiştir. Pterjium başında pro-apoptotik proteinlerin yokluğu, proliferatif davranışıyla korelasyona sahiptir (Riau ve ark., 2009; Hou ve ark., 2014; Tong ve rak., 2014; Cárdenas-Cantú ve ark., 2016).

Hücre çoğalmasıyla ilgili olduğu bilinen heterozigotluk kaybı (LOH) ve mikrosatellit instabilitesi (MI) faktörleri ile ilgili de bir çalışma yapılmıştır. LOH'un, hücre proliferasyonu ve kanserle ilişkili olduğu düşünölmektedir, çünkü MI, bozulmuş bir DNA uyumsuzluğunun onarım mekanizmasının bir göstergesi iken genellikle işlevsel bir tümör baskılayıcı genin yokluğuna karşılık gelmektedir. Bu anlamda bugüne kadar elde edilen sonuçlar tartışmalıdır. Pterjium fibroblastları heterozigotluk kaybı ve mikrosatellit instabilitesi dahil olmak üzere dönüştürölmüş hücrelerin özelliklerini göstermektedir. Ayrıca, tekrarlayan pterjiumda fibrovasküler tabakanın proliferasyonunun arttığını gösteren çalışmalar olduğu kadar böyle bir farklılık bildirmeyen çalışmalar da mevcuttur (Di Girolamo ve ark. 2004; Cárdenas-Cantú ve ark., 2016).

2.4.3. Anti-Apoptoz

UV'ye maruz kalmış korneal epitel hücreleri apoptoza uğramakta ve kornea yüzeyinden dökülmektedir. Yapılan bir çalışmada, kronik olarak UV'ye maruz kalma ilginç bir şekilde kornea keratositleri ve endotel hücrelerinin apoptoza dirençli olduğu görülmüştür. Bununla beraber pterjium epitelinin UV ile indüklenen apoptoza dirençli olma ihtimali üzerinde durulmaktadır. TUNEL yöntemi ile boyanmış pterjium epiteli, konjonktiva ile karşılaştırıldığında daha az apoptoza uğradığı gözlenmektedir. Ancak hem pterjium hem de normal konjonktival stromada heterojen bir model görülmektedir. Pterjium epitelinde bcl-2 anti-apoptotik bir proteinin varlığı, ancak her iki epitelde de bulunan pro-apoptotik protein bax'a karşı koyan konjonktivanın bu gözlemi açıklayabildiğini düşündürmüştür (Di Girolamo ve ark. 2004).

2.4.4. Tümör Supresör p53 ve İlişkili Proteinler

p53, UV radyasyona maruz kalarak hasar görmüş birçok hücre tipinde, önemli bir hücre stres regülatörü olup, yüksek miktarda ifade edilebilmekte ve immünohistokimyasal olarak saptanabilmektedir. p53 geni iyi bilinen bir tümör supresördür ve hücre döngüsünü düzenlemektedir. Ayrıca, DNA onarımı ve sentezi, hücre farklılaşması ve apoptoz sırasında da işlev görmektedir. Hücre proliferasyonunun kontrol noktalarından birinin pterjium gelişimindeki rolü, genellikle p53 tarafından kontrol edilmektedir. Pterjiumun bazal epitelinde p53 miktarında artış olduğu rapor edilmiştir ve p53 mutasyonlarının, neoplastik hücre büyümesinin en yaygın genetik göstergesi olduğu düşünülmektedir. Pterjium, dejeneratif işlev bozukluğundan ziyade neoplastik bir büyüme bozukluğu olarak da bilinmektedir. Yapılmış olan bir çalışmada, kontrol numunelerinin hiçbirinde pozitif p53 boyası gözlenmezken, pterjium numunelerinde p53 ifadesinin anormal seviyeleri immünohistokimyasal olarak

gösterilmiştir. SNP markırları, genler ve hastalıklar arasındaki karmaşık ilişkiyi tanımlamak için iyi bir araç olarak kullanılmaktadır. p53 kodon 72 polimorfizmleri (rs104 (21) 2522, G / C, Arg72Pro) tümör duyarlılığı için önemli belirteçlerdendir. p53 proteininin ve kodon 72 polimorfizminin anormal ekspresyonuna eşlik eden p53 gen mutasyonunun varlığının pterjium patogenezinde de rol oynayabileceği düşünülmektedir. Çevresel kirlenici olan benzo (a) piren (BaP) 'nin de p53 mutasyonuna neden olduğu bulunmuştur. BaP'nin son bir metaboliti olan BaP 7,8-diol 9,10-epoksit (BPDE), bir eklenti oluşturmak üzere deoksiguanozine saldırabilir, böylece p53 gen mutasyonuna neden olabilmektedir. Pterjium numunelerinde BPDE benzeri DNA eklentisinin oluşumu, sitokrom p450 polimorfizmleri ile ilişkilidir. Bu nedenle, bir CYP1A1 polimorfizmi pterjium ile korelasyon gösterir ve pterjium duyarlılığı için bir belirteç olarak kullanılabilir (Liu ve ark. 2012; Liu ve ark., 2013; Cárdenas-Cantú ve ark., 2016). Buna ek olarak bazı çalışmalar, p53 mutasyonlarının normal pro-apoptotik fonksiyonunu inhibe edebileceğini de öne sürmektedir. Bununla birlikte, p53'teki mutasyonlara karşı olarak pterjiumda p53 direnci için bir mekanizma olması gerektiği düşünülmektedir. p16 gen promotörü, pterjiumda hipermetilasyona uğramış ve bu hipermetilasyonun ifadesi ile güçlü bir bağlantısı olduğu söylenmektedir. DNA metiltransferaz 3b (DNMT3b) proteininin pozitif ifadesinin ve p16 proteininin bastırılmasıyla da ilişkilendirilebilir. Bu veriler metilasyonun pterjiumda meydana geldiğine ve gelişimlerinde rol oynayabileceğine dair moleküler kanıtlar sağlamaktadır. Bununla birlikte pterjiumda, hücre çoğalması ve apoptoz ile ilgili bazı proteinlerin ifadelerinin azaldığı, buna karşın hücre çoğalmasına katılan bazı importinlerin ise ifadesinin arttığı söylenebilmektedir. Pterjiumların da, çoğunlukla epitelde telomeraz aktivitesine sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu bulgular pterjiumun apoptozun anormal

regülasyonunun bir sonucu olabileceğini de düşündürmektedir (Shimmura ve ark., 2000; Di Girolamo ve ark., 2004; Chen ve ark., 2006; Kase ve ark., 2007; Cárdenas-Cantú ve ark., 2016).

UV ışınlanması, p53'ü daha sonra çekirdeğe giren, DNA'ya bağlanan ve hücre döngüsünü durdurma, apoptoz veya DNA onarımını tetikleyen translasyon sonrası mekanizmalarla stabilize edilmektedir. p53'ün stabilizasyonu, p53 ve düzenleyicileri ile bax ve bcl-2 oranı arasındaki etkileşimlere yol açabilir. Bax-bcl-2 oranı doz bağlantısı olduğunu göstermektedir ve düşük doz UV ile hücre siklusunun durması ve yüksek doz da bax'ın birikmesi ile ilişkili olarak apoptoz ortaya çıkmaktadır (Di Girolamo ve ark., 2004).

Tüm bunlara ilaveten, pterjiyumda p53 ile yapılan çalışmalar çelişkili sonuçlar vermektedir. Mutant p53 ve retinoblastoma gen ürünü arasında, transforme edici büyüme faktörü-b'nin regülasyonunda artışa yol açan bir etkileşim olduğu bulunmuştur. Ancak bununla birlikte pterjiyumda meydana gelen bu değişimlere bir kanıt olarak gösterilememiştir. Diğer araştırmacılar ELISA veya immünohistokimyasal teknikler kullanarak yaptıkları çalışma sonuçlarında p53 miktarında yükselme olduğunu bulmuşlardır. p53 normalde, hücrede küçük bir oranda bulunmaktadır. Başlangıçta pterjiyum için pozitif p53 olan, sonraki tekrarlarında negatif hale geldiği gösterilmiştir. p53'ün birikiminin, pterjiyum patogenezinde mutant p53 için kritik bir rol oynadığı düşüncesine ters düşen tekrarlar ile ilişkili olmadığını düşündürmektedir. İlginç olarak, sadece bir çalışmada pterjiyumda p53 mutasyonlarında yabancı tipli p53'ün bulunmadığı bildirilmiştir. Metodolojik farklar bu çeşitli sonuçları açıklayabilmektedir. Alternatif olarak, p53 birikimi, UV harabiyeti ve hücre devrinin değişimine cevap olabilir. Tek doz UV-B'ye maruz bırakılan insan derisinde p53 birikimi 24 saatte zirveye ulaşır ve 3-

4 gün sonra bazal seviyelere gerileyebilir. Bu nedenle eğer pterjiumlu hastalar cerrahiden önce güneş ışığına maruz bırakıldıysa, bu örneklerdeki p53 boyası bir yabancı tipli p53 birikimini yansıtıyor olabilmektedir. p53'teki mutasyonlar tümörler arasında ortaktır, ancak alt hücreli bölümlendirme gibi diğer araçlarla yabancı tipli p53'ün işlevsel inaktivasyonu da tanımlanabilmektedir. Örneğin; insan keratinositlerinde yabancı tipli p53'ün sitoplazmik ayırımına yol açan p38 MAP kinaz yolağının UV aktivasyonu bildirilmiştir. Pterjium yüzeysel katmanlarında p53 ve TUNEL boyamasının olmaması, bu hücrelerin UV ışınlarına maruz kalması nedeniyle şaşırtıcıdır. Alternatif olarak, Qin ve ark.'nın son bulguları bu gözlemi açıklayabilir. UV'ye maruz bırakılmış organ kültürlü deride, bazal tabaka, p53 indüksiyonunda ve DNA tamirinde suprabazal katmanlara kıyasla daha tepki verici olarak gösterilebilir. Bu suprabazal hücreler, bazal tabakadan çok daha yavaş bir hızda apoptoz geçirirler. Buna ek olarak, kültürde yaşlanan keratinositler, apoptoz nispeten dirençlidir, düşük seviyede p53'ü ifade etmektedir. Bu da, DNA'ya zarar veren ajanlara (UV veya adriamisin) maruz bırakıldığında indüklenebilir değildir, fosforile edilemez veya asetillenemez (Qin ve ark., 2002; Di Girolamo ve ark., 2004). Farklı potansiyele sahip olan keratinosit popülasyonları da p53 ile indüklenen apoptoza duyarlılık bakımından farklılık göstermektedir. Böylece bölünme için sınırlı kapasiteye sahip hücrelerde, p53 ile indüklenen hücre döngüsü tutuklanması, nispeten kısa ömürleri göz önüne alındığında, kök hücreler genomdaki değişikliklere karşı koruma sağlamak için işlevsel bir p53 hücre döngüsü kontrol noktasına ihtiyaçları vardır. p53 regülasyonunun karmaşıklığı göz önüne alındığında, pterjiumdaki son çalışmalar pek çok soruyu cevapsız bırakmaktadır. Bazal epitelyal boyama, normal UV maruziyetine yanıt olarak bir yabancı tipli p53 birikimini yansıtıyor mu veya gerçekten mutant formlar mı?"

sorularını sormaktadır. Bu çalışmaların çoğunun her ikisine de tepki veren bir antikor kullanıldığı göz önüne alındığında kesin olarak belirlemek zordur. Dahası, biriken p53'ün fonksiyonel aktivitesi bilinmemektedir. Mantıksal olarak, yabancı tipli p53 birikiminin başarısızlığına alternatif bir mekanizma olabileceği iddia edilebilir. Dahası, p53 birikiminin olmaması, p53 genine mutasyonların olmadığı anlamına gelmez. Bu nedenle, pterjium patogeneğinde p53 ile ilgili daha ayrıntılı araştırmalar yapılarak sonuç almak için henüz erken olduğu söylenenebilmektedir (Qin ve ark., 2002; Di Girolamo ve ark., 2004).

2.4.5. İnflamatuar Mediatorler ve Büyüme Faktörleri

Pterjium fibroblastlarındaki fibroanjyogenik büyüme faktörleri ve matriks bozucu enzimlerin modülasyonunun kornea istilasına yol açan gelişiminin, progresyona katkıda bulunduğu gösterilmiştir. Histolojik ve sitolojik incelemeler pterjium epitelinin, oküler yüzeyin skuamoz metaplazi ve goblet hücre hiperplazisi ile karakterize bir durum olduğunu düşündürmektedir. Kısa süre önce, hücre döngüsü ile ilgili moleküllerin pterjium epitel hücrelerinde proliferasyon aktivitesinde potansiyel bir rol oynadığı gösterilmiştir. Bu veriler de, pterjium dokusunda hücre çoğalması ve yapışmanın, epitel ve stromadan kaynaklandığını düşündürmektedir (Kase ve ark., 2007). Kökeni ne olursa olsun, inflamatuvar mediatorlerin, pterjium gelişiminde anahtar faktör sayılabilmesi için önemli miktarlarda bulunması gereklidir. UV-B radyasyonunu takiben pterjiumda, interlökin 1 (IL-1), 6 (IL-6) ve 8 (IL-8) düzeylerinin yanı sıra tümör nekroz faktör alfa (TNF α) düzeylerinin de artmış olduğu bulunmuştur. Varlıkları ve artmış ifadeleri göz önüne alındığında, UV ile indüklenebilen bu sitokinler, çeşitli seviyelerde pterjium oluşumuna katkıda bulunabilmektedirler (Di Girolamo ve ark., 2004; Cárdenas-Cantú ve ark., 2016). Siklooksijenaz-2 (COX-2), siklooksijenazların indüklenebilen

izoformudur ve inflamasyonlu sitokin kaynaklı anjiyogenez için anahtar enzimdir. Son zamanlarda COX-2'nin kronik inflamasyon ve çeşitli tümörlerde vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ifadesini arttığı bildirilmiştir (Park ve ark. 2011). COX-2 aynı zamanda pterjium dokusunda da aşırı ifade edilmektedir ve prostaglandin ürünlerin ve inflamatuvar basamakların güçlendirilmesinden sorumlu olduğu düşünülmektedir. Pterjiumda inflamasyon ve hücrel farklılaşmaya neden olan bir enzim olan fosfolipaz D'nin ve sistein proteinazların bir inhibitörü olan sistein C'nin miktarında da artış olduğu bulunmuştur (Tong ve ark., 2008; Barba-Gallardo ve ark., 2013; Cárdenas-Cantú ve ark., 2016).

Bununla birlikte; Nükleer faktör kb (NF-kb)'nin hem kanonik hem de non-kanonik yollarının (sırasıyla akut ve gecikmiş inflamatuvar süreçlerle ilgili olduğunu) pterjiumda aktif rol oynadığı ve inflamatuvar hücrelerin pterjium dokusuna alınmasını da içeren çok sayıda biyolojik etkiye neden olabileceği düşünülmektedir. Pterjium oluşumunda etkili olan hücre proliferasyonu ile ilgili geniş bir dizi büyüme faktörü de incelenmiştir. Heparin bağlayıcı epidermal büyüme faktörü (HB-EGF) 'nin pterjiumda hücre göçünü indüklediği bulunmuştur. Temel fibroblast büyüme faktörü (bFGF), vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ve HB-EGF'nin, UV-B radyasyonunu takiben regülasyonunu artırdığı rapor edilmiştir. COX2 ile birlikte VEGF, pterjium makrofajlarında bulunur ve bu da anjiogenez, kollajen birikiminde ve muhtemelen pterjium büyümesinde rol oynadığını düşündürmektedir. Pterjiumda pigment epitelinde türetilmiş faktörde (PEDF) bir azalma ve insülin benzeri büyüme faktörü bağlama proteini-2'de (IGFBP-2) de bir artış gözlenmiştir. PEDF'deki bu azalma anjiyogenik bir inhibitör olduğu için anjiyogeneze neden olabilmektedir. Ayrıca pterjiumda kök hücre faktörü, trombosit türevli büyüme faktörü (PDGF), bağ dokusu büyüme faktörü (CTGF)

ve transforme edici büyüme faktörü-beta (TGF-b)'nin da ifade düzeyindeki artış rapor edilmiştir (Cárdenas-Cantú ve ark., 2016).

Pterjiumun inflamatuvar süreçleri, düzensiz ve uygun olmayan doku yeniden modellenmesine neden olabilecek reaktif yara oluşumunu tetikleyebilmektedir. Fibroproliferasyon, artmış vaskülarizasyon ve hücre dışı matriksin birikmesi, hipertrofik yara izi oluşumuna neden olmaktadır. Son zamanlarda, organ tamirinin üst regülatörü olan stromal türevli faktörün (SDF-1) yanı sıra reseptörünün (CXCR-4) pterjium stromasında aşırı ifade edildiği bildirilmiştir. Yapılan çalışmada, miyofibroblast transformasyonuna katkıda bulunabilen, miyofibroblastların bir özelliği olan SDF-1 ile α -düz kas aktini (α -Sma) arasında da anlamlı bir ilişki olduğu düşünülmektedir (Cárdenas-Cantú ve ark., 2016).

Pterjiumda da ekstraselüler matriks yeniden düzenlenmesi, hastalığın önemli bir özelliği olarak kabul edilmektedir. Bu süreçte proliferatif hücreler farklı büyüme faktörlerine ve sitokinlere erişebilirler ve böylece içeriğin göç etmesini engelleyen kollajen engelleri kırılabilirler (Cárdenas-Cantú ve ark., 2016). Ekstraselüler matriks yeniden şekillenmesi, esas olarak MMP'lerin daha derinden incelendiği farklı proteinazların etkisi ile elde edilebilmektedir. MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, ve MMP-9 da dahil olmak üzere birçok MMP'nin ekspresyon seviyelerinin, göç ve çoğalmanın asıl noktası olan baş bölgesinde arttığı bulunmuştur. Özellikle MMP-8 ve MMP-13'ün ifadesinin pterjium patogenezi ile ilişkili olduğu söylenebilir. Ekstraselüler matriks yeniden düzenlenmesinde transglutaminaz-2 (TGM2) ve MMP-2'nin anormal DNA metilasyonuna sahip olduğu bulunmuştur, bu da pterjiumun patogenezinin temel ekstraselüler matriks genlerinin metilasyon durumuyla ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. Dahası, MMPs inhibitörlerinin (TIMPs) pterjium

örneklerinde yüksek ifade düzeylerinde olduğu bulunmuştur. Bununla birlikte, bu proteinazların ve bunların inhibitörlerinin ifade seviyeleri, pterjium oluşum ve gelişim hızına aracılık edebileceği düşünülmektedir (Cárdenas-Cantú ve ark., 2016).

2.4.6. Anjiyogenez ve Lenfanjiyogenez

Sağlıklı yetişkin bir organizmada, yeni damarların gelişimi (anjiyogenez) yarı iyileşmesi sırasında gözlenirken, patolojik koşullar altında, bu durum düzensiz olabilmektedir. Maligniteye dönüştürülmüş hücreler anjiyogenik faktörler üretirler ve bu da neovaskülarizasyonun otokrin büyüme kontrolünü ve parakrini kontrol etmesini uyarmaktadır. İnflamasyonun neovaskülarizasyona ve pterjium büyümesine neden olabilecek anjiyogenik yollarada neden olduğu bilinmektedir (Cárdenas-Cantú ve ark., 2016).

Bunların hepsi doğrudan anjiyogenik aktiviteyi indükleyen ETS-1 transkripsiyon faktörünün aktivitesini teşvik eder. Vasküler endotelial büyüme faktörünün (VEGF), endotel hücrelerinin daha ileri hareket ve proliferasyonu için gerekli bir süreç olan anjiyogenez sırasında, temel zar degradasyonunun ilk basamağında bir kemokin görevi görür ve tübül benzeri yapılar geliştirir. Tsp-1, anti-anjiyogenik faktör görevi gören çok işlevli trombosit ve hücre dışı matriks proteindir. Pterjiumda bulunan azalmış seviyeleri, anjiyogenezin uyarıcılarının inhibe edilmiş bir durumda hareket etmesine izin verebilmektedir. VEGF ile birlikte indüklenebilir nitrik oksit sentazının (iNOS) aşırı miktarda ifade edildiği ve nitrik oksitte bir artışa ve daha fazla anjiyogenik uyarılmaya neden olduğu bulunmuştur. Embriyogenez sırasında vasküler pleksusun kompleks organizasyonunu oluşturması gereken protein ve tirozin kinaz tipi reseptör olan sisteminin göz anjiyogenezinde rol aldığı bulunmuştur. Dahası, UV-ışığı tarafından

indüklenen timin dimerleri primer ve tekrarlayan pterjium patogenezinde anjiogenez ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Özellikle fibrovasküler dokunun vasküler ağında hem primer hem de tekrarlayan pterjiumda kan ve lenfatik damarlar tespit edildiği göz önüne alındığında bu sonuca varılabilmektedir (Cárdenas-Cantú ve ark., 2016).

Son zamanlarda pterjiumda lenfanjiyogenez geliştiği de gösterilmiştir. Lenfatik damarların bolluğu ile pterjiumun şiddeti arasında bir ilişki bulunabileceği düşünülmüştür (Cárdenas-Cantú ve ark., 2016). Ayrıca, cerrahi örneklerde lenfatik mikrodamar yoğunluğunun artmasının pterjium nüksünü öngördüğü bildirilmiştir. Kan damarları bağışıklık sistemi hücreleri için daha fazla iltihap yaratan bir geçiş yolu sağlamaktadır. Lenfatik damarlar, antijenik maddenin oküler yüzeyden bölgesel lenf düğümüne çıkışını sağlar ve böylece iltihap için olumlu bir geri besleme döngüsü oluşturur. Bu mekanizmalar pterjium başlangıcı ile pek ilgili olmasa da, kesinlikle dokunun büyümesi ve gelişimi ile ilgili olabileceği düşünülmektedir (Ling ve ark., 2012; Cárdenas-Cantú ve ark., 2016).

2.4.7. İmmünolojik Mekanizmalar

Hem humoral (İmmünoglobulin (Ig) A, IgM ve IgG) hem de hücrel (lenfositler, plazma hücreleri ve mast hücreleri) immünolojik mekanizmaların pterjium gelişimi ve nüksünde rol oynadığına inanılmaktadır. Vasküler hücrel adezyon molekülü 1 (VCAM-1), interselüler (hücreiçi) adezyon molekülü-1 (ICAM-1) ve insan lökosit antijeni-DR (HLA-DR) de dahil olmak üzere immünolojik aktivitenin belirteçlerinin arttığı rapor edilmiştir. Bunlara ek olarak; E-kaderin ve β -kateninin ifadesinin artmış olduğu gözlemlenmiştir. Pterjiumda mast hücreleri, lenfositler, plazma hücreleri, dendrit hücreler ve CD4+ ve CD8+ T-hücrelerindeki artış da gözlemlenmiştir.

İnflamasyon sürecinin yoğunluğu antijen düzeylerine bağı olarak değiştiği için makrofaj tipi hücreler pterjiumda düzensiz dağılım göstermektedir. Bu immün hücre infiltrasyonu subepitelde ve epitelin üzerini örten bölgelerde bol miktarda bulunmaktadır. İnflamatuvar sürecin hücre proliferasyonundan, anjiyogenez sürecinden veya pterjiumun tekrarlamasından sorumlu olmadığı düşünölmektedir (Park ve ark., 2011; Cárdenas-Cantú ve ark., 2016).

2.4.8.Kolesterol Metabolizmasındaki Değişiklikler

Pterjium türevli fibroblastlarda kolesterol metabolizmasında bir değişiklik gözlenmiştir. Dahası hidroksil-metilglutaril-koenzim A-redüktazın (Kolesterol biyosentezinin hız sınırlayıcı enzimi) mRNA düzeyindeki artış ve düşük yoğunluklu lipoprotein reseptörü (Kolesterol açısından zengin lipoproteinleri içine alan) insan örneklerinden izole edilen pterjium fibroblastlarında bulunmaktadır. Everolimus ve pioglitazonun pterjium fibroblast proliferasyonunu ve hücre içi kolesterol homeostazisini asil-koenzim A kolesterol açıltransferaz ve çoklu ilaç direnci proteininde rol alan moleküllerin seviyelerini azalttığı gösterilmiştir. Bu çalışmaların sonuçları, tropikal ilaçların, kolesterol ester metabolizmasının modölyasyonu ile pterjium çoğalmasının önlenmesinde kullanılabileceğini önermektedir (Cárdenas-Cantú ve ark., 2016).

2.4.9.Epitelyal-Mezenkimal Geçiş (EMG/EMT)

Epitelyal hücrelerin farklı durum ve uyarılar sonucunda epitelyal özelliklerini kaybederek mezenkimal özellikler kazanmaları epitelyal mezenkimal geçiş (EMT) olarak adlandırılır ve bu durum kanser hücrelerinde de görölmektedir. Epitelyal tümör hücreleri, yüksek yayılma özelliklerini geliştirmek için, morfolojilerini ve işlevlerini değiştirmektedirler. Böylece geçici olarak örneğin alfa düz kas aktini (α -SMA) gibi mezenkimal farklılaşma belirteçlerini alırlar ve epitelyal özelliklerinin bir kısmını kaybederler (örn., Epitelyal (E) kaderin) (Ando ve ark., 2011; Vatansever, 2016). EMT'deki bu epitelyal özelliklerin kaybı, hücre iskeleti yeniden düzenlenme ve bazal membranın bozulmasıyla sonuçlanan bir süreç olabilmektedir (Hills ve ark., 2012).

Kaderinler, kalsiyuma bağımlı hücre yapışma moleküllerinin bir ailesidir. Homofilik bağlanma etkileşimleri vasıtasıyla kaderinler, morfolojik farklılaşma ve hücresel proliferasyonda önemli rol oynamaktadırlar. E-kaderin, hücre-hücre yapışmasının aracısı olarak, genellikle bir yapışma bandında yer alan bir transmembran glikoproteindir (Kase ve ark., 2007).

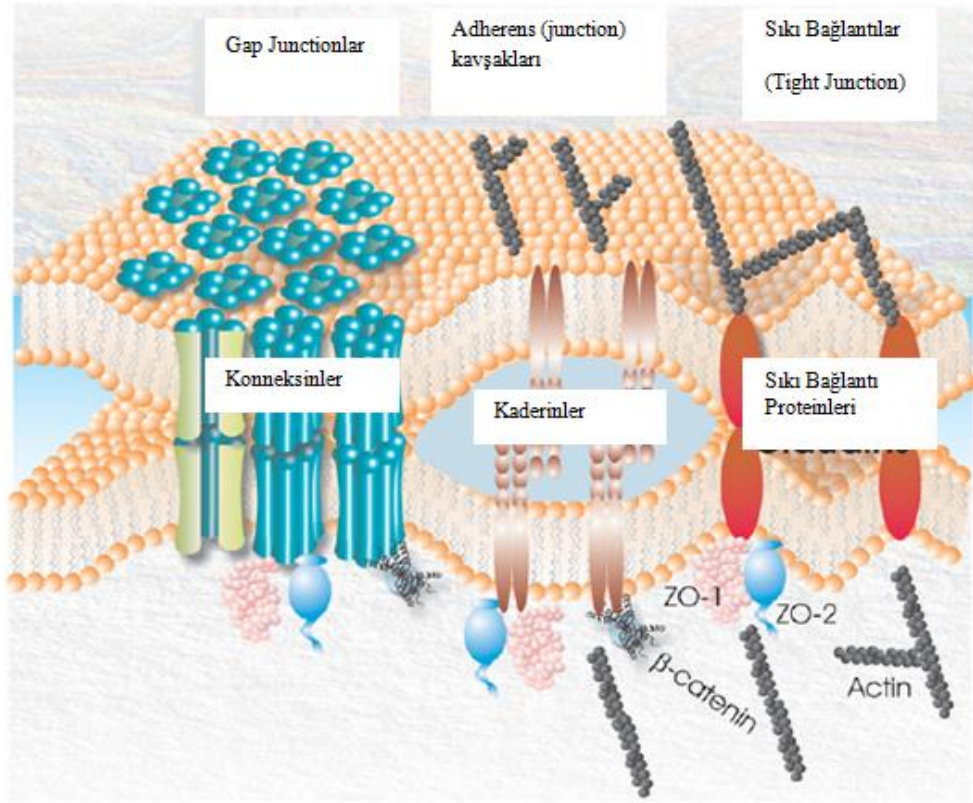
Yürütölen bir çalışmada, E-kaderinin regölasyonundaki azalma ve hücre-hücre yapışmasını düzenleyen β -katenin proteinlerinin hücre içi birikimi pterjium epitelinde immünohistokimyasal olarak tespit edilmiştir. E-kaderinin regölasyonundaki bu azalış EMT sırasında önemli rol almaktadır. Kanonik β -katenin sinyal yolağı gelişimde EMT'yi yönlendiren ve kanserde sıklıkla aktive olan bir tamamlayıcıdır. (Cárdenas-Cantú ve ark., 2016). Üstelik, kültörlenmiş kanser hücrelerinde E-kaderin'in benzer şekilde bloke edilmesi EMT'yi anımsatan hücre şeklindeki değişikliklere yol açmaktadır ve aynı zamanda bu durum metastatik özellikteki hücrelerin oluşumuna da neden olmaktadır. E-kaderin immünreaktivitesinin α -SMA pozitif pterjiyal epitel hücrelerinde

de yer aldığı gösterilmiş olup EMT'nin peritum patogenezinde önemli bir rol oynadığını düşündürmekte ve son zamanlardaki bazı çalışmalarda bu verileri desteklemektedir (Ando ve ark., 2011; Engelsvold ve ark., 2013; Cárdenas-Cantú ve ark., 2016).

Ayrıca EMT'nin, fibroblast benzeri özellik kazanması ve hücre içi yapışıklığın azalmasının önemli bir süreç olduğu düşünülmektedir. Bunlara ek olarak, kanser hücrelerinin yayılması, tümör progresyonu ve malign transformasyon sırasında ortaya çıkan olaylarda da EMT'nin kritik bir rol oynadığını göstermektedir. Çeşitli onkojenik yollar (peptid büyüme faktörleri, Src, Ras, Ets, integrin, Wnt / β -katenin ve Notch) EMT'yi indüklemektedir ve buna ek olarak da, hücre yapışma molekülü E-kaderin'in ifadesinin azalmasına neden olmaktadır (Larue ve ark., 2005).

EMT'nin hem gelişim süreçlerinde hem de tümör metastazında önemli olması, epitel hücrelerinin hücre-hücre temasını kaybettiği ve mezenkimal özellikler kazandığı geri dönüşümlü bir dizi olayı açıklamakta kullanılabilmektedir. Bu olaylar, E-kaderin gibi epitelyal spesifik hücre-hücre yapışma moleküllerinin kaybedilmesi veya yeniden düzenlenmesi, fibronektin, vimentin ve N-kaderin gibi mezenkimal belirteçlerin devreye sokulması da dahil olmak üzere hücrenin moleküler yeniden programlanması ile ilgili olabilmektedir. Ayrıca, tümör biyolojisi üzerine yapılan çalışmalar, TGF β , Wnt, Notch, PDGF ve FGF gibi büyüme faktörlerini içeren sinyal yollarının EMT'yi indükleyebileceğini düşündürmektedir. TGF β uyarımı üzerine, ZEB transkripsiyon faktörlerinin (ZEB1 / ZEB2) regülasyonunun artması; sonuçta EMT'ye yol açan E-box elementlerine bağlanma ve E-kaderin genlerinin bastırılması ile sonuçlanabileceği görüşünü desteklemektedir (Engelsvold ve ark., 2013). Azalmış E-kaderin seviyeleri ile ilişkili hücre adezyon kaybı, TGF- β 1 ile indüklenen tübüler hasarına tepki olarak daha

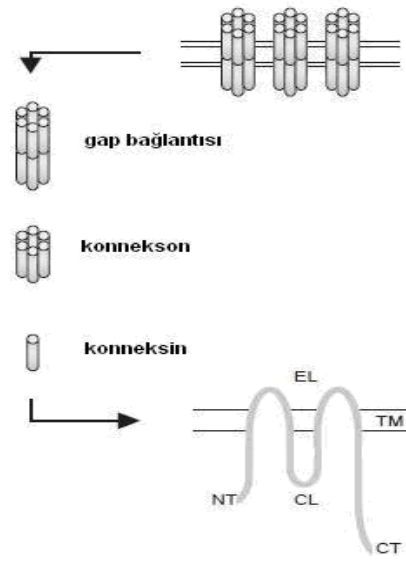
önce gözlenen erken fenotipik ve morfolojik değişikliklerdeki önemli bir adımı temsil etmektedir. Tüm bunların yanında kaderinler, hücre-hücre temasında aktini, hücre iskeletine ve çeşitli diğer sinyal moleküllerine bağlayan çoklu protein adherens (junction) kavşağının oluşturulmasında rol oynamaktadırlar. Sitoplazmik alan, β -katenin'e bağlanırken, hücre dışı etki, bitişik hücreler üzerinde E-kaderin ile ligasyona aracılık etmektedir ve kaderini α -katenin aracılığıyla aktin hücre iskeletine bağlamaktadır (Kase ve ark., 2007; Hills ve ark., 2012). Kateninler vasıtasıyla kaderinlerin F-aktin'in etkileşimi sadece birleşim yerinin yapışma gücünü arttırmakla kalmaz aynı zamanda yapışkanlığı ve hücre içi sinyalleme başlatan proteinler için bir sinyal düğümü olarak da işlev görür. E-kaderin ve β -katenin ile hücre-hücre temas yerlerinde birlikte lokalize edilmektedir. Bitişik hücrelerin sitoplazmasını ve gap junctionları birbirine bağlayan hekzamerik hemikanallar yani konneksonlar içine oligomerize etmektedirler. Konneksonlardan oluşan gap junctionlar, kaderinlerden oluşan ara bölme ve sıkı bağlantılar sık sık epitel hücrelerinde düzenlenir (Şekil 2.6). Gap junctionlar, çözünen maddelerin, metabolik öncüllerin ve elektrik akımlarının transferini mümkün kılmaktadırlar. Ayrıca, uygun işlevin sağlanması ve aktivitenin senkronize edilmesi için gereklidirler. Kaderin bazlı hücre adezyonunun inhibisyonu gap junction düzenliğini inhibe ederken, güçlü bağlantıları olmayan hücrelerin içindeki rekombinant kaderinlerin üretimi adherens (junction) kavşağında konneksin fosforilasyonunu ve hücre-hücre iletişimini arttırmaktadır (Şekil 2.6) (Laird, 2006; Hills ve ark., 2012).



Şekil 2.6: Bir Gap junctionda düzenlenmiş kavşak kompleksleri (Laird, 2006)

2.5.Gap Junctionlar

Gap junctionlar (GJs), birbirine bitişik hücreler arasında küçük moleküllerin doğrudan geçişine izin veren, membran yüzeyinde tipik olarak 10 ila 10.000 arasında değişen, plaklar halinde toplanan, hücre içi zar kanallarıdır. Bunlar, iki karşıt hemikanalın (veya konneksonlar) etkileşmesinden ve sırasıyla altı konneksin proteinlerinden meydana gelmektedirler (Şekil 2.7). Gap junctionlara konneksinler tarafından oluşturulan hücreler arası geçiş kanalları da denilebilmektedir. Konneksinler veya fonksiyonel analog yapıları, çok çeşitli organizmalarda bulunmaktadır. Hepsi dört membran alanı, iki hücre dışı döngü, bir sitoplazmik döngü, bir sitozolik N terminal kuyruk ve bir C-terminal bölgesi içeren bir yapıdan oluşmaktadır (Şekil 2.7) (Laird, 2006; Vinken ve ark., 2006; Tuzcu ve ark., 2010).



Şekil 2.7: Gap junctionların yapısı (Vinken ve ark., 2006; Tuzcu ve ark., 2010).

Boşluk bağlantıları, membran yüzeyinde plaklar halinde gruplandırılır ve iki heksametik konveks (hemikanallar) olarak düzenlenmiş on iki konneksin proteininden oluşur. Konneksin yapısı iki hücre dışı halkadan (EL), dört zardan geçen alandan (TM), bir sitoplazmik döngüden (CL), bir N terminal kuyruğundan (NT) ve bir C-terminal kuyruğundan (CT) oluşur.

Gap junction kanalları aynı tipteki hücreler arasında oluştuğunda, homosellüler gap junctionlar, farklı tipteki hücreler arasında oluştuğu zaman ise heterosellüler gap junctionlar olarak adlandırılmaktadırlar (Laird ve ark., 2005). Gap junctionlar hemen hemen her memeli hücre türünde var olduklarından, işlevleri hücre ve doku biyolojisinde son derece önemlidir. Bu çeşitli dağılım, konneksin ailesinin farede 20 ve insanlarda 21 üyeden oluştuğunun bulunması ile açıklanmıştır. Tüm kanalların özellikleri farklı olmasına rağmen, 1 kDa'yı aşan molekülleri içeri almamaktadırlar. İkincil haberciler ve küçük metabolitler (cAMP, InsP3, adenosin, ADP ve ATP) ise bir hücreden diğerine doğrudan geçen moleküller olarak bilinmektedirler (Laird, 2006). Bu küçük moleküllerin (genellikle 1 kDa'dan daha düşük) doğrudan hücre içi geçişine izin veren, gap junctionları oluşturmak için komşu hücrelerdeki bağlayıcılarla bağlantılı olabilen, konneksinler olarak adlandırılan heksametik hemikanalları oluştururlar.

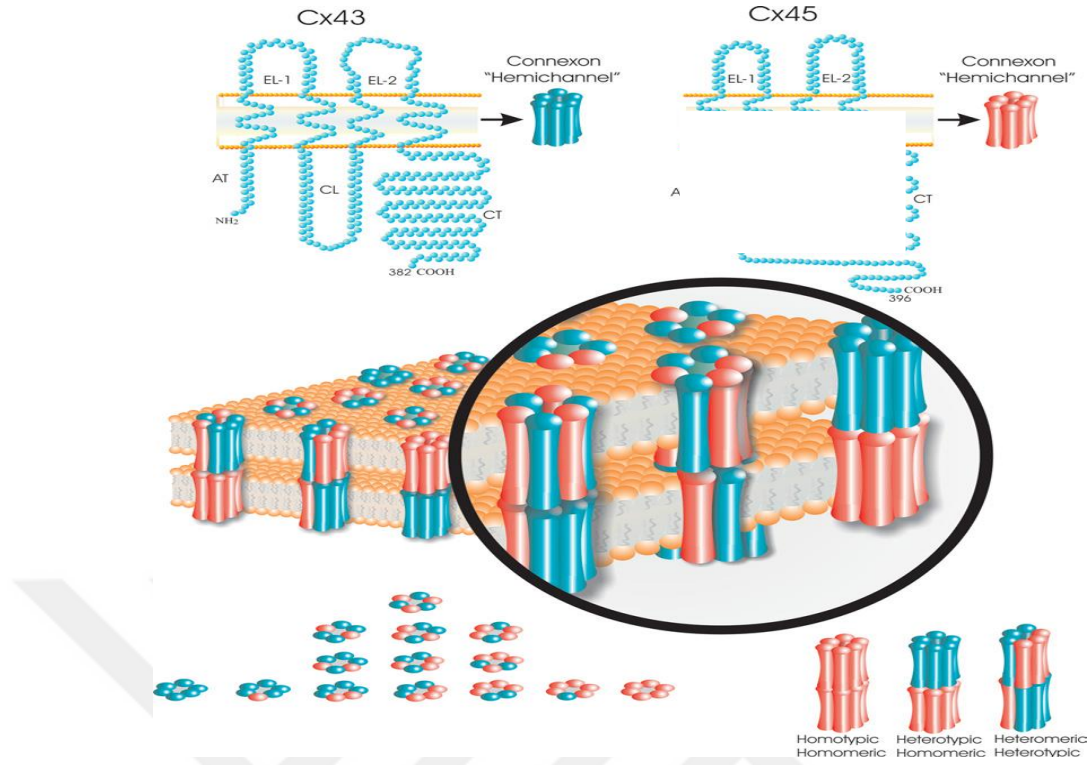
Bununla birlikte, son kanıtlar da konneksinlerin bazı hücre tiplerinde belirli amaçlar için hemikanallar olarak işlev görebildiğini göstermişlerdir. Diğer gap junction aile üyelerinin ise, bağışıklık yanıtlarını içeren ilginç hücresel olayları teşvik etmek, tümör baskılayıcı özelliklere sahip olmak ve hücre morfolojisinin ve iskeletinin düzenlenmesinde rol aldığı da düşünülmektedir. Gap junctionların membran kanalları olarak rolleri uzun zamandan beri araştırılmakla beraber bu kanalları oluşturan konneksinlerin yapıları ve işlevleri tam olarak netlik kazanamamıştır (Matsuuchi ve ark. 2013).

2.5.1. Konneksinlerin Moleküler Yapısı ve Konneksin 43 Geni

Konneksinlerin, iki hücre dışı (EL1 ve EL2) ve bir sitoplazmik halkaya (CL) sahip olduğu, proteoliz duyarlılığı ve bölgeye yönlendirilmiş antikor lokalizasyonu çalışmaları ile belirlenmiştir. Amino- (NT) ve karboksil- (CT) kısımları da sitoplazmik tarafta bulunmaktadır (Şekil 2.10) (Liu ve ark., 2001; Paznekas ve ark., 2003; Söhl ve ark., 2004; Laird, 2006; Grosely ve ark., 2013). Bu integral membran proteinleri, oluşturdukları ilmekler yardımıyla sitoplazmada açığa çıkan hem N-terminal hem de C-terminalin ikisine de sahip olan sitoplazmik bağı (CL) kullanırlar (Tuzcu ve ark, 2010). Bugüne kadar konneksin aile üyelerinin hepsinin topolojisi ayrıntılı olarak incelenmemiştir. Buna rağmen; bu aile üyeleri arasındaki dizi korunumu; iki EL ve AT bölgesini de içeren dört transmembran bölge de açıkça bellidir. EL domainleri, intramoleküler disülfid bağı ile bağlanmaktadır, çünkü bütün konneksinler her EL'de üç korunmuş sistein kalıntısına sahiptirler. Konneksinler, her biri konneksin veya hemikanallar olarak adlandırılan hegzamerlerin içine oligomerize olurlar. Yan yana gelen plazma membranlarından iki bitişik konneksin bir bağlantı kanalını oluşturmak için birbirine yanaşarak yaklaşık 2 nm çapında olan kanallar elde edilir. Konneksin ara

birimleri bu kanal içerisine paketlenmiştir (Tuzcu ve ark., 2010). Teorik olarak olası kanal alt tiplerinin karmaşıklığı, birçok hücre tipinin üç veya daha fazla konneksin ifade ettiği kanal alt tiplerinin karmaşıklığından kaynaklandığını düşündürmektedir. Epidermisin en az yedi adet konneksini farklı şekilde ifade ettiği bildirilmiştir ve bunların tam olarak keratinosit farklılaşması tarafından düzenlendiği bulunmuştur (Di ve ark., 2001). Bunun yanında, kanal çeşitliliği ile birlikte ifade edilen tüm bağlantılar heteromerik konneksin veya heterotipik kanalları oluşturmaktadır. Epidermisdeki konneksin düzeninin önemi ve gelişmişliği, farklı yerlere özel spesifik gap junction bölmelerinin kurulmasına izin vermektedir (Laird, 2006). Örneğin yara iyileşmesinde, CX26 ve CX30 ifade düzeyleri artarken, CX31 ve CX43'ün regülasyonu azalmaktadır. Bu durum kanal alt tiplerinin farklı görevlere sahip olduğunu göstermektedir (Kretz ve ark., 2003; Laird, 2006). Dolayısıyla, gap junctionların genel karmaşıklığı büyük oranda kanallara bağlanan bileşenler tarafından düzenlendiği söylenebilmektedir (Laird, 2006).

Çeşitli konneksinler (CX43, CX32 ve CX26 gibi) için temel topoloji doğrulanmaktadır. Karşılıklı olarak, konneksinler arasındaki çeşitlilik CL ve CT bölgelerinin dizisi, boyutu ve posttranslasyonel modifikasyonundan kaynaklanmaktadır. Konneksinlerin oluşturduğu hegzamerler, homotipik, heterotipik ve kombine heterotipik/heteromerik olarak bir konneksin içinde düzenlenmektedir (Şekil 2.8) (Söhl ve ark., 2004; Laird, 2006; Meşe ve ark., 2007; Grosely ve ark., 2013).



Şekil 2.8: Gap junctionların konneksin montajı (Laird, 2006).

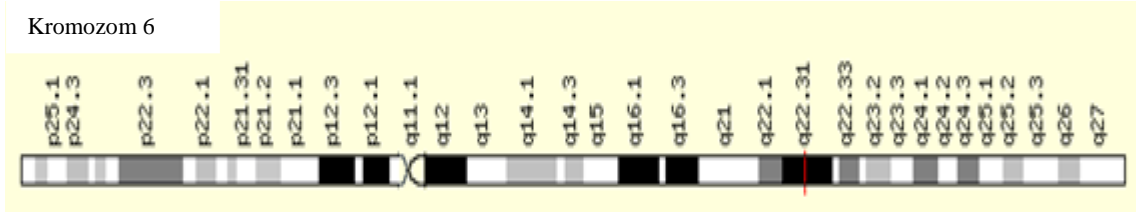
Konneksin proteinleri aynı zamanda hücre büyümesi, yapışma, göç, apoptoz ve sinyalleme gibi hücre homeostazının düzenlenmesinde de rolleri vardır (Zhao ve ark., 2013). Karsinogenezin altında yatan çok sayıda mekanizmada gap junction hücrelerarası iletişimin (GJIC) kaybı ile ilişkilidir. Bununla birlikte, konneksin genlerinde mutasyonların oluşması nadir bir olaydır. DNA hipermetilasyonu gibi epigenetik modifikasyonlar, konneksin gen ekspresyonunun susturulmasını tetikleyebilir. Konneksin proteinlerinin uygun olmayan fosforilasyonu ve anormal sitosolik lokalizasyonu da sıklıkla tümör hücrelerinde gözlenmektedir. Gap junction hücrelerarası iletişimin kesilmesi, tümör hücrelerinin, çevredeki hücreler tarafından normal büyüme düzenlemesinden kaçmasına neden olur ve böylece anormal büyümeye devam ettiği düşünülmektedir. Konneksin ifadesine müdahale etmek, doğrudan homeostatik dengesizliği tetikleyebilmektedir. Aslında, konneksin eksikliğinin,

kendiliğinden veya kimyasal olarak neden olunan karsinojeneze karşı artan duyarlılığa yol açtığı bilinmektedir. Bu nedenle Konneksin genleri tümör süpresör genleri olarak kabul edilir ve bunların tümör hücrelerinde aşırı ekspresyonunun, hücre proliferasyonunun azalması ve hücre ölüm aktivitelerinin artmasıyla sonuçlandığı bilinmektedir (Vinken ve ark., 2006).

Konneksin 43, en yaygın konneksin homologlarından biridir. Konneksin 43, diğer konneksin proteinleri gibi, bir hücre içi N-terminal, dört transmembran alan, iki hücre dışı halka, bir sitoplazmik halka ve bir hücre içi C-terminalden oluşmaktadır. Konneksin 43, karsinogenez ve tümör metastazında önemli rol oynamaktadır ve birçok kanser tipinde eşzamanlı olarak ifade edilmektedir (Paznekas ve ark., 2003; Boengler ve ark., 2006; Xu ve ark., 2008). Konneksin ailesi üyeleri arasındaki çeşitlilik sitozolik bölgelerdeki yapısal farklılıklardan da kaynaklanmaktadır. Farklı konneksin türlerini belirlemek için günümüzde iki terminoloji sistemi kullanılmaktadır. Bunlardan ilk sistem, cDNA dizilemesi ile konneksinleri moleküler ağırlık temeline göre ayırmaktadır. Örneğin, en bol olan hepatik konneksin, 43 kDa'lık bir tahmini moleküler kütleyle sahiptir ve bu nedenle Konneksin 43 olarak adlandırılır. İkinci sistemde ise, konneksinler, dizilim benzerliği ve sitoplazmik alanların uzunluğuna göre, gap junction için " GJ " önceliği kullanılarak alt sınıflara (a, h, g veya y) ayrılır ve keşfedilme sıralarına göre sayı alırlar. Bu sistemde, Konneksin 43, CX43; Gap junction Protein alfa 1, GJA1 olarak adlandırılır. Ancak, en yaygın olarak moleküler ağırlık temelli isimlendirme kullanılmaktadır (Vinken ve ark., 2006).

CX43 (GJA1) geni, 382 aminoasitten oluşan 43 kDa'luk bir proteini kodlamaktadır. İnsanda 6q22-q23'de, farelerde 10. Kromozom üzerinde yerleşiktirler (Şekil 2.9) (Liu ve ark., 2001; Paznekas ve ark., 2003; Söhl ve ark., 2004). Bu veriler,

NCBI veritabanından elde edilen sekans bilgilerinin mevcut durumunu yansıtmaktadır (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2697>).



Şekil 2.9: CX43'ün kromozom üzerindeki yeri
(<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CX43> (GJA1))

2.5.2. Konneksin İfade Çeşitliliği

Çok sayıda konneksin göz önüne alındığında, hücresel ve doku dağılımının birbirinden farklı olduğunu görmek şaşırtıcı değildir. Tüm hücre ve doku tiplerinde konneksin ifadesinin ayrıntılı değerlendirmesinde öne çıkan üç temel ilke vardır. Bunlardan;

1. Birçok doku ve hücre tipi, konneksin ailesinin iki veya daha fazla üyesini ifade eder. Örneğin, keratinositler, en az CX26 (konneksin26), CX30, CX30.3, CX31, CX31.1 ve CX43; aynı şekilde, kardiyomiyositlerde CX40, CX43 ve CX45'i ve hepatositler CX26 ve CX32'yi ifade etmektedir. Aynı hücre tipindeki birden fazla konneksin aile üyelerinin birlikte ifadesi muhtemelen telafi edici mekanizmalarının fonksiyonel kaybı veya mutasyonunun üstesinden gelmesine olanak vermektedir. Bu durum, konneksin-gen çalışmalarında etkin şekilde gösterilmektedir. Böylece, ortak ifade edilen konneksin aile üyeleri arasında herhangi bir telafi mekanizması mevcut değilse, hastalığın prevalansı veya anormal gelişim insidansı tahmin edilebileceğinden çok daha düşüktür.

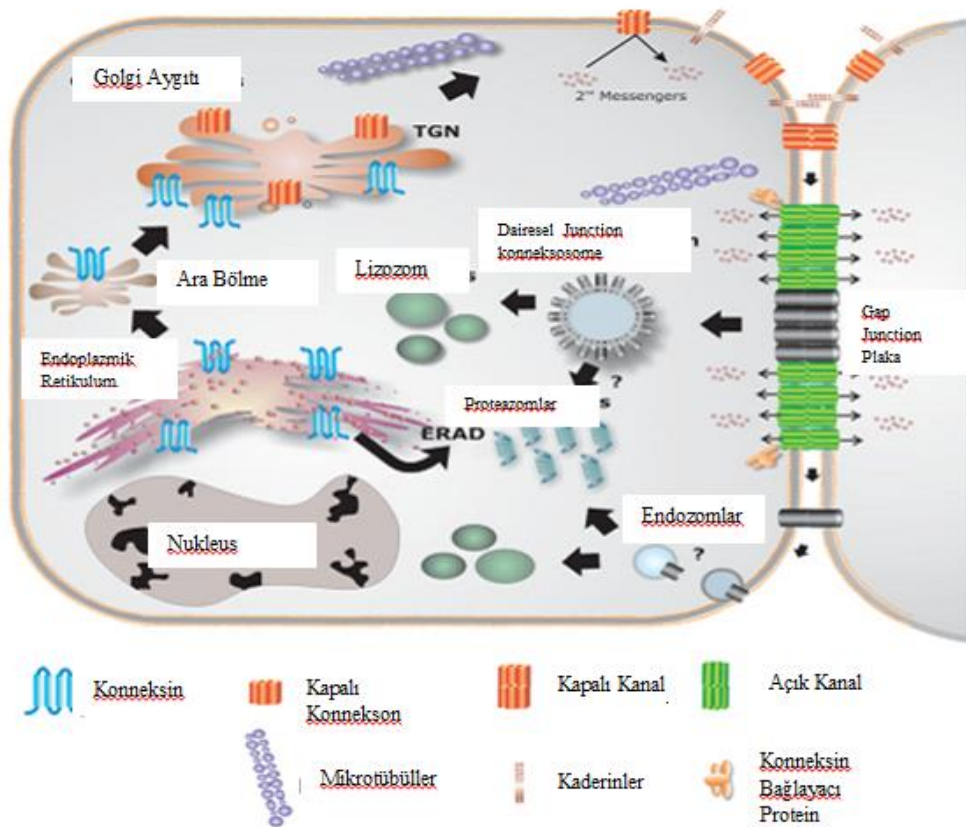
2. Aynı hücrede iki veya daha fazla konneksin birlikte sentezlense bile, oluşan kanallar her zaman bir konneksin aile üyesinin kaybını veya mutasyonunu telafi edemeyebilir.
3. En çok bulunan konneksinin, Konneksin 43 olması bunun, kardiyomiyositler, keratinositler, endotel ve düz kas hücreleri gibi 35 hücre tipini kapsayan farklı dokularda endojen olarak ifade edildiğini göstermektedir (Laird, 2006).

2.5.3.Konneksinlerin Biyosentezi

Konneksin proteinleri, sadece birkaç saatlik yarılanma ömrüne sahiptir. Bu nedenle, konneksinler sürekli olarak, biyosentezlenip parçalanacak şekilde programlanmışlardır. Konneksinlerin eşleşmesinin derecesini yukarı ya da aşağı doğru düzenleyen fizyolojik gerekliliklere yanıt vermek için kısa bir yarılanma ömrüne sahip olmaları önemlidir. Konneksinlerin, klasik bir integral membran proteinleri ile ilişkili olarak, translokon, kodlanmış başlangıç ve durdurma transfer dizileri yoluyla, translasyonel olarak ER'ye (endoplazmik retikulum) geçtiği düşünülmektedir. Bu kuralın bir istisnası olabilir (CX26 gibi) (Laird, 2006). Konneksinler glikozile edilmemiş olsalar da, bir veya daha fazla moleküler şaperon tarafından katlanıp, daha kararlı duruma ulaştıkları tahmin edilmektedir. Sistein kalıntılarının hücre dışı ilmekleri (başlangıçta ER lümenine maruz kalan alanlar) arasında disülfid bağlarını oluşturması, konneksinlerin en azından protein disülfid izomerazlarının gözetiminde olduğunu göstermektedir. Dahası, diğer moleküler şaperonların, ER'de geçici olarak bulunan konneksinlerin katlanmasına yardımcı oldukları da öngörülmüştür. Konneksin oligomerleşmesinin, ER içinde hareket süreleri boyunca gerçekleştiği bildirilmiştir. Bu bulgu CX43 ve CX46 için geçerli değildir çünkü bu iki konneksinin de golgi aygıtında

monomerik formda buldukları ve trans-golgi ağında oligomerize oldukları görülmüştür. Son zamanlarda, erken konneksin oligomerizasyonu, aşırı ekspresyonun bir ürünü mü veya ER'den çıktıktan sonra oluşan konneksinlerin doğal oligomerizasyonu ile mi yükseltildiği soruları ortaya çıkmıştır. Konneksin alt birimlerinin oligomerizasyonunun, trans-golgi ağını içeren geç golgi bölmelerinde sabit oligomerler üreterek birleşmeye başladığı bir olay olduğu düşünülmektedir (Laird, 2006; Tuzcu ve ark., 2010).

2.5.4. Konneksinin Yaşam Döngüsü



Şekil 2.10: Konneksin yaşam döngüsü (Laird, 2005; Tuzcu ve ark., 2010)

Endoplazmik retikulumda biyosentezlenen konneksinler normal olarak, endoplazmik retikulumun çıkış bölgelerinden tomurcuklandığı ve golgi aygıtının cis-golgi ağı ile birleştiği klasik sekresyon yoluna girmektedirler. Konneksinler tipik olarak eş-translasyonel olarak ER'ye yerleştirilir. Yanlış katlanmış konneksinlerin, endoplazmik retikulum membranlarından translokasyona uğratılması ve muhtemelen proteazomal degradasyona maruz bırakılmasına neden olur. Hatalı protein trafiği özellikleri olan bazı dönüştürülmüş hücrelerde, konneksinler normal sekresyon yolundan geçebilmekte ve degradasyon için lizozomlara girebilmektedir. Oligomerizasyon ve konneksin oluşumunun hem endoplazmik retikulumda hem de TGN (trans-golgi ağı) de dahil olmak üzere daha uzak bölgelerde meydana geldiği bildirilmiştir. Çeşitli taşıyıcı veziküller, hücre yüzeyine kapalı konneksinler sunar ve bu işlem mikrotübüller ile kolaylaşır. Aynı zamanda kaderin bazlı hücre adezyon olayları, bir gap junction kanalı oluşturan hücreler arası temas yerlerinde konneksinlerin yerleştirilmesini kolaylaştırır. Konneksin bağlayıcı proteinlerin (yani, ZO-1), ikincil haberciler dahil olmak üzere küçük moleküllerin değişimi için uygun olan gap junction (GJ) düzeninin oluşturulmasında rol oynadığı ileri sürülmüştür. GJ plakı, dış kenardan monte edilir ve plağın iç kanallarının, sonunda işlevlerini kaybetmesi ve halka şeklindeki kavşaklar olarak adlandırılan çift-membran yapıları oluştururlar (Laird, 2005). Eğer konneksinler düzgün şekilde katlandıysa, ERAD'dan uzak tutulması beklenmektedir. Ancak, bazı durumlarda ERAD için hedef alınmış da olabilir. Konneksin ailesinin en azından bazı üyelerinin, konneksin ara bölmeden geçene ve golgi aygıtının, yani TGN'nin distal elemanlarına ulaşana kadar tam oligomerizasyonu geciktirilir. Pleiomorfik veziküllerin ve taşıyıcı ara ürünlerin, mikrotübüllerin kolaylaştırdığı bir süreç olan hücre yüzeyine kapalı konneksinler verdiği düşünülür. Konneksinler hemikanallar olarak işlev

görebilir ve hücre dışı ortamlarla küçük moleküllerin alışverişinde bulunabilir veya kapalı bir durumda hücre-hücre birleşim bölgelerine yayılabilirler ve karşıt bir hücreden konneksionlar ile kenetlenirler. Kaderin tabanlı hücre adezyonuyla bağlantılı olarak, gap junction kanalları plakalar halinde kümelenir ve ikincil habercileri değiştirebilir. Yeni gap junction kanalları, gap junction plakalarının kenarlarına yerleştirilir ve plakaların merkezinde daha eski kanallar bulunur. Çeşitli konneksin-bağlayıcı proteinler tanımlanmıştır ve bu bağlanma proteinlerinin bir veya daha fazlasının, hücre iskelet elementlerine etki ederek plak oluşumu ve stabilitesini düzenledikleri muhtemeldir. Gap junction plakaları ve bu plakaların fragmanları, genellikle bir halka şeklinde birleşme olarak adlandırılan bir çift-membran yapısı olarak iki bitişik hücreden birbirine dahil edilir. Bu durum daha sonra konneksom olarak yeniden adlandırılmıştır. Konneksionların parçalanmasına yönelik diğer yollar, konneksionların klasik endositik yollarla hücreyi girdiği yerlerde bulunabilir. Bazı kanıtlar, proteazomal bozulmada rol oynadığını düşündürse de, parçalanmış gap junctionlar, lizozomlara hedeflenmektedirler (Laird, 2006).

2.5.5. Konneksinlerin Hücre Yüzeyine Taşınması

Düzgün katlanmış konneksinlerin, ER'yi terk ettikten sonra, cis-golgi ağına girmeden önce ERGIC'den geçmesi beklenmektedir. Birçok çalışma, konneksinlerin golgi aygıtından geçtiğini ortaya çıkarmıştır. Bununla birlikte, diğer araştırmalar CX26'nın golgiden bağımsız bir yol izleyerek hücre yüzeyine ulaşabileceğini bildirmiştir. Kısa süre önce yapılan bir çalışmada, aynı hücrelerde hem CX26 hem de CX43 izleyen salgı yolu doğrudan karşılaştırılmış ve her iki konneksin de bozulmamış mikrotübüllere diferansiyel bağımlılık gösteren benzer sekresyon yollarını izlediği tespit edilmiştir (Thomas ve ark., 2005; Laird, 2006). Konneksinlerin, hücre yüzeyine nakli

sirasında salgı yolundaki translasyon sonrası modifikasyonlar için substratların ne ölçüde olduğu tam olarak anlaşılammış olsada; bazı kanıtlar, CX43'ün salgı yolağının erken dönemlerinde geçici olarak fosforile edildiğini ve bunun büyük çoğunluğunun plazma membranına ulaştığı zaman gerçekleştiği düşünülmektedir (Laird, 2006). Canlı hücrelerde Floresan proteinlerle işaretli konneksinler kullanarak yapılan çalışmalar; konneksinlerin trans-golgi ağından çıktıklarında, çeşitli boyut ve şekillerde hücre yüzeyine iletilmesi için çeşitli taşıyıcılar ile işbirliği yapmaktadırlar. Bu pleiomorfik veziküller ve tübüler uzantılar, trans-golgi ağından yayılıyor gibi görülebilmektedir (Thomas ve ark., 2005; Laird, 2006). Bundan ötürü, konneksin transportunun, konneksin taşıyıcılarının hücre yüzeyine ulaşmasını kolaylaştırması ve dağıtım sürecinin verimliliğini arttırmakta da görevli olan mikrotübüllerle olduğu da düşünülmektedir. Konneksonların hücre yüzeyine ulaşması ile küçük moleküllerin hücre dışı ortama kontrolsüz geçişini önlemek için yüzeydeki açıklıklara sıkı biçimde dizilmeye devam etmektedirler (Laird, 2006). Konneksonlar, plazma zarlarına yerleştirildikten sonra, lipid çift katmanında serbestçe dağılırlar. Spesifik N- ve E-kaderin esaslı yapışma olaylarının yönlendirmesinde gap junction kanalları oluşturmak için komşu hücrelerdeki konneksonlar ile bağlantı oluşturmaktadırlar. Yapılan bazı araştırmalar, N-kaderin ve CX43'ün aslında bir araya gelebileceğini ve adherens (junction) kavşakları ile gap junctionları arasında doğrudan çapraz bağlantı oluşturabileceklerini de ileri sürmektedir (Wei ve ark., 2005; Laird, 2006).

2.5.6.Konneksin Yıkımı

Başlangıçta, konneksinler ve gap junctionlar parçalanırken, diğer integral plazma membran proteinleri gibi bunlarında lizozomlarda yaşamlarına son verdikleri bilinmektedir. Daha sonra, proteazomların, konneksin yıkımını düzenlemede doğrudan ya da dolaylı olarak rol oynadığı bulunmuştur. Bununla birlikte, lokalizasyon çalışmaları ise, konneksinlerin lizozomlarda yıkıldığını savunmaktadır. Sonuç olarak, proteazomların ER ile ilişkili degradasyondan (ERAD) sorumlu oldukları model üzerinde durulsa da, lizozomların plazma membranı aracılı döngüde konneksinleri parçaladıkları düşünülmektedir. Genel olarak, poli-ubiquitinlenmiş konneksinlerin ERAD'ı hedef aldığı ve mono-ubiquitin konneksinlerin internalizasyon için etiketlendiği ve son olarak lizozomlarda yıkıldığı söylenebilmektedir. Ancak tüm konneksinlerin yıkımının aynı olup olmayacağı hala tartışmalı bir konudur (Laird, 2006; Tuzcu ve ark. 2010).

2.5.7.Gap Junctionların Stabilitelerini Düzenleyen Konneksin Bağlayıcı Proteinler

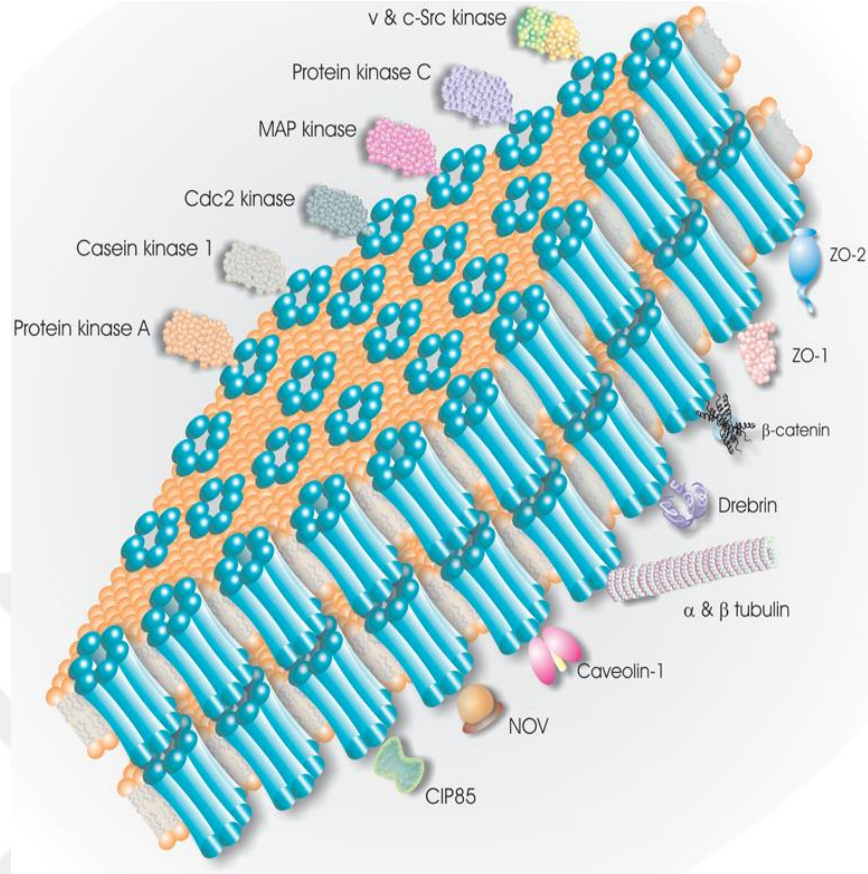
Konneksinlerin bazıları translasyon sonrası fosforile edildiğinden, protein kinazlar ve fosfatazlar da geçici olarak konneksin ailesinin üyeleriyle etkileşime girmektedirler. Bu kinazlar arasında; v-src ve c-src kinaz, protein kinaz C, MAPK (mitojen ile aktive protein kinaz), cdc2 kinaz (siklin bağımlı kinaz olarak da bilinir), kazein kinaz 1 ve protein kinaz A da vardır (Şekil 2.9). Konneksin fosforilasyonunun önemi ve işlevini araştıran çalışmalar mevcuttur. Konneksin-bağlayıcı proteinlerin ikinci bir sınıflandırması, fosforilasyon / defosforilasyon olaylarında yer almayan proteinler tanımlanmaya başladığında ortaya çıkmıştır. Konneksinlerin bağlandığı gösterilen moleküllerden biri; sıkı bağlantılı bir protein olarak düşünülen ZO-1 (zonula occludens 1)'dir. ZO-1, CX43 dışında CX32, CX46 ve CX50 gibi diğer konneksinlere

de bağlanmaktadır. CX43'e bağlanan proteinlerden bir diğeri; MAGUK (membrana bağlı guanilat kinaz) ailesinin ikinci bir üyesi olan ZO-2'dir. MAGUK aile üyelerinin konneksinlere bağlanmasındaki işlevsel rolleri daha yeni anlaşılmaya başlanmıştır. Singh ve ark.'ları (Singh ve ark., 2005; Laird, 2006) hücre döngüsünün farklı aşamalarında CX43'e ZO-1 ve ZO-2'nin bağlanmalarını incelemişlerdir. Bu durum CX43 ile ZO-1 etkileşiminin, gap junctionlarının kararlılığından kaynaklandığını düşünmektedirler. Sıkı kavşaklarda occludinin lokalize ve stabilize edilmesi için MAGUK ailesi üyeleri için de benzer bir rolü olduğu düşünülmüştür. Bu çalışmalara ek olarak, CX43'e bağlanan ZO-1'in gap-junctionlar boyutunu ve istikrarını düzenlemek için etkili olduğu ileri sürülmektedir. MAGUK aile üyelerine bağlanan konneksinler yanında, kanıtlar şimdi β -katenin'in birlikte immüno-çökeltilmesi ve CX43 ile birlikte lokalize olabileceğini düşündürmektedir. Doğrudan veya dolaylı olarak bu etkileşim, β -katenin'in, hücre sinyallenmesinde ve WNT sinyalizasyon yolağı ile çapraz bağlanma aktivitesi ile GJIC (Gap Junction Hücrelerarası iletişimi)'in düzenlenmesinde rol oynama olasılığını gözler önüne sermektedir. Aynı şekilde, CX43'ün CT'sine bağlandığı tespit edilen bir başka potansiyel sinyal molekülü, NOV (nefroblastom aşırı ifade)'dur. Büyüme baskılanmasında CX43-NOV etkileşimlerinin rolü olduğu gösterilmiştir. Mekanik olarak bu protein-protein etkileşimi şaşırtıcıdır, çünkü CX43'ün CT alanının normalde NOV gibi çözünebilir bir salgı faktörü ile karşılaşması beklenmemektedir (Laird, 2006).

Konneksinlerin yaşam döngüsünün düzenlenmesinde rol oynayabilecek bir diğeri protein-konneksin etkileşimi keşfedilmiştir. Hem α hem de β -tübülünün CX43'ün C-kuyruğuna bağlandığı ve mikrotübüller dördüncü transmembran alanının yakınında kodlanmış bir motife bağlandığı iyi bilinmektedir. Bu bulgu, konneksin taşımacılığını

düzenleyen mikrotübüllerin rolünü destekleyen önceki ve son araştırmalarla uyumludur. Bununla birlikte, alternatif olarak, gap-junctionların mikrotübül bağlantı yerleri olarak görev yapabileceği ve dolayısıyla mikrotübül işleviyle ilişkili hücrel aktiviteyi düzenleyebileceği gösterilebilmektedir. Her durumda, Gap junctionlar, hücrelerarası iletişimde işlev görmeye devam edebilir. Aktin bağlayıcı protein drebrin'in ayrıca CX43'ün CT'sine bağlandığı gösterilmiştir ve bu, CX43'ün muhtemelen köprülenmiş mikrofilament olduğunu düşündürmektedir. Drebrinin susturulmasında, hücre yüzeyinde gap junctionlarının korunmasında rolü olduğunu düşünülmektedir. Bir diğer konneksin-etkileşim proteini olan, CIP85 (85 kDa'lık CX43 ile etkileşen protein)'in; CX43'ün iki prolin açısından zengin motifine bağlandığı gösterilmiştir. Benzer şekilde, CX43'ün caveolin-1'e bağlandığı bulunmuştur. Bugüne kadar OCP2 (Corti protein 2 organı) olarak adlandırılan bir E3-ubiquitin ligazın da CX26'ya bağlandığı bildirilmiştir. Konneksinlerin ubiquitinasyon için substrat olduğu kanıtları göz önüne alındığında, her bir gap-junctionun özümsemesi veya bozulması izlenebilmektedir (Şekil 2.11) (Laird, 2006).

Bugüne kadar, CX43 bağlayıcı proteinlerin büyüklüğünün, konneksinlerin yaşam döngüsünün bir bölümünü düzenleyen fonksiyonlar olduğu söylenebilir. Fakat bu etkileşimlerin bir veya daha fazlasının kanalların geçit özelliklerini düzenleyebileceği ihtimaline de dikkat edilmelidir (Laird, 2006).



Şekil 2.11: CX43'e bağlanan proteinler (Laird, 2006).

CX43'ü fosforile ettiği bilinen protein kinazları temsil edilen bir gap-junction plakası üst kısmında gösterilmektedir. Doğrudan veya dolaylı olarak CX43'e bağlandığı gösterilen iskele proteinleri ve fonksiyonları bilinmeyen proteinler, gap-junction plakasının alt kısmında gösterilmektedir. Burada gösterilen tüm proteinlerin, gap-junction plakasının bir parçası olduğu halde CX43'e bağlanmasının zorunlu olmadığı unutulmamalıdır (Laird, 2006).

3.GEREÇ VE YÖNTEM

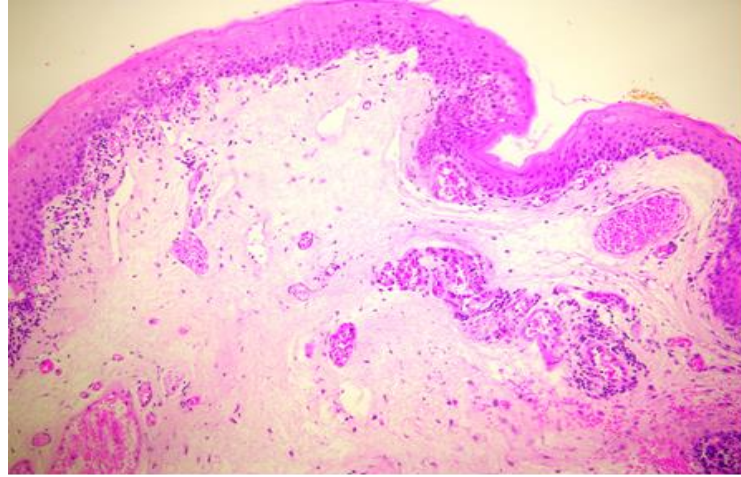
3.1.GEREÇ

3.1.1.Çalışma Grubu

Çalışmaya, Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi Göz Hastalıkları Anabilim Dalı polikliniğine pterjium tanısıyla başvuran 26 (18 erkek; 8 kadın) pterjiumlu olgu dahil edildi. Çalışma da; katılımcıların izni ve bilgisi dahilinde ameliyat esnasında alınan pterjium doku örnekleri hasta grubunu ve aynı hastaların aynı gözüne ait normal konjonktiva dokuları kontrol grubu olarak kullanıldı. Bu çalışma için, Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulun'dan 09.12.2014 tarihinde, 2014/21 toplantı numarası ve 14-KAEK-229 proje numarası ile izin onayı alındı. Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından 2015/26 proje numarası ve TÜBİTAK tarafından 215S692 proje numarası ile desteklendi. Çalışmanın tamamı Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Laboratuvarı'nda yapıldı.

3.1.2.Dokuların Saklanması

Ameliyat sırasında alınan doku örneklerinin bir kısmı histopatolojik incelemeye gönderilerek pterjium tanısı konuldu (Şekil 3.1). Kalan dokular ikiye ayrılarak sıvı azot içerisinde dondurulup, -80°C'de saklandı. İkiye ayrılan dokulardan, birinci grup doku parçaları cDNA elde edilerek gen ekspresyon analizi Gerçek zamanlı PZR ile tespit etmek için kullanılırken, diğer grup doku örnekleri protein izolasyonu yapılarak western blot analizi için kullanıldı.



Şekil 3.1: Pterjium dokusuna ait histopatolojik kesit

(yüzeyde konjunktiva epiteli altta ödemli subepiteliyal mesafelerde konjesyone farklı çaplarda dilate vasküler yapılara ait kesitler izleniyor)

3.1.3.Çalışmada Kullanılan Alet ve Cihazlar

1. -20 Derin Dondurucu (Arçelik)
2. -80 Derin Dondurucu (Nuair, NU-9483E, ABD)
3. Blotlama Sistemi (Biorad, 1704150, ABD)
4. Buzdolabı (Arçelik, 570465 MB, Türkiye)
5. Çalkalayıcı (İka, Almanya)
6. Dikey Elektroforez Seti (Biorad, 1658030, ABD)
7. Distile Su Cihazı (Elga-option Q7, İngiltere)
8. Etüv (Mommert, Almanya)
9. Güç Kaynağı (Biorad, 1645070, ABD)
10. Hassas Terazı(Kern, ABT, WB0750631, Almanya)
11. Homojenizatör (Next Advance Storme 24, BBY24M-CE, ABD)
12. Jel Görüntüleme Sistemi (QUANTUM-ST4, 1000/20M- 09200806)

13. Manyetik Karıştırıcı (Velp Scientifica,F20520162, İtalya)
14. Mikrodalga Fırın (Arçelik MD554, Türkiye)
15. Mikropipet Seti (Gilson, Thermo Scientific, Finnpiquette)
16. Mikrosantrifüj (Mikro120, Hettich Zentrifugen D- 78 532n)
17. Otoklav (HMC, HV25, Almanya)
18. Otomatik pipetler (Gilson, Fransa)
19. pH metre (Hanna Instruments,HI2020W, ABD)
20. Plate (Applied Biosystems, 4346907, İngiltere)
21. Plate yapıştırıcı (Applied Biosystems, 2014005092, İngiltere)
22. PZR Cihazı (Termal Döngü Cihazı (Techne, İngiltere)
23. Qubit (İnvitrogene)
24. Real Time (RT) PZR (Applied Biosystems, İngiltere)
25. Santrifüj (Hettich, D78532, Almanya)
26. Soğutmalı Santrifüj (Hettich, Almanya)
27. Vorteks (Velp Scientifica; F20220176, İtalya)

3.1.4.Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Kitler

Beta merkaptoetanol (Merck, Almanya)

cDNA Sentez Kiti (Gene All, Hyperscript, First strand synthesis kit Katalog no:

601-005, Kore)

HyperScript™ Reverse Transkriptaz Enzimi

10X RTase Reaksiyon Solüsyonu

0.1 M DTT

10 mM dNTP karışımı

ZymAll™ RNase Engelleyici

Oligo (dT)₂₀

Random hexamer (primer)

Nükleaz içermeyen su

Etanol (Sigma-Aldrich Katalog No:E7023, ABD)

GAPDH-antikör (Cell Signaling, Katalog no: 2118S, Hollanda)

NuPAGE LDS Örnek Solüsyonu (Thermo Katalog No: NP0008, ABD)

NuPAGE Reducing Ajan (Thermo Katalog No: NP0004, ABD)

Marker (NZytech Katalog No: MB09002, Portekiz)

Ponceu (Sigma-Aldrich Katalog No: P7170-1L, ABD)

Proteaz inhibitör kokteyli (Santa Cruz Biotechnology Katalog No: SC-29130, ABD)

Qubit Protein Assay Kit (İnvitrogen Katalog No: Q33212, ABD)

Qubit ssDNA Assay Kit (İnvitrogen Katalog No: Q10212, ABD)

Qubit RNA HS-Assay Kit (İnvitrogen Katalog No: Q32852, ABD)

RNA izolasyon kiti (Thermo, Katalog No: 12183018A, ABD)

Lizis Solüsyonu

Yıkama Solüsyonu 1

Yıkama Solüsyonu 2

RNase-İçermeyen Su

RNasezap (Thermo, Katalog No: AM9780, ABD)

Running Solüsyonu

Western Blot Breeze Kit (İnvitrogen, Chromogenic Immunodetection System, Rabbit)

Rabbit Primary Antikör (Katalog No:WB7105)

Bloker/Diluent A

Bloker/Diluent B

Antikor Yıkama Solüsyonu(16X)

Kromojenik Substrat

Sekonder Antikor Solüsyonu

Konneksin 43- antikor (Cell signaling; Katalog No: 3512S, Hollanda)

CX43 Taqman Primer-prob seti (Thermo, ABD)

3.1.5.Tampon ve Çözeltiler

3.1.5.1. RNA eldesinde kullanılan tampon ve çözeltiler

400 µL Lys

+

4 µL B-mercaptoethanol(Lys'nin %1'i olarak şekilde)= LYS Solüsyonu

3.1.5.2.SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi Tamponları

20X MES Solüsyon (Running Solüsyon): 1X olarak hazırladı.

3.1.5.3.Western Blot Tamponları

Bloklama işlemi, Western Blot Breeze Kit (İnvitrogen, Chromogenic Immunodetection System, Rabbit) (Dilüent A: 2ml, Dilüent B: 3ml, Distile su:5ml) kullanıldı.

3.1.5.4.Gerçek Zamanlı PZR'de Kullanılan Taqman Prob

Gerçek Zamanlı PZR'de Kullanılan Taqman Prob Dizisi Tablo 3.1'de verilmiştir.

Tablo 3.1: Gerçek Zamanlı PZR'de Kullanılan Taqman Prob Dizisi

Test	CX43	β-act
Marka	Thermo	Thermo
Katalog No	Hs00748445_s1	Hs01060665_g1

3.2.YÖNTEM

Ameliyat esnasında alınan dokular iki parçaya ayrılarak -80°C 'de saklandı. Saklanan birinci grup doku parçaları gen ifade analizi için kullanılırken, ikinci grup dokular, protein çalışması için kullanıldı.

3.2.1.Dokudan RNA İzolasyonu

RNA izolasyonu için, Thermo marka RNA mini kit (Kat No: 12183018A) RNA izolasyon kiti kullanıldı. İzolasyon aşamaları aşağıda maddeler halinde sıralandığı şekilde uygulandı.

- Çalışma için RNAase'lerden arındırılmış bir ortam hazırlandı. -80°C 'den çıkartılan doku örnekleri buz üzerinde bistüri ile küçük parçalara ayrıldı ve her örnekten 20-25 mg kullanıldı.
- Parçalanan dokuların üzerine 400 μl LYS buffer (400 μL lys + 4 μL B-merkaptöetanol) ve doku hacmi kadar eklenen çelik bilyelerle homojenizatörde 10.000 rpm'de 5dk parçalandı.
- Tam parçalama sağlandıktan sonra bilyeler uzaklaştırıldı ve homojenat yüksek devirde 5 dk. santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrası üst kısım alınarak buna eşit hacimde %70'lik etanol eklendi. Elde edilen lizat vortekslenip mini spin kolona aktarıldı.
- 11.500 rpm'de 15 sn vortekslendi.
- Yıkama Solüsyonu I'den 700 μl eklenerek 11.500 rpm'de 15 sn santrifüj elde edildi.
- Yıkama Solüsyonu II'den 500 μl eklenerek 11.500 rpm'de 15 sn santrifüj elde edildi.

- Bu basamak tekrarlandı.
- Tüpler bir kez de boş olarak 11.500 rpm’de 1-2 dk santrifüj elde edildi.
- Spinler temiz bir ependorf tüpe aktarıldı.
- 30 µl elution Solüsyonu eklenerek oda ısısında 1 dk bekletilip max. hızda 2 dk. Santrifüj edildi.
- Elde edilen RNA - 20°C’de saklandı.

3.2.2.RNA Miktarının Ölçümü

RNA örneklerinin yoğunluk ölçümleri için Qubit 2.0 cihazı ve RNA HS-Assay kit (Q32852) kullanıldı.

3.2.3.RNA’dan cDNA Sentezi

İzole edilen RNA’lardan Gene All, Hyperscript, First strand synthesis kit (Cat no: 601-005) kullanılarak cDNA sentezi yapıldı. Sentez iki aşamda gerçekleştirildi.

1. Aşama

Tablo 3.2: cDNA sentezinde kullanılan 1. aşama bileşenler ve miktarları

Bileşenler	Miktar (1X)
dH ₂ O	7 µL
dNTPs	1 µL
Oligo dt primer	0,5 µL
Random Hexamer	0,5 µL
RNA örneği	5 µL
Total hacim	14µL

Bileşenler eklendikten sonra 65°C’ de 5 dakika PZR cihazında inkübe edildi.

Örnekler daha sonra buz üzerine alındı ve sentezin ikinci aşamasına geçildi.

2. Aşama

Tablo 3.3: cDNA sentezinde kullanılan 2. aşama bileşenler ve miktarları

Bileşenler	Miktar
10x Reaksiyon Solüsyonu	2 µL
0.1 M DTT	2 µL
Enzim (Reverse Transcriptase 200 U/ µL)	1 µL
RNase Engelleyici	1 µL
Total hacim	6 µL

İkinci aşamada Tablo 3.2.’de belirtilen malzemeler eklendikten PZR cihazında 55°C’de 1 saat, 95°C’de 5 dakika inkübe edildi. -20°C’de örnekler çalışma anına kadar bekletildi.

3.2.4.cDNA Konsantrasyon Ölçümleri

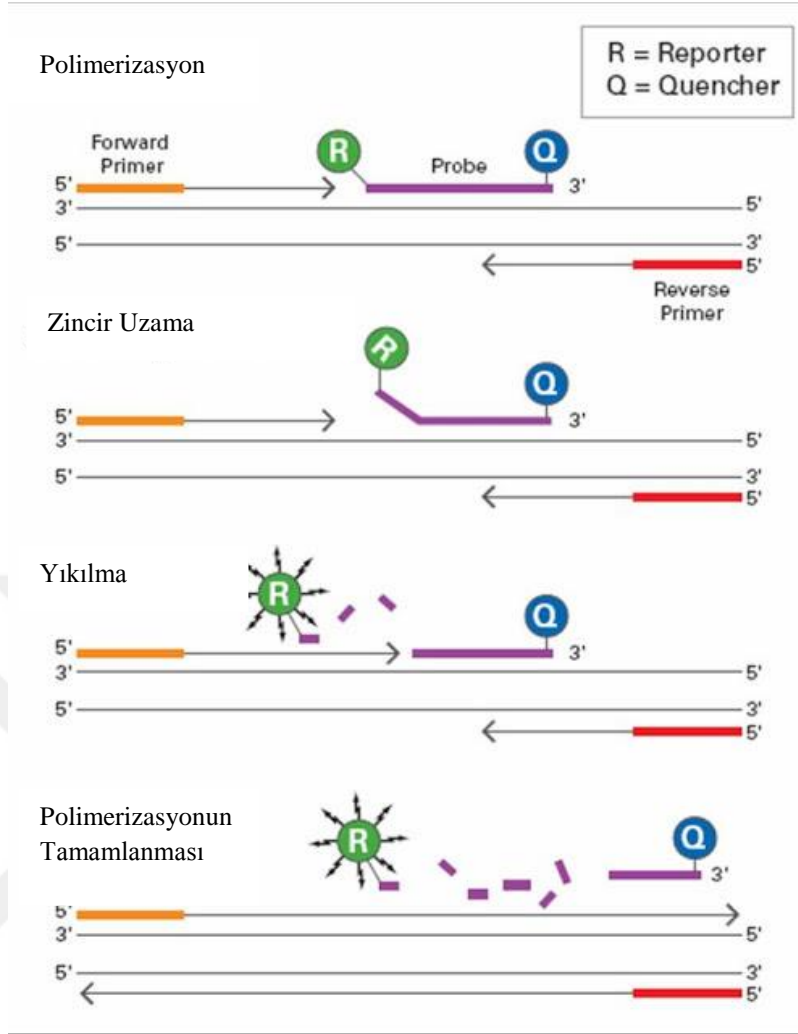
Qubit 2.0 cihazı ile Qubit ssDNA Assay Kit (İnvitrogen, Q10212) kullanılarak cDNA miktarları ölçüldü. Her bir reaksiyonda cDNA miktarı 60 ng olacak şekilde hesaplanarak eklenecek cDNA miktarı her bir örnek için ayrı ayrı hesaplandı.

3.2.5.Konneksin 43 mRNA İfadesi

Pterjium ve normal konjonktiva dokularında Konneksin-43 gen ifadeleri Applied Biosystem StepOnePlus cihazında Taqman temelli Gerçek zamanlı- PZR metodu kullanılarak yapıldı.

3.2.5.1. Gerçek Zamanlı (Real-Time, RT-PZR) PZR

Gerçek Zamanlı PZR (RT-PZR), DNA'nın çoğaltımını ve ürünlerinin miktarını tek bir tüpte belirlemeyi mümkün kılan, PZR çoğaltımını görünür hale getiren ve monitorize edebilen floresan işaretli prob ve boyaların kullanıldığı, floresanın oluşan DNA ile doğru orantılı olarak arttığı bir çoğaltma yöntemidir. "RT- PZR " metodu ile çok az miktardaki biyolojik örneklerden elde edilen DNA'nın çoğalma sayısını sayısal değerlere dönüştürme mRNA'nın düzeyini sayısal olarak belirleyebilme özelliğini hızlı, güvenilir ve hassas bir şekilde ortaya koyulabilmektedir (Günel, 2007; Günel ve Aydın 2009). DNA'nın çoğaltılmak istenilen bölgesinin saptanmasında o bölgeye uygun floresan işaretli proplar kullanılmaktadır. "TaqMan" prob floresan işaretli proplardan biridir. Bu yöntemde, hedeflenen DNA bölgesine komplementer olan ve 5' ve 3' uçlarından floresan veren maddelerle işaretli tek zincirli prob kullanılmaktadır. Probu 5' ucunda "fluorophore" (6-karboksifloresin= 6-FAM) ve 3' ucunda "quencher" (6-karboksitetrametil-rodamin= TAMRA) boya bulunur. 3' uçtaki basılayıcı boya 5' uçtaki boyanın sinyal oluşturmasını engellemektedir. Prob hedef DNA'ya bağlanma durumunda floresan sinyal ölçümü düşüktür. Çoğaltılma sırasında hedef nükleik asit dizisi üzerinde primer bağlanma bölgeleri arasında "TaqMan" proplar bağlanırlar. Primerlerin bağlanmasının ardından yeni zincir oluşmaya başlar. Probu bağlı olduğu bölgeye gelindiğinde Taq DNA polimeraz enzimi 5'→3 nükleaz aktivitesi ile FAM'ı probdan ayırır. Serbest hale geçen FAM sinyal oluşturur. DNA zincir sentezi uzamaya devam eder. Her bir döngüde ürün çoğalımı arttıkça floresanda ona bağlı olarak artmaya devam etmektedir (Günel, 2007)



Şekil 3.2: RT- PZR şeması (Yuan ve ark., 2000)

Çalışmada 5'ucundan FAM ile 3'ucundan ise MBG (minör groove binding) ile işaretli Taqman prob kullanıldı.

Konneksin 43 ve Beta (β) Aktin Primer Dizini;

Konneksin 43 primeri olarak Konneksin Probe set (Assay ID: Hs00748445_s1 Applied Biosystems), β Aktin primeri olarak β Aktin Probe Set (Assay ID: Hs01060665_g1, Applied Biosystems) kullanıldı.

Tablo 3.4: RT-PZR’de kullanılacak tepkime karışımının miktarları

Bileşenler	Miktar
dH ₂ O	(9-2) μ L
Primer Prob(CX43; β Aktin)	1 μ L
cDNA	2 μ L
Mastermix	10 μ L
Total	20 μL

Tepkime Tablo 3.4. ‘de verilen bileşenler kullanılarak 20 μ l hacimde gerçekleştirildi. Konneksin 43 geninin ifade analizinde internal kontrol olarak Beta aktin (β -aktin), negatif kontrol olarak cDNA örneği içermeyen PZR karışımı kullanıldı.

Tablo 3.5: RT- PZR protokolü

50°C	2 dk	
95°C	10dk	} 40X
95°C	10sn	
60°C	1 dk	

3.2.6.Konneksin 43 Geni RT-PZR Sonuçlarının Analizi

Çıkan sonuçlar $2^{-\Delta\Delta Ct}$ methodu ile hesaplandı (Livak ve Schmittgen, 2001).

Hedef gen: CX43; Housekeeping gen: β Aktin

- ✓ ΔCt (Pterjium dokusu)=Hedef Gen Ct-Housekeeping Gen Ct (a)
- ✓ ΔCt (Konjonktivadokusu)= Hedef Gen Ct-Housekeeping Gen Ct (b)
- ✓ $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ (Pterjium dokusu)- ΔCt (Konjonktivadokusu) (c)

(a)-(b)

Kuvvetli değer = $2^{-\Delta\Delta Ct}$

= 2^{-c} Hedef gen ve housekeeping gene göre normalize değer

Elde edilen değerlerin analizi 0,9 – 1,1 aralığına göre yapıldı.

3.2.7.Protein izolasyonu

GeneAll ProteinExTM Animal cell/tissue (Cat. No:701-001) kiti kullanılarak üretici firmanın protokolüne uygun olarak protein izolasyonu yapıldı.

- ✓ Bistüri yardımıyla ufak parçalara ayrılan dokular, dokunun büyüklüğüne göre (20-25mg) belirlenen miktardaki ProteinEx solüsyonu (250 μ l) ve proteaz inhibitör kokteyli (2,5 μ l) çelik bilyeler yardımıyla homojenize edildikten sonra bilyeler uzaklaştırıldı.
- ✓ Örnekler, 5 dk buz üzerinde inkübe edildikten sonra, soğutmalı santrifüjde 16.000xg, 4 °C de 10 dk santrifüj edildi.
- ✓ Süpernatant yani üst kısmı yeni bir ependorf tüpüne alınarak izolasyon işlemi tamamlandı. Elde edilen protein örnekleri çalışma anına kadar -80⁰C’de saklandı.

3.2.8. Protein Miktarının Ölçümü

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

3.2.9. Konneksin 43 Geni Protein Analizi

Western blot, hücre ve moleküler biyolojide kullanılan önemli bir tekniktir. Araştırmacılar bu tekniği kullanarak, belirli proteinleri tanımlayabilirler ve bunu üç şekilde yerine getirebilirler: (1) boyutlarına göre ayırma, (2) katı bir desteğe aktarma ve (3) görselleştirmek için uygun bir birincil ve ikincil antikor kullanarak hedef proteini işaretleme şeklindedir.

Bu teknikte, proteinler, moleküler ağırlığa ve dolayısıyla türüne göre, jel elektroforezi yoluyla ayrılmaktadırlar. Daha sonra ayrılan her protein için jel, uygun bir membrana (Polivinilidendiflorid (PVDF) veya Nitroseluloz membran) aktarılır. Zar daha sonra ilgili proteine özgü belirli antikorlar ile inkübe edilir. Antikorlar sadece ilgili proteine bağlandığında, sadece bir bant görünmelidir. Bandın kalınlığı mevcut protein miktarına karşılık gelmektedir. Böylece mevcut protein miktarını belirlenebilmektedir (Mahmood ve Yang, 2012)

Membran üzerindeki proteinleri tespit etmek için sekonder antikor ile konjuge enzimle reaksiyona girerek sinyal oluşturacak substratların kullanılması gerekmektedir. Yaygın olarak kullanılan substratlar; Kromojenik, Kemilüminesans, Kemifloresanslardır (Karaaslan, 2008).

3.2.9.1. Protein Örneklerinin Hazırlanması

- Qubit fluorometer cihazı ile yapılan ölçüm sonrası elde edilen protein miktar değerine ve transfer sonrası kullanılacak deteksiyon (Kemiluminesans/Kromojenik) yöntemine göre jele yükleyeceğiniz protein miktarı belirlenir.
- Kemiluminesans deteksiyon yöntemi kullanılacak ise protein jeline en az 30 µg; kromojenik deteksiyon yöntemi kullanılacak ise protein jeline en az 50 µg protein yüklemeniz önerilir.
- Deteksiyon yöntemine bağlı olarak jele yüklenmesi gereken minimum miktarı, Qubitte ölçülen protein miktarına bölünüp; A değeri belirlenir (örnek miktarı)
- A değeri kadar proteini µL cinsinden mikrosantrifüj tüpüne ilave edin. A değerini 6,5 µL değerine bölün (B değeri). B değerini 2,5 ile çarpın (C değeri). 0,5 ml mikrosantrifüj tüpüne eklediğimiz örnek üzerine C değeri kadar NuPAGE® LDS Örnek Solüsyonu (4X) ilave edin. B değeri kadar NuPAGE® İndirgeyici Ajan (10X) eklendi (Tablo 3.6).
- Hazırlanan örnekler 70°C’de 10 dk boyunca denatüre edildi. Denatüre ettiğimiz örnekler 2 dk buz üzerine alınarak soğuması sağlandı.

Tablo 3.6: Protein örneklerinin hazırlanmasında kullanılan reaktifler ve miktarları

Reaktif	Miktar
Örnek	A değeri
NuPAGE® İndirgeyici Ajan (10X)	B değeri (A değeri/6,5)
NuPAGE® LDS Örnek Solüsyonu (4X)	C değeri (Bdeğerix2,5)
Deiyonize dH ₂ O	X

3.2.9.2. SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi

20xMES Running Solüsyonundan (ThermoFisher, NP0002) 25 ml bir mezüre alınarak distile su ile 500 ml'ye tamamlandı. (1X MES Solüsyonu)

- ✓ Hazırlanan running solüsyonu ile ilk önce üst solüsyon odasına jel kuyucuklarının üzerini 0,5 cm geçene kadar dolduruldu. Kalan buffer alt solüsyon odasına ilave edildi.
- ✓ Jelin ilk kuyucuğuna en başta olana 8 µL markır (NZY Colour Protein Marker II) ve kalan kuyuculara hazırlanan protein örneğinden 50 µL (total protein miktarı eşitlendikten sonra 50 µg protein içerecek şekilde hesaplanmıştır) protein örneği .%4-12'lik Bis-Tris Gradient jele (İnvitrogen, NuPAGE 4-12% Bis-Tris Gel, CaT: NP0321Box, Lot: 120471ABD) yüklendi.
- ✓ Örnekler 120V'da 50 dk yürütüldü.
- ✓ Yürütme işlemi sonunda jel içerisinde distile su bulunan bir kap içerisine alındı.

3.2.9.3. Blotma

- ✓ Blotlama işleminde Biorad transblotter yarı-kuru blotlama sistemi kullanıldı.
- ✓ Jel, membran (Nitroselüloz), filtre kağıtları ve blotlama süngeri üst üste konularak hazırlanan sandviç, blotlama yapılacak olan tanka yatay olarak yerleştirildi. Sistem güç kaynağına bağlanarak 10 dk'lık sürede blotlama işlemi tamamlandı.
- ✓ Membran dikkatli bir şekilde distile su içerisine alındı.
- ✓ Transfer işleminin başarılı olup olmadığını anlayabilmek için membran Ponceu ile boyandı. Proteinler görüldükten sonra membran Ponceudan yıkayarak uzaklaştırıldı.

- ✓ Bu aşamadan sonra Western Breeze kiti kullanıldı (İnvitrogen, Chromogenic Immunodetection System, Rabbit Primary Antibody Cat:WB7105).
- ✓ Bloklama işlemi için; dilüent A: 2ml, Dilüent B: 3ml, Distile su:5ml eklendi ve yavaş çalkalayıcıda ağzı kapalı bir şekilde 1 saat bekletildi. Membranlar 20ml distile su ile 2x5 dk yıkandı.
- ✓ Yıkama işlemi tamamlanan membranlar 1/500 oranında sulandırılan CX43 primer antikor ve GAPDH primer antikor ilave edilerek, gece boyu çalkalayıcıda bekletildi.
- ✓ Membranlar 3x5 dk 20ml Antikor yıkama solüsyonu ve 2x5 dk distile su ile çalkalayıcıda yıkandıktan sonra üzerine 10ml AP konjuge sekonder antikor eklenerek 1 saat yavaş çalkalayıcıda bekletildi.
- ✓ Daha sonra membranların yıkama işlemi 3x5 dk 20ml Antikor yıkama solüsyonu ile çalkalayıcıda, 2X2 dk 20ml distile su ile hızlı çalkalayıcıda tamamlandı.
- ✓ 5ml kromojenik substrat (İnvitrogen, ABD) eklenerek yavaş 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 ImageJ analiz programı yardımı ile bant kalınlıklarındaki kat artışı oranları hesaplandı.

3.2.10. Verilerin İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi

Pterjium ve normal konjonktiva dokulardaki CX43 mRNA ifade ve Western blot yöntemi ile protein miktarlarının istatistiksel analizi SPSS 18 programı kullanılarak yapıldı. SPSS (Statistical Package for Social Sciences) programında Independent Samples T Test kullanılarak p değerleri elde edildi. Elde edilen p değerlerine göre İstatistiksel olarak $p \leq 0,05$ ise anlamlı, $p > 0,05$ ise anlamlı farklılık olmadığı kabul edildi.



4.BULGULAR

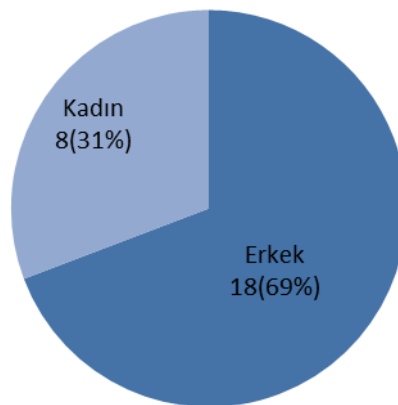
Çalışma grubunu oluşturan hastalar, Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi Göz Hastalıkları Polikliniğine başvurmuş ve pterjium tanısı almış kişilerdir. 26 pterjium tanısı almış bireylerde, pterjium ve aynı pterjiumlu gözüne ait normal konjonktiva dokularında Konneksin 43 gen ekspresyonu ve protein düzeyleri Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PZR) ve Western Blot yöntemleri ile analiz edilmiştir.

Çalışmaya dahil edilen pterjiumlu hastaların demografik ve klinik özelliklerinin dağılımları Tablo 4-1’de belirtilmiştir.

Tablo 4.1: Pterjiumlu hastaların demografik ve klinik özellikleri

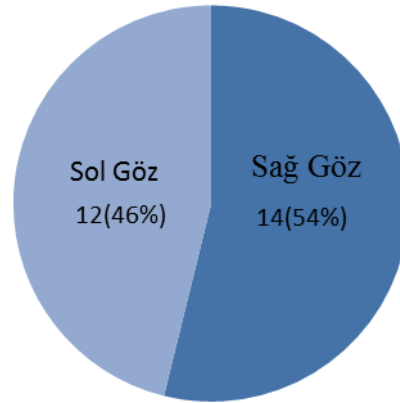
	Pterjium (n=26)
Yaş / yıl, Ort.±S.D.	57.5±7.64
Aralık	8kadın /18erkek
Cinsiyet	
Sağ-sol göz	12sol göz; 14sağ göz

Cinsiyet Dağılımı



Şekil 4.1: Çalışmaya dahil edilen pterjiumlu hastaların cinsiyet dağılımı

Pterjium Dokusu Alman Göz

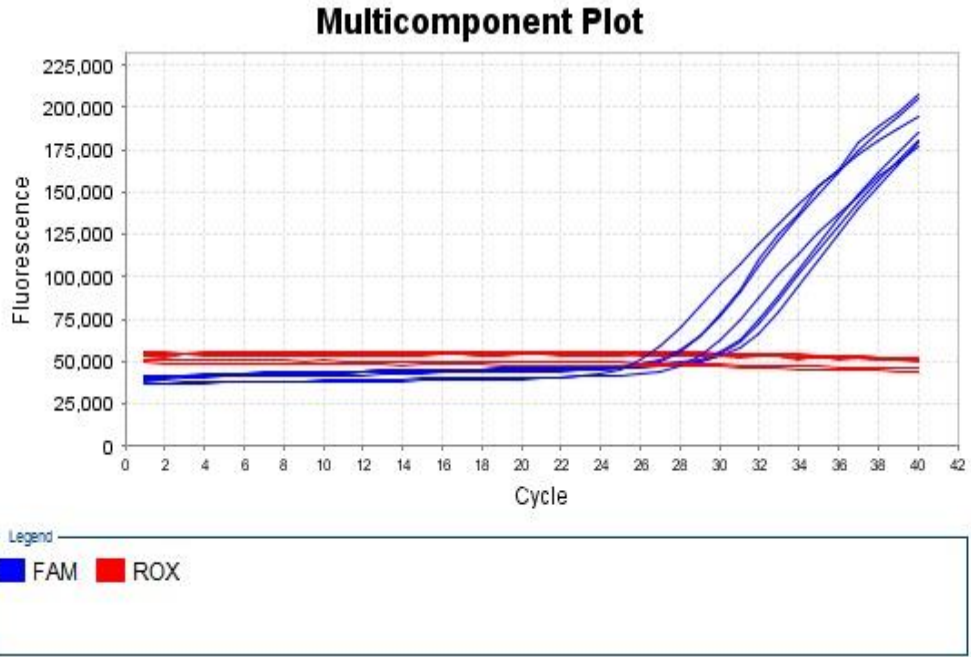


Şekil 4.2:Çalışmada kullanılan pterjium ve normal konjonktiva dokularının alındığı göz

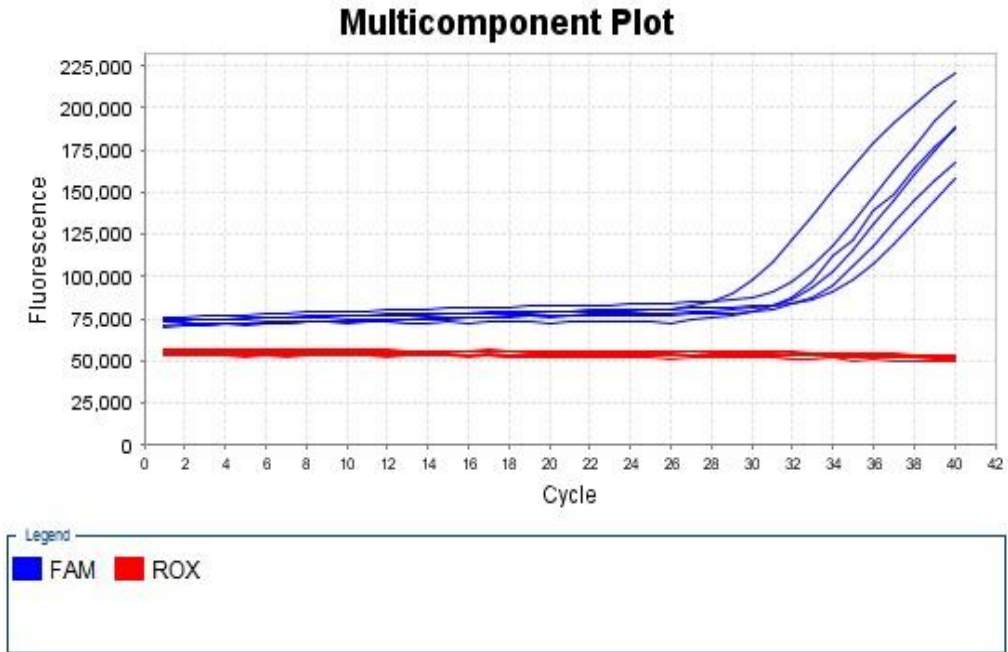
4.1.CX43 mRNA İfade Analiz Sonuçları

mRNA ifade analizi için, çalışmaya dahil edilen 26 Pterjiumlu hastanın pterjium ve sağlıklı konjonktiva doku örneklerinden izole edilen RNA'lerden sentezlenen cDNA ile Applied Biosystems StepOnePlus cihazı ile Taqman temelli Real-Time PZR analizi yapıldı. Referans gen olarak β -aktin kullanıldı. CX43 ve β -aktin genlerinin Ct (Cycle Threshold) değerleri, $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerlerini hesaplamak için kullanıldı.

Elde edilen değerlerin analizi 0,9 – 1,1 aralığına göre yapıldı. 0,9'dan düşük olan değerlerde normal dokuya oranla pterjiyum dokusunda CX43 geninin ifade düzeyinin azaldığı, 0,9–1,1 aralığında ise normal dokuya göre değişmediği ve 1,1 değerinden yüksek değerlerde ise normal dokuya oranla bir artış olduğu kabul edildi (Schmittgen ve Livak, 2008).



Şekil 4.3: Pteridium dokusunda CX43 genine ait RT- PZR görüntüsü



Şekil 4.4: Pteridium dokusunda β -Aktin genine ait RT- PZR görüntüsü

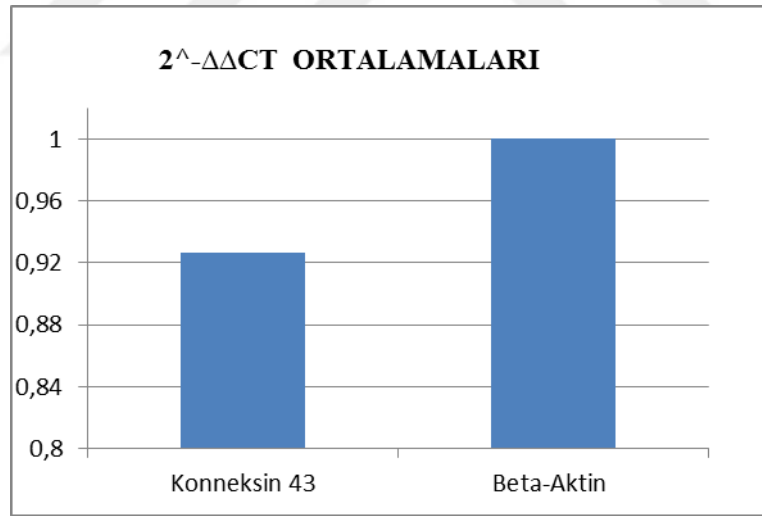
Tablo 4.2: Pterjium ve normal dokulara ait CX43 ve β -Aktin(referans gen) Ct değerleri

HASTA NO	Ct CX43 Pterjium Dokusu	Ct β -Aktin Pterjium Dokusu	Ct CX43 Normal Konjonktiva Dokusu	Ct β -Aktin Normal Konjonktiva Dokusu	2- $\Delta\Delta$ CT
1	34,29	22,9	30,59	20,3	0,46
2	30,92	21,78	34,62	28,86	0,09
3	37,08	28,76	31,73	23,65	0,84
4	32,24	22,4	35,4	25,8	0,85
5	26,24	19,77	27,23	20,65	1,08
6	33,74	18,78	34,19	20,31	0,47
7	36,13	19,98	36,53	25,26	0,03
8	33,71	18,87	32,61	19,38	0,32
9	35,56	27,55	37,04	27,65	2,6
10	28,88	23,2	24,81	23,83	0,03
11	30,96	25,68	33,59	26,82	2,81
12	35,02	21,72	32,47	22,01	0,13
13	36,32	22,81	31,69	22,28	0,05
14	34,71	25,35	27,92	24,45	0,01
15	35,6	24,44	34,36	26,11	0,13
16	32,7	31	29,9	29,1	0,52
17	26,5	26,2	30,6	29,6	1,62
18	29,2	29,6	32,3	31,7	2
19	28,6	28,1	29,5	29,6	0,66
20	30,4	30,4	32,4	32,3	1,07
21	28,9	29	31	30,7	1,31
22	31,1	31,5	31,5	30,8	2,14
23	31,2	31,2	31,7	31,2	1,41
24	31,6	31,3	30,8	30,7	0,88
25	29	29,6	30,3	30,1	1,74
26	30,7	30,8	30,4	30,7	0,87

Tablo 4.3: CX43 ve β -Aktin genine ait Ct, Δ Ct, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ve p değeri

	CX43 CT Ort±ST D	Beta Aktin CT Ort± STD	Δ Ct Ort± STD	$\Delta\Delta$ Ct Ort± STD	$2^{-\Delta\Delta Ct}$ Ort± STD	p
Pterjium dokusu	31,97 ±3,004	25,87±4,20	6,09±5,74	1,04±2, 06	0,927	0,66
Konjontiva dokusu	31,73 ±2,70	26,68±4,10	5,04±4,74	0	1	

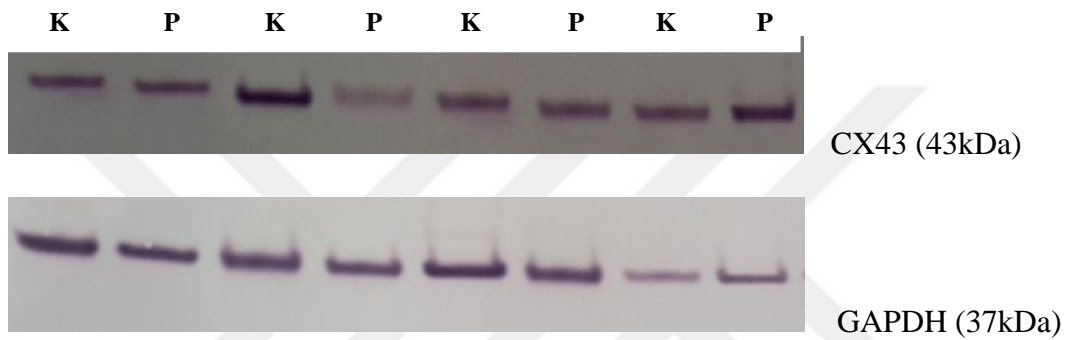
RT- PZR analiz sonuçlarına göre pterjium dokularında CX43 gen ifade düzeyindeki azalmanın normal konjonktiva dokularına göre istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi ($p>0,05$) (Tablo 4.3).

**Şekil 4.5:** Konneksin 43 ve Beta-Aktin Genine ait ortalama $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri

4.2. Western Blot Analiz Sonuçları

Pterjium ve konjonktiva dokusunda CX43 ve GAPDH antikoları ile Western blot analizinde elde edilen bant görüntüleri Şekil 4.6'da gösterilmiştir.

Yapılan bant yoğunluğu ölçümlerine göre pterjium dokularında CX43 protein düzeyindeki azalmanın normal konjonktiva dokularına göre istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi ($p>0,05$) (Tablo 4.4).



Şekil 4.6: Pterjium ve konjonktiva dokularına ait membran görüntüsü

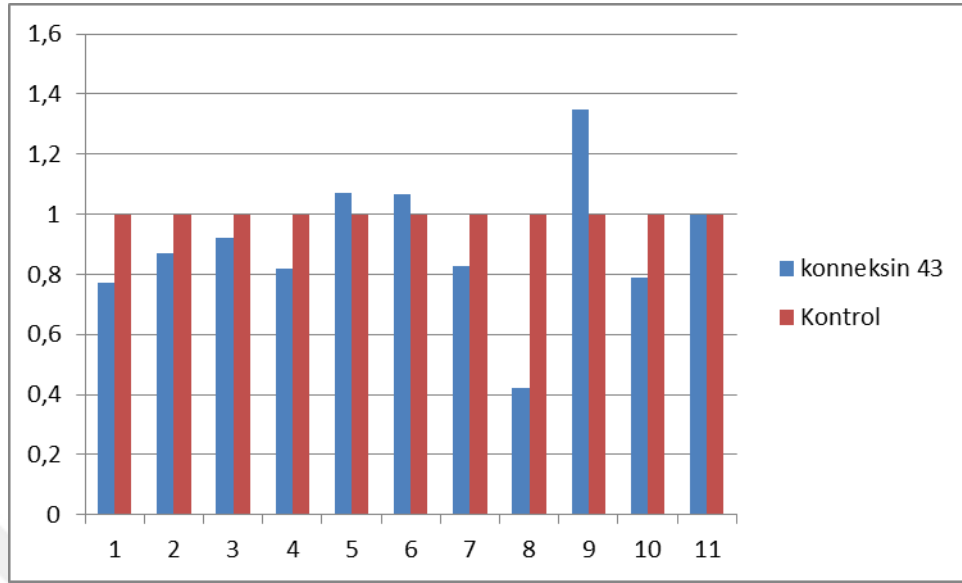
Pterjium CX43 bant değeri/pterjium GAPDH bant değeri= A

Konjonktiva CX43 bant değeri/Konjonktiva GAPDH bant değeri= B

A/B= artış azalış oranı (Tablo 4.4).

Tablo 4.4: CX43 ve GAPDH genine ait p değeri

	CX43/GAPDH (Ort ±Ss)	CX43 Artış Azalış Oranı (Ort± Ss)	p
Pterjium Dokusu	0,63±0,19	0,76±0,31	0,719
Normal Konjonktiva Dokusu	0,77±0,19	1	



Şekil 4.7: Dokulardaki CX43 proteininin ait artış azalış oranları
(pterjium ve konjonktiva dokularında CX43 proteinine ait artış azalış oranları)

5.TARTIŞMA

Pterjiium; temel hücre proliferasyonu, vaskülarizasyon ve kornea epitelyumunun invazyonu ile karakterize, konjonktivanın bening bir büyümesidir. İleri vakalarda görsel fonksiyonu önemli derecede değiştirebilir, alevlenir hale gelebilir ve bölgede kızarıklığa ve tahrişe neden olabilir. Buna ek olarak, pterjiium, oküler yüzey skuamoz neoplazisi de dahil olmak üzere bazı oküler kanserlere ilerleme potansiyeline sahiptir. Pterjiiumun ekvatora yakın bölgelerde yaşıyan popülasyonlarda daha yaygın olarak görüldüğü bilinmektedir. (Liu ve ark., 2013; Cárdenas-Cantú ve ark., 2016). Hastalığın patogenezi açık olmamasına rağmen, ultraviyole (UV) radyasyona bağlı olduğu düşünölmektedir. Alternatif olarak; epigenetik, epitelyal mezenkimal geçiş, anti-apoptotik, anjiyogenik ve lenfanjiyogenik mekanizmalar, ekstraselöler matris modölatörleri ve büyüme faktörleri sıralanabilir (Cárdenas-Cantú ve ark., 2016). Bunlara ek olarak, pterjiium epitelinde p53 proteininin anormal olarak eksprese edildiği bulgusunu takiben, pterjiiumun tümör benzeri, UV'ye maruz kalmayla ilişkilili, kontrolsüz hücre çoğalması olduğu da söylenmektedir (Young ve ark., 2010).

Doku yapısını koruyan kaderin, hücre-hücre yapışma molekülleri (CAM), selektin ve integrin gibi birçok adezyon molekölü vardır. Bir transmembran protein olan E-kaderin, embriyogenez sırasında doku ve organ oluşumunda ve gelişiminde rol oynamakta ve aynı zamanda, E-kaderin, komşu hücreleri kalsiyuma bağımlı homofilik etkileşimler yolu ile birbirine bağlamaktadır. E-kaderinlerin sitoplazmik kısmı ise hücre iskeletlerini α -katenin, β -katenin ve p120ctm proteinleri aracılığıyla birbirine bağlamaktadır. β -katenin, sadece hücresel yapışmaya katkıda bulunmakla kalmayıp, aynı zamanda erken gelişim sırasında eksen tayini ve organogenezinde önemli olan

Wingless/Wnt (Wg/Wnt) sinyalleme yolağında merkezi bir yapı oluşturmaktadır. Mitotik bir sinyal olmadan, serbest sitoplazmik β -katenin, adenomatöz polipozis coli (APC) tümör baskılayıcı protein, Axin ve serin treonin glikojen sentetaz kinazdan oluşan protein kompleksi tarafından fosforilasyon yoluyla ubiquitin-proteazom sistemi tarafından bozulmuş olur. Bu mekanizma, düşük serbest sitoplazmik β -katenin seviyesini korur. Bununla birlikte, serbest sitoplazmik β -katenin, mitotik sinyaller (Wnt proteini) veya E-kaderinin azaltılmış ifadesi ile birlikte artar. Wnt proteininin kökeni ile aynı olan reseptöre bağlanması, APC-Axin-GSK-3 β protein kompleksinin regülasyonunu azaltan dishevelled (Dsh) proteinin aktivasyonuna yol açar. Dolayısıyla, sitoplazmik β -kateninin bozunmasını önler ve sitoplazmada birikir. Buna ek olarak, azaltılmış E-kaderin, E-kaderin-katenin kompleksinin parçalanmasına ve serbest sitoplazmik β -kateninin artmasına yol açar. E-kaderin ayrıca epitel hücre yapışmasına aracılık eder. Serbest sitoplazmik β -katenin artmasıyla çekirdeğe transloke olur ve transkripsiyon faktörleri LEF (Lenfoid Arttırıcı Faktör) ve TCF (T Hücre Faktörü) ile bağlanır ve bu durum hedef genlerin aktivasyonu ile sonuçlanır. Siklin D1 ve c-myc gibi hedef genler, hücre proliferasyonundan ve neoplastik dönüşümden sorumludur. Bu nedenle E-kaderin epitel farklılaşmasına katkıda bulunur. Genetik düzenleyici elementlerin metilasyonu, epigenetik değişim ve gen inaktivasyonunda da rol oynamaktadır (Young ve ark., 2010).

Tümör supresör genlerin promotör bölgesinin metilasyonu ve bununla ilişkili gen sessizliği, insan kanserlerinin birçoğunun patogenezi ile ilişkilidir. Promotor bölgedeki CpG adalarının metilasyonu, gen ifadesini susturur. Bununla birlikte, hipermetillenmiş DNA lokusundaki mekanizmalar belirsizliğini korur. E-kaderin geninin (CDH1) promotörünün CpG ada hipermetilasyonu, E-kaderinin

inaktivasyonunda katkıda bulunan bir faktördür ve bu durum birçok kanser türü ile ilişkilidir. E-kaderin geninin promoter bölgesinde fonksiyon kaybettiği düşünülen bir çalışma yapılmış ve gen mutasyonlarının yanında, promoter bölgesinde epigenetik değişiklikler (örneğin gen düzenleyici unsurların hipermetilasyonu) olduğu da bulunmuştur (Young ve ark., 2010). Konneksinler, hücre-hücre temas bölgelerine E-kaderin ve β -katenin ile birlikte, hücreleri birbirine bağlayan ve gap junctionları oluşturan heksameric hemikanallar içine oligomerize olurlar. Gap junctionlar, çözünen maddelerin, metabolik öncüllerin ve elektrik akımlarının hücrelerarası geçişine izin vermektedir. Kaderin bazlı hücre adezyonunun inhibisyonu gap junction düzeyini inhibe ederken, güçlü bağlanma olmayan hücrelerde rekombinant kaderinlerin üretimi, konneksin fosforilasyonunu ve hücre-hücre iletişimini arttırmaktadır (Hills ve ark., 2012). Konneksinler, gap junctionlarla plazma membran alanlarında birleşir ve hücreler arası iyonların ve küçük moleküllerin geçişine olanak sağlarlar. Aynı zamanda gap junctionların hücre içi iletişim, hücre büyümesini ve farklılaşmasını düzenleme ve doku homeostazisini koruma gibi önemli görevleri vardır. Bu tip hücre iletişimi, kanser gelişimi sırasında sıklıkla bozulmaktadır. Konneksin protein ailesinin çeşitli üyelerinin, tümör baskılayıcılar olarak işlev gördüğü gösterilmiştir. (Zhao ve ark., 2013; Sirnes ve ark., 2015).

Önceki çalışmalar, tümör baskılayıcı gen grubu olan konneksinlerin kemoterapi için potansiyel anti-onkojenik hedefler olduğunu ve konneksin ifadesinin artmasının birçok kanser türünde anti-tümör ilaçlara karşı duyarlılığı artırabildiğini göstermiştir. Konneksin ifadesinin azalması ve gap junctionların kaybolması da yine karsinogenezde önemli olaylardır. Konneksin 43 (CX43), konneksinlerin gap junction protein ailesinin bir üyesidir ve gap junctionları temin etmek için farklı dokularda geniş ölçüde ifade edilmektedirler. CX43 ifadesinin birçok kanser türünde azalması, CX43 ekspresyon

seviyesinin bazı kanserlerle ilişkili olabileceğini düşündürmüştür (Zhao ve ark, 2013; Wang ve ark., 2017).

Pterjium, hücre proliferasyonu, invazyon ve rezeksiyon sonrası tekrarlama gibi kanser hücrelerine benzer özellik göstermektedir. Proliferatif aktivitenin artması ile ilişkili proteinler, düşük hücre apoptozu ve malignite sağlıklı konjonktiva ile karşılaştırıldığı zaman pterjiumun epitel hücre yüzeyinde aşırı derecede eksprese olduğu bulunmuştur. Bu proteinlerin farklı kanser tiplerinde, altta yatan neoplastik durumlarda artması, tümörün proliferatif aktivitesinin değerlendirilmesinde kullanılmıştır. DNA metilasyon modellerindeki değişimlerin pek çok kanser tipinde yaygın olması pterjium ve kanser arasındaki ilişkiyi artırmaktadır (Cárdenas-Cantú ve ark., 2016). Bizim çalışma grubumuzu oluşturan hastalarda pterjium ve normal konjonktiva dokularında CX43 RNA ifade düzeyi ve protein miktarı arasındaki bağlantı araştırıldı. 26 pterjiumlu hastanın, pterjium ve normal konjonktiva dokularında gen ifade ve protein düzeylerine bakıldı. Elde ettiğimiz verilere göre pterjium dokusundaki hem gen ifadesi hem de protein seviyelerindeki azalmalar istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0.05$).

Zhao ve ark. yapmış oldukları bir çalışmada küçük hücreli olmayan akciğer kanserli (NSCLC) hastaların normal ve primer akciğer karsinom dokusunda CX43 ve E-kaderinin protein ve mRNA düzeylerini araştırmışlardır. Her iki proteinin pozitif ifade oranları, komşu normal dokularda primer akciğer karsinom dokularına göre daha yüksek bulunduğu gösterilmiştir. CX43 ve E-kaderin proteininin bu oranları, NSCLC ilerlemesi dışında histolojik tip, klinik evre, kanser hücre farklılaşması ve lenf nodu metastazı ile de ilişkilendirilmiştir (Zhao ve ark., 2013). Bir başka çalışmada, yine NSCLC'de CX43 ve E-kaderin arasındaki ilişki incelenmiştir. Akciğer kanseri hücrelerinin hücre döngüsü ve proliferasyonunu incelemişlerdir. Hem CX43 hem de E-

kaderinin azalmış ifadesinin kötü diferansiyasyon ve NSCLC lenf nodu metastazı ile ilişkili olduğu sonucuna varılmıştır (Xu ve ark., 2008).

Sirnes ve ark. yapmış oldukları çalışmada, kolorektal tümörlerde CX43'ün, kısmen apoptoz artırarak, kolon kanseri hücrelerinin büyümesini negatif olarak düzenlediğini bulmuşlardır. Buna ek olarak, CX43'ün β -katenin ile birlikte lokalize olduğu ve Wnt sinyalini azalttığı görülmüştür. Çalışma, CX43'ün kolorektal kanser de tümör baskılayıcısı olarak etki ettiği ve kolorektal kanser gelişimi sırasında CX43 ifade kaybının hasta sağkalımının azalması ile ilişkili olduğunu düşündürmektedir. Ayrıca, çalışma sonuçlarına göre, CX43'ün kolorektal kanseri önleme ve tedavisindeki bir prognostik belirteç olarak değerlendirilebileceği üzerinde durulmuştur. CX43'ün hücre büyüme kontrolü ve farklılaşmasında önemli rol oynadığı ve sıklıkla insan kanserlerinde düzensiz olduğu bilinmektedir. Bununla birlikte, CX43'ün kanser gelişimindeki fonksiyonel ve klinik önemi anlaşılamamıştır. Burada, CX43'ün, hücre içi iletişimde gap junction kaybı ile ilişkili olan, kolon kanseri hücre dizileri ve kolorektal karsinomlarında regülasyonunun azaldığı gösterilmiştir. Bu verilere göre, CX43'ün bir kolorektal kanser tümöründe baskılayıcı protein olabileceği sonucuna varılmıştır (Sirnes ve ark., 2012).

Bir başka çalışmada yine, konneksin protein ailesinin kolorektal kanser gelişiminde önemli rollere sahip olduğu gösterilmiştir. Normal kolonik epitelyal dokuda, özellikle üç konneksin izoformu, konneksin 26 (CX26), CX32 ve CX43'ün, protein seviyesinde ifade edildiği gösterilmiştir. Kolorektal kanser gelişimi, konneksin ekspresyonunun kaybı veya konneksinlerin plazma membranından hücre içi bölümlere yer değiştirmesi ile ilişkilidir. Transkripsiyonel seviyede kolorektal karsinomlarda konneksinlerin regülasyonu azalmaktadır. Son çalışmalar, CX43'ün, Wnt / γ -katenin

yolağına müdahale ederek kolon kanseri hücrelerinin büyümesini kısıtlayabildiğini göstermektedir. Bu da konneksinlerin, kolorektal kanserde prognostik belirteç potansiyeline sahip olabileceğine dair kanıtları daha da artırmaktadır (Sirnes ve ark. 2015).

Konneksinlerin, kanserlerde regülasyonu azaltması nedeniyle tümör supresör olarak bilinmesine rağmen, bazı yeni kanıtlar, metastaz dahil olmak üzere, sonraki aşamalarda, tümör ilerleyişini kolaylaştıran rollere de sahip oldukları gösterilmeye başlanmıştır (Tsai ve ark., 2018). şimdiye kadar, meme tümörü oluşumu ve ilerlemesinde CX43'n işlevini belirlemek için bir dizi araştırma çalışması yapılmıştır. Primer tümörlerde araştırmalar, meme tümörlerinde CX43 ifade düzeyinin normal insan meme dokusuyla karşılaştırıldığında değiştiğini göstermektedir. Bazı raporlar CX43 düzeylerinin azaldığını gösterirken, diğer kanıtlar CX43 düzeylerinin arttığını ve protein lokalizasyonunun plazma membranından sitoplazmaya geçtiğini göstermektedir. Her iki durumda da, hakim olan teori, göğüs tümör hücrelerinin, primer tümörler içinde, gap junctionların intraselüler iletişimini azaltmasıdır. Mevcut görüş, CX43'n hücreler arası iletişim kaybının, malignitede erken bir olay olmasıdır. Bununla birlikte, bu iddiayı desteklemek için ek kanıtlara ihtiyaç olduğu düşünülmektedir (Phillips ve ark., 2017). Ayrıca, konneksinlerin ekspresyonunu, modifikasyonunu, stabilitesini ve lokalizasyonunu düzenleyen en önemli faktörlerden biri, hormona bağımlı kanserlerde hormon reseptörleridir. Hormonların ve hormon reseptörlerinin, konneksin ekspresyonunu modüle edebildiğini ve meme kanseri ilerlemesi sırasında konneksinlerin hücresel kontrolünde kritik rol oynayabildiğini düşünmek mantıklıdır. Östrojen reseptöründe (ER) -pozitif meme kanserlerinde, tamoksifen ve fulvestrant yaygın olarak kullanılan terapötik ajanlardır ve ER sinyalizasyonunu

değiştirdiği düşünülmektedir. Tsai ve ark.'larının yaptıkları bir çalışmada, ER-pozitif meme kanseri hastalarında CX43'ün rolü ve CX43 ile ER arasındaki ilişki araştırılmıştır. ER'nin inhibisyonunun, CX43 ubiquitinasyonuna yol açtığını bulmuşlardır. Bu bulgular, hücre göçünü pozitif olarak düzenleyebilen CX43 ifadesinin, ER-pozitif meme kanseri hücresinde ER'ye bağımlı olduğunu göstermektedir (Tsai ve ark., 2018).

Bir başka çalışmada, göğüs epitelini çevreleyen fibroblastlarda ve endotelial hücrelerde CX43 ifade düzeyi araştırılmıştır. Meme kanserinde CX43'ün rolü hala tartışmalı bir konudur. Bir yandan, CX43 uzun süredir tümör baskılayıcı olarak kabul edilmekte, diğer yandan ise kanser hücre dizilerindeki mRNA ve protein seviyesinde ya da tümörlerde anormal lokalizasyon ve fosforilasyonda yetersiz olarak ifade edildiği söylenmektedir. CX43'ün kanserdeki rolünün dokuya ve kanser evresine özgü olabileceği ve hatta bazen tümör ilerlemesini artırabileceğini düşündüren yeni çalışmalar da yapılmıştır. Busby ve ark. yapmış oldukları çalışmada, CX43 ifadesinin tümör alt tiplerinin her biri ile kanser ilerlemesi sırasında ilişkili olduğunu göstermişlerdir. Özellikle, CX43 ifadesinin büyük ölçüde kanser alt tiplerine bağlı olduğu üzerinde durmuşlardır. Çalışma sonuçlarına göre; CX43'ün ifade düzeyinin bir grup alt tipte yüksek, diğer grup alt tipte ise düşük olarak gözlemlenmiştir. Sonuç olarak, CX43'ün tümör supresör veya kanser progresyonu ile ilişkili olduğu ifadesini netleştirebilmek için kanserlerin alt tiplerinin daha iyi anlaşılması gerektiği fikrine varmışlardır (Busby ve ark., 2018).

Kirichenko ve ark., yapmış oldukları çalışmalarında çeşitli derecelerde glial tümör örneklerinde CX43 ifade düzeyini araştırmışlardır. Glial tümörler normal doku ile karşılaştırıldığında CX43 ifadesinin değişen modeli gösterilmiştir. En kötü huylu beyin

gliomlarında genellikle CX43'ün ifadesinde bir azalma olduğu bulunmuştur. Düşük CX43 ifade seviyeleri, hem astroglial fonksiyonel gap junctionlarında hem de semikanallardaki azalmayı yansıtabilmektedir. CX43'ün sitoplazmik ve nükleer ifadesinin, proto-onkogen tirozin-kinaz Src ve protein kinaz C gibi bir dizi kinazın anormal aktivitesi ile ilişkili olmasının muhtemel olduğu düşünülmektedir (Kirichenko ve ark., 2017).

Wang ve ark. yapmış oldukları bir diğer çalışmada, *Helikobakter pilori* (*H. pilori*) enfeksiyonu sonrası mide mukozasındaki anormal CX32 ve CX43'ün ifade analizlerini yapmışlardır. *H. pilori* enfeksiyonu, henüz tam olarak anlaşılmayan kanserojen mekanizmaları ile mide kanseri için önemli bir risk faktörüdür. CX32 ve CX43, gastrik epitelyal hücreler arasındaki gap junctionların kilit üyeleridir. *H. pilori* enfeksiyonu ile ilişkili mide karsinogenezisi sırasında CX32 ve CX43, mRNA ifade düzeyleri kademeli olarak azalmıştır ve bu durumun genlerin promotörünün hipermetilasyonu ile ilişkili olduğu düşündürmüştür (Wang ve ark., 2014).

Dai ve ark. yaptıkları bir çalışmada, tümör hücresi büyümesi üzerinde inhibitör etkisi olduğu bilinen ve bitkisel bir mantar olan *Ganoderma lucidum* (*G. Lucidum*) ile insan yumurtalık kanseri hücreleri HO 8910 (HOCC) ve insan birincil yumurtalık hücrelerini (HPOC) tedavi etmişler ve CX43'ün ifade miktarlarını ölçmüşlerdir. Çalışma sonuçları, *G. lucidum* tedavisinin doza bağımlı CX43 ifadesinin arttırdığını ve buna bağlı olarak yumurtalık kanser hücresinin (HOCC'de) proliferasyonunun azaldığını göstermişlerdir (Dai ve ark. 2014).

Zhang ve ark.'ları yapmış oldukları bir başka çalışmada; hücre-hücre iletişimini kolaylaştıran gap junction alt birimleri olan konneksinlerin bozulmuş ifadesinin, prostat kanseri büyümesinde rol oynadığını düşünmüşlerdir. Prostat kanseri ilerlemesinde

konneksinlerin rolünü aydınlatmak için, malignite spektrumlu prostat kanseri hücre hattında konneksin ifade düzeyini araştırmışlardır. Tüm konneksin alt birimlerinin transkriptleri tespit edilmiş ve CX43, artmış metastatik potansiyeli olan hücrelerde hem RNA hem de protein seviyelerinde belirgin bir yükselme göstermiştir (Zhang ve ark., 2015).

Tittarelli ve ark.'ları yapmış oldukları çalışmada, CX43'ün dört farklı insan melanoma hücre hattında hücre proliferasyonu ve apoptozdaki rolünü araştırmışlardır. CX43 kanal aktivitesinin, spesifik inhibisyonu, melanoma hücre proliferasyonunu hızlandırırken, CX43'ün aşırı ifadesi, gap junction bağlanmasını arttırdığı ve hücre büyümesini azalttığı bulunmuştur. Dahası, bir hücre hattında CX43 aşırı ifadesinin proliferasyon oranlarını azalttığı ve bu melanom hücrelerinde apoptoza yatkınlığı artırdığını bulmuşlardır. CX43'ün melanoma büyümesini, apoptoz ve metastazını içsel olarak kontrol etmede önemli bir rol oynadığını vurgulamaktadırlar. Sonuç olarak, bu sonuçlar melanom hücrelerinde CX43 ifadesinin, GJIC'ye bağlı bir mekanizma yoluyla hem proliferasyon hem de sağkalım oranlarını etkileyen tümörjenik ve metastatik potansiyelini azalttığını göstermektedir (Tittarelli ve ark., 2015).

Sonuç olarak, tüm bu veriler ışığında günümüze kadar yapılmış olan çalışmaların bazılarında CX43'ün mRNA ve protein seviyelerinin bazı kanser türlerinde azaldığı, bazılarında ise artmış olduğu ve bu sonuçların farklı etkileri olduğu gösterilmektedir. Bu çalışmaların çoğunda sınırlı sayıda örnek analiz edilmiştir. Bazı çalışmalarda da kanserlerin alt tipleri sınıflandırılmamıştır. Bizim sonuçlarımızı değerlendirecek olursak, çalışmamızda; pterjium ve konjonktiva dokularında, CX43 gen ekspresyonu ve protein miktarları analiz edildi. Veri sonuçlarımıza göre pterjium dokularında CX43 gen ifade ve protein düzeyindeki azalmaların normal konjonktiva

dokularına göre istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi ($p>0.05$). Pterjiumun kanser benzeri bir doku ve CX43'ün tümör supressör bir gen olması pek çok çalışmada teyit edilmesine rağmen, bizim çalışmamızda bu verileri doğrular nitelikte sonuçlar elde edilememiştir. Çalışmamız, pterjium hastalarında CX43 gen ifade ve protein miktarının belirlendiği Türk toplumunda yapılmış, literatürdeki ilk çalışma olması, yapılacak yeni çalışmalara fikir vermesi açısından önemlidir.

CX43 gen ifade analizleri ve protein miktar tayini sonuçlarımızın pterjium ve konjonktiva dokularında istatistiksel olarak anlamlı çıkmaması CX43 ile pterjium arasında önemli bir ilişki olmadığını göstermektedir. Ancak, konu ile ilgili ileriki çalışmalarda, pterjium dokusunda CX43 metilasyon modellerine bakılabilir, pterjium nükslerindeki CX43'ün ifade düzeyleri araştırılabilir ya da konneksin gen ailesine ait diğer alt tipler ile çalışılabilir. Bu yeni çalışmaların yapılmasıyla pterjiumda CX43'ün rolünün daha net bir şekilde anlaşılabileceğini düşünmekteyiz.

6.KAYNAKLAR

- Academic.** Limbus Cornea. https://medicine.academic.ru/137051/limbus_corneae (Erişim tarihi:11.10.2018)
- Ando, R., Kase, S., Ohashi, T., Dong, Z., Fukuhara, J., Kanda, A., Murata, M., Noda, K., Kitaichi, N., Ishida, S. (2011).** Tissue factor expression in human pterygium. *Mol Vis.* Jan 8;17:63-9.
- Anguria, P., Kitinya, J., Ntuli, S., Carmichael, T. (2014).** The role of heredity in pterygium development. *Int J Ophthalmol.* 7(3):563-573.
- Aslankurt, M., Yazıcı, A. T., Astam, N. (2003).** Pterijum Etiyoloji. *Tip Araştırmaları Dergisi.*1(2): 39-42.
- Aspiotis, M., Tsanou, E., Gorezis, S., Ioachim, E., Skyrilas, A., Stefaniotou, M., Malamou-Mitsi, V. (2007).** Angiogenesis in pterygium: study of microvessel density, vascular endothelial growth factor, and thombospondin-1. *Eye.* 21, 1095-1101.
- Barba-Gallardo, L.F., Ventura-Juárez, J., Kershenobich, Stalnikowitz, D., Gutiérrez, Campos, R., Torres-Bernal, E., Torres-Bernal, L.F. (2013)** Overexpression of human cystatin C in pterygium versus healthy conjunctiva. *BMC Ophthalmol.* Feb 27;13:6.
- Bautista-de Lucio, V.M., López-Espinosa, N.L., Robles-Contreras, A., Pérez-Cano, H.J., Mejía-López, H., Mendoza, G., Jiménez-Martínez, M.C., Garfias, Y. (2013).** Overexpression of peroxiredoxin 2 in pterygium. A proteomic approach. *Exp Eye Res.* 2013 May;110:70-5.
- Boengler, K., Schulz, R., Heusch, G. (2006).** Connexin 43 signalling and cardioprotection. *Heart;* 92:1724–1727.
- Busby, M., Hallett, M.T., Plante, I. (2018).** The Complex Subtype-Dependent Role of Connexin 43 (GJA1) in Breast Cancer. *Int J Mol Sci.* Feb 28;19(3).
- Cárdenas-Cantú, E., Zavala, J., Valenzuela, J., Valdez-García, J. E. (2016).** Molecular Basis of Pterygium Development. *Semin Ophthalmol.* ;31(6):567-83.
- Chao, S.C., Hu, D.N., Yang, P.Y., Lin, C.Y., Nien, C.W., Yang, S.F., Roberts, J.E. (2013).** UltravioletA irradiation upregulated urokinasetype plasminogen activator in pterygiumfibroblasts through ERK and JNK pathways. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2013 Feb 5;54(2):999-1007.
- Chen, P.L., Cheng, Y.W., Chiang, C.C., Tseng, S.H., Chau, P.S., Tsai, Y.Y. (2006).** Hypermethylation of the p16 gene promoter in pterygia and its association with the expression of DNA methyltransferase 3b. *Mol Vis.* 2006 Nov 17;12:1411-6.
- Chen, P.L., Yeh, K.T., Tsai, Y.Y., Koeh, H., Liu, Y.L., Lee, H., Cheng, Y.W. (2010).** XRCC1, but not APE1 and hOGG1 gene polymorphisms is a risk factor for pterygium. *Molecular Vision;* 16:991-996

- Chui, J., Coroneo, M. T., Tat, L. T., Crouch, R., Wakefield, D., and Nick Di Girolamo. (2011).** Ophthalmic Pterygium: A Stem Cell Disorder with Premalignant Features. *Am J Pathol.* Feb;178(2):817-27.
- Cimpean, A.M., Sava, M.P., Raica, M. (2013).** DNA damage in human pterygium: one-shot multiple targets. *Mol Vis.*;19:348-56.
- Coroneo, M.T., Di Girolamo, N., and Wakefield, D. (1999).** The pathogenesis of pterygia. *Current Opinion in Ophthalmology*, 10:282–288.
- Dai, S., Liu, J., Sun, X., Wang, N. (2014).** Ganoderma lucidum inhibits proliferation of human ovarian cancer cells by suppressing VEGF expression and up-regulating the expression of connexin 43. *BMC Complement Altern Med.* 14(1):434.
- Di Girolamo, N., Chui, J., Coroneo, M.T., Wakefield, D. (2004).** Pathogenesis of pterygia: role of cytokines, growth factors, and matrix metalloproteinases. *Prog Retin Eye Res.* Mar;23(2):195-228.
- Di, W.L., Rugg, E.L., Leigh, I.M., Kelsell, D.P. (2001).** Multiple epidermal connexins are expressed in different keratinocyte subpopulations including connexin 31. *J Invest Dermatol.* Oct;117(4):958-64.
- Engelsvold, D.H., Utheim, T.P., Olstad, O.K., Gonzalez, P., Eidet, J.R., Lyberg, T., Trøseid, A.M., Dartt, D.A., Raeder, S. (2013).** miRNA and mRNA expression profiling identifies members of the miR200 family as potential regulators of epithelial-mesenchymal transition in pterygium. *Exp Eye Res.* Oct; 115:189-98.
- GeneCard.** GJA1 Gene in genomic location. <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CX43> (Erişim tarihi:11.10.2018)
- Grosely, R., Sorgen, P.L. (2013).** A history of gap junction structure: hexagonal arrays to atomic resolution. *Cell Commun Adhes.* Feb; 20 (1-2):11-20.
- Günel, T., (2007).** Gen Anlatımının Kantitatif Analizi “Real-Time PZR. *Turkiye Klinikleri J Med Sci.*, 27:763-767.
- Günel, T., Aydınli, K. (2009).** “Real-Time PCR” ve Uygulama Alanları. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi.* 2(2): 43-45.
- Hills, C.E., Siamantouras, E., Smith, S.W., Cockwell, P., Liu, K.K., Squires, P.E. (2012).** TGF β modulates cell-to-cell communication in early epithelial-to-mesenchymal transition. *Diabetologia.* Mar;55(3):812-24.
- Hou, A., Lan, W., Law, K.P., Khoo, S.C., Tin, M.Q., Lim, Y.P., Tong, L. (2014).** Evaluation of global differential gene and protein expression in primary Pterygium: S100A8 and S100A9 as possible drivers of a signaling network. *PLoS One.* 2014 May 13;9(5):e97402.
- Ismail, R., Rashid, R., Andrabi, K., Parray, F.Q., Besina, S., Shah, M.A., Ul Hussain, M. (2014).** Pathological Implications of Cx43 Down-regulation in Human Colon Cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*, 15 (7), 2987-2991.
- Karaaslan Ç. (2008).** “Western Blot” Tekniği. *Astım alerji İmmünoloji*, 6(1):38-40.

- Kase, S., Osaki, M., Sato, I., Takahashi, S., Nakanishi, K., Yoshida, K., Ito, H., Ohno, S. (2007).** Immunolocalisation of E-cadherin and b-catenin in human pterygium. *Br J Ophthalmol.* Sep;91(9):1209-12.
- Kase, S., Takahashi, S., Sato, I., Nakanishi, K., Yoshida, K., Ohno, S. (2007).** Expression of p27(KIP1) and cyclin D1, and cell proliferation in human pterygium. *Br J Ophthalmol.* Jul;91(7):958-61.
- Kato, N., Shimmura, S., Kawakita, T., Miyashita, H., Ogawa, Y., Yoshida, S., Higa, K., Okano, H., Tsubota, K. (2007).** Beta-catenin activation and epithelial-mesenchymal transition in the pathogenesis of pterygium. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2007 Apr;48(4):1511-7.
- Kau, H.C., Tsai, C.C., Hsu, W.M., Liu, J.H., Wei, Y.H. (2004).** Genetic polymorphism of hOGG1 and risk of pterygium in Chinese. *Eye (Lond);*18(6):635–639.
- Kau, H.C., Tsai, C.C., Lee, C.F., Kao, S.C., Hsu, W.M., Liu, J.H., and We, Y.H. (2006).** Increased oxidative DNA damage, 8-hydroxydeoxy- guanosine, in human pterygium. *Eye (Lond);*20(7):826–831.
- Kirichenko, E.Y., Savchenko, A.F., Kozachenko, D.V., Akimenko, M.A., Filippova, S.Y., Matsionis, A.E., Povilaitite, P.E. (2017).** Connexin 43 expression in human brain glial tumors. *Arkh Patol. ;*79(2):3-9.
- Kretz, M., Euwens, C., Hombach, S., Eckardt, D., Teubner, B., Traub, O., Willecke, K., Ott, T. (2003).** Altered connexin expression and wound healing in the epidermis of connexin-deficient mice. *J Cell Sci.* Aug 15;116(Pt 16):3443-52.
- Laird D.W. (2005).** Connexin phosphorylation as a regulatory event linked to gap junction internalization and degradation. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1711. 172– 182.
- Laird, D.W. (2006).** Life cycle of konneksins in health and disease. *Biochem. J.* 394, 527–543 (Printed in Great Britain).
- Larue, L., Bellacosa, A. (2005).** Epithelial-mesenchymal transition in development and cancer: role of phosphatidylinositol 3' kinase/AKT pathways. *Oncogene.* Nov 14;24(50):7443-54.
- Ling, S., Liang, L., Lin, H., Li, W., Xu, J. (2012).** Increasing lymphatic microvessel density in primary pterygia. *Arch Ophthalmol.* Jun;130(6):735-42.
- Liu, X.Z., Xia, X.J., Adams, J., Chen, Z.Y., Welch, K.O., Tekin, M., Ouyang, X.M., Kristiansen, A., Pandya, A., Balkany, T., Arnos, K.S., Nance, W.E. (2001).** Mutations in GJA1 (connexin 43) are associated with non-syndromic autosomal recessive deafness. *Hum Mol Genet.* Dec 1;10(25):2945-51.
- Liu, K.J., Qi, H.Z., Yao, H.L., Lei, S.L., Lei, Z.D., Li, T.G., Zhao, H. (2012).** An updated meta-analysis of the p53 codon 72 polymorphism and gastric cancer risk. *Mol Biol Rep.* Aug;39(8):8265-75.

- Liu, T., Liu, Y., Xie, L., He, X., Bai, J. (2013).** Progress in the pathogenesis of pterygium. *Current Eye Research*; 38(12): 1191–1197.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D. (2001).** Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real- Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Method. *Methods* 25, 402–408.
- Mahmood, T., Yang, P.C. (2012).** Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *N Am J Med Sci.* 2012 Sep;4(9):429-34.
- Matsuuchi, L., Naus, C.C. (2013).** Gap junction proteins on the move: Connexins, the cytoskeleton and migration. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1828. 94–108.
- Maxia, C., Perra M.T., Demurtas, P., Minerba, L., Murtas, D., Piras, F., Corbu, A., Gotuzzo, D.C., Cabrera, R.G., Ribatti, D., Sirigu, P. (2008).** Expression of survivin protein in pterygium and relationship with oxidative DNA damage. *J. Cell. Mol. Med.* Vol 12, No 6A, pp. 2372-2380.
- Meşe, G., Richard, G., and White, T.W. (2007).** Gap Junctions: Basic Structure and Function. *Journal of Investigative Dermatology.* Nov;127(11):2516-24.
- Ncbi.** <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK11534/> (Erişim tarihi:11.10.2018)
- Ncbi.** <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2697>. (Erişim tarihi:11.10.2018)
- Nielsen, M.S., Axelsen, L.N., Sorgen, P.L., Verma, V., Delmar, M., Holstein-Rathlou N.H. (2012).** Gap Junctions. *Compr Physiol.* July;2(3).
- Nolan, T.M., DiGirolamo, N., Sachdev, N.H., Hampartzoumian, T., Coroneo, M.T., Wakefield, D. (2003).** The role of ultraviolet irradiation and heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor in the pathogenesis of pterygium. *Am J Pathol.* Feb;162(2):567-74.
- Park, C.Y., Choi, J.S., Lee, S.J., Hwang, S.W., Kim, E.J., Chuck, R.S. (2011).** Cyclooxygenase-2-expressing macrophages in human pterygium co-express vascular endothelial growth factor. *Mol Vis.*;17:3468-80.
- Paznekas, W.A., Boyadjiev, S.A., Shapiro, R.E., Daniels, O., Wollnik, B., Keegan, C.E., Innis, J.W., Dinulos, M.B., Christian, C., Hannibal, M.C., Jabs, E.W. (2003).** Connexin 43 (GJA1) mutations cause the pleiotropic phenotype of oculodentodigital dysplasia. *Am J Hum Genet.* Feb;72(2):408-18.
- Phillips, S.L., Williams, C.B., Zambrano, J.N., Williams, C.J., Yeh, E.S. (2017).** Connexin 43 in the development and progression of breast cancer: What's the connection? (Review). *Int J Oncol.* Oct;51(4):1005-1013.
- Piras, F., Moore, P.S., Ugalde, J., Perra, M.T., Scarpa, A., Sirigu, P. (2003).** Detection of human papillomavirus DNA in pterygia from different geographical regions. *Br J Ophthalmol.* Jul;87(7):864-6.

- Qin, J.Z., Chaturvedi, V., Denning, M.F., Bacon, P., Panella, J., Choubey, D., Nickoloff, B.J. (2002).** Regulation of apoptosis by p53 in UV-irradiated human epidermis, psoriatic plaques and senescent keratinocytes. *Oncogene* 21, 2991–3002.
- Riau, A.K., Wong, T.T., Beuerman, R.W., Tong, L. (2009).** Calcium-binding S100 protein expression in pterygium. *Mol Vis.* 15:335-42.
- Riau, A.K., Wong, T.T., Finger, S.N., Chaurasia, S.S., Hou, A. H., Chen, S., Yu, S.J., Tong, L. (2011).** Aberrant DNA Methylation of Matrix Remodeling and Cell Adhesion Related Genes in Pterygium. *PLoS One.* February| Volume 6 | Issue 2 | e14687.
- Schmittgen, T. D. and Livak. (2008).** Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols*, .3 (6): 1101- 1108.
- Sebastiá, R., Ventura, M.P., Solari, H.P., Antecká, E., Orellana, M.E., Burnier, M.N Jr. (2013).** Immunohistochemical detection of Hsp90 and Ki-67 in pterygium. *Diagn Pathol.* Feb 21;8:32.
- Shimmura, S., Ishioka, M., Hanada, K., Shimazaki, J., Tsubota, K. (2000).** Telomerase activity and p53 expression in pterygia. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* May;41(6):1364-9.
- Singh, D., Solan, J.L., Taffet, S.M., Javier, R., Lampe, P.D. (2005).** Connexin 43 interacts with zona occludens-1 and -2 proteins in a cell cycle stage-specific manner. *J Biol Chem.* 2005 Aug 26;280(34):30416-21.
- Sirnes, S., Bruun, J., Kolberg, M., Kjenseth, A., Lind, G.E., Svindland, A., Brech, A., Nesbakken, A., Lothe, R.A., Leithe, E., Rivedal, E. (2012).** Connexin43 acts as a colorectal cancer tumor suppressor and predicts disease outcome. *Int J Cancer.* Aug 1;131(3):570-81.
- Sirnes, S., Lind, G.E., Bruun, J., Fykerud, T.A., Mesnil, M., Lothe, R.A., Rivedal, E., Kolberg, M., Leithe, E. (2015).** Connexins in colorectal cancer pathogenesis. *Int J Cancer.* Jul 1;137(1):1-11.
- Söhl, G., Willecke, K. (2004).** Gap junctions and the connexin protein family. *Cardiovascular Research*, 62, 228– 232.
- Tan, D.T., Tang, W.Y., Liu, Y.P., Goh, H.S., Smith, D.R. (2000).** Apoptosis and apoptosis related gene expression in normal conjunctiva and pterygium. *Br J Ophthalmol.* 2000 Feb;84(2):212-6.
- Thomas, T., Jordan, K., Simek, J., Shao, Q., Jedeszko, C., Walton, P., Laird, D.W. (2005).** Mechanisms of CX43 and Cx26 transport to the plasma membrane and gap junction regeneration. *J Cell Sci.* Oct 1;118(Pt 19):4451-62.

- Tittarelli, A., Guerrero, I., Tempio, F., Gleisner, M.A., Avalos, I., Sabanegh, S., Ortíz, C., Michea, L., López, M.N., Mendoza-Naranjo, A., Salazar-Onfray, F. (2015).** Overexpression of connexin43 reduces melanoma proliferative and metastatic capacity. *Br J Cancer*. 2015 Jul 14;113(2):259-67.
- Tsai, C.F., Cheng, Y.K., Lu, D.Y., Wang, S.L., Chang, C.N., Chang, P.C., Yeh, W.L. (2018).** Inhibition of estrogen receptor reduces connexin 43 expression in breast cancers. *Toxicol Appl Pharmacol*. Jan 1;338:182-190.
- Tong, L., Li, J., Chew, J., Tan, D., Beuerman, R. (2008).** Phospholipase D in the human ocular surface and in pterygium. *Cornea*. Jul;27(6):693-8.
- Tong, L., Lan, W., Sim, H.S., Hou, A. (2013).** Conjunctivochalasis is the precursor to pterygium. *Med Hypotheses*. Nov;81(5):927-30.
- Tong, L., Lan, W., Lim, R.R., Chaurasia, S.S. (2014).** S100A proteins as molecular targets in the ocular surface inflammatory diseases. *Ocul Surf*. Jan;12(1):23-31.
- Tuzcu, M., Gençoğlu, H. ve Şahin, K. (2010).** Konneksinlerin Hücreler Arası İletişimdeki Rolü (Derleme). ISSN:1306-3111 *e-Journal of New World Sciences Academy*, Volume: 5, Number: 2, Article Number: 1B0018.
- Vatansever, H.S. (2016).** Epithelial Mesenchymal Transition. *Türkiye Klinikleri J Radiat Oncol-Special Topics*; 2(1):52-5.
- Vinken, M., Vanhaecke, T., Papeleu, P., Snykers, S., Henkens, T., Rogiers, V. (2006).** Connexins and their channels in cell growth and cell death. *Cell Signal*. May;18(5):592-600.
- Wang, Y., Huang, L.H., Xu, C.X., Xiao, J., Zhou, L., Cao, D., Liu, X.M., Qi, Y. (2014).** Connexin 32 and 43 promoter methylation in *Helicobacter pylori* associated gastric tumorigenesis. *World J Gastroenterol*. Sep 7;20(33):11770-9.
- Wang, S., Zhang, S., Zhao, Z., Zhang, C., Yang, X., Wang, Y. (2017).** Connexin 43 enhances paclitaxel cytotoxicity in colorectal cancer cell lines. *Exp Ther Med*. 2017 Aug;14(2):1212-1218.
- Wei, C.J., Francis, R., Xu, X., Lo, C.W. (2005).** Connexin43 associated with an N-cadherin-containing multiprotein complex is required for gap junction formation in NIH3T3 cells. *J Biol Chem*. May 20;280(20):19925-36.
- Xu, H.T., Li, Q.C., Zhang, Y.X., Zhao, Y., Liu, Y., Yang, Z.Q., Wang, E.H. (2008).** Connexin 43 recruits E-cadherin expression and inhibits the malignant behaviour of lung cancer cells. *Folia Histochem Cytobiol*. 46(3):315-21.
- Young, C.H., Chiu, Y.T., Shih, T.S., Lin, W.R., Chiang, C.C., Chou, Y.E., Cheng, Y.W., Tsai, Y.Y. (2010).** E-cadherin promoter hypermethylation may contribute to protein inactivation in pterygia. *Molecular Vision*; 16:1047-1053.
- Yuan, C.C., Peterson, R.J., Wang, C.D., Goodsaid, F., Waters, D.J. (2000).** 5' Nuclease Assays for the Loci CCR5-1/D32, CCR2-V64I, and SDF1-G801A Related to Pathogenesis of AIDS. *Clinical Chemistry*, 46:1. 24-30.

- Zhang, A., Hitomi, M., Bar-Shain, N., Dalimov, Z., Ellis, L., Velpula, K.K., Fraizer, G.C., Gourdie, R.G., Lathia, J.D. (2015).** Connexin 43 expression is associated with increased malignancy in prostate cancer cell lines and functions to promote migration. *Oncotarget*. 2015 May 10;6(13):11640-51.
- Zhao, J.Q., Sun, F.J., Liu, S.S., Yang, J., Wu, Y.Q., Li, G.S., Chen, Q.Y., Wang, J.X. (2013).** Expression of connexin 43 and E-cadherin protein and mRNA in non small cell lung cancers in Chinese patients. *Asian Pac J Cancer Prev.*;14(2):639-43.



ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Saime SEZER SONDAŞ

Doğum Yeri ve Yılı: Tokat / 1986

Eğitim;

- Lisans; Cumhuriyet Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü (2004 - 2008)

- Yüksek Lisans; Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı (2009-2012)

- Doktora; Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında (2012- Halen)

Görevler;

Araştırma Görevlisi (2547 sayılı kanunun 50/d maddesi) **Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında (2014-2018)**

Akademik Yayınlar;

1. Ates, O., Kurt, S., Altinisik, J., Karaer, H., **Sezer, S.** (2011). Genetic variations in tumor necrosis factor alpha, interleukin-10 genes, and migraine susceptibility. *Pain Med.* Oct;12(10):1464-9.
2. Ates, O., Demirturk, F., Toprak, M., **Sezer, S.** (2013). Polymorphism of catechol-o-methyltransferase and uterine leiomyoma. *Mol Cell Biochem.* Mar;375(12):179-83
3. Ates, O., Karakus, N., **Sezer, S.**, Bozkurt, N. (2013). Genetic association of 5-HT1A and 5-HT1B gene polymorphisms with migraine in a Turkish population. *J Neurol Sci.* Mar 15;326(1-2):64-7.
4. Ates, O., Celikel, F.C., Taycan, S.E., **Sezer, S.**, Karakus, N. (2013). Association between 1603C>T polymorphism of DBH gene and bipolar disorder in a Turkish population. *Gene.* May 1;519(2):356-9.
5. Karakus, N., Yigit, S., Kalkan, G., **Sezer, S.** (2013). High association of angiotensin-converting enzyme (ACE) gene insertion/deletion (I/D) polymorphism with recurrent aphthous stomatitis. *Arch Dermatol Res.* Aug;305(6):513-7.
6. Kalkan, G., Ateş, O., Karakuş, N., **Sezer, S.** (2013). Functional polymorphisms in cell death pathway genes FAS and FAS ligand and risk of alopecia areata. *Arch Dermatol Res.* Dec;305(10):909-15.
7. Inanir, A., Karakus, N., Ates, O., **Sezer, S.**, Bozkurt, N., Inanir, S., Yigit, S. (2014). Clinical symptoms in fibromyalgia are associated to catechol-O-methyltransferase (COMT) gene Val158Met polymorphism. *Xenobiotica.* Oct;44(10):952-6
8. **Sezer, S.**, Kurt, S., Ates, O. (2016). Analysis of dopamine beta hydroxylase gene polymorphisms in migraine. *Clin Neurol Neurosurg.* Jun;145:96-100.
9. Somuk, B.T., Koc, S., Ates, O., Göktas, G., Soyalic, H., Uysal, I.O., Gurbuzler, L., Sapmaz, E., **Sezer, S.**, Eyibilen, A. (2016). MBL, P2X7, and SLC11A1 gene polymorphisms in patients with oropharyngeal tularemia. *Acta Otolaryngol.* Nov;136(11):1168-1172.

10. **Sezer, S.**, Altınısık, J., Bozkurt, N., Akkanet, S., Ates, O. (2013). Migrende Anjiotensin Dönüştüren Enzim ACE İnsersiyon/Delesyon (I/D) Gen Polimorfizminin Analizi. Çağdaş Tıp Dergisi, 3(1), 7-11. (Kontrol No: 106206).

