



T.C.

GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

**KERATOKONUSTA KORNEA EPİTEL HÜCRELERİNDE HUMANİN,
MOTS-C, HİSTATİN-1, HİSTATİN-3, HİSTATİN-5 PEPTİD
DÜZEYLERİNİN BELİRLENMESİ, NİTROZATİF STRES VE
FERROPTOZLA İLİŞKİLENDİRİLMESİ**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. Cahit DEMİRKIRAN

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Abdullah Tuncay DEMİRYÜREK

GAZİANTEP

ARALIK-2024

T.C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

**KERATOKONUSTA KORNEA EPİTEL HÜCRELERİNDE HUMANİN,
MOTS-C, HİSTATİN-1, HİSTATİN-3, HİSTATİN-5 PEPTİD
DÜZEYLERİNİN BELİRLENMESİ, NİTROZATİF STRES VE
FERROPTOZLA İLİŞKİLENDİRİLMESİ**

TIPTA UZMANLIK TEZİ
Dr. Cahit DEMİRKIRAN

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Abdullah Tuncay DEMİRYÜREK

GAZİANTEP
ARALIK-2024

TEZ ONAY SAYFASI

T.C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

**KERATOKONUSTA KORNEA EPİTEL HÜCRELERİNDE HUMANİN, MOTSC, HİSTATİN-1, HİSTATİN-3, HİSTATİN-5 PEPTİD DÜZEYLERİNİN
BELİRLENMESİ, NİTROZATİF STRES VE FERROPTOZLA
İLİŞKİLENDİRİLMESİ**

Dr. Cahit DEMİRKIRAN

TARİH
04.12.2024

Tıp Fakültesi Dekanlığı Onayı

Prof. Dr. Şevki Hakan EREN
Tıp Fakültesi Dekanı

Bu tez çalışmasının “Tıpta Uzmanlık” derecesine uygun ve yeterli bir çalışma olduğunu onaylıyorum.

Prof. Dr. Belgin ALAŞEHİRLİ
Anabilim Dalı Başkanı

Bu tez tarafımdan okunmuş ve her yönü ile “Tıpta Uzmanlık” tezi olarak uygun ve yeterli bulunmuştur.

Prof. Dr. Abdullah Tuncay DEMİRYÜREK
Tez Danışmanı

TEZ JÜRİSİ:

1. Prof. Dr. Abdullah Tuncay DEMİRYÜREK
2. Prof. Dr. Belgin ALAŞEHİRLİ
3. Prof. Dr. Muradiye NACAK

I. TEŞEKKÜR

Öncelikle Tıpta Uzmanlık Eğitimi ve tez çalışmam esnasında varlıklarıyla ve her türlü destekleriyle beni teşvik ederek yanımda olan sevgili eşim Fulya DEMİRKİRAN'a ve kızlarıma çok teşekkür ederim.

Tez çalışmamın her aşamasında yakın ilgi ve desteğini gördüğüm, çalışmalarımın yönlendirilmesi ve sonuçlandırılmasında büyük emeği geçen tez danışmanım sayın Prof. Dr. Abdullah Tuncay DEMİRYÜREK'e, uzmanlık eğitimime büyük katkılarından dolayı Gaziantep Üniversitesi Tıbbi Farmakoloji Ana Bilim Dalı Başkanı sayın Prof. Dr. Belgin ALAŞEHİRLİ, sayın hocalarım Prof. Dr. Muradiye NACAK ve Dr. Öğr. Üyesi Ahmet SARACALOĞLU'na, tez çalışmasında yardımlarını esirgemeyen Gaziantep Üniversitesi Göz Hastalıkları Ana Bilim Dalı öğretim üyesi sayın Prof. Dr. Alper METE'ye çok teşekkür ederim.

Bu tez çalışmasına; "1002-A Hızlı Destek Modülü" kapsamında 222S673 numaralı proje ile destek veren Türkiye Bilimsel Ve Teknolojik Araştırma Kurumu Başkanlığı (TÜBİTAK) Araştırma Destek Programları Başkanlığına; TF.ALT.23.11 proje numarası ile destek sağlayan Gaziantep Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi Komisyonu Başkanlığı'na teşekkür ederim.

Dr. Cahit DEMİRKİRAN

Aralık-2024

II. ÖZET

DEMİRKIRAN C., Keratokonusu kornea epitel hücrelerinde humanin, MOTS-c, histatin-1, histatin-3, histatin-5 peptid düzeylerinin belirlenmesi, nitrozatif stres ve ferroptozla ilişkilendirilmesi, Gaziantep Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, Tıpta Uzmanlık Tezi, Gaziantep, 2024

Amaç: Keratokonus, tüm etnik gruplarda yaygın, genetik olarak aktarılan ve genellikle gençlerde rastlanan stromal şekil bozukluğudur. Keratokonusun histopatolojik özelliklerinden biri korneal epitel bazal membranında demir depolanmasıdır. Demir, lipit peroksidasyonunu tetikleyip ferroptozu neden olabilir. Humanin ve MOTS-c (mitokondriyal 16S ribozomal RNA içindeki açık okuma çerçevesi), apoptoz, metabolizma ve oksidatif stresin düzenlenmesi de dahil olmak üzere hücresel işlevin birçok yönü için kritik öneme sahiptir. Çalışmamızda keratokonus kornea epitel hücrelerinde ferroptoz ve nitrozatif stres parametrelerinin düzeyinin belirlenmesi ve keratokonusla ilişkilendirilmesi amaçlanmıştır. Aynı zamanda bu çalışmada keratokonuslu hastalardan alınan korneal epitel hücrelerinde mitokondriyal türevli peptidler olan humanin ve MOTS-c ile endojen antimikrobiyal peptidlerin önemli bir sınıfı olan histatin-1, histatin-3 ve histatin-5 düzeylerinin belirlenmesi ve sağlıklı kornea epitel hücrelerindeki verilerle karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Keratokonus tanısı alan ve tedavi olarak korneal çapraz bağlama yapılan hastalardan, tedavi uygulanırken tedavinin bir parçası olarak soyulan ve cerrahi atık olarak kabul edilen keratokonuslu kornea epitel hücreleri mekanik debridmanla elde edildi. Sağlıklı kornea epitel hücreleri herhangi bir göz hastalığı olmayan ve ölümden sonraki 24 saat içinde post-mortem alınan sağlıklı donör korneasından mekanik debridmanla elde edildi. Bu gruplarda humanin, MOTS-c, histatin-1, histatin-3 ve histatin-5 peptid düzeyleri belirlendi, nitrozatif stresin değerlendirilmesi için nitrik oksit (NO) ve 3-nitrotirozin (3-NT) düzeyleri ve ferroptozu değerlendirmek için glutatyon peroksidaz 4 (GPX4), soluble transferrin reseptörü 1 (sTFR1), malondialdehit (MDA) ve asil-KoA sentetaz uzun zincirli aile üyesi 4 (ACSL4) düzeyleri ölçüldü.

Bulgular: Keratokonusu NO ve 3-NT düzeylerinin artmış olduğu bulundu. Mitokondriyal kökenli peptidlerden MOTS-c düzeyleri azalmakta, fakat humanin düzeyleri artmaktadır. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında keratokonuslu hastalardan izole edilen korneal epitel hücrelerinde MDA ve ACSL4 düzeylerinin artmasına karşın, GPX4 ve sTFR1 düzeylerinin azaldığı saptanmıştır. Keratokonusu histatin-1 ve histatin-5 düzeylerinde anlamlı bir değişiklik saptanmamış, fakat histatin-3 düzeylerinde anlamlı artış olduğu belirlenmiştir.

Sonuç: Bu çalışmada ilk kez histatin-3, nitrozatif stres, mitokondriyal kökenli peptid salıverilmesi ve ferroptoz oluşumunun keratokonus gelişimine önemli katkıda bulunduğu gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Keratokonus, nitrozatif stres, ferroptoz, humanin, MOTS-c, nitrik oksit, 3-nitrotirozin, histatin-1, histatin-3, histatin-5

ABSTRACT

DEMİRKIRAN C., Determination of humanin, MOTS-c, histatin-1, histatin-3, histatin-5 peptide levels in corneal epithelial cells in keratoconus and correlation with nitrosative stress and ferroptosis, Gaziantep University, Faculty of Medicine, Department of Medical Pharmacology, Medical Speciality Thesis, Gaziantep, 2024

Objective: Keratoconus is a common, genetically transmitted stromal deformity in all ethnic groups and is usually seen in young people. One of the histopathological features of keratoconus is iron storage in the corneal epithelial basement membrane. Iron can trigger lipid peroxidation and cause ferroptosis. Humanin and MOTS-c (mitochondrial open-reading frame of the 12S rRNA-c) are critical for many aspects of cellular function, including the regulation of apoptosis, metabolism, and oxidative stress. Our study aimed to determine the level of ferroptosis and nitrosative stress parameters in keratoconus corneal epithelial cells and to associate them with keratoconus. We also aimed to determine the levels of mitochondrial-derived peptides humanin and MOTS-c and histatin-1, histatin-3 and histatin-5, an important class of endogenous antimicrobial peptides, in keratoconus and to compare them with the results in healthy corneal epithelium.

Materials and Methods: Keratoconus corneal epithelial cells, which was peeled off as part of the treatment and considered as surgical waste, were obtained by mechanical debridement from patients diagnosed with keratoconus and treated with corneal cross-linking. Healthy corneal epithelial cells were obtained by mechanical debridement from healthy donor corneas that did not have any eye disease and were taken post-mortem within 24 hours after death. In these groups, humanin, MOTS-c, histatin-1, histatin-3 and histatin-5 peptide levels were determined, nitric oxide (NO) and 3-nitrotyrosine (3-NT) levels were measured to evaluate nitrosative stress and glutathione peroxidase 4 (GPX4), soluble transferrin receptor 1 (sTFR1), malondialdehyde (MDA) and acyl-CoA synthetase long chain family member 4 (ACSL4) levels were measured to evaluate ferroptosis.

Result: We found that NO and 3-NT levels were increased in keratoconus. Mitochondrial peptide MOTS-c levels were decreased, but humanin levels were increased. Compared to the control group, it was found that MDA and ACSL4 levels increased, while GPX4 and sTFR1 levels decreased in corneal epithelial cells isolated from patients with keratoconus. No significant changes were found in histatin-1 and histatin-5 levels, but a significant increase was found in histatin-3 level in keratoconus.

Conclusion: In this study, it was shown for the first time that histatin-3, nitrosative stress, mitochondrial-derived peptide release and ferroptosis formation contribute significantly to the development of keratoconus.

Keywords: Keratoconus, nitrosative stress, ferroptosis, humanin, MOTS-c, nitric oxide, 3-nitrotyrosine, histatin-1, histatin-3, histatin-5

III. İÇİNDEKİLER

I. TEŞEKKÜR.....	iii
II. ÖZET.....	iv
III. İÇİNDEKİLER.....	vi
IV. SİMGE VE KISALTMALAR.....	viii
V. ŞEKİLLER	ix
VI. TABLOLAR.....	xi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Keratokonus	3
2.1.1. Keratokonusun Tanımı ve Prevalans	3
2.1.2. Keratokonusun Patofizyolojisi	3
2.1.3. Keratokonusta Genetik	6
2.1.4. Keratokonusta Predizpozan Faktörler	6
2.1.5. Keratokonusta Klinik	8
2.1.6. Keratokonusta Tanı	8
2.1.7. Keratokonusun Evrelendirilmesi	9
2.1.8. Keratokonusta Tedavi	9
2.1.8.1. Gözlük Tedavisi	9
2.1.8.2. Kontak Lens Tedavisi	9
2.1.8.3. Kollajen Çapraz Bağlama	10
2.1.8.4. Kornea Nakli	10
2.1.8.5. Diğer Tedavi Şekilleri	11
2.2. Mitokondriyal Kökenli Peptidler	12
2.2.1. Humanin ve MOTS-c	12
2.3. Histatinler.....	14
2.4. Oksidatif ve Nitrozatif Stres.....	16
2.4.1. Serbest Radikal.....	16
2.4.1.1.Serbest Radikallerin ve Oksidanların Oluşumu.....	18
2.4.2. Antioksidanlar	18
2.4.2.1.Antioksidanların Etki Mekanizmaları.....	19
2.4.3. Nitrozatif Stres	20
2.4.3.1. Nitrik Oksit.....	20
2.4.3.2. 3-Nitrotirozin.....	21

2.4.3.3. Nitrozatif Stresin Hastalıklara Etkisi.....	23
2.5. Ferroptoz	24
2.5.1. Ferroptoz Oluşum Mekanizmaları	25
2.5.2. Ferroptoz Ölçüm Parametreleri.....	28
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	29
3.1. Araştırmanın Tipi, Yeri ve Zamanı.....	29
3.2. Araştırmaya Dahil Olma Kriterleri.....	29
3.3. Araştırmadan Hariç Tutulma Kriterleri	29
3.4. Araştırmada İncelenilen Parametreler	30
3.4.1. Hücre Canlılığı (MTT Ölçümü)	31
3.4.2. Protein Ölçümü	31
3.4.3. Mitokondriyal Peptidlerin Ölçümü	31
3.4.4. Histatin Düzeylerinin Ölçümü	31
3.4.5. Nitrozatif Stres Belirteçlerinin Ölçümü	32
3.4.6. Ferroptoz Belirteçlerinin Ölçümü	33
3.5. İstatistiksel Analiz	33
4. BULGULAR	35
5. TARTIŞMA	54
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	59
7. KAYNAKLAR.....	61
8. EKLER	
Ek 1. İntihal Raporu	
Ek 2.Etik Kurul Onay Sayfası	
Ek 3. Öz Geçmiş	
Ek 4. Tez Kontrol Formu	

IV. SİMGE VE KISALTMALAR

ACSL:	Açıl-KoA sentetaz uzun zincirli ailesi (<i>acyl-CoA synthetase long-chain</i>)
ADDE:	Suyu Yetersiz Kuru Göz Hastalığı (<i>aqueous-deficient dry eye disease</i>)
ATP :	Adenozin trifosfat
CXL:	Kollajen çapraz bağlama (<i>collagen crosslinking</i>)
DM:	Diabetes mellitus
EGF:	Epidermal Büyüme Faktörü (<i>Epidermal Growth Factor</i>)
eNOS:	Endotelial Nitrik Oksit sentaz
Fe ⁺² :	Demir
Fer-1:	Ferostatin-1
FSP1:	Ferroptoz süpresor protein 1
GPX:	Glutasyon peroksidaz
GSH:	Glutasyon
HN:	Humanin
KVH:	Kardiyovasküler hastalık
LOX:	Lipoksijenaz
MDP:	Mitokondriyal Kaynaklı Peptidler (<i>Mitochondrial-derived peptides</i>)
mtDNA:	Mitokondriyal DNA
NGF:	Sinir büyüme faktörü (<i>nerve growth factor</i>)
NO:	Nitrik oksit
NO ⁺ :	Nitrozonyum
NS:	Nitrozatif stres
P:	Fosfor
ROS:	Reaktif oksijen türleri
RNS:	Reaktif nitrojen türleri
RS:	Reaktif stres
sTFR1:	soluble transferrin reseptörü 1
UV:	Ultraviyole
3-NT:	3-Nitrotirozin

V. ŞEKİLLER

Şekil 2.1. Normal kornea ve keratokonus korneası	3
Şekil 2.2. Keratokonusun patofizyolojisi	5
Şekil 2.3. Keratokonusa konikleşme.....	7
Şekil 2.4. Humaninin apoptozla ilişkisi	13
Şekil 2.5. Oksidatif yollar	17
Şekil 2.6. Tirozinden 3-nitrotirozinin oluşumu	21
Şekil 2.7. NO ve bazı önemli nitrozatif türlerin sentezi	22
Şekil 2.8. Ferroptozu düzenleyen sinyal yolları.....	26
Şekil 2.9. FSP1 ile hücre ölümünün engellenmesi	27
Şekil 4.1. Sağlıklı kontrol grubu ile kerotokonus hastalarından alınan korneal epitel hücrelerinde MTT testi ile hücre canlılığının saptanması	36
Şekil 4.2. Sağlıklı kontrol grubu ile kerotokonus hastalarından alınan korneal epitel hücre homojenatında protein düzeyleri	37
Şekil 4.3. Sağlıklı kontrol grubu ile kerotokonus hastalarından alınan korneal epitel hücrelerinde nitrik oksit (NO) düzeyleri	38
Şekil 4.4. Sağlıklı kontrol grubu ile kerotokonus hastalarından alınan korneal epitel hücrelerinde 3-nitrotirozin (3-NT) düzeyleri	39
Şekil 4.5. Sağlıklı kontrol grubu ile kerotokonus hastalarından alınan korneal epitel hücrelerinde humanin (MT-RNR2) düzeyleri	40
Şekil 4.6. Sağlıklı kontrol grubu ile kerotokonus hastalarından alınan korneal epitel hücrelerinde MOTS-c (Mitochondrial-derived peptide MOTS-c, Mitochondrial open reading frame of the 12S rRNA-c, MT-RNR1) düzeyleri	41
Şekil 4.7. Sağlıklı kontrol grubu ile kerotokonus hastalarından alınan korneal epitel hücrelerinde malondialdehit (MDA) düzeyleri	42
Şekil 4.8. Sağlıklı kontrol grubu ile kerotokonus hastalarından alınan korneal epitel hücrelerinde glutatyon peroksidaz 4 (GPX4) düzeyleri	43
Şekil 4.9. Sağlıklı kontrol grubu ile kerotokonus hastalarından alınan korneal epitel hücrelerinde ACSL4 (Long-chain-fatty-acid-CoA ligase 4) düzeyleri	44
Şekil 4.10. Sağlıklı kontrol grubu ile kerotokonus hastalarından alınan korneal epitel hücrelerinde sTFR1 (soluble Transferrin Receptor1) düzeyleri	45
Şekil 4.11. Sağlıklı kontrol grubu ile kerotokonus hastalarından alınan korneal epitel hücrelerinde histatin-1 düzeyleri.....	46
Şekil 4.12. Sağlıklı kontrol grubu ile kerotokonus hastalarından alınan korneal epitel	

hücrelerinde histatin-3 düzeyleri.....	47
Şekil 4.13. Sağlıklı kontrol grubu ile keratokonus hastalarından alınan korneal epitel hücrelerinde histatin-5 düzeyleri.....	48
Şekil 4.14. Sağlıklı kontrol grubu ile keratokonus hastalarından alınan korneal epitel hücre kalınlığı.....	49
Şekil 4.15. Sağlıklı kontrol grubu ile keratokonus hastalarından alınan korneal epitel hücrelerinde hemotoksilen-eosin boyaması sonrasındaki görüntüler.....	50
Şekil 4.16. Sağlıklı kontrol grubu ile keratokonus hastalarından alınan korneal epitel hücrelerindeki histopatolojik analiz sonucu elde edilen skor.....	51



VI. TABLOLAR

Tablo 3.1. Amsler-Krumeich keratokonus evrelemesi.....	30
Tablo 4.1. Kontrol ve hasta grubunun demografik özellikleri.....	35
Tablo 4.2. Çalışma gruplarında ölçülen parametreler arasındaki istatistiksel olarak anlamlı korelasyonlar.....	53



1. GİRİŞ

Keratokonus, korneanın zayıflaması ve incilmesi ile oluşan tüm etnik gruplarda nispeten yaygın olan ve genetik olarak kalıtılabilen genellikle gençlerde rastlanan stromal bir şekil bozukluğudur. Görme problemleri oluşturup ileri vakalarda kornea nakline kadar gidebilmektedir. Keratokonusun etiyolojisi ve patogenezi tam olarak bilinmemektedir (1).

Humanin ve MOTS-c (*mitochondrial open-reading frame of the 12S rRNA-c*), birçok hastalığın seyrinde ve yaşlanmayla beraber oluşan dejeneratif değişikliklere karşı koruyucu etkisinin olduğu gösterilen mitokondriyal peptidlerdir. Hücresel stres koşullarına ve apoptoza karşı lökositler, germ hücreleri, nöronal dokular dahil olmak üzere çeşitli hücre tiplerinde koruyucu etkiler gösterirler ve stres koşulları altında mitokondriyal fonksiyonları düzenleyen temel sitoprotektif ajanlardır (2). Humanin ve MOTS-c, antiapoptozis, hücre stres yanıtı iltihabı ve substrat metabolizması dahil olmak üzere birçok biyolojik olayda rol alır (3).

Histatinler, endojen antimikrobiyal peptidlerin önemli bir sınıfıdır. Histatin peptidleri, *HTN1* ve *HTN3* geninden kaynaklanan uzunlukları 7-38 amino asit içeren 12 peptidten (histatin 1–12) oluşan ve en az 12 histidin kalıntısı ile histidin açısından zengin bir ailedir (4,5).

Nitrozatif stres, reaktif nitrojen oksit türlerinin nitrozonyum (NO^+) grubunu nükleofil bir gruba aktarması sonucu biyomoleküllerin uğradığı strestir. Meydana gelen reaktif türlerin nükleik asit (DNA, RNA) protein ve glutatyon (GSH) gibi antioksidanları modifiye etmesi nitrozatif stresin temelini oluşturur. Reaktif nitrojen türleri (RNS) de oksijen radikalleri gibi lipid peroksidasyonuna neden olabilir, nükleik asitlerde (DNA, RNA) zincir kırılmalarına ve/veya baz modifikasyonlarına neden olabilir. Ayrıca metal iyonlarında oksidasyona neden olup, proteinleri oksitleyebilir ve böylelikle antioksidanların aşırı tüketilip bitmesine neden olabilirler. Oksidatif, sitotoksik yan ürünlerin birikmesi, çeşitli kornea proteinlerinin değişmesine neden olarak bir dizi olayı tetikleyip apoptoza ve sonunda hücre kaybı ile korneal incelmeye neden olabilir. Yapılan çalışmalar keratokonus patogenezinde artmış nitrik oksitin (NO) etkili olduğunu göstermiştir. Özellikle de peroksinitritin yüksek oranda toksik olduğu belirtilmiştir (6-8).

İlk olarak 2012'de ortaya atılan ferroptoz, lipit hidroperoksitlerin demire bağılı olarak ölümcül seviyelerde birikmesiyle karakterize edilen, programlanmış bir hücre ölümü şeklidir. Başlıca özellikleri; aşırı demir yüklenmesi, lipit peroksidasyonu ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) birikimidir (9,10). Ferroptozdaki son adım, tam hücre yetmezliğine neden olan aşırı lipit peroksidasyonudur. Ferroptoz, daha önce yaygın olarak oksidatif stres kaynaklı hücre ölümü biçiminin birçok özelliğini sergilemesine rağmen, onu farklı bir hücre ölümü biçimi olarak ayıran birçok yönleri vardır. Örneğin, ferroptoz, hidrojen peroksit kaynaklı nekroz gibi oksidatif stresten morfolojik ve işlevsel olarak farklıdır (9,10). Keratokonusta kornea epitelinde demir birikimi Fleischer halkası olarak gözlenebilmektedir (11,12). Keratokonusta korneal stromal fibroblastlarda ROS ve RNS'nin yüksek düzeyde olduğu ve serbest radikalleri nötralize eden süperoksit dismutaz (SOD) enziminin azaldığı da gösterilmiştir (13,14).

Bu çalışmamızda keratokonusta kornea epitel hücrelerinde MOTS-c, humanin, histatin-1, histatin-3 ve histatin-5 peptid düzeylerinin belirlenmesi ve keratokonusun nitrozatif stres ve ferroptozla ilişkilendirilmesi amaçlanmıştır.

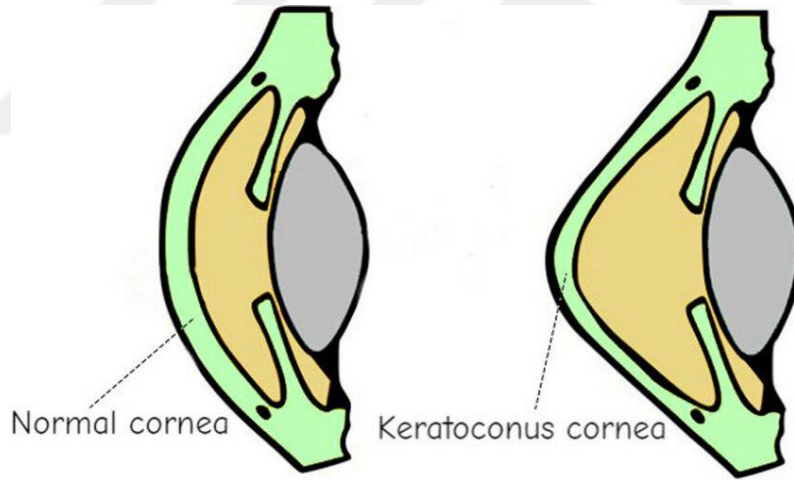
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Keratokonus

2.1.1. Keratokonusun Tanımı ve Prevalansı

Keratokonus, tüm etnik gruplarda yaygın olup korneanın zayıflaması ve incilmesi ile karakterize, genetik olarak aktarılan ve genellikle gençlerde rastlanan stromal bir şekil bozukluğudur (Şekil 2.1). Görme problemleri olduğundan ilerlemiş vakalarda kornea nakline kadar gidebilmektedir. Keratokonus etiyolojisi ve patogenezi henüz tam olarak bilinmemektedir (1).

Yaklaşık 2000'de bir ve yılda 100.000 popülasyonda iki vaka insidansı ile keratokonus, otozomal resesif veya dominant bir kalıtım modeli göstermektedir ve çevresel, genetik ve diğer faktörlerle etkileşime giren genlerle ilişkilidir Türkiye'de yapılan bir çalışmada keratokonus prevalansı % 2,4 olarak saptanmıştır. Keratokonus çoğu vakada sporadiktir. Ancak % 6-14 oranında aile hikayesi mevcuttur (15-17).



Şekil 2.1. Normal kornea ve keratokonus korneası. Keratokonus korneasında koni şeklindeki ektatik değişiklik görülmektedir (18).

2.1.2. Keratokonusun Patofizyolojisi

Keratokonus histopatogenezinde; korneal stromanın normale göre incilmesi, Bowman tabakasında oluşan kırıklar, kornea epiteli bazal membranında Fe^{+2} depolanması, epitelyal incelme, stromal kollajen fibril yoğunlaşması ve derin stromal skarlaşma görülmektedir (12). Keratokonustaki epitel düzensizdir (19,20). Epitel tabakası sıklıkla koni (*cone*) bölgesinde kalınlaşma içerir. İleri evrelerde belirgin

stromal incelmeyi telafi edici epitel kalınlaşması sıklıkla ortaya çıkmaktadır (21,22). Kornea epitelinin bazal katmanlarında demir birikintileri oluşabilmektedir. Bu birikintiler kendilerini keratokonus tabanı etrafında bir Fleischer halkası olarak göstermektedir (11,12).

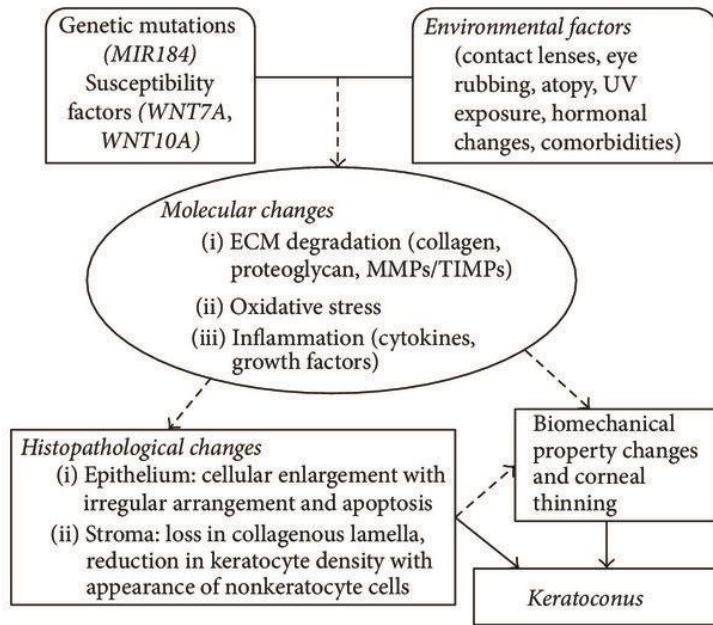
Keratokonusta koni tepesine uyan bölgede epitel katmanda incelme olduğunu gösteren çalışmalar da mevcuttur (23). Epitelde meydana gelen bazal membran dejenerasyonları Bowman tabakasının epitel içine doğru uzanımlar yapmasına neden olur. Keratokonusta epitel tabakasında normal hücre düzeni kaybolmuştur. Kornea epitel hücrelerinin dansitesinde de kayıp tespit edilmiştir (24). Bazal hücrelerde düzleşme, yüzey hücrelerinde uzama ve kıvrımlarında artma koni apeksinde görülen hücresel değişikliklerdir (25). Toplam epitel kalınlığının arttığını gösteren çalışmalar olmakla beraber azaldığını gösteren çalışmalar da bulunmaktadır (26-28).

Keratokonusta bazı kollajen tiplerinin kornea epitel ve stromasında azaldığı gösterilmiş olup Descemet membranda etkilenme (çatlak, ayrılma) nadir olarak saptanmıştır. Bazı çalışmalarda dejenerasyon, polimegatzim, hücre membran lizisi ve pleomorfizm saptansa da endotel ciddi şekilde etkilenmemektedir (29,30).

Keratokonüs gelişiminde biyokimyasal mekanizmaların katkısı olduğu gösterilmiştir. Katabolik enzimlerdeki (özellikle proteaz) artma ve proteaz 19 inhibitörlerindeki azalma nedeniyle gerçekleşen yıkıma bağlı stromal kayıp artmaktadır (31). Keratokonusta apoptotik hücre ölümü sonucu ön stromal keratosit hücrelerinde kayıp gerçekleşmekte çoğunlukla buna korneadaki epitelyal abrazyon ve subepitelyal ablasyon da eşlik etmektedir (32). Keratokonusta kornea epiteli ve kornea endoteli gibi dokularda interlökin (IL)-1 üretimi ve IL-1 reseptör ekspresyonunun arttığı ve bunun sonucunda keratosit ölümünün arttığı ve keratosit kemotaksisinin de azaldığı saptanmıştır (33). Keratokonusun önceleri inflamatuvar özellikte olmadığı ağırlık kazansa da sonraki çalışmalarda apoptoz mekanizmalarına ilaveten inflamatuvar kaskadın da etkili olduğu gösterilmiştir (34,35). Keratokonusun karakteristik özelliği olan kornea incelmesinde proliferasyon ve apoptoz arasındaki dengesizlik rol oynamaktadır (32). Keratokonus hastalarında ön stromal keratosit hücrelerinde apoptotik hücre ölümünün gösterilmesinin yanında korneal epitel hücrelerinde proapoptotik marker olan BAX ekspresyonu artışı da gösterilmiştir. Keratokonik korneaların koni bölgesindeki hücreler, artan hücre ölümü, kötü

farklılaşma (*differentiation*), proliferasyon ve epitelyal-mezenkimal geçiş (*transition*) göstermektedir (36).

Birçok çalışma, keratokonus ile oksidatif stres arasında keratokonusun ilerlemesini etkileyecek şekilde bir korelasyon olduğunu göstermiştir (37). Ayrıca, normalde serbest radikalleri nötralize eden SOD gibi antioksidan enzimlerin keratokonusta azaldığı rapor edilmiştir (14). Keratokonusta kaskad hipotezi öne sürülmüştür. Bu hipotezde oksidatif hasara sebep olan lipid peroksidasyonunda artış sonucu ve NO yolunda bazı anormal ve defektif enzimlerin varlığı ile oksidatif ve sitotoksik ürünlerin birikmesi çeşitli korneal proteinlerde değişikliğe yol açmaktadır. Bunun sonucunda artmış enzim aktivitesi, sinyal yollarında değişiklikler, apoptoz, fibrozis gibi olayları içeren bir kaskad başlamaktadır. Sağlıklı bireylerde oksidatif stresi azaltmanın keratokonus oluşumunu önlemede ve ilerlemesini durdurmada etkili olabileceği düşünülmektedir. Güneş gözlüğü takmak ve kontakt lens kullanmak ultraviyoleten (UV) korumada önerilmektedir. Diğer koruyucu önlemler mekanik travmayı (göz ovalama) azaltmak, suni gözyaşı, non-steroidal antiinflamatuvar ilaçlar ve alerji tedavisiyle kornea yüzeyini rahatlatmak olarak tavsiye edilmiştir (8).



Şekil 2.2. Keratokonusun patofizyolojisi (40).

Keratokonuslu hastalarda artan mitokondriyal DNA (mtDNA) içeriğinin, mitokondriyal solunum zinciri kusurlarını ve dolayısıyla mitokondriyal anormallik

durumunu gösterdiği bildirilmiştir (38). Keratokonus kornealarında ayrıca normal kornealara kıyasla artmış mtDNA hasarı, daha yüksek ROS seviyeleri ve daha düşük mitokondriyal membran potansiyeli ve adenosin trifosfat (ATP) düzeylerinin bulunduğu gösterilmiştir (39) (Şekil 2.2).

Keratokonusta hastalık ilerlemesini yavaşlatabilecek (veya durdurabilecek) ve etiyolojik tedavileri geliştirmek için kornea ektazisi, redoks homeostazı ve inflamatuvar yol arasındaki karmaşık ilişkiyle ilgili çok az sayıda çalışma mevcut olup ilişkiyi daha iyi anlamak için başka çalışmalara ihtiyaç vardır (37).

2.1.3. Keratokonusta Genetik

Keratokonus çoğu vakada sporadiktir. Ancak % 6-14 oranında aile hikayesi mevcuttur (17). Monozigotik ve dizigotik ikizler arasında daha yüksek uyum bulunmuştur. Keratokonuslu kişilerin ailelerinde genel popülasyona göre prevalans 15-67 kat yüksektir (41-43). Otozomal dominant kalıtımda birbirinden farklı fenotiplerin görülmesi geçiş penetransının tam olmadığını göstermektedir (44).

Genetik açıdan etiyolojide tek bir geni suçlamak mümkün değildir. Bugün için henüz tam olarak aydınlatılamamış karmaşık bir genetik yapının keratokonusa neden olabileceği düşünülmektedir. Keratokonuslu hastalar üzerinde yapılan genetik çalışmalarda birçok şüpheli gen tespit edilmiştir (45-49).

Yapılan çalışmalarda, *WNT10A* genindeki bir yanlış kodlama varyantı, kornea kalınlığının azalması yoluyla keratokonus ile ilişkilendirilmiştir (50). *WNT7B* genindeki intronik bir varyant ise merkezi kornea kalınlığı ile ilişkilendirilmiştir (51).

2.1.4. Keratokonusta Predizpozan Faktörler

Ektatik kornea hastalıklarının patogenezinde kalıtım ve çevresel faktörlerin rol oynadığı gösterilmiştir. Yaklaşık %8'i genetik mutasyonlardan ve %92'si çevresel faktörlerden kaynaklanmaktadır (49,52).

İklimin predizpozan faktörlerden biri olduğu varsayılmaktadır. Daha sıcak ve kurak bölgelerde yaşayanların kornealarının keratokonus gelişimine daha fazla maruz kaldığı öne sürülmüştür. Ancak somut bir kanıt bulunamamıştır (53).

Keratokonus genetik olarak duyarlı bireylerde göz ovalama, kontakt lens kullanımı gibi, mikrotravmaya neden olan çevresel faktörler ve endojen faktörlerin bir araya gelmesi sonucu meydana gelen, multifaktöriyel korneal bir hastalıktır (54).

Uzun süreli göz ovalama keratokonus gelişimi için önemli ve bağımsız bir risk faktörüdür. Allerji ve atopi keratokonus ile ilişkilendirilmiştir. Atopinin kendisinden çok, neden olduğu göz ovalamanın hastalığı tetiklediği bildirilmektedir (55-56).

Kontakt lens aşınmasından sonra keratokonusda matriks metalloproteinaz-9 ve IL-8'in yükselmesi ve buna eşlik eden sinir büyüme faktörü (*nerve growth factor*; NGF), metalloproteinaz doku inhibitörü-1 (*tissue inhibitor of metalloproteinases-1*; TIMP-1) ve plazminojen aktivatör inhibitörü-1'in (PAI-1) azalması, keratokonik korneaların ayırt edici özelliği olan matris bozulmasında rol oynayabilir (57).

Down sendromlu hastalarda yapılan çalışmalarda korneanın keratokonus morfolojik bulgularını sergilediği gösterilmiştir (58,59).

Hamilelik sırasındaki yüksek östrojen seviyeleri, seçici doku östrojen düzenleyici (*selective tissue estrogen regulator therapy*; STEAR) tedavisi ve tiroid hormonu dengesizliği gibi hormonal değişikliklerin keratokonusa bir etken olabileceği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (60-62).

Sistemik bir inceleme ve meta-analizde keratokonus için en yaygın risk faktörleri; aile öyküsü (olasılık oranı [OR] = 6,42), göz ovma (OR = 3,09), egzama (OR = 2,95) ve astım (OR = 1,94) olarak saptanmıştır (63).

Keratokonusta ROS ve RNS'nin arttığı birçok çalışma ile gösterilmiş ve kornea epitelinde kontrollere göre daha yüksek apoptoz tespit edilmiştir (8,13,36,64).



Şekil 2.3. Keratokonusa konikleşme (65)

2.1.5. Keratokonusta Klinik

Keratokonuslu hastalarda ilk şikayetler genellikle puberte döneminde başlayan bulanık görmedir. Erken dönemde refraktif kusur dışında bulgu olmayabilir (66). Hastalarda yüksek sıralı aberasyon belirtileri, özellikle gece görüşünde yansıma, parlama ve halo görme gibi pozitif disfotopsi semptomları görülebilir (67).

Hastalığın ilerlemiş evrelerinde aşağı bakışta alt kapak kenarında korneanın öne doğru konik biçimde ilerlemesi 'V' şeklinde görülebilir (Munson Belirtisi) (Şekil 2.3). Nonspesifik ve genellikle geç dönemde görülen bir bulgudur (68).

2.1.6. Keratokonusta Tanı

Keratokonus hastalığında tanı koyabilmek için klinik olarak şüphelenmek gerekmektedir. Öncelikle detaylı bir anamnez alınmalı ve fizik muayene yapılmalıdır. Hastanın yüksek sıralı aberasyon belirtileri, özellikle gece görüşünde yansıma, parlama ve halo görme gibi pozitif disfotopsi semptomları mevcutsa keratokonus mutlaka düşünülmelidir (67).

Sağlık geçmişi atopi, göz ovma ve gevşek göz kapağı sendromu, Down sendromu, Ehlers-Danlos sendromu, uyku apnesi veya Marfan sendromu gibi bağ dokusuyla ilgili durumları ortaya çıkarabilir (67).

Göz muayenesinde optimum olmayan en iyi düzeltilmiş görme, Munson işareti, kırmızı reflekste yağ damlacığı, otorefraksiyonda dik K okumaları, olağandışı astigmatizma, anizometropi ve ziyaretler arasında astigmatik eksenlerde önemli değişiklikler görülebilir. Erken aşamada, yarı lamba muayenesi normal görünebilir, hastalığın orta-ileri vakalarında Vogt striaları denilen stroma ve descemet zarında vertikal çizgiler, Fleisher halkası ve apikal skar oluşumu mevcut olabilir (67).

Erken dönemde keratokonus tanısı atlanabilmektedir. Erken tanı ile hastaların düzenli takipleri yapılabilmekte ve kornea nakli ihtiyacı azaltılarak mümkün olduğunca yaşam kalitesi yüksek düzeyde tutulabilmektedir (69). Kornea topografisi gibi görüntüleme yöntemleri başlangıç döneminde tanı için çok önemlidir. Hastalığın takibinde otorefraktometri, keratometri ve korneal topografi ölçümleri kullanılmaktadır. Erken evrelerde tanı konulabilmesini sağlayan kornea topografisi tanıda en değerli yöntem kabul edilmektedir. Çünkü korneanın morfolojisini girişim yapmadan hem kantitatif hem de kalitatif olarak analiz etmek mümkündür (70).

Keratokonus için ayırıcı tanılar; kontakt lens komplikasyonları, kontakt lens kaynaklı kornea çarpıklığı, kornea ektazisi, refraktif cerrahiye bağlı ektazi, diplopi, interstisyel keratit, keratoglobus, şeffaf marjinal dejenerasyon, posterior keratokonus, Terrien marjinal dejenerasyonu ve korneal skar. Konjenital bozukluklardan konjenital kalıtsal endotel distrofisi, Fuchs endotel distrofisi ve enfeksiyöz veya enfeksiyöz olmayan keratit de keratokonus ayırıcı tanıları arasındadır (71).

2.1.7. Keratokonusun Evrelendirilmesi

Morfolojik (Buxton) sınıflama, keratometrik sınıflama, klinik bulgulara dayanan Hom's sınıflaması, RETICS (*Red Temática de Investigación Cooperativa en Salud*) sınıflaması, Sandali sınıflaması, CLEK (*The Collaborative Longitudinal Evaluation of Keratoconus*) sınıflaması ve Amsler-Krumeich sınıflaması dahil olmak üzere çok çeşitli sınıflaması vardır. Bizim çalışmamızda pratik ve yaygın olarak kullanılan Amsler-Krumeich sınıflaması kullanılmıştır. Bu sınıflamada keratokonus 4 evreye ayrılmaktadır. Yapılan değerlendirmede evreleme kriterlerinden bir tanesi bile saptanırsa hastalık o evrede kabul edilmektedir (Tablo 3.1) (72).

2.1.8. Keratokonusta Tedavi

Keratokonusun tedavi yaklaşımı kişiye özgü olup, görmeyi düzeltmeyi ve hastalığın ilerlemesini durdurmayı amaçlamalıdır. Mevcut tedavi seçenekleri hastalığın evresine ve ilerlemesine göre değişir. Durumu stabilize ederken görmenin düzeltilmesi önceliklidir. Ancak daha fazla ilerlemenin önlenmesi tüm hastalar için en önemli konu olmaya devam etmektedir (1).

2.1.8.1. Gözlük Tedavisi

Erken dönemde hafif keratokonus hastalarına gözlük reçete edilerek hastaların görmeleri düzeltilir. Gözlükler, hastanın görme ihtiyaçlarını artık yeterince desteklemeyinceye kadar değiştirilmez (73).

2.1.8.2. Kontak Lens Tedavisi

Hastalık ilerledikçe astigmatın artması sonucu görme keskinliği kötüleşir. Bu aşamada birçok hasta, etkili görme düzeltilmesi için kontakt lenslere ihtiyaç duyar. Keratokonus hastalarının yaklaşık %90'ının bu durumu tedavi etmek için kontakt lens kullandığı tahmin edilmektedir. Sert yapıda olup gaz geçirgen olan bu kornea lensleri keratokonuslu hastalar tarafından yaygın olarak tercih edilmektedir. Çünkü

bu lenslerin sert yapısı ve yüzeyi kornea düzensizliklerini ortadan kaldırır ve lensin arkasında gözyaşı oluşumunu teşvik eder. Ancak, düzensiz veya yüksek skar olan hastalar bunları tolere edemeyebilir (1).

Sert gaz geçirgen lensler hastalarda bazı zorluklar (dev papiller konjonktivit, kornea aşınması ve neovaskülarizasyon gibi) oluşturabilirler. Bazı hastalar intolerans ve alerjik reaksiyonlarla karşılaşabilirler (17). Diğer lensler arasında; hibrit lensler, skleral lensler veya sırt üstü lensler yer alır. Burada hastalar, yumuşak bir lens yerine sert bir lensi birleştirmeyi tercih eder (74,75). Yerleştirilmeden önce salinle doldurulan skleral lensler, korneaya temas etmeden sklera üzerinde durur, böylece daha fazla konfor sunar ve daha az skar izi kalır. Şiddetli keratokonusu olan veya geleneksel lensleri tolere edemeyen hastalarda skleral lensler kullanılabilir (1).

2.1.8.3. Kollajen Çapraz Bağlama

2007 yılından bu yana, kollajen çapraz bağlama (*collagen crosslinking*; CXL), hafif-orta dereceli vakalarda keratokonus ilerlemesini durdurmak için uluslararası olarak kullanılmaktadır (76,77).

CXL, invaziv olmayan bir yöntemdir. Kornea dokusunun sertliğini arttırmak ve ektatik hastalığı stabilize etmek için riboflavin (B₂ vitamini) göz damlaları ve UV tip A (UV-A) ışığı kullanılır. CXL, keratokonus hastalığının ilerlemesini durdurup kornea nakli ihtiyacını ortadan kaldırabilir. Ancak mevcut protokoller kapsamında keratokonuslu tüm hastalar CXL'e uygun değildir. Bu protokollerde keratokonus hastalarında hastalığın ilerlediğini gösteren dik keratometride artış, refraktif silindirde artış veya en iyi düzeltilmiş görme keskinliğinde (*best-corrected visual acuity*; BCVA) kayıp gibi objektif kriterler kullanılmaktadır (68). CXL tedavisini alabilmek için hastalarda bilinen başka bir kornea hastalığı olmamalı, 16 yaşından büyük olmalı, minimum kornea kalınlığı (CCT) 400 mikron olmalı ve maksimum keratometrisi < 60 D olmalıdır (77,78).

2.1.8.4. Kornea nakli

Kontakt lenslerin artık etkili olmadığı ve yeterli görme düzeltilmesinin sağlanamadığı durumlarda kornea nakli veya keratoplasti tercih edilir. Keratokonuslu bireylerin yaklaşık %10 ila %15'i bu işleme ihtiyaç duyar (1).

Tam kalınlıkta kornea nakli: Penetran keratoplasti veya tam kalınlıkta keratoplasti, konakçı korneanın tamamının çıkarılmasını ve yerine donör dokusunun

yerleştirilmesini içerir (79). Bu prosedür %90'ı aşan bir başarı oranına sahiptir ve birçok hastada 20/40 veya daha iyi görme keskinliği elde edilmektedir. Hastaların yaklaşık %15'inde sonradan görsel düzeltmeye ihtiyaç duyulmazken, %40'ında gözlüğe ihtiyaç duyulur ve %26'sında kontakt lens kullanılır.

Astigmatizma ameliyat sonrası yaygın bir sorundur ve kontakt lens düzeltmesi, refraktif cerrahi, rahatlatıcı kesiler, kama rezeksiyonu ve kompresif dikişler gibi çeşitli yöntemlerle çözülebilir (1).

Derin ön lameller keratoplasti: Derin ön lameller keratoplasti, hastanın arka kornea katmanlarını koruyarak, hastalıklı korneanın ön katmanlarının donör dokusuyla değiştirilmesini içeren cerrahi bir yöntemdir. Avantajları arasında daha hızlı iyileşme, daha hızlı görme restorasyonu ve daha az postoperatif komplikasyon sayılabilir. Tam kat nakil yapılan hastalar daha net görme elde etme eğilimindeyken, derin anterior lameller keratoplasti uygulanan hastalara kıyasla iç kornea tabakasından hücre kaybı ve nakil reddi gibi daha yüksek risklerle karşı karşıyadırlar (80). Bu prosedür daha az tercih edilmektedir (1).

Ön sınırlayıcı lamina nakli: Bu teknik, donör korneasının ön kısmından hastanın korneasının içine veya üzerine bir tabaka yerleştirilmesini içerir. Prosedür, UV korneal çapraz bağlama veya intrakorneal halka segmentleri için çok dik veya ince olan keratokonuslu gözlerde ilerleyici ektatik kornea değişikliklerini stabilize edebilir. Bunu yaparak hastalar penetran keratoplasti veya derin anterior lamellar keratoplastiden kaçınır veya ertelerler. Bu tekniğin ilerlemeyi durdurabildiği ve kontakt lenslerle görmeyi 5 ila 7 yıla kadar koruyabildiği gösterilmiştir (81).

2.1.8.5. Diğer Tedavi Şekilleri

İntrastromal kök hücre nakli: Keratokonuslu hastalarda kornea katmanlarını gençleştirmenin veya değiştirmenin çeşitli yolları araştırılmaya devam etmektedir. Deneysel yöntemler, keratokonus hastalarında kornea katmanlarını gençleştirmek veya değiştirmek için kök hücrelerin doğrudan korneaya enjekte edilmesini veya destekleyici yapılarla gömülmesini içerir. Deneysel yöntemler aynı zamanda kök hücrelerin kornea dokusuyla birleştirilmesini de içerir. Bu teknikleri doğrulamak için daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır (82).

2.2. Mitokondriyal Türevli Peptidler

Mitokondri, hem enerjinin hem de serbest radikallerin ana üreticisidir. Hücre apoptozunu düzenleyip, yaşlanma süreci sırasında meydana gelen fizyolojik olayların çoğunda yer aldığından, yaşlanma teorilerinin birçoğunda merkezde yer alır (83,84). Mitokondri içindeki proteinlerin çoğu nükleer genom tarafından kodlanır ancak mitokondrinin kendine özgü transkripsiyon mekanizması ve genomu da vardır (85,86).

Son yıllarda tanımlanan mitokondriyal türevli peptidler (*Mitochondrial-Derived Peptide*; MDP) ve mikropeptidlerin sayısı hızla artmaktadır. Şimdiye kadar mitokondri kaynaklı tanımlanan proteinlerden bazıları humanin, MOTS-c ve 6 adet SHLPs (*small humanin-like peptides 1-6*), SHMOOSE (*small human mitochondrial ORF over serine tRNA*) ve Gau (*gene antisense ubiquitous in mtDNAs*) bulunmaktadır. Bunlardan en çok çalışılanları humanin ve MOTS-c olduğundan bizim çalışmamızda bu peptidler kullanılmıştır (87).

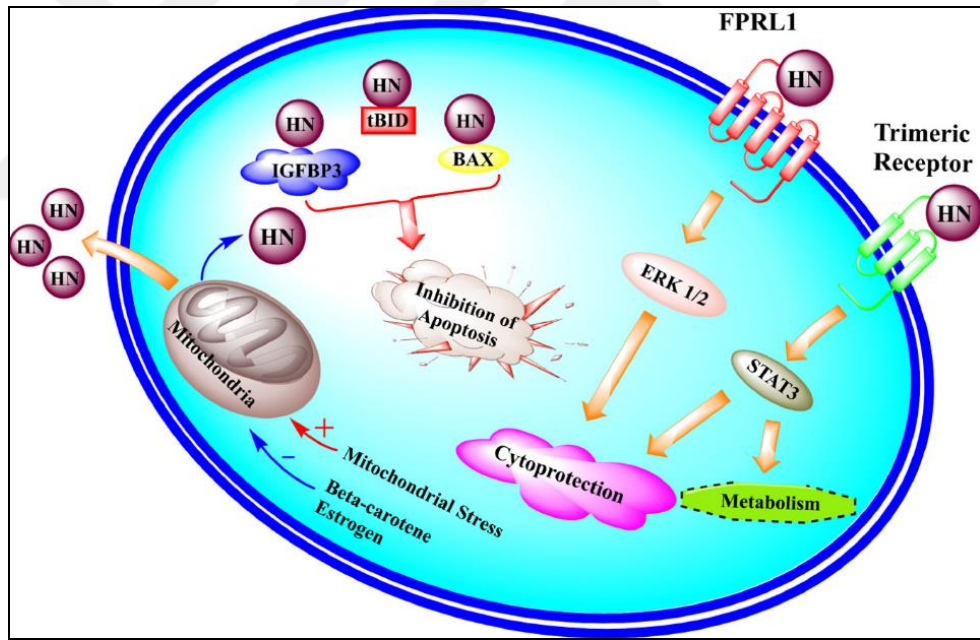
2.2.1. Humanin ve MOTS-c

Humanin ve MOTS-c, birçok hastalığın seyrinde ve yaşlanmayla beraber oluşan dejeneratif değişikliklere karşı koruyucu etkisinin olduğu gösterilen mitokondriyal peptidlerdir. Humanin, bazı sinyal mekanizmalarını düzenleyerek (JAK/STAT yolu ve BCL-2 gibi) hücrel stres koşullarına ve apoptoza karşı lökositler, germ hücreleri, nöronal dokular dahil olmak üzere çeşitli hücre tiplerinde koruyucu etkiler gösterir. Bu peptidler, stres koşulları altında mitokondriyal fonksiyonları düzenleyen temel sitoprotektif ajanlardır (2).

Humanin, antiapoptotik ve nöroprotektif etkileri olan doğal kısa mitokondriyal bir polipeptiddir (2). Humanin ilk olarak 2001 yılında Hashimoto ve ark. (88) tarafından Alzheimer hastası beyninin sağlıklı dokularından yapılan bir araştırmada keşfedilmiştir. Humanin, mitokondriyal 16S ribozomal RNA (rRNA) içindeki bir açık okuma çerçevesi (*Open Reading Frame*; ORF) bölümünde 75 baz çifti tarafından kodlanan ilk keşfedilen mitokondriyal kökenli peptiddir ve geni *MT-RNR2* olarak bilinir. Fizyolojik koşullarda humanin; beyin, böbrek, karaciğer, kalp ve iskelet kaslarını da kapsayan çeşitli organlardaki dokular tarafından eksprese edilir. Humanin endojen olarak üretilmesinden sonra kana salınır ve hedef hücrelere taşınır. Son zamanlarda yayınlanan veriler, endojen humaninin oksidatif stres ve sitotoksiste dahil olmak üzere çeşitli hastalıklara karşı koruyucu rolü olduğunu ileri

sürmektedir (88,89). Humaninin endotel hücrelerini ve fonksiyonunu ROS'a karşı koruduğu gösterilmiştir. Humanin analoglarının aterosklerotik plakları azalttığı ve endotelial NO sentaz (eNOS) ekspresyonunu artırdığı rapor edilmiştir (90,91).

Humanin, hücre metabolizmasında temel bir molekül olarak kabul edilir ve endokrin/parakrin/otokrin koruyucu stres yanıt faktörlerinin bir kaynağı olarak son yıllarda kapsamlı bir şekilde araştırılmıştır (92). Humaninin birçok dokuda hücre ölümüne karşı korumada önemli olduğu görünmektedir (93). Humaninin sitoprotektif işlevini, BCL-2 protein ailesinin hücre içi lokalizasyonuna aracılık ederek intrinsik veya mitokondriyal apoptotik yolu düzenleyerek gösterdiği bildirilmiştir. Humanin, BCL-2 ekspresyonunu yukarı (*up*) regüle eder ve apoptozu inhibe etmek için BAX ekspresyonunu baskılar (92,94). Humanin, BID ve BAX gibi diğer BCL-2 protein ailesi üyeleri ile etkileşebilir ve mitokondriye translokasyonu etkileyerek apoptozom oluşumunu ve kaspaz aktivasyonunu inhibe edebilir (95).



Şekil 2.4. Humaninin apoptozla ilişkisi. HN, Humanin; FPRL1, N-formil peptid benzeri reseptör 1; tBID, (truncated Bid), Bax, pro-apoptotik Bcl-2 protein aktivasyonunun belirteçleri; IGFB3, insulin-benzeri büyüme faktörü bağlayıcı protein 3; ERK1/2, Hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz 1/2; STAT3, Transkripsiyon 3 sinyal transdüseri ve aktivatörü (2)

Humanin ve MOTS-c, antiapoptoz, hücre stres yanıtı inflamatuvar ve substrat metabolizması dahil olmak üzere birçok biyolojik olayda rol almaktadır (3) (Şekil

2.4). Humanin, *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda osteoporozu, kardiyovasküler hastalık (KVH), Diabetes mellitus (DM) ve nörodejeneratif hastalıkların tedavisi sırasında apoptozu önemli ölçüde baskılamıştır. Humanin peptidinin oksidatif strese ve apoptozla ilişkili hastalıklara karşı geçerli bir terapötik seçenek olabileceği düşünülmektedir (2).

MOTS-c, humanin gibi mitokondri DNA'sından kodlanan mitokondriyal kaynaklı 16 amino asitlik bir peptiddir ve geni MT-RNR1 olarak bilinir. Nöroprototektif ve antidiyabetik etkileri gösterilmiştir. Farelerde yapılan çalışmada akut akciğer hasarında MOTS-c uygulamasının inflamasyonu baskıladığı gösterilmiştir (96,97). Metabolik stresin kemirgen modellerinde MOTS-c tedavisinin; insülin direncinde, tip 2 diyabette, obezitede faydalı etkileri açıklanmıştır. MOTS-c'nin kemirgenlerdeki metabolik koruyucu etkileriyle uyumlu olarak, insanlardaki serum düzeylerinin obezite, insülin direnci, tip 2 diyabet, kronik böbrek hastalığı ve endotel disfonksiyonu ile azaldığı da bildirilmiştir. Koroner arter hastalığı olup tip 2 diyabeti (NCT04027712), non-alkolik steatohepatiti ve obezitesi (NCT03998514) olan hastalarda MOTS-c ve MOTS-c analogu ile klinik araştırmalar yapılmaktadır (98).

Literatürde daha önce keratokonus hastalarında mitokondriyal peptidler olan humanin ve MOTS-c düzeyine yönelik herhangi bir çalışma yapılmamıştır. Bu çalışmamızda keratokonuslu hastalardan izole edilen kornea epitel hücrelerinde humanin ve MOTS-c düzeyleri ölçülerek kontrol grubu olarak seçilen sağlıklı kornea epitelinden izole edilen hücreler ile karşılaştırılmıştır.

2.3. Histatinler

Histatinler, endojen antimikrobiyal peptidlerin önemli bir sınıfıdır. Histatin peptidleri, *HTN1* ve *HTN3* geninden kaynaklanan 12 peptidten (histatin 1–12) oluşan histidin açısından zengin bir ailedir. En az 12 histidin kalıntısı ile uzunlukları 7-38 amino asit içerir ve histidin açısından zengin proteinler olarak adlandırılırlar (4,5).

1973 yılında tükürükte histidinden zengin bazı proteinlerin antimikrobiyal etkinlik gösterdiği keşfedilmiştir (99). 1987 yılında ise histatinler, ilk kez insan parotis sekresyonunda histidin açısından zengin proteinlerin yeni bir ailesi olarak tanımlanmış ve histatin 1, 3 ve 5'in tam aminoasit dizilimi belirlenmiştir (100).

Histidin içeriği zengin polipeptidlerin, antimikrobiyal ve antifungal özelliklere sahip olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (101). Histatin-1 ve histatin-3 insanlardaki *HTN1* ve *HTN3* genleri aracılığıyla sentezlenir (101). Histatin-5, histatin-3'ten elde edilir, yüksek oranda reaktif ve metallerle bağlanmaya yüksek afinitesi olan N-terminali içerir. Kimyasal yapı, ROS tutulmasına yol açar (102,103).

Histatin-1'in korneal epitelyal yara iyileşmesini hızlandırıp, korneal epitel göçünü ve *in vitro* yol bulmayı artırabileceği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (104). Kornea dışı dokularda yapılan çalışmalarda da, histatinlerin hücre yayılmasını ve göçünü desteklediği gösterilmiştir; bunların yara iyileştirici etkilerinin, epitelyal proliferasyonun önemli bir uyarımı olmaksızın Epidermal Büyüme Faktörü (*Epidermal Growth Factor*; EGF)'nden bağımsız olarak meydana geldiği düşünülmektedir (105). Histatin yoluyla yara iyileşmesine muhtemelen hücre dışı sinyalle düzenlenen kinazlar (*extracellular regulated protein kinase*; ERK) 1/2 mitojenle aktive olan protein kinazlar (*Mitogen-activated Protein Kinase*; MAPK) yolları aracılığıyla G-protein kenetli reseptörler (*G-protein coupled receptor*; GPCR) aracılık eder. Ayrıca, tanımlanmamış bir GPCR yolunun (Gαi bağlantılı) hücre göçü üzerindeki histatin peptidinin etkileri için kritik olduğu bildirilmiştir (106).

Histatin-5, antifungal aktivitesi açısından tüm histatin aile üyeleri arasında en güçlü olanıdır. Histatinler en büyük antifungal etkiyi *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* ve *Aspergillus fumigatus* gibi patojenik mantarlara karşı gösterir. Histatin-5, *Candida albicans* hücre duvarı proteinlerini (Ssa1/2) ve glikanları bağlar ve hücreler tarafından mantar poliamin taşıyıcıları aracılığıyla enerjiye bağlı bir şekilde alınır. Mantar hücrelerinin içine girdikten sonra, histatin-5 mitokondriyal fonksiyonları etkileyebilir ve oksidatif strese neden olabilir; bununla birlikte hücre ölümünün nihai nedeni, ozmotik stres tarafından tetiklenen hacim düzensizliği ve iyon dengesizliğidir (107,108).

Oküler yüzeyin bileşenlerinde ve hastalardan alınan Schirmer gözyaşı şeridi numunelerinde histatin ekspresyonunun varlığı gösterilmiştir. Histatin-1'in epitelyal göçü, yapışmayı, bariyer bütünlüğünü destekleyebildiği ve epitelyal-mezenkimal geçiş teşvik edici ajanların etkilerini azalttığı gösterilmiştir (5).

Yapılan bir çalışmada kuru göz hastalığı (*Aqueous deficient dry eye disease*; ADDE) hastalarında histatin-1 düzeylerinin normal hastalara göre daha düşük olduğu

ayrıca yaş ve histatin-1 seviyeleri ile negatif bir ilişki olduğu tespit edilmiştir. Oküler Yüzey Hastalık İndeksi (*Ocular Surface Disease Index*; OSDI) ve Schirmer I değerleri de dahil olmak üzere, kuru göz hastalığı için altın standart tanı ölçütleri ile histatin-1 konsantrasyonu arasında güçlü bir korelasyon bulunmuştur. 100 ng/ml histatin-1'deki her artış için, ADDE riskinde 0,5'lik bir azalma kaydedilmiştir (5).

Histatin-5, histatin-3'ten daha yüksek bir antifungal aktiviteye sahipken, histatin-3 çoğunlukla yara iyileşmesinde rol oynar. Hem histatin-3 hem de histatin-5, aktin ile etkileşime girer, ancak histatin-3, aktine daha güçlü bağlanır ve histatin-3 C-terminalindeki ekstra sekiz amino asit dizisi nedeniyle, histatin-5'ten daha düşük konsantrasyonda aktin yapısını etkiler (109).

Histatin-1 uygulanmasının BMP2 (kemik morfogenetik protein 2; *bone morphogenetic protein 2*) kaynaklı osteogenezi ve anjiyogenezi artırabileceği ve dolayısıyla büyük hacimli kemik defektleri için bir tedaviye dönüşme potansiyeline sahip olabileceği gösterilmiştir (110). Histatin-1'in kolon kanser hücresi olan Caco-2 epitelyal kanser hücrelerinde hücre-hücre yapışmasını desteklediği, bunun da transepitelyal direncin artmasına ve epitel tabakasının korunmasında önemli bir role yol açtığı gösterilmiştir. Histatin-1'in Caco-2 hücrelerinde hücre-hücre yapışma belirteçleri E-cadherin ve ZO'i arttırdığı, EGF ve TGF- β dahil olmak üzere epitelden mezenkimal geçişi indükleyici ajanların etkilerine azalttığı gösterilmiştir (111,112).

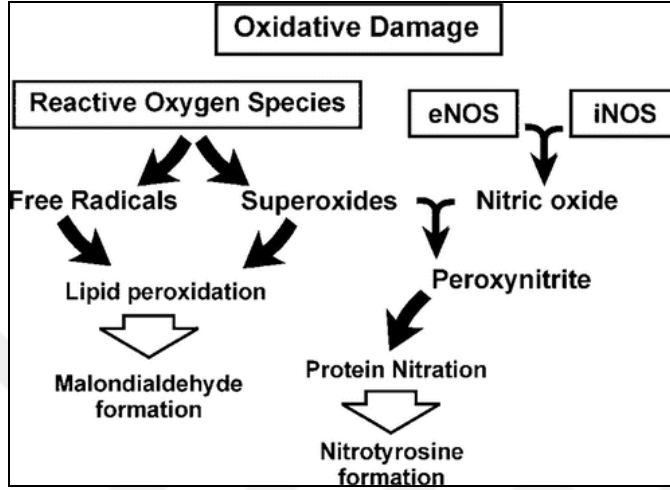
2.4. Oksidatif ve Nitrozatif Stres

2.4.1. Serbest Radikal

Dış kabuğunda bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron bulunan moleküle serbest radikal denir (113). Serbest radikaller, bir parçanın bir elektron tutacağı şekilde kimyasal bir bağın kırılması, bir radikalın başka bir radikal vermek üzere bölünmesi ve redoks reaksiyonları yoluyla moleküllerden oluşurlar (114).

Hücrelerde oksijen enerji kaynağı olarak kullanılmakta ve özellikle mitokondride adenosin trifosfat (ATP) sentezlenmesinin sonuçlarından biri olarak serbest radikaller oluşmaktadır. Oluşan bu maddeler genellikle ROS ve hücresel redoks işleminden kaynaklanan RNS'dir. Faydalı ve toksik maddeler arasındaki denge, yaşamın önemli bir yönüdür. Yüksek konsantrasyonlarda tüm hücre yapılarını hasara uğratabilecek olan oksidatif stresi oluştururlar (113-115).

İnsan vücudu, oksidatif strese karşı koymak için çeşitli mekanizmalara (antioksidanlar üretmek gibi) sahiptir. Antioksidanlar "serbest radikal temizleyiciler" olarak çalışıp ROS ve RNS kaynaklı hasarları onararak veya tamamen önleyerek bağışıklık savunmasını artırabilir, böylelikle kanser ve dejeneratif hastalık riskini azaltabilirler (116,117) (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Oksidatif yollar. iNOS, indüklenebilir nitrik oksit sentaz; eNOS, endotelial nitrik oksit sentaz (64).

Keratokonus patogenezinin gelişiminde mtDNA hasarının belirgin ve önemli bir rolü vardır. Yaşa uygun normal kornealarla karşılaştırıldığında, keratokonus korneaları, protein kodlayan mtDNA bölgesini etkileyen ve oksidatif fosforilasyonun mitokondriyal sürecini bozan mtDNA hasarında artma oluşturmaktadır. Oksidatif fosforilasyona giren proteinlerin ekspresyonundaki anormallikler, uygun olmayan ATP sentezine, artan ROS/RNS oluşumuyla da artan oksidatif hasara yol açar (118).

Keratokonus korneaları, transkript düzeyinde ve/veya farklı antioksidan enzimlerin aktivitelerinde bozukluk içerirler (8). Ekstraselüler SOD ve GSH düzeyleri keratokonus kornealarında normal örneklere kıyasla düşüktür (119,120). Keratokonus kornealarında artan ROS oluşumu, oksidatif stres ve mtDNA hasarı ve antioksidan savunmaların azalması, keratosit apoptozisine ve hücre dışı matrikste korneanın incelmeye ve deformasyonuna neden olur. Oksidatif stres apoptozunu hızlandırır (121). mtDNA'nın bütünlüğü, hücrelerin canlılığında önemli bir rol oynar ve mitokondriyal disfonksiyon keratokonus deformasyonuna katkıda bulunur (118).

Serbest radikaller arasında hidroksil ($\text{OH}\bullet$), süperoksit ($\text{O}_2\bullet^-$), nitrik oksit ($\text{NO}\bullet$), nitrojen dioksit ($\text{NO}_2\bullet$), peroksil ($\text{ROO}\bullet$) ve lipid peroksil ($\text{LOO}\bullet$) radikalleri bulunur. Hidrojen peroksit (H_2O_2), ozon (O_3), singlet oksijen ($^1\text{O}_2$), hipokloröz asit (HOCl), nitroz asit (HNO_2), peroksinitrit (ONOO^-), dinitrojen trioksit (N_2O_3), lipid peroksit (LOOH), serbest radikal değildirler ve genellikle oksidanlar olarak adlandırılırlar. Ancak canlı organizmalarda kolayca serbest radikal reaksiyonlarına yol açabilirler ve oluşan bu radikaller lipidler, proteinler, DNA gibi çeşitli organik substratlarla reaksiyona girecek elektronlara sahip çok kararsız moleküllerdir (122).

2.4.1.1. Serbest Radikallerin ve Oksidanların Oluşumu

ROS ve RNS oluşumu hücrelerde enzimatik ve non-enzimatik reaksiyonlar olmak üzere iki şekilde gerçekleşebilir. Enzimatik reaksiyonlar arasında solunum zinciri, prostaglandin sentezi, fagositoz ve sitokrom P450 sistemi ile ilgili reaksiyonlar yer alır (123,124). Hidroksil radikali ($\text{OH}\bullet$), *in vivo* olarak en reaktif serbest radikaldır, O_2 'nin reaksiyonu ile oluşur, 2H^+ ve 2O_2 ile Fe^{2+} veya Cu (katalizör) varlığında gerçekleşir ve Fenton reaksiyonu olarak bilinir (125,126).

Serbest radikaller, oksijenin organik bileşiklerle enzimatik olmayan reaksiyonlarından ve iyonlaştırıcı radyasyonlarla başlatılan reaksiyonlardan da üretilir (non-enzimatik). Ayrıca, mitokondride aerobik solunum esnasında da serbest radikaller non-enzimatik olarak meydana gelebilirler (126-128).

ROS ve RNS üretimi, endojen veya eksojen kaynaklardan olabilir. Endojen serbest radikallerin üretimi, inflamasyon, bağışıklık hücresi aktivasyonu, zihinsel stres, çok fazla egzersiz, iskemi, enfeksiyon, kanser ve yaşlanma sürecinde meydana gelebilir. Eksojen ROS/RNS ise hava kirliliği, sigara dumanı, su kirliliği, alkol, ağır veya geçiş metallerine (Cd, Hg, Pb, Fe, As) maruziyet, bazı ilaçların kullanımı (siklosporin, takrolimus, gentamisin, bleomisin), pişirme (tütülenmiş et, kullanılmış yağ, katı yağ), endüstriyel çözücüler ve radyasyondan kaynaklanabilir (127,129).

2.4.2. Antioksidanlar

Canlı organizmalarda ROS ve RNS'nin hücrenin yapısına ve işleyişine toksik olacak hasarı detoksifiye etmek, engellemek veya ortadan kaldırmak için çalışan mekanizmalar antioksidanlar olarak tanımlanmaktadır. Antioksidanlar, serbest radikallere bağlı hasarların oluşumunu engellemek için hızlıca onlarla reaksiyona girerler. Hücrenin metabolik işleyişi esnasında ortaya çıkan serbest radikallerin

(ROS, RNS) zararlarının engellenmesinde ve bunlara bağılı gelişebilecek hastalıkların engellenmesinde antioksidanların büyük katkısı olduğu belirtilmektedir (130-132).

Antioksidanlar iki grupta sınıflandırılabilir: enzimatik olanlar ve non-enzimatikler. Enzimatik olan başlıca antioksidan enzimler şunlardır:

- 1- SOD (serbest radikallere karşı ilk savunma hattını oluşturur),
- 2- Katalaz (CAT),
- 3- Glutasyon peroksidaz (GPX),
- 4- Glutasyon redüktaz (GRX) (133-135).

Non-enzimatik antioksidanlar da kendi içinde metabolik antioksidanlar ve besleyici antioksidanlar olmak üzere ikiye ayrılabilir. Vücuttaki metabolizma tarafından üretilen metabolik antioksidanlara endojen antioksidanlar da denilmektedir. Bunlar; GSH, koenzim Q10, bilirubin, lipoik asit, L-arjinin, melatonin, ürik asit, transferrin, metal şelatlayıcı proteinler, vb. gibi maddelerdir. Vücutta üretilemeyen dışardan alınması gereken ekzojen antioksidanlara ise besleyici antioksidanlar da denilmektedir. Bunlar; E vitamini, C vitamini, karotenoidler, flavonoidler, omega-3 ve omega-6 yağ asitleri ve selenyum, manganez, çinko gibi eser metallerdir. Bunlar gıdalar veya takviyeler yoluyla sağlanabilir (128,136).

2.4.2.1. Antioksidanların Etki Mekanizmaları

Antioksidanların etki mekanizmaları temel olarak aşağıdaki gibidir:

- 1) ROS'ları ortamdan uzaklaştırmak veya reaktif olmayan moleküllere dönüştürmek,
- b) Serbest radikallerin hasar yapıcı zincir reaksiyonları başlatmasını önlemek,
- c) Serbest radikallerin verdiği hasarı onarıcı faaliyetler göstermek,
- d) Ortamda bulunan katalitik metal iyonlarını uzaklaştırmak (134).

Bir antioksidan bir serbest radikalle reaksiyona girdiğinde, bu defa kendi oksitlenir. Bundan dolayı vücutta antioksidan kaynaklarının durmadan yenilenmesi gerekir. Bir sistemde bir antioksidan madde serbest radikallere karşı etkili olurken, başka bir sistemde aynı antioksidan etkisiz hale gelebilir. Bazen de antioksidanın kendisi pro-oksidan gibi toksik ROS/RNS üretebilir. Antioksidan süreç zincir kırma veya önleme şeklinde gerçekleşebilir. Bir radikal bir elektronu serbest bıraktığında veya çaldığında ikinci bir radikal meydana gelir. Sonra bu etki başka bir molekül üzerinde aynı şekilde devam eder. Oluşan serbest radikal, zincir kıran bir antioksidan

(C, E vitamini, karotenoidler, vb.) tarafından stabilize edilince veya zararsız bir ürüne parçalanınca zincir kırılır. Zincirleme reaksiyonun klasik örneklerinden biri lipit peroksidasyonudur. SOD, CAT ve GPX gibi bir antioksidan enzim, zincir başlatma hızını azaltarak (örneğin serbest radikalleri süpürme) veya bakır, demir gibi geçiş metali radikallerini stabilize ederek oksidasyonu önleyip antioksidan savunmayı sağlayabilir (135).

2.4.3. Nitrozatif Stres

Birçok kanserin ve kronik hastalığın mekanizmasında oksidatif stres anahtar olayıdır. Canlı organizmalar kimyasal toksik maddelere (UV, hiperglisemi, sigara dumanı vb. gibi) maruz kaldığında nitrozatif-oksidatif stres riski ortaya çıkar (137).

Kornea, gelen ışığın daha arka oküler yapılara geçişine izin veren şeffaf bir avasküler dokudur. Bu nedenle, bu doku sürekli olarak UV aralığı da dahil olmak üzere geniş bir ışık spektrumuna maruz kalır. UV maruziyeti, çoğu hücre ve doku için zararlı olan ROS ve RNS üreten, kanıtlanmış bir çevresel stres faktörüdür (137).

Nitrozatif stres, RNS'nin nitrozonyum (NO^+) grubunu nükleofil bir gruba aktarması sonucu biyomoleküllerin uğradığı streştir. Meydana gelen reaktif türlerin nükleik asit (DNA, RNA) protein ve glutatyon (GSH) gibi antioksidanları modifiye etmesi nitrozatif stresin temelini oluşturur. RNS de oksijen radikalleri gibi lipit peroksidasyonuna neden olabilir, nükleik asitlerde (DNA, RNA) zincir kırılmalarına ve/veya baz modifikasyonlarına neden olabilir. Ayrıca metal iyonlarında oksidasyona neden olup, proteinleri oksitleyebilir ve böylelikle antioksidanların aşırı tüketilip bitmesine neden olabilirler. Oksidatif, sitotoksik yan ürünlerin birikmesi, çeşitli kornea proteinlerinin değişmesine neden olarak bir dizi olayı tetikleyip apoptoza ve sonunda hücre kaybı ile korneal incelmeye neden olabilir. Yapılan çalışmalar keratokonus patogenezinde artmış nitrik oksitin (NO) etkili olduğunu göstermiştir. Özellikle de peroksinitritin yüksek oranda toksik olduğu belirtilmiştir (6-8).

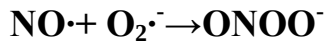
2.4.3.1. Nitrik Oksit

NOS tarafından L-arjininden oksidatif deaminasyonla üretilen NO, göz boyunca çeşitli ve karmaşık hücresel süreçlerde bir aracı olarak hizmet eder. NO'nun sitotoksik etkilerine, NO ve süperoksitlerin hızlı reaksiyonu ile üretilen güçlü bir oksidan olan peroksinitrit aracılık eder. Peroksinitrit, proteinler, protein olmayan sülfhidriller, metiyonin, DNA ve fosfolipitlerle reaksiyona girer. Peroksinitrit, stabil

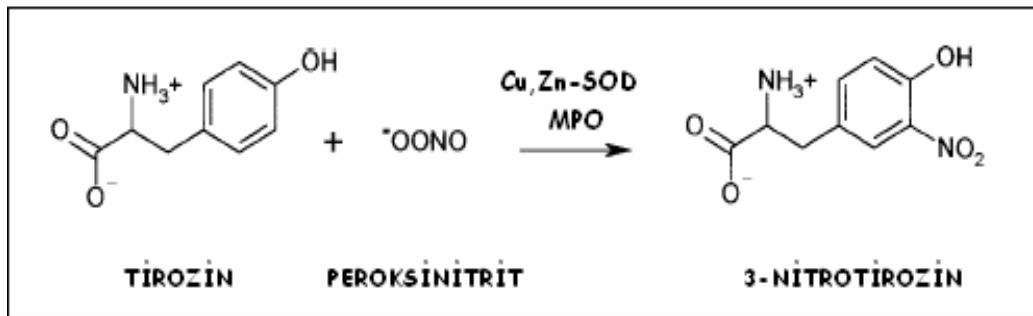
bir ürün olan 3-nitrotirozin (3-NT) oluşturmak için tirozinin fenolik halkası ile reaksiyona girer. 3-NT kalıntılarının gösterilmesi, peroksinitrit ve nitrojen ile ilişkili oksidanlar için spesifik bir belirteç olarak kabul edilir (138-146) (Şekil 2.5).

2.4.3.2. 3-Nitrotirozin

Keratokonüs kornealarında 3-NT oluşumunun artması, serbest radikallerin patogeneizde önemli bir rolü olduğunu düşündürmektedir. Peroksinitrit aracılı tirozin nitrasyonu ve ayrıca peroksinitritin kendisi değişmiş biyolojik fonksiyonlara yol açabilir (147-150). Yapısal proteinler, polimerik yapılarının bozulmasıyla sonuçlanan peroksinitrit tarafından nitrasyonun ana hedefleri gibi görünmektedir (141,151). Proteinler üzerindeki etkiye ek olarak, hem NO hem de peroksinitrit, sitotoksik yolda yer alır. Hem NO hem de peroksinitrit, DNA için toksiktir ve mutasyonlara ve DNA zinciri kopmalarına yol açabilirler (139,152). Keratokonusta, düşük seviyelerde NO veya peroksinitrite sürekli maruz kalmanın apoptozu tetikleyebileceği ve muhtemelen keratokonüs kornealarında artan apoptotik aktivitenin patogeneizde rol oynayabileceği rapor edilmiştir (32,152). iNOS (NOS2) enzimi NO'dan peroksinitriti (ONOO⁻) oluşturur. Burada NO ile reaksiyona giren molekül O₂⁻'dir. Bu reaksiyon aşağıdaki gibidir (153):



3-NT, peroksinitritin hücrede bulunan proteinlerin içindeki veya serbest haldeki tirozinin fenolik halkasına nitro grubunu eklemesiyle oluşur. Bu reaksiyon hem spontan olarak oluşabilir hem de SOD, geçiş metalleri, CO₂ ve myeloperoksidaz (MPO) enzimi tarafından da katalize edilerek oluşabilir (154).

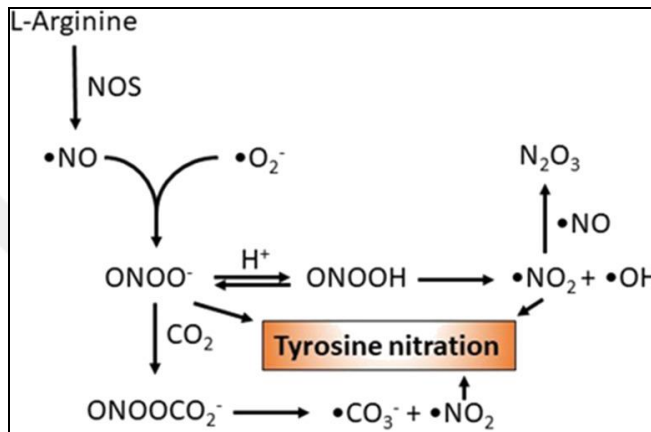


Şekil 2.6. Tirozinden 3-nitrotirozinin oluşumu

Peroksinitrit reaktif nitrojen türlerindendir ve lipitlere, proteinlere ve DNA'ya önemli ölçüde toksisiteye sahip bir oksidandır. Bu makromoleküllerin oksidatif

strese maruz kaldığını biyobelirteçlerle gösterebiliriz (malondialdehit lipidlerin, methemoglobin proteinlerin oksidatif hasarını gösteren biyobelirteçlerdendir) (155).

Peroksinitritin tirozini orto pozisyonunda nitrolaması ve fenolik halkanın ortamdan ayrılmasıyla 3-NT oluşur ve tirozin stabil hale gelir (Şekil 2.6; Şekil 2.7). Plazmada 3-NT varlığı organizmada çeşitli hasarların olduğunu gösterebilir (156). Organizmadaki en yüksek ölçülen 3-NT değeri kronik böbrek hastalarının septik şoklarında gözlenen ve yaklaşık 120 pM olarak ölçülen değerdir (157).



Şekil 2.7. NO ve bazı önemli nitrozatif türlerin sentezi. Tirozin nitrasyonu, yani 3-nitrotirozin, tipik olarak peroksinitrit oluşumunun bir biyolojik belirteci olarak kullanılır. NOS, nitrik oksit sentaz; NO, nitrik oksit; O₂⁻, süperoksit radikali; ONOO⁻, peroksinitrit; ONOOH, peroksinitröz asit; NO₂, nitrojen dioksit; •OH, hidroksil radikali; ONOOCO₂⁻, nitrosoperoksokarbonat; CO₃⁻, karbonat radikali; N₂O₃, dinitrojen trioksit (158)

Normal korneadaki ROS ve RNS düzeyi, antioksidan savunma mekanizmaları tarafından düzenlenir, ancak bazı çalışmaların sonuçları, keratokonusta transkript düzeyinde ve/veya farklı antioksidan enzimlerin aktivitelerinde hasar olduğunu düşündürmektedir (8). Normal numunelerle karşılaştırıldığında, keratokonus kornealarında ekstraselüler SOD aktivitesi azalmıştır (119,159) SOD, süperoksidin oksijen ve hidrojen peroksit dismutasyonundan sorumlu önemli bir enzimdir. SOD aktivitesindeki değişiklikler, artan miktarda süperoksit radikallerinin oluşumuna yol açabilir (160). Ayrıca, keratokonus kornealarında, UV ile indüklenen lipid peroksidasyonu tarafından

üretileen reaktif aldehitleri detoksifiye eden aldehit dehidrogenaz sınıf 3'ün (ALDH3) düzeylerinin düşük olduğu da gösterilmiştir (8,13,161).

Normal kornea ile karşılaştırıldığında, keratokonus korneaları, süperoksit (13) dahil olmak üzere artan stres kaynaklı ROS üretiminin yanı sıra peroksinitrit oluşumu için bir belirteç olan 3-NT birikiminde ve NO üretiminde artış gösterirler. Bowman katmanının kırık bölgesine yakın stromal hücrelerinde yüksek miktarlarda eNOS boyanması tespit edilmiştir (64). Artan ROS ve RNS oluşumu oksidatif strese yol açar ve keratokonus kornealarında mtDNA bozukluğuna neden olabilir (120).

Yapılan çalışmalarda Alzheimer ve Parkinson hastalığı gibi nörolojik hastalıklar, hipertansiyon, KVH (ateroskleroz, koroner arter hastalıkları) ve diyabetik vaskülopatide nitrotirozin patogeneizde önemli bir etken olarak saptanmıştır. Dokularda ölçülen nitrotirozin düzeyleri, reaktif nitrojen varlığını ve hastalıkların ortaya çıkabilme ihtimalinin varlığını bize göstermektedir (162).

2.4.3.3. Nitrozatif Stresin Hastalıklara Etkisi

Modern yaşam tarzının etkisi, diyet, bitki sağlığı için kullanılan maddeler gibi kimyasallara maruz kalma, egzersiz eksikliği ve hareketsiz yaşam tarzı gibi nedenler reaktif stres (RS) ve hastalıkların tetiklenmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Serbest radikallerin üretimi ve temizlenmesindeki dengesizlik ve RS'nin (oksidatif, nitrozatif ve halojenatif) indüksiyonu, KVH, DM, nörodejeneratif hastalıklar ve kanser gibi çeşitli kronik hastalıkların etiyolojisinde önemli bir rol oynar. Serbest radikallerin ve reaktif türlerin metabolik bozukluklardaki ve birçok hastalığın başlangıcındaki etkisi uzun yıllardır birikmektedir. Artık birçok kronik hastalığın ana nedeni olarak kabul edilmektedirler. Yüksek seviyelerde serbest radikallere maruz kalmak, proteinler, lipitler ve DNA üzerinde moleküler yapısal etkiye neden olabilir. Ayrıca enzim homeostazisinin fonksiyonel değışimine neden olarak gen ekspresyonunda sapmalara yol açabilir. Antioksidan enzimlerin endojen olarak tükenmesi, eksojen antioksidanlar kullanılarak hafifletilebilir. İnsanların hastalıklarının tedavisinde eksojen antioksidanların yardımcı ajan olarak kullanımına yoğun ilgisi, bu hastalıkların daha iyi anlaşılmasına olanak tanımıştır (163).

Serbest radikaller özellikle süperoksit anyon radikali, hidroksil radikali, alkilperoksil gibi radikaller birçok hastalıkların patogenezinde rol alır. Bunlar güçlü bir şekilde lipit peroksidasyonuna neden olurlar. Oluşan peroksinitritler bazı

hasarlara neden olabilirler. DNA bazları ROS oksidasyonuna karşı çok hassastır ve DNA bazlarının oksidasyonu hem nükleer hem de mtDNA'da mutasyon ve delesyona neden olabilir. mtDNA, ROS kaynağına yakınlığı ve nükleer DNA'ya göre yetersiz onarım kapasitesinden dolayı oksidatif hasara daha duyarlıdır (164).

Kronik inflamasyon, reaktif oksijen ve nitrojen türlerinde artışla ilişkilendirilmiştir. Bu da epigenetik değişikliklere, genomik istikrarsızlığa ve DNA mutasyonlarına neden olur (165). Günümüzde yaşa bağlı kronik hastalıklarda (romatoid artrit, kalp-damar hastalıkları, kanser vb.) ve bunlarla ilişkili mortalite ve morbiditede bir artış görülmektedir. DM gibi bazı metabolik hastalıklar artmış lipid peroksidasyon düzeyi ile ilişkilendirilmiştir. Dokularda üretilen ROS, lipitlere, nükleik asitlere ve proteinler gibi moleküllere direkt olarak hasar verebilir (166).

2.5. Ferroptoz

Hücre ölümü biçimleri, programlanmamış hücre ölümü ve programlanmış hücre ölümü olmak üzere iki kategoriye ayrılır. Programlanmamış hücre ölümü, esas olarak nekroz olmak üzere pasif ölüm türüdür. Programlanmış hücre ölümü, herhangi bir dışsal müdahale olmaksızın hücre ölümünü düzenleyen, büyüme ve gelişme ile iç çevresel homeostaz bağlamında meydana gelen fizyolojik bir durumdur. Programlanmış hücre ölümü, otofaji, apoptoz, programlanmış nekroz, piroptoz ve ferroptoz dahil aktif hücre ölümü olarak sınıflandırılmaktadır (167).

İlk olarak 2012'de ortaya atılan ferroptoz, lipid hidroperoksitlerin demire bağlı olarak ölümcül seviyelerde birikmesiyle karakterize edilen, programlanmış bir hücre ölümü şeklidir. Başlıca özellikleri; aşırı demir yüklenmesi, lipid peroksidasyonu ve ROS birikimidir (9,10). Ferroptozdaki son adım, tam hücre yetmezliğine neden olan aşırı lipid peroksidasyonudur. Ferroptoz, daha önce yaygın olarak oksidatif stres kaynaklı hücre ölümü biçiminin birçok özelliğini sergilemesine rağmen, onu farklı bir hücre ölümü biçimi olarak ayıran birçok yönleri vardır. Örneğin, ferroptoz, hidrojen peroksit kaynaklı nekroz gibi oksidatif stresten morfolojik ve işlevsel olarak farklıdır (9,10).

Transferrin reseptör 1 (TFR1) hücre dışı ortamdan hücrelere demir alımını sağlar ve ferroptoz için gerekli hücrel demir havuzuna katkıda bulunur. TFR1, transferrin ile etkileşimi yoluyla hücrel demir alımında önemli bir rol oynayan ferroptozun önemli bir aracısıdır. Dolaşımdaki demir (ferrik; Fe^{+3}), TFR1 yoluyla

hücrelere taşınır ve daha sonra endozomlarda Fe^{+2} 'ye dönüştürülür. Aşırı Fe^{+2} , Fenton reaksiyonu yoluyla lipid peroksidasyonunun birikmesine yol açarak ferroptozu yol açar. Ferroptozun bir özelliği hücre yüzeyinde TFR1 birikiminin gerçekleşmesidir. TFR1, spesifik bir ferroptoz belirteci olarak kabul edilir (168-172).

Ferroptoz indükleyicileri olan erastin ve RSL3 (*RAS-selective lethal*) ile GSH ve GPX4 içeren lipid onarım sistemlerinin hasarlanması ile çarpıcı biçimde modüle edildiğinden ferroptotik ölüm, programlanmış hücre ölümü şeklindedir (10,48).

Yağ asidi metabolizması, bir dizi enzim tarafından ince ayarlanmış anabolik (yağ asidi sentezi ve lipogenez) ve katabolik (lipoliz ve yağ asidi oksidasyonu) yollara ayrılmıştır (173). Endoplazmik retikulum ve mitokondriyal dış zar üzerinde eksprese edilen Açıl-KoA sentetaz uzun zincirli ailesi (ACSL, *acyl-CoA synthetase long-chain*), yağ asitlerini açıl-KoA'lar oluşturmak için katalize edebilir. ACSL4, ferroptoz duyarlılığını belirleyen önemli bir enzim olup, hem ferroptozun hassas bir biyobelirtecidir hem de ferroptozu önemli katkı sağlar (174-176).

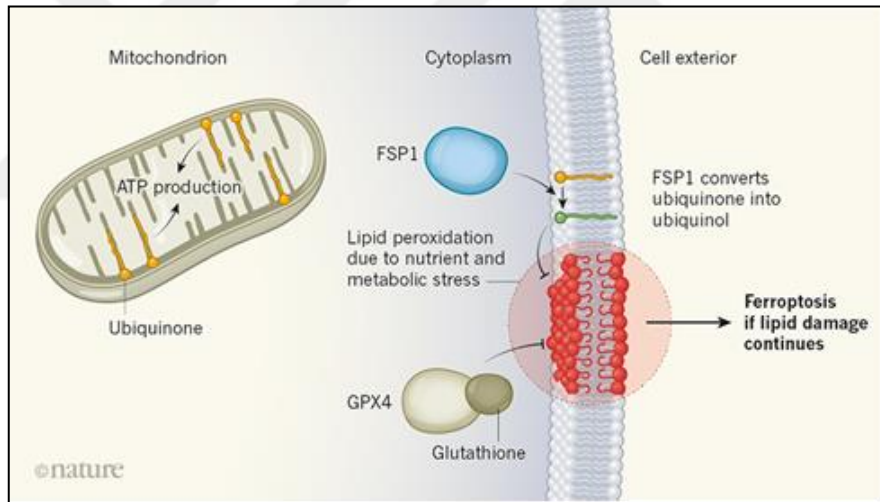
2.5.1. Ferroptoz Oluşum Mekanizmaları

Lipid peroksidasyonu, hücre membranlardaki PUFA (çoklu doymamış yağ asitleri; *polyunsaturated fatty acid*)'nın serbest oksijen radikalleri aracılığıyla aldehitler, alkoller ve peroksitler gibi çeşitli ürünlere yıkılması reaksiyonudur. Bu bileşikler hücre metabolize edebilir veya bir kısmı hücrenin diğer bölümlerine diffüze olup orada da hasar oluşturabilirler. Böylece doku hasarına neden olup çoğu hastalığın patogenezinde rol alabilirler (177). PUFA'ların temel sekonder oksidasyon ürünü olması ve serbest radikal hasarıyla ilişkili pek çok hastalıkta seviyelerinin yükseldiği bilindiğinden, MDA en sık kullanılan oksidatif hasar belirteçleridir (178). Ferroptozda da lipid peroksidasyonun gerçekleştiği gösterilmiştir (48).

Ferroptozun birçok gen ve molekül tarafından düzenlendiği bildirilmiştir. Endojen antioksidan savunma sistemi, ferroptozun başlaması üzerine oksidatif hasarı önlemek için aktive edilebilir. Nükleer faktör eritroid 2 ile ilişkili faktör 2 (Nrf2), GPX4'ün bir kofaktörü olan GSH sentezi yoluyla ferroptotik tepkilerin modüle edilmesinde çok önemli bir rol oynar (179-182). GPX4'ün çeşitli ferroptoz indükleyicilerinin hedefi olduğu, lipid ve diğer peroksitlerin azalmasını katalize ettiği düşünülmektedir. Onarılmamış lipid peroksitler, GSH eksikliği ve GPX4 aktivitesinin kaybının sonucu olarak birikerek ferroptozu neden olmaktadır (183,184). İnsan

Apoptozu indükleyen faktör mitokondri ile ilişkili 2'nin (AIFM2, *apoptosis inducing factor mitochondrion-associated-2*) daha önce bilinmeyen bir anti-ferroptotik gen olduğu tespit edilmiştir. Başlangıçta proapoptotik bir gen olarak tanımlanan AIFM2, ferroptoz baskılayıcı protein 1 (FSP1, *ferroptosis suppressor protein-1*) olarak yeniden adlandırılmış ve GPX4'ün silinmesiyle ortaya çıkan ferroptozu karşı koruma sağladığı ortaya konmuştur. Ayrıca, FSP1 tarafından ferroptozun baskılanmasına ubiquinonun (koenzim Q10, CoQ10) aracılık ettiği de gösterilmiştir. FSP1, glutatyondan bağımsız bir ferroptoz baskılayıcıdır (185).

CoQ10, hücrenin enerji taşıyıcısı olan ATP molekülünün üretimine yardımcı olan mitokondri dahil olmak üzere lipid zarlarında bulunan bir antioksidandır. FSP1, hücre zarındaki CoQ10'u hedefleyerek molekülü ubiquinole indirger. Ferroptoz, peroksidasyon adı verilen lipid modifikasyonu hücre zarına zarar verdiğinde oluşur. Ubiquinol peroksidasyonu inhibe ederek ferroptozu bloke eder (185-187) (Şekil 2.9).



Şekil 2.9. FSP1 (ferroptoz supresör protein 1) ile hücre ölümünün engellenmesi (186).

Fe^{+2} ile indüklenen lipid peroksidasyonu, apoptotik olmayan hücre ölümünü yani ferroptozu tetikler. Yaygın olarak eksprese edilen peroksiredoksinler (PRDX, *peroxiredoxins*) antioksidan enzim ailesindendir ve redoks sensörü PRDX1, hidrojen peroksiti indirgeme yeteneğine sahiptir. Memelilerde farklı hücresel lokalizasyona sahip altı PRDX proteini izoformu (PRDX1-6) bulunur (188,189).

Keratokonius kornea epitelinde apoptoz gibi programlı bir hücre ölümü olan (167) ferroptoz üzerine herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Tek bir biyobelirteç

ile ferroptozu araştıran yayınlar olduğu gibi (190,191) iki veya üç biyobelirteç ile ferroptozu inceleyen araştırmalar da bulunmaktadır (192-194). Bizim bu çalışmamızda dört biyobelirteç ile ferroptoz değerlendirilmiştir.

2.5.2. Ferroptoz Ölçüm Parametreleri

Malondialdehit (MDA): Lipit peroksidasyonunun önemli bileşiklerinden biri olan MDA, oksidatif durumun belirlenmesinde yaygın şekilde kullanılmaktadır. MDA, hem serbest hem de makromoleküllerin SH ve/veya NH₂ gruplarına bağılı olarak bulunur. Bağılı form idrarla atılır. Bu nedenle, MDA düzeyinin değerlendirilmesi, oksidatif stresin belirlenmesinde önemli bir belirteçtir (195).

Transferrin reseptörü-1 (TFR1): Transferrin reseptör 1 (TFR1) hücre dışı ortamdan hücrelere demir alımını sağlar ve ferroptoz için gerekli hücrel demir havuzuna katkıda bulunur (168). TFR1, transferrin ile etkileşimi yoluyla hücrel demir alımında önemli bir rol oynayan ferroptozun önemli bir aracısıdır (169,170). Dolaşımdaki demir, ferrik iyon (Fe⁺³), TFR1 yoluyla hücrelere taşınır ve daha sonra endozomlarda Fe⁺²'ye dönüştürülür. Aşırı Fe⁺², Fenton reaksiyonu yoluyla lipit peroksidasyonunun birikmesine yol açarak ferroptozu yol açar (171). Ferroptozun önemli bir özelliğı hücre yüzeyinde TFR1 birikiminin gerçekleşmesidir. TFR1 tarafından demir alımının yukarı düzenlenmesi, ferroptozis için gerekli olan redoks-aktif demir havuzunu artırır. TFR1, spesifik bir ferroptoz belirteci olarak kabul edilmektedir (172).

Asil-KoA sentetaz uzun zincirli aile üyesi 4 (ACSL4): Endoplazmik retikulum ve mitokondriyal dış zar üzerinde eksprese edilen ACSL4, yağ asitlerini açıl-KoA'lar oluşturmak için katalize edebilir. ACSL4, ferroptoz duyarlılığını belirleyen PUFA metabolizması için önemli bir enzim olup, ferroptozun hassas biyobelirtecidir ve ferroptozu önemli bir katkı sağlar (174-176).

Glutasyon Peroksidaz (GPX4): GPX4 önemli antioksidan enzimlerden biridir. GPX4'ün çeşitli ferroptoz indükleyicilerinin hedefi olduğu, lipit ve diğ er peroksitlerin azalmasını katalize ettiğı düşünülmektedir (183). Onarılmamış lipit peroksitler, GSH eksikliği ve GPX4 aktivitesinin kaybının bir sonucu olarak birikerek ferroptozu neden olmaktadır (184).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamız prospektif olarak yapılmıştır. Çalışmamıza dahil edilen hastalardan ve postmortem vakaların yakınlarından bilgilendirilmiş onam alınarak yapılmıştır. Araştırma öncesinde Gaziantep Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 08.06.2022 (2022/199) ve 14.09.2022 (2022/299) tarihlerinde etik kurul onayı alınmıştır.

3.1. Araştırmanın Tipi, Yeri ve Zamanı

Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Şahinbey Araştırma ve Uygulama Hastanesi Göz polikliniğinde 15 Şubat 2023 – 15 Haziran 2024 tarihleri arasında keratokonus tanısı ile takip ve tedavi edilen 141 hastaya ait kornea epitel örnekleri ve sağlıklı kontrol olarak yine aynı hastanede postmortem 24 saat içinde alınan 45 adet kornea epitel örnekleri prospektif olarak çalışmaya dahil edilmiştir.

3.2. Araştırmaya Dahil Olma Kriterleri

Klinik olarak ilerleyici keratokonus hastalığı tespit edilmiş ve Amsler-Krumeich Evrelemesine göre (Tablo 3.1) ilk üç evre içinde olan hastalar çalışmamıza dahil edilmiştir (196,197). Son altı ay içerisinde ardışık iki kontrolde; en dik simule keratometri (Sim Kmax) değerinin 1 diyoptri (D) veya daha fazla artması, santral korneal astigmatizmada 1 D veya daha fazla artış, görme keskinliğinde 1 sıra veya üzerinde azalma tespit edilmesi, kornea kalınlığının en ince noktada ≥ 350 μm olması, keratokonus dışında ek oküler hastalığı olmayan saydam bir korneası olan hastalar. En az iki hafta önce kontakt lens kullanımını bırakmış, tedavi sonrası en az 12 ay takibe gelen hastalar çalışmamıza dahil edilmiştir.

3.3. Araştırmadan Hariç Tutulma Kriterleri

İntraoküler veya refraktif cerrahi öyküsü olan, korneal skar dokusu olan hastalar ve Evre 4 keratokonus hastaları, korneal yara iyileşmesini etkileyecek sistemik ya da kollajen doku hastalığı olan, sistemik bir ilaç kullanan, ciddi kuru gözü olan, gebelik ya da laktasyon dönemindeki hastalar ile kronik oküler yüzey hastalığı bulunan ya da herpetik keratit geçirme hikayesi, glokom tanısı, korneal distrofi tanısı, Pellusid marjinal dejenerasyon, keratoglobus gibi diğer korneal ektatizi tanısı olan hastalar çalışmamıza dahil edilmemiştir.

Tablo 3.1. Amsler-Krumeich Keratokonus Evrelemesi

Evre 1	5 Diyoptri (D)'den az astigmatizma ve/veya miyopi 48 D'den az ortalama K değeri Ekzantrik dikleşme Korneal skar dokusunun olmaması
Evre 2	5–8 D arası astigmatizma ve/veya miyopi 48–53 D arasındaki ortalama K değeri En ince kornea kalınlığı 400 μm 'den fazla Korneal skar dokusunun olmaması
Evre 3	8–10 D arası astigmatizma ve/veya miyopi 53 D üzeri ortalama K değeri En ince kornea kalınlığı 300 – 400 μm arasında Korneal skar dokusunun olmaması
Evre 4	Refraksiyonun alınamadığı 55D üzerinde ortalama K değeri En ince kornea kalınlığı 200 μm Santral korneda skar dokusu

Bizim çalışmamızda pratik ve yaygın olarak kullanılan Amsler-Krumeich sınıflaması kullanılmıştır. Amsler-Krumeich sınıflamasında keratokonus 4 evreye ayrılmaktadır. Yapılan değerlendirmede evreleme kriterlerinden bir tanesi bile saptanırsa hastalık o evrede kabul edilmektedir (Tablo 3.1) (72).

3.4. Araştırmada İncelenilen Parametreler

Araştırmaya dahil edilen bireylere ait cinsiyet, yaş, alınan örneklerde: Histatin-1, Histatin-3, Histatin-5, NO, 3-NT, MDA, humanin, MOTS-c, TFR1, ACSL4 ve GPX4 düzeyleri ölçülmüştür. Hücre canlılığı ölçümü MTT [3,(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difeniltetrazolyumbromid] yöntemi ile belirlenmiştir. Tetkikler Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji laboratuvarında çalışılmıştır.

Hasta ve kontrol grubundan örnekler alındıktan sonra azot tankı içinde laboratuvara ulaştırıldı. Laboratuvara azot tankı içinde taşınan kriyo tüpler azot tankından çıkarılıp 250 μL homojenize fosfat tamponu (PBS) ile tamponlanıp 20 saniye sonikatörle (Sonopuls Ultrasonic Homogenisers, Bandelin, Almanya) işleme

tabi tutulduktan sonra vorteksleme (BR-2000 Vortexer, BioRad, ABD) yapıldı. Daha sonra 4000 G'de 10 dakika boyunca soğuk (4°C'de) santrifüjleme (Eppendorf Centrifuge 5810R, Merck, Almanya) uygulanarak doku lizatları elde edildi ve daha sonra 0.5 ml'lik tüplere örnekler aliquot yapılarak -80°C'de saklandı (197).

Humanin, MOTS-c, histatin-1, histatin-3, histatin-5 peptidlerinin düzeyleri ile MDA, 3-NT, TFR1, ACSL4, GPX4 düzeyleri ELISA kit kullanılarak mikrolaka okuyucuda (Epoch Microplate Spectrophotometer, BioTek Instruments, Winooski, VT, USA) ölçüldü.

3.4.1. Hücre Canlılığı (MTT testi)

Örneklerdeki hücre canlılığı ölçümü MTT yöntemi ile belirlenmiştir. Bu yöntemde MTT formazana indirgenir, bu esnada oluşan renk kolorimetrik olarak ölçülür. Oluşan formazan miktarı canlı hücre sayısını verir (198).

3.4.2. Protein Düzeylerinin Ölçümü

Kornea epitelinden elde edilen doku lizatlarının total protein miktarları (mg/ml), spektrofotometre cihazı (Epoch Microplate Spectrophotometer, BioTek Instruments, USA)'na uyumlu mikro hacimli plaka (Epoch Take3 micro-volume plate, Biotek, USA) kullanılarak belirlenmiştir.

3.4.3. Mitokondriyal Peptidlerin Ölçümü

Örneklerdeki humanin ve MOTS-c seviyeleri ticari olarak temin edilen ELISA kitleri (Humanin için: Kat. No. EH9261, Human humanin (MT-RNR2) ELISA Kit, FineTest Biotech Inc., Wuhan Fine Biotech Co., Ltd., Wuhan, Hubei, Çin; MOTS-c için: Kat. No. E6880Hu, Human Mitochondrial-derived Peptide Mots-C, MT-RNR1 ELISA Kit, BT-LAB, Shanghai Korain Biotech Co., Ltd., Shanghai, Çin) kullanılarak üretici firmanın belirttiği protokole uygun olarak hazırlanıp mikrolaka okuyucu (Epoch Microplate Spectrophotometer, BioTek Instruments, Winooski, VT, USA) kullanılarak protokolde belirtilen 450 nm absorbansta okundu.

3.4.4. Histatin Düzeylerinin Ölçümü

Örneklerdeki Histatin-1(Kat. No. EH4471, Human HTN1 (Histatin 1) ELISA Kit, FineTest Biotech Inc., Wuhan Fine Biotech Co., Ltd., Wuhan, Hubei, Çin), Histatin-3 (Kat. No. EH1780, Human HTN3 (Histatin-3) ELISA Kit, FineTest

Biotech Inc., Wuhan Fine Biotech Co., Ltd., Wuhan, Hubei, Çin) ve Histatin-5 (Kat. No. E1444Hu, Human HTN5 (Histatin-5) ELISA Kit, BT-LAB, Shanghai Korain Biotech Co., Ltd., Shanghai, Çin) seviyeleri ticari olarak temin edilen ELISA kiti kullanılarak üretici firmanın belirttiği protokole uygun olarak hazırlanıp mikropłaka okuyucu (Microplate Reader, Biotek Epoch, Spectrophotometer, ABD) kullanılarak protokolde belirtilen 450 nm absorbansta okundu (5,193).

3.4.5. Nitrozatif Stres Belirteçlerinin Ölçümü

3.4.5.1 Nitrik Oksit (NO) Ölçümü

NO, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalındaki NO analizörü (Model 280i NOA, Sievers Instruments, Boulder, CO, ABD) ile NO/ozon kemiluminesans tekniğıyle ölçülmüştür (158,199,200). Çalışmada kullanılan NO/ozon kemiluminesans tekniğinde, nitrit (NO₂-) veya nitrat (NO₃-) NO'ya dönüştürülerek gaz fazındaki NO'nun ölçümü yapılır. Numuneler, 1:2 v/v karışımı içinde 0°C'de absolu etanol ile proteinden arındırılıp, 0°C'de 30 dakika inkübe edildi, ardından 20800 G'de 5 dakika santrifüjlendi. Süpernatant, NO analizörü (Model 280i NOA, Sievers Instruments, Boulder, CO, ABD) tarafından NO seviyelerini belirlemek için kullanıldı. Standartlar ve numuneler, indirgeyici ajan olan vanadyum III klorür (95°C'de 1 M HCl içinde çözülmüş) ile reaksiyona girmek üzere tahliye kabına enjekte edilip ve reaksiyon kabından elde edilen NO, saf nitrojen altında analiz edildi. Standart bir eğri elde etmek için sodyum nitrat kullanılıp ve numunenin NO konsantrasyonu bu eğriden hesaplandı. Veri toplama ve analiz için NOAnalysis yazılımı (versiyon 3.21, Sievers, Boulder, CO, ABD) kullanıldı (158,199,200).

3.4.5.2. 3-Nitrotirozin (3-NT) Düzeylerinin Ölçümü

3-NT seviyeleri ticari olarak temin edilen ELISA kiti (Kat. No. EU2560, 3-NT(3-Nitrotyrosine) ELISA Kit, FineTest Biotech Inc., Wuhan Fine Biotech Co., Ltd., Wuhan, Hubei, Çin) kullanılarak üretici firmanın belirttiği protokole uygun olarak Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalındaki mikropłaka okuyucu (Microplate Reader, Biotek Epoch, Spectrophotometer, ABD) ile ölçülmüştür (158,199,200).

3.4.6. Ferroptoz Belirteçlerinin Ölçümü

Örneklerdeki ferroptoz gelişimi 4 parametre sonucu kullanılarak değerlendirilmiştir. Transferrin reseptör-1 (TFR1) (201), açıl-KoA sentetaz uzun zincirli aile üyesi-4 (ACSL4) (193), MDA (202,203) ve GPX4 (193) düzeylerinin ticari olarak temin edilen ELISA kitleri (TFR1 için Kat. No. EH0386, Human sTfR1 (Soluble Transferrin Receptor1) ELISA Kit, FineTest Biotech Inc., Wuhan Fine Biotech Co., Ltd., Wuhan, Hubei, Çin; ACSL4 için Kat. No. EH6088, Human ACSL4 (Long-chain-fatty-acid-CoA ligase 4) ELISA Kit, FineTest Biotech Inc., Wuhan Fine Biotech Co., Ltd., Wuhan, Hubei, Çin; Human GPX4 (Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase) ELISA Kit, FineTest Biotech Inc., Wuhan Fine Biotech Co., Ltd., Wuhan, Hubei, Çin; MDA için Kat. No. EH2577 MDA (Malondialdehyde) ELISA Kit, FineTest Biotech Inc., Wuhan Fine Biotech Co., Ltd., Wuhan, Hubei, Çin) kullanılarak üretici firmanın belirttiği protokole uygun olarak hazırlanıp mikrolaka okuyucuda (Microplate Reader, Biotek Epoch, Spectrophotometer, ABD) protokolde belirtilen 450 nm absorbansta okunup, ölçülen diğer parametrelerle korelasyon gösterip göstermediği analiz edilmiştir.

3.5. İstatistiksel Analiz

Gruplarda analiz edilen sürekli değişkenlerin normalliği Kolmogorov-Smirnov normalite testi kullanılarak belirlendi. Veriler normal olarak dağıtıldığında ortalama $\pm$ standart sapma veya değişkenler normal olarak dağıtılmadıysa medyan ve çeyrekler arası aralık olarak sunuldu. Nitel veriler, yüzdelik oranlar olarak tanımlandı. Anormal dağılım gösteren veriler için Mann-Whitney U testi kullanıldı. Normal olarak dağılım gösteren iki veri grubunu karşılaştırmak için eşleştirilmemiş bir Student t testi, ikiden fazla grubu karşılaştırmak için tek yönlü ANOVA testi kullanıldı. Daha sonra çoklu karşılaştırmalar için post hoc Bonferroni testi uygulandı. Bu varsayımlar karşılanmadığında, ikiden fazla grubun karşılaştırılması için Kruskal-Wallis testi uygulanıp ve post hoc testi olarak Dunn çoklu karşılaştırma testi kullanıldı. Kategorik veriler Fisher'in tam veya Ki-kare testleri kullanılarak analiz edildi. Normal olarak dağılım gösteren gruplarda korelasyonlar Pearson testi ile ve normal olarak dağılım göstermeyen gruplarda korelasyonlar Spearman nonparametrik korelasyon testi ile analiz edildi. TFR1, ACSL4, MDA ve GPX4 biyobelirteçlerin düzeyleri kendi aralarında ve ayrıca humanin, MOTS-c, 3-NT ve

NO düzeyleri arasında korelasyon olup olmadığı incelendi. Analizde SPSS (versiyon 22.0, SPSS Inc. Chicago, IL, ABD) ve GraphPad InStat versiyon 3.05 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, ABD) istatistik programları kullanılıp, istatistiksel anlamlılık düzeyi $P < 0.05$ olarak kabul edildi.



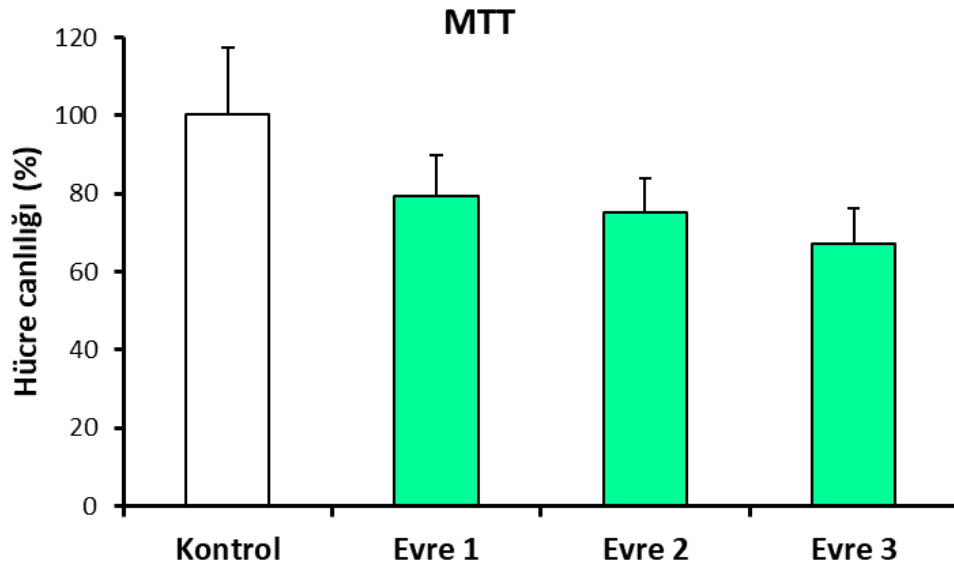
4. BULGULAR

Bu çalışmamız için 15.02.2023 – 15.06.2024 tarihleri arasında Gaziantep Üniversitesi Göz polikliniğine başvurup tedavi edilen keratokonus hastaları ve aynı hastanede postmortem 24 saat içinde alınan herhangi bir göz hastalığı olmayan kornea örnekleri kullanılarak yapılmıştır. Kontrol ve hasta grubunun demografik özellikleri Tablo 4.1’de gösterilmiştir. Gruplar arasında yaş, cinsiyet, komorbidite ve sigara içimi açısından anlamlı bir fark bulunmamıştır.

Tablo 4.1. Kontrol ve hasta grubunun demografik özellikleri

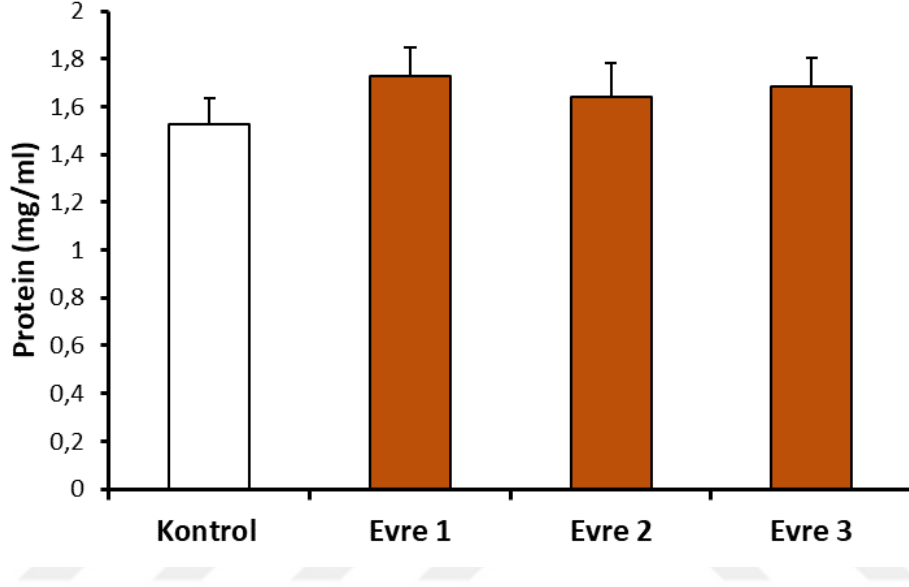
	Kontrol (n=45)	Keratokonus hasta grubu			P değeri
		Evre 1 (n=49)	Evre 2 (n=45)	Evre 3 (n=47)	
Yaş (yıl)	25.8 ± 1.2	22.7 ± 0.9	24.0 ± 0.7	22.8 ± 0.9	0.0747
Cinsiyet, n (%)					
Erkek	23 (51.1)	23 (46.9)	23 (51.1)	21 (44.7)	0.9039
Kadın	22 (48.9)	26 (53.1)	22 (48.9)	26 (55.3)	
Komorbidite, n (%)					
Astım	-	2 (4.1)	-	2 (4.3)	1.0000
Migren	-	-	1 (2.2)	1 (2.1)	1.0000
Sepsis	1 (2.2)	-	-	-	1.0000
Koroner	1 (2.2)	-	-	1 (2.2)	
Arter					
Hastalığı					
Hepatit	-	-	1 (2.2)	-	
Sigara, n (%)					
İçiyor	17 (37.8)	11 (22.4)	8 (17.8)	8 (17.0)	0.0714
İçmiyor	28 (62.2)	38 (77.6)	37 (82.2)	39 (83.0)	

Sağlıklı kontrol grubu ile keratokonus hastalarından alınan korneal epitel hücrelerinde MTT testi ile hücre canlılığı ölçülmüş ve sonuçlar Şekil 4.1’de sunulmuştur. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında Evre 1, 2 ve 3’de hücre canlılığında azalma görülse de bu azalmalar anlamlı bulunmamıştır.



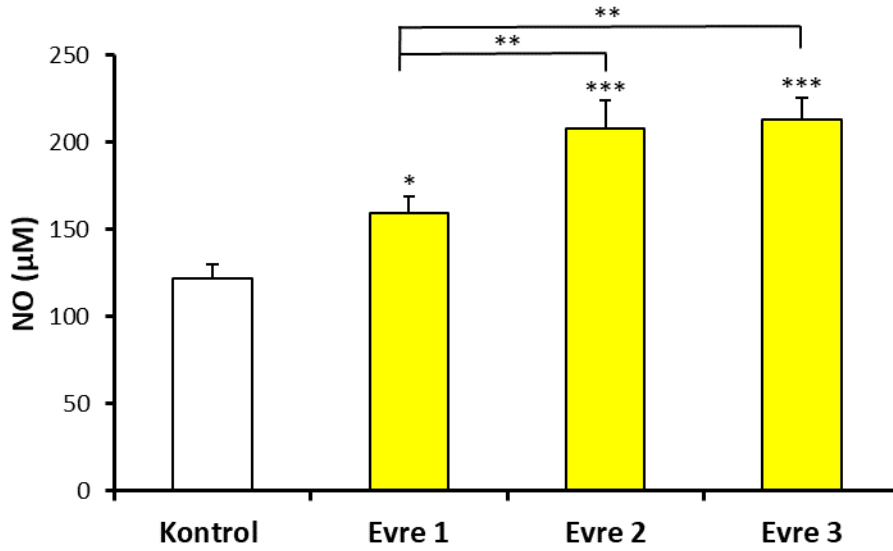
Şekil 4.1. Sağlıklı kontrol grubu ile keratokonus hastalarından alınan korneal epitel hücrelerinde MTT testi ile hücre canlılığının saptanması. Sonuçlar ortalama $\pm$ standart hata (SH) olarak sunulmuştur (n=5-7).

Sağlıklı kontrol grubu ile keratokonus hastalarından alınan korneal epitel hücre homojenatında protein düzeyleri ölçülmüş ve gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır (Şekil 4.2). Bu durum gruplar arasında protein düzeyleri açısından homojen bir dağılım olduğunu göstermektedir.



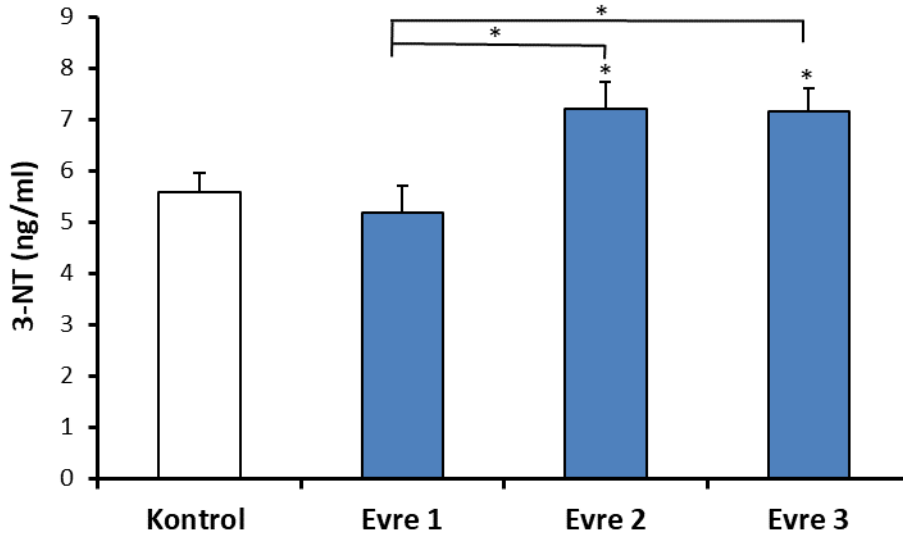
Şekil 4.2. Sağlıklı kontrol grubu ile keratokonus hastalarından alınan korneal epitel hücre homojenatında protein düzeyleri. Sonuçlar ortalama $\pm$ SH olarak sunulmuştur. $P = 0.6687$ ($n=43-47$).

Sağlıklı kontrol grubu ile keratokonus hastalarından alınan korneal epitel hücrelerinde NO düzeyleri ölçülmüş ve sonuçlar Şekil 4.3’de sunulmuştur. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında Evre 1 ($P < 0.05$), 2 ve 3 ($P < 0.001$) hastalarından alınan epitel hücrelerinde yüksek NO düzeyi saptanmıştır. Bu sonuçlar, keratokonus hastalarında NO düzeyinde nitrozatif stresin Evre 1 düzeyinde başladığına işaret etmektedir. Evre 2 ve 3 NO düzeylerinin Evre 1 NO düzeyinden anlamlı olarak yüksek olduğu da belirlenmiştir ($P < 0.01$).



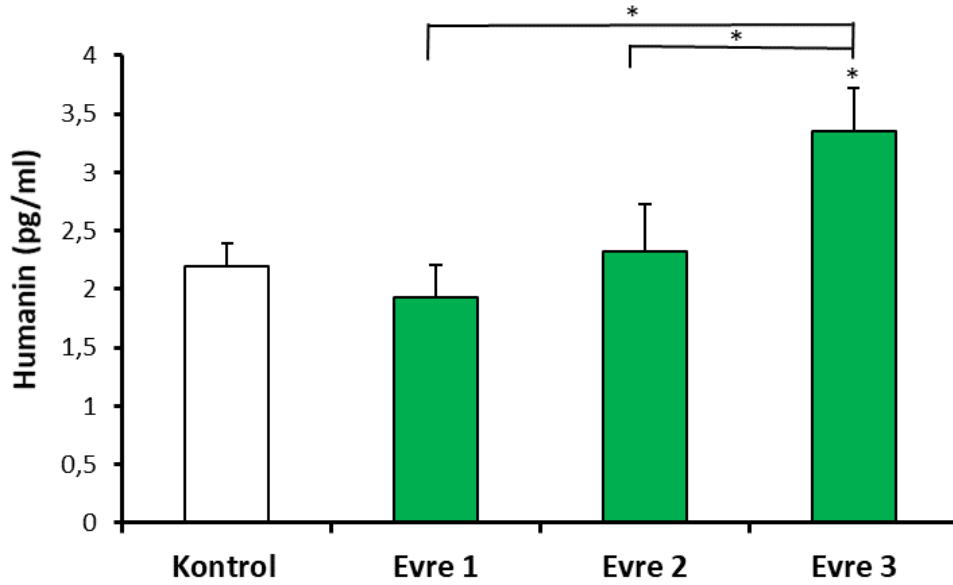
Şekil 4.3. Sağlıklı kontrol grubu ile keratokonus hastalarından alınan korneal epitel hücrelerinde nitrik oksit (NO) düzeyleri. Sonuçlar ortalama $\pm$ SH olarak sunulmuştur. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ (n=22-24).

Sağlıklı kontrol grubu ile keratokonus hastalarından alınan korneal epitel hücrelerinde 3-NT düzeyleri ölçülmüş ve sonuçlar Şekil 4.4’de sunulmuştur. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında Evre 1’de anlamlı bir fark saptanmamış, ancak Evre 2 ve 3 hastalarından alınan epitel hücrelerinde 3-NT düzeyinin yüksek olduğu belirlenmiştir ($P < 0.05$). Bu sonuçlar, keratokonus hastalarında 3-NT açısından nitrozatif stresin Evre 2 ve 3’de belirgin düzeyde olduğunu göstermektedir.



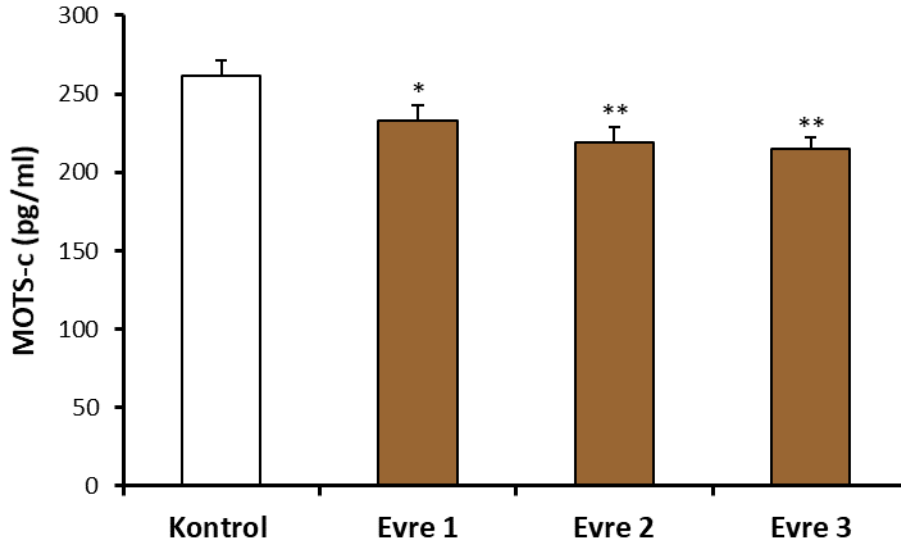
Şekil 4.4. Sağlıklı kontrol grubu ile keratokonus hastalarından alınan korneal epitel hücrelerinde 3-nitrotirozin (3-NT) düzeyleri. Sonuçlar ortalama $\pm$ SH olarak sunulmuştur. * $P < 0.05$ (n=22-23).

Sağlıklı kontrol grubu ile keratokonus hastalarından alınan korneal epitel hücrelerinde humanin (MT-RNR2) düzeyleri ölçülmüş ve sonuçlar Şekil 4.5'te sunulmuştur. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında sadece Evre 3 hastalarından alınan epitel hücrelerinde yüksek humanin düzeyi saptanmıştır ($P < 0.05$). Bu sonuçlar, keratokonus hastalarında mitokondriyal peptid salıverilmesinin belirgin düzeyde etkilendiğini göstermektedir. Evre 3'deki humanin düzeyinin Evre 1 ve 2 ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak yüksek olduğu da saptanmıştır ($P < 0.05$).



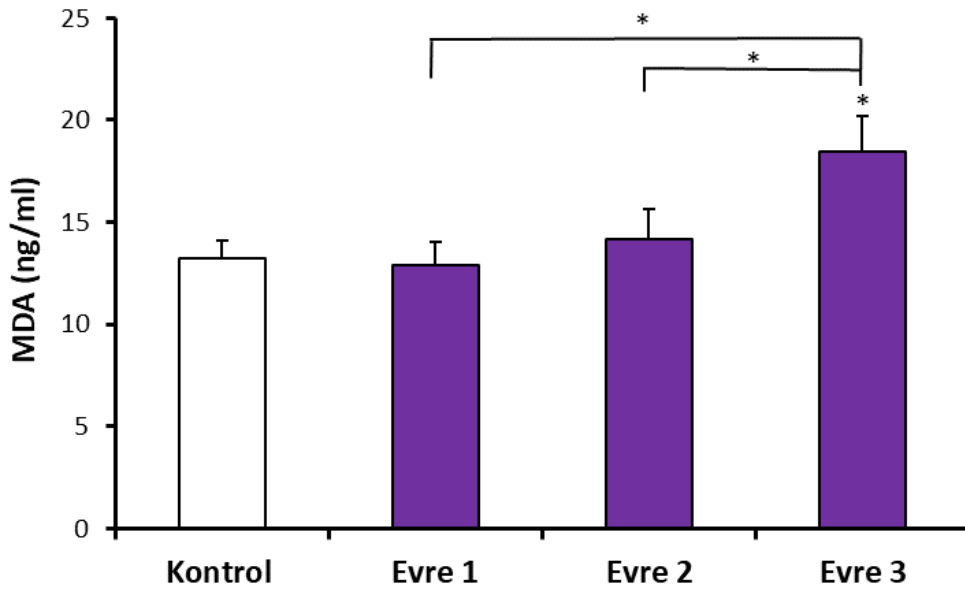
Şekil 4.5. Sağlıklı kontrol grubu ile keratokonus hastalarından alınan korneal epitel hücrelerinde humanin (MT-RNR2) düzeyleri. Sonuçlar ortalama $\pm$ SH olarak sunulmuştur. * $P < 0.05$ (n=23-27).

Sağlıklı kontrol grubu ile keratokonus hastalarından alınan korneal epitel hücrelerinde MOTS-c (MT-RNR1) düzeyleri ölçülmüş ve sonuçlar Şekil 4.6’da sunulmuştur. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında bütün evrelerde epitel hücrelerinde MOTS-c düzeyleri azalmıştır. Evre 2 ve 3’deki azalma ($P < 0.01$) Evre 1’den daha fazla bulunmuştur ($P < 0.05$). Ancak hasta grupları (evreler) arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır.



Şekil 4.6. Sağlıklı kontrol grubu ile keratokonus hastalarından alınan korneal epitel hücrelerinde MOTS-c düzeyleri. MOTS-c: Mitochondrial-derived peptide MOTS-c, (*Mitochondrial open reading frame of the 12S rRNA-c, MT-RNR1*). Sonuçlar ortalama $\pm$ SH olarak sunulmuştur. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında ($n=23$).

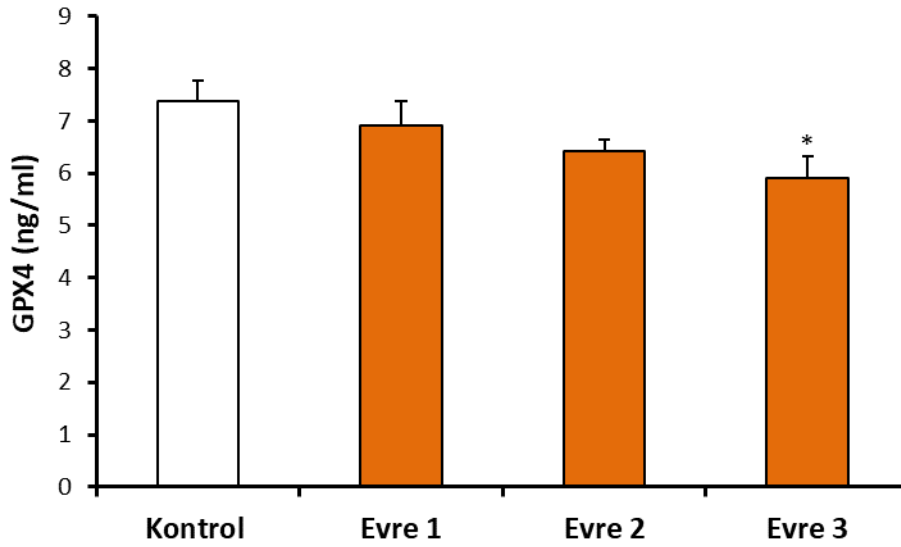
Sağlıklı kontrol grubu ile keratokonus hastalarından alınan korneal epitel hücrelerinde MDA düzeyleri ölçülmüş ve sonuçlar Şekil 4.7’de sunulmuştur. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında sadece Evre 3 hastalarından alınan epitel hücrelerinde yüksek MDA düzeyi saptanmıştır ($P < 0.05$). Evre 3’deki MDA düzeyinin Evre 1 ve 2 ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak yüksek olduğu da saptanmıştır ($P < 0.05$). Bu veriler, ferroptozun bir göstergesi olan lipid peroksidasyonun Evre 3 hastalarında anlamlı olarak arttığını göstermektedir.



Şekil 4.7. Sağlıklı kontrol grubu ile keratokonus hastalarından alınan korneal epitel hücrelerinde malondialdehit (MDA) düzeyleri. Sonuçlar ortalama $\pm$ SH olarak sunulmuştur.

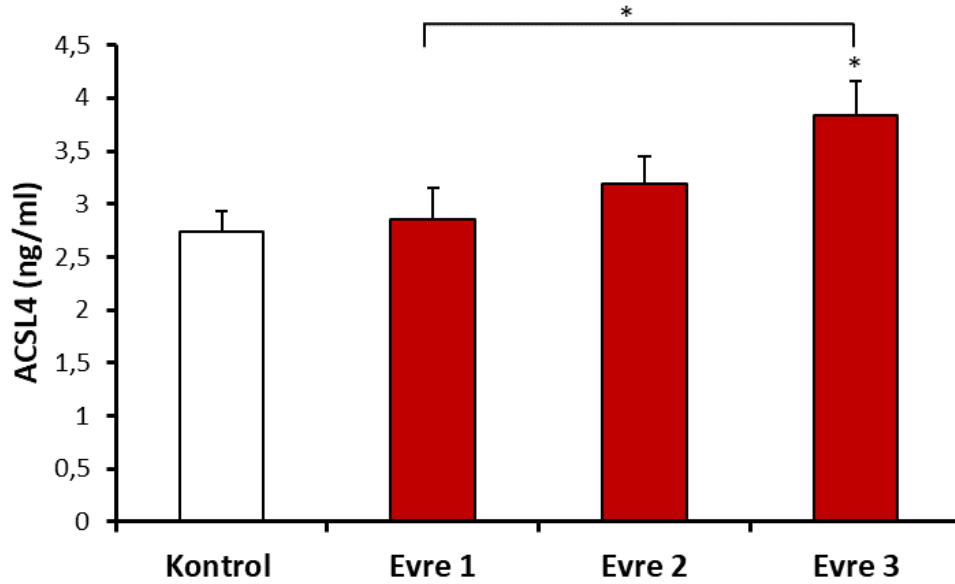
* $P < 0.05$ (n=22).

Sağlıklı kontrol grubu ile keratokonus hastalarından alınan korneal epitel hücrelerinde GPX4 düzeyleri ölçülmüş ve sonuçlar Şekil 4.8’de gösterilmiştir. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında sadece Evre 3 hastalarından alınan epitel hücrelerinde düşük GPX4 düzeyi saptanmıştır ($P < 0.05$). Hasta grupları (evreler) arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. Bu sonuçlar, ferroptozun biyobelirteçlerinden biri olan GPX4’ün keratokonusda önemli ölçüde azalarak ferroptoz gelişimine katkı sağladığını ortaya koymaktadır.



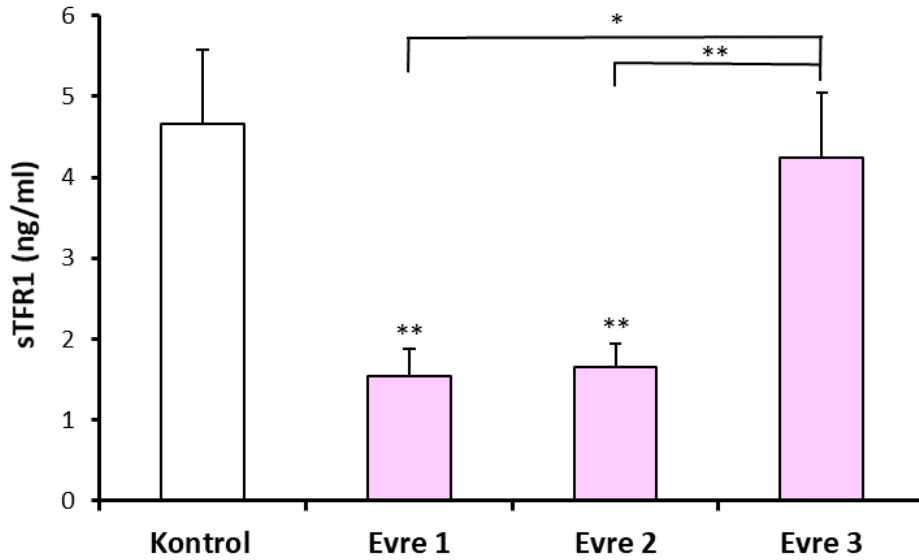
Şekil 4.8. Sağlıklı kontrol grubu ile keratokonus hastalarından alınan korneal epitel hücrelerinde glutatyon peroksidaz 4 (GPX4) düzeyleri. Sonuçlar ortalama $\pm$ SH olarak sunulmuştur. * $P < 0.05$ kontrol grubuyla karşılaştırıldığında ($n=23$).

Sağlıklı kontrol grubu ile keratokonus hastalarından alınan korneal epitel hücrelerinde ACSL4 düzeyleri ölçülmüş ve sonuçlar Şekil 4.9’da gösterilmiştir. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında sadece Evre 3 hastalarından alınan epitel hücrelerinde yüksek ACSL4 düzeyi saptanmıştır ($P < 0.05$). Hasta grupları (evreler) karşılaştırıldığında Evre 1 ile Evre 3 arasındaki farkın anlamlı olduğu saptanmıştır ($P < 0.05$). Bu sonuçlar da ferroptozun biyobelirteçlerinden biri olan ACSL4’ün keratokonusda önemli ölçüde artarak ferroptoz gelişimine katkı sağladığını ortaya koymaktadır.



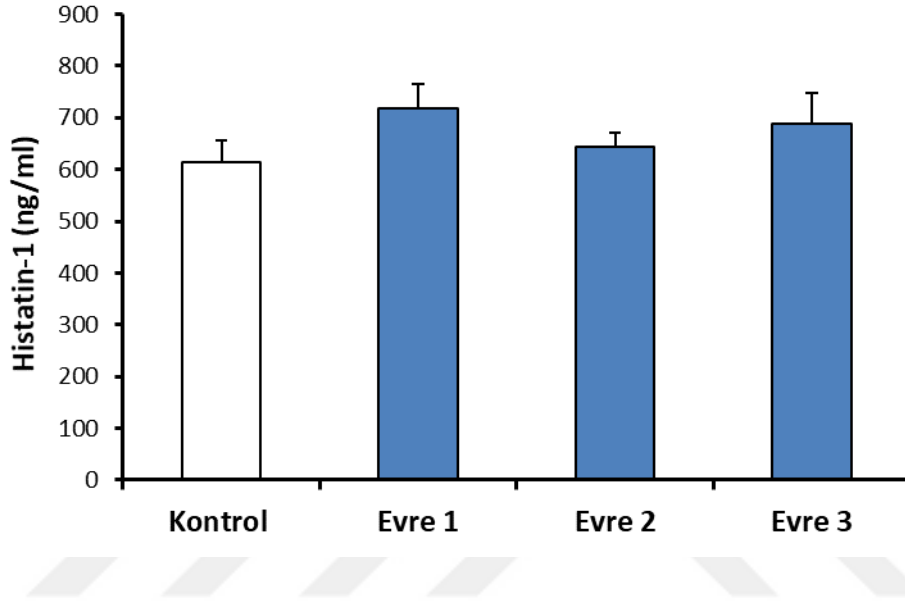
Şekil 4.9. Sağlıklı kontrol grubu ile keratokonus hastalarından alınan korneal epitel hücrelerinde ACSL4 düzeyleri. Sonuçlar ortalama $\pm$ SH olarak sunulmuştur. * $P < 0.05$ (n=23-25).

Sağlıklı kontrol grubu ile keratokonus hastalarından alınan korneal epitel hücrelerinde soluble Transferrin Receptor 1 (sTFR1) düzeyleri ölçülmüş ve sonuçlar Şekil 4.10'da gösterilmiştir. İlginç olarak, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında Evre 3'de değil de Evre 1 ve Evre 2'de belirgin bir azalmanın oluşu görülmüştür ($P < 0.01$). Evre 1 ve Evre 2'deki azalmalar Evre 3'e göre anlamlı olarak farklıdır (sırasıyla $P < 0.05$ ve $P < 0.01$). Bu veriler de keratokonusta özellikle Evre 1'de sTFR1 düzeyindeki belirgin düşüş olmasından dolayı bu hastalıkta ferroptoz gelişiminin ilk biyobelirteci sTFR1 olabileceğini düşündürmektedir.



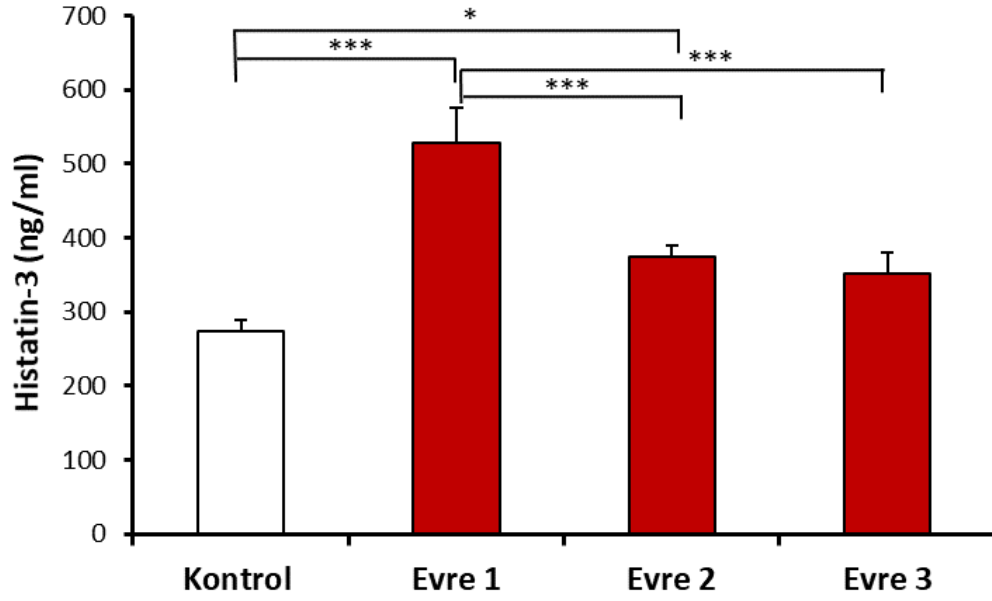
Şekil 4.10. Sağlıklı kontrol grubu ile keratokonus hastalarından alınan korneal epitel hücrelerinde sTFR1 (soluble Transferrin Receptor 1) düzeyleri. Sonuçlar ortalama $\pm$ SH olarak sunulmuştur. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (n=22).

Sağlıklı kontrol grubu ile keratokonus hastalarından alınan korneal epitel hücrelerinde histatin-1 düzeyleri Şekil 4.11’de sunulmuştur. Gruplar arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır.



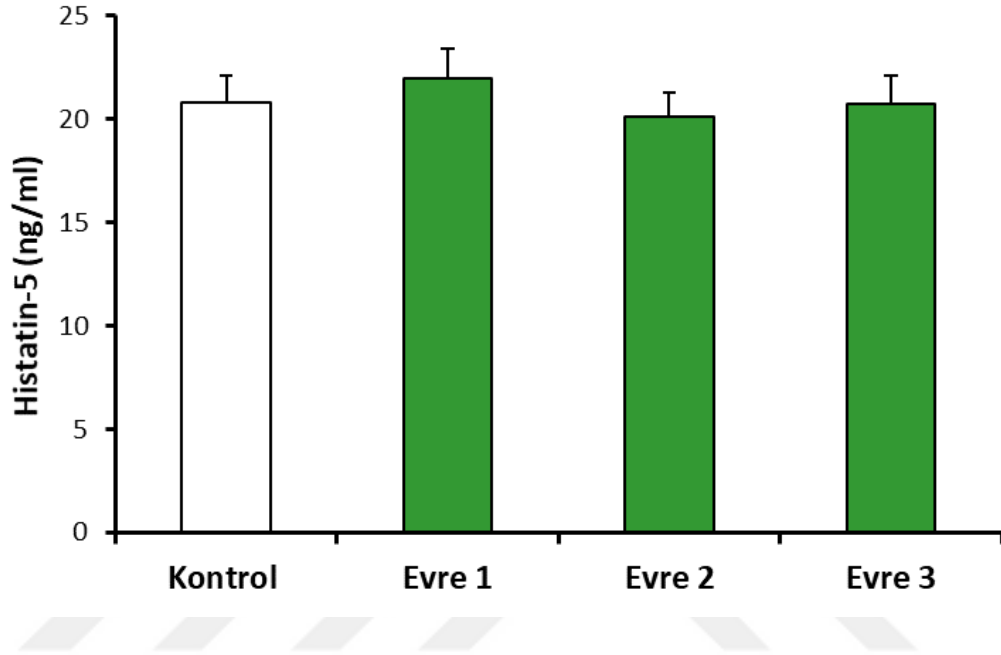
Şekil 4.11. Sağlıklı kontrol grubu ile keratokonus hastalarından alınan korneal epitel hücrelerinde histatin-1 düzeyleri. Sonuçlar ortalama $\pm$ SH olarak sunulmuştur. $P=0.3640$ ($n=17-18$).

Sağlıklı kontrol grubu ile keratokonus hastalarından alınan korneal epitel hücrelerinde histatin-3 düzeyleri Şekil 4.12’de sunulmuştur. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında Evre 1 ve 2 hastalarında histatin-3 düzeylerinin anlamlı olarak artış gösterdiği saptanmıştır. En belirgin artış Evre 1’de saptanmıştır. Evre 1’deki artış Evre 2 ve 3’den anlamlı olarak fazla bulunmuştur ($P < 0.001$).



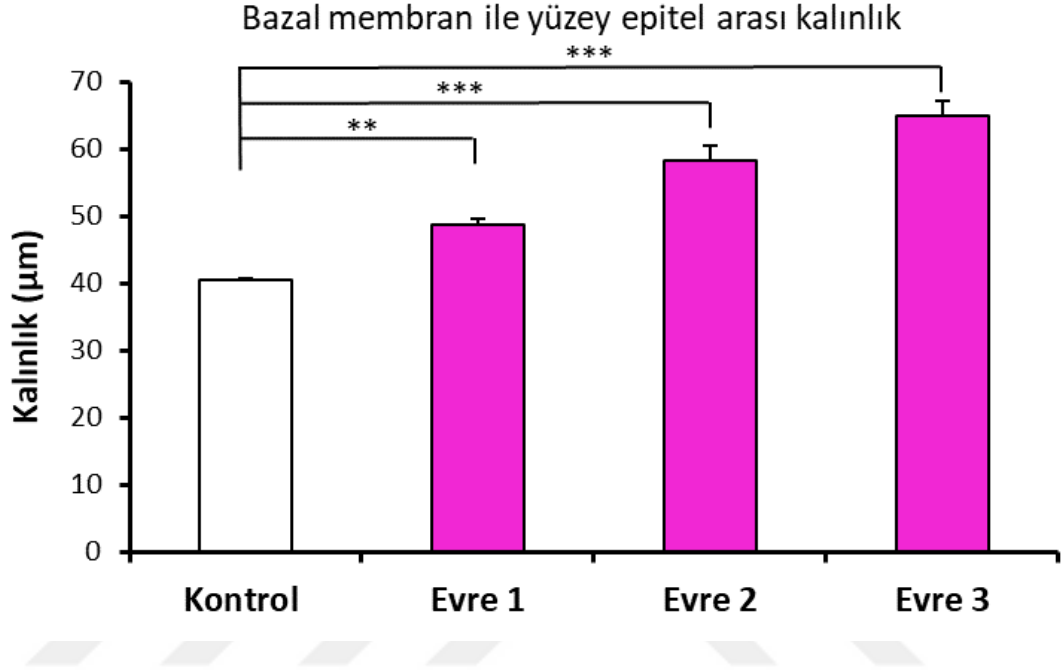
Şekil 4.12. Sağlıklı kontrol grubu ile keratokonus hastalarından alınan korneal epitel hücrelerinde histatin-3 düzeyleri. Sonuçlar ortalama $\pm$ SH olarak sunulmuştur. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ (n=18).

Sağlıklı kontrol grubu ile keratokonus hastalarından alınan korneal epitel hücrelerinde histatin-5 düzeyleri Şekil 4.13’de sunulmuştur. Gruplar arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır.



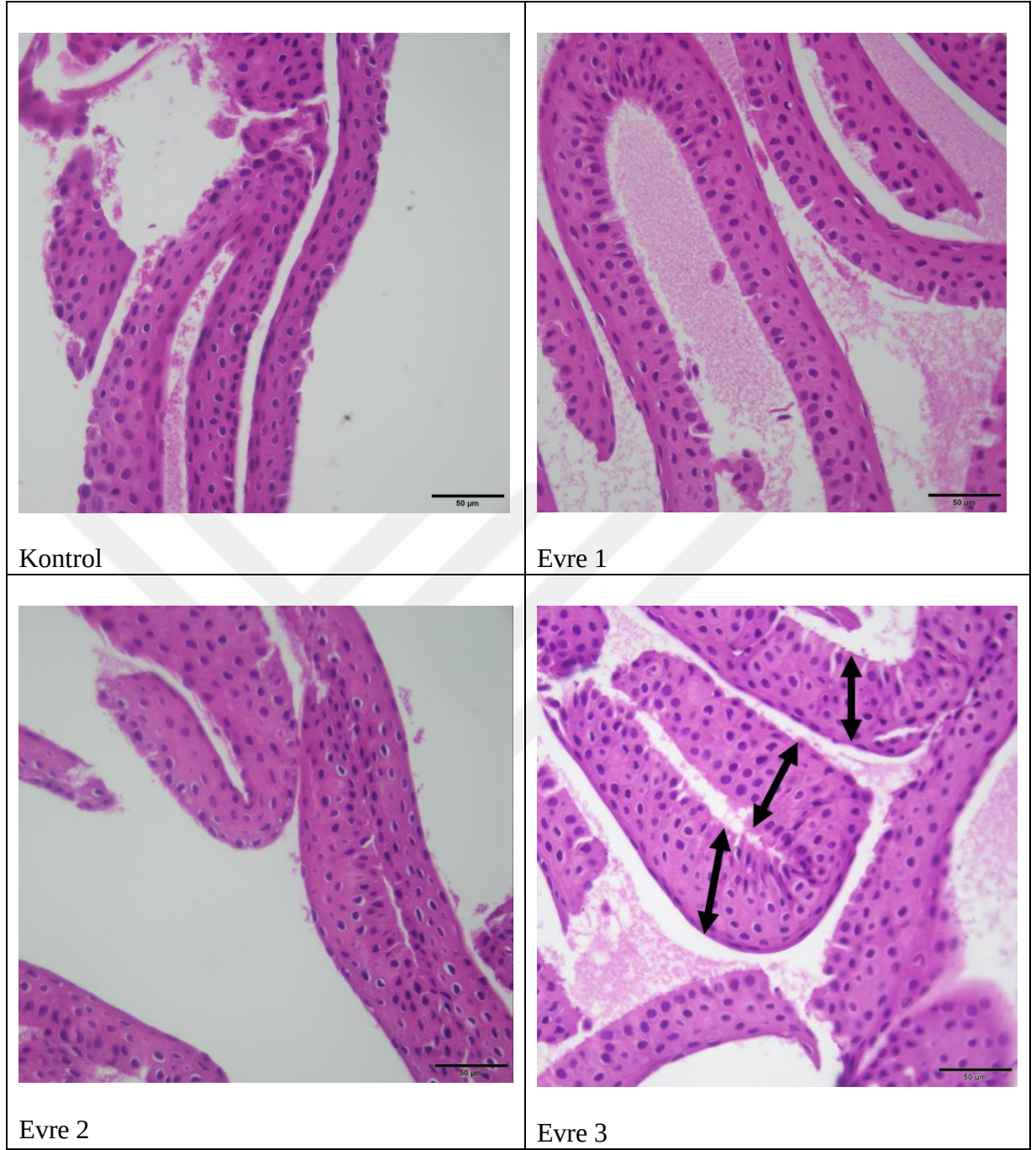
Şekil 4.13. Sağlıklı kontrol grubu ile keratokonus hastalarından alınan korneal epitel hücrelerinde histatin-5 düzeyleri. Sonuçlar ortalama $\pm$ SH olarak sunulmuştur. $P=0.8019$ (n=18).

Sağlıklı kontrol grubu ile keratokonus hastalarından alınan korneal epitel hücrelerinde hücre kalınlığı Şekil 4.14’de gösterilmektedir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında hasta gruplarında belirgin olarak epitel hücre kalınlaşması saptanmıştır. Evereler arttıkça kalınlaşma da artmaktadır.



Şekil 4.14. Sağlıklı kontrol grubu ile keratokonus hastalarından alınan korneal epitel hücre kalınlığı. Her bir değer beş farklı alandan epitel kalınlığı ölçülerek belirlenmiştir. Sonuçlar ortalama $\pm$ SH olarak sunulmuştur. **P < 0.01, ***P < 0.001 (n=3).

Histopatolojik incelemede sağlıklı kontrol grubu ile keratokonus hastalarından alınan korneal epitel hücrelerinde hemotoksilen-eosin boyaması sonrasındaki görüntüler Şekil 4.15’de sunulmuştur.

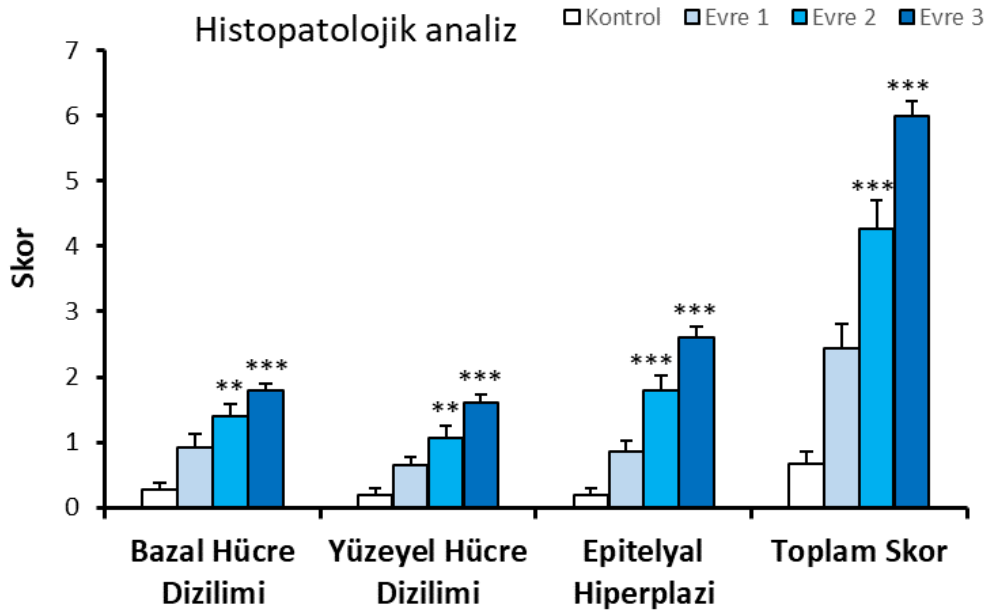


Şekil 4.15. Sağlıklı kontrol grubu ile keratokonus hastalarından alınan korneal epitel hücrelerinde hemotoksilen-eosin boyaması sonrasındaki görüntüler. Büyütme: x40

Kontrol grubunda normal histolojik yapıda kornea epiteli görülürken, Evre 1’de kornea epitelinde minimal hücresel değişiklikler ve bazal hücrelerin boyutunda minimal artış saptanmıştır. Evre 2’de epitelyal hiperplazi, bazal hücre boyutunda artış ve çekirdek değişiklikleri, kanat hücrelerde hidropik değişiklikler ile yüzey

hücrelerde hafif şekil değişikliği saptanmıştır. Evre 3’de ise epitelde belirgin hiperplazi, bazal hücrelerde şekil değişikliği ve boyut artışı, kanat ve bazal hücrelerde boyut artışı, hidropik değişiklikler, anizokaryozis ile yüzey hücrelerde iç benzeri görünüm bulunmaktadır (Şekil 4.15).

Bazal hücre dizilimi, yüzeyel hücre dizilimi ve epitelyal hiperplazi mikroskopta beş farklı alanda incelenmiş ve daha önce yayınlanan kaynaklara göre (204,205) skorlanma yapılmıştır. Bazal hücre dizilimi ve yüzeyel hücre dizilimi için skorlama 0=düzenli, 1=orta, ve 2=kötü olarak yapılırken, epitelyal hiperplazi için 0: yok, 1: az, 2: orta, ve 3: şiddetli olarak yapıldı. Farklı beş alandan rastgele ölçüm yapıldı. Her alan toplam skor en az 0 en fazla 7 olacak şekilde skorlanmış oldu (204,205). Sağlıklı kontrol grubu ile keratokonus hastalarından alınan korneal epitel hücrelerindeki histopatolojik analiz sonucu elde edilen skorlar Şekil 4.16’de gösterilmektedir. Genel olarak evreler arttıkça skorların da arttığı en yüksek skorun Evre 3’de olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.16. Sağlıklı kontrol grubu ile keratokonus hastalarından alınan korneal epitel hücrelerindeki histopatolojik analiz sonucu elde edilen skor. Her bir preparat için değer beş farklı alandan epitel kalınlığı ölçülerek belirlenmiştir. Sonuçlar ortalama $\pm$ SH olarak sunulmuştur. **P < 0.01, ***P < 0.001 (n=3).

Korelasyon analizleri

Hasta gruplarında (evreler) ölçülen parametreler arasındaki istatistiksel olarak anlamlı korelasyonlar Tablo 4.2’de gösterilmiştir. Bütün evrelerde histatin-1 ile histatin-3 arasında pozitif korelasyon saptanmıştır. Evre 1’de protein düzeyi ile histatin-1 düzeyi arasında, histatin-3 düzeyi ile humanin düzeyi arasında ve histatin-5 düzeyi ile 3-NT ve ACSL4 düzeyleri arasında pozitif, protein düzeyi ile histatin-5 düzeyi arasında ise negatif korelasyon bulunmuştur. Evre 2’de histatin-1 ile histatin-5 arasında pozitif korelasyon vardır. Yine Evre 2’de MDA ile 3-NT, humanin ile ACSL4 ve GPX4 ile ACSL4 arasında pozitif korelasyon olduğu belirlenmiştir. Evre 2’de NO ile sTFR1 ve MOTS-c ile humanin düzeyleri arasında ise negatif korelasyon saptanmıştır. Evre 3’de protein düzeyi ile histatin-1 düzeyi arasında, histatin-5 ile ACSL4 arasında ve humanin ile 3-NT arasında pozitif korelasyon bulunmaktadır.

Tablo 4.2. Çalışma gruplarında ölçülen parametreler arasındaki istatistiksel olarak anlamlı korelasyonlar

Parametreler	Correlation coefficient (r)	Coefficient of determination (r²)	P
<i>Evre 1 grubunda:</i>			
Histatin-1 ↔ Histatin-3	0.5381	0.2895	0.0259
Histatin-1 ↔ Protein düzeyi	0.5348	0.2860	0.0270
Histatin-3 ↔ Humanin	0.4900	0.2401	0.0390
Histatin-5 ↔ Protein düzeyi	-0.6361	0.4047	0.0045
Histatin-5 ↔ 3-NT	0.5219	0.2724	0.0263
Histatin-5 ↔ ACSL4	0.5742	0.3298	0.0127
<i>Evre 2 grubunda:</i>			
Histatin-1 ↔ Histatin-3	0.7997	0.6395	<0.0001
Histatin-1 ↔ Histatin-5	0.5046	0.2547	0.0327
NO ↔ sTFR1	-0.8934	0.7981	0.0005
MOTS-c ↔ Humanin	-0.4690	0.2200	0.0240
MDA ↔ 3-NT	0.4487	0.2014	0.0413
Humanin ↔ ACSL4	0.4148	0.1720	0.0491
GPX4 ↔ ACSL4	0.4193	0.1758	0.0464
<i>Evre 3 grubunda:</i>			
Histatin-1 ↔ Histatin-3	0.8866	0.7860	<0.0001
Histatin-1 ↔ Protein düzeyi	0.5181	0.2684	0.0332
Humanin ↔ 3-NT	0.4388	0.1925	0.0411
Histatin-5 ↔ ACSL4	0.5224	0.2729	0.0261

5. TARTIŞMA

Keratokonus, korneanın zayıflaması ve stromanın incilmesiyle karakterize, görmeyi etkileyen, non-inflamatuvar stromal bir şekil bozukluğudur. Patofizyolojisi henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Etyolojide genetik, çevresel ve birçok biyokimyasal faktörün rol aldığı gösterilmiştir (206). Bu çalışmada keratokonus patofizyolojisinde rol oynayan mekanizmaların aydınlatılmasına çalışılmış ve histatin-3, nitrozatif stres, mitokondriyal kökenli peptid salıverilmesi ve ferroptoz gelişiminin keratokonus oluşumuna önemli katkıda bulunduğu gösterilmiştir.

Reaktif oksijen ve reaktif nitrojen türevlerinin aşırı üretimi antioksidan inaktivasyonuna sebep olarak antioksidan düzeylerini azaltmaktadır (141). Peroksinitritin tirozini nitrolaması ile stabil tirozin formu olan 3-NT oluşumu gerçekleşir. Plazmadaki 3-NT varlığı organizmada çeşitli hasarların olduğuna işaret eder ve nitrozatif stresin varlığını gösterir (142). Valko ve ark. (127) yaptığı çalışmada kanserde, kardiyovasküler hastalıklarda, aterosklerozda, Alzheimer hastalığında, diyabette 3-NT düzeylerinde artış görülmüştür. Bu bulgular 3-NT'nin oksidatif stres varlığında biyobelirteç olarak kullanılabileceğini göstermektedir.

UV maruziyeti, çoğu hücre ve doku için zararlı olan ROS ve RNS üreten, kanıtlanmış bir çevresel stres faktörüdür. Kornea, gelen ışığın daha arka oküler yapılara geçişine izin veren şeffaf bir avasküler dokudur ve sürekli olarak UV aralığı da dahil olmak üzere geniş bir ışık spektrumuna maruz kalır (137). Bu nedenle nitrozatif stres riski yüksektir ve çalışmamızda da hem NO seviyelerinde hem de 3-NT düzeylerinde belirgin artış olması keratokonus patofizyolojisinde nitrozatif stresin rolü olduğunu kanıtlamaktadır.

Mitokondri, enerji üretimi, apoptoz düzenlenmesi, biyosentetik öncü üretimi, hem sentezi, Fe-S kümesi üretimi, iyon homeostazisi ve ROS üretimi dahil olmak üzere birçok önemli hücresel aktiviteden sorumludur. Büyük ölçüde retrograd sinyalleşme olarak bilinen bir süreç aracılığıyla hücreyle iletişim kurar (207). Mitokondri transkripsiyonel stres tepkisine aracılık eden, metabolizmayı düzenleyen spesifik peptidler üretmektedir. Humanin, küçük humanin benzeri peptidler (1–6)

(*Small humanin-like peptides (SHLPs)*), MOTS-c, SHMOOSE ve Gau dahil olmak üzere on farklı mitokondri kökenli peptid rapor edilmiştir. Mitokondri kökenli peptidler, mitokondriyal genom dizileri içinde kodlanmaları bakımından benzersiz olan, yakın zamanda tanımlanmış retrograd sinyallerdir (208). Yeni bir araştırmaya göre, mitokondriyal kaynaklı peptidlerin keşfedilmesiyle mitokondrinin genetik etkisi genişlemiştir. Humanin, SHLPs ve MOTS-c'nin mitokondriyal açık okuma çerçevesi, hücrel metabolizmayı modüle edebilen ve sitoproteksiyon sağlayabilen mitokondri kökenli peptidlerdir ve daha önce tanınan mitokondriyal aktivite ile ilgili olarak paradigmaları yıkmaktadır (209). Muzumdar ve ark. (210) yaptıkları çalışmada humanin seviyelerinin yaşlanma ile ilişkili olduğunu belirlemiştir. Humanin sitoprotektif olarak düşünülmekte olup yaşlanma ile birlikte plazmada humanin düzeylerinde azalma olduğu gözlenmiştir.

Mitokondriyal kökenli peptidler ile ilgili yapılan çeşitli çalışmalar bunların antioksidatif stres, antiinflamatuvar yanıtlar ve antiapoptoz yoluyla sitoprotektif etkiler sergilediğini göstermiştir (211). MOTS-c, yağ birikimini en aza indirmek, enerjiyi geri kazandırmak ve insülin duyarlılığını iyileştirmek için AMPK (5-adenosine monophosphate activated protein kinase) yolağını aktive etmektedir (212). MOTS-c tedavisi, AMPK'yi fosforile ederek nesne ve konum tanıma anılarının oluşumunu arttırmaktadır. Altta yatan mekanizmanın astrosit ve mikroglia aktivasyonunu arttırıp proinflamatuvar sitokin üretimini inhibe ederek nöroprotektif bir etki oluşturmaya bağlı olduğu tespit edilmiştir (213). Kim ve ark. (214) MOTS-c'nin, metabolik strese yanıt olarak nukleusa etki ederek adaptif nükleer gen ekspresyonunu modüle edebileceğini göstermiştir. D'Souza ve ark. tarafından 2020 yılında yapılan araştırma (215) sonucuna göre 70-81 yaşındaki kişilerde ölçülen MOTS-c düzeylerinin, 18-30 yaşındaki bireylerle karşılaştırıldığında yaklaşık % 21 oranında düştüğü gözlenmiştir. Qin ve ark. (96) tarafından insanlarda azalmış MOTS-c düzeyleri ile koroner endotel disfonksiyonu arasında bir korelasyon olduğu bulunmuştur. Shen ve ark. (216) fare üzerinde MOTS-c ile oksidatif stresi değerlendirmek için yaptıkları deneyde MOTS-c'nin verilmesi ile oksidatif stresin azaldığını kanıtlamışlardır. Çin'de 2023 yılında sepsise bağlı oluşan oksidatif stresin miyokard üzerinde etkisini görmek için MOTS-c verilerek yanıt değerlendirilmiş ve

MOTS-c sonrası azalan mitokondriyal membran potansiyelinin düzeldiği ve kardiyomiyosit ROS oluşumunun azaldığı görülmüştür (217). Bizim çalışmamızda da MOTS-c düzeylerinde belirgin azalma saptanmıştır. Bu azalma, oluşan nitrozatif ve oksidatif stresi kompanse etmek için fazla tüketim nedeniyle meydana geliyor olabilir. Buna karşın humanin düzeyinde artış belirlenmiştir. Bu çalışma, keratokonus hastalığında mitokondriyal peptidlerden humanin ve MOTS-c'nin rolünü araştıran ilk çalışmadır. Mekanizması kesin olmamakla birlikte MOTS-c düzeylerindeki azalmayı kompanse etmek amacıyla humanin düzeylerinde artma olmuş olabilir.

Bu projede ilk defa keratokonus hastalığında ferroptozun rolü araştırılmıştır. Ferroptozun göstergelerinden olan lipit peroksidasyonun ve ACSL4'ün Evre 3 hastalarında anlamlı olarak arttığı, GPX4 düzeylerinin ise azaldığı saptanmıştır. Ayrıca korneal epitel hücrelerinde sTFR1 düzeylerinin Evre 1 ve 2 hastalarında azalmış olması yine ilk defa saptanan bulgulardan biridir. Bu deneyler keratokonusta ferroptoz yolağının aktive edildiğini göstermektedir. Keratokonusta kornea epitelinde demir birikimi Fleischer halkası olarak gözlenebilmektedir (218) ve bu demir birikimi ferroptozu katkıda bulunabilir. GPX4 aktivitesinin kaybının bir sonucu olarak onarılmamış lipit peroksitler birikerek yine ferroptozu neden olmaktadır (184). Bizim çalışmamızda da GPX4 düzeyleri azalmış olarak saptanmış olup ferroptoz oluşumunu desteklemektedir. Yine lipit peroksidasyonunun önemli bileşiklerinden biri olan MDA düzeyleri de yüksek olarak saptanmış olup keratokonusta ferroptoz geliştiğini destekleyen sonuçlardan biridir. Keratokonusta korneal stromal fibroblastlarda ROS ve RNS'nin yüksek düzeyde olduğu ve serbest radikalleri nötralize eden SOD enziminin azaldığını gösteren çalışmalar (13,14) bizim bulgularımızı desteklemektedir.

Kornea epiteli, non keratinize çok katlı yassı epiteldir. Yaklaşık beş tabakadan oluşur ve ortalama kalınlığı 50 µm'dir (219). Keratokonusta hematoksislen ve eozin boyama, hafifçe kalınlaşmış skuamöz epitel ve patolojik olarak hafif atipi olarak teşhis edilen anizokaryozlu hafif nükleer büyüme göstermiştir (220). Epitel kalınlığının ölçümleri bazal membrandan daha yüzeysel epitel tabakasına kadar elde

edilmiştir. Keratokonusta kalınlaşmış epitel bildirilmiştir (22). Kornea kalınlığında düzensizlikler ve epitel hücrelerinin düzensiz dağılımları gözlemlenmiştir. Epitel hücre katmanlarının sayısı değişmektedir ve bazı durumlarda 10'dan fazla katmandan, diğerlerinde sadece 2-3 hücre katmanına kadar değişen katmanlar bildirilmiştir. Yüzeysel epitelyal hücreler uzunlamasına veya iğ benzeri şekilli görünümünün bulunması, kanat hücrelerinin büyük, düzensiz ve aralıklı bir çekirdek sergilemiş olması, bazal epitel hücrelerinin ise büyümüş ve bazı durumlarda sitoplazmik şişlik göstermiş olduğu tespit edilmiştir (221). Epitelin belirgin hiperplazisi gözlenmiştir (222). Düzensiz çekirdekli kanat hücreleri, uzamış epitel hücreleri ve Bowman tabakasının bozulması gibi histolojik değişiklikler rapor edilmiştir (223). Bizim deneylerimizde de benzer histopatolojik bulgular elde edilmiştir. Dolayısıyla bulgularımız literatürle uyumluluk göstermektedir.

Histatinlerin korneadaki rolüne ilişkin az sayıda çalışma vardır. Histidin açısından zengin bir peptid ailesi olan histatinlerin, ağız ve deri epitelyal yara iyileşmesinde rol oynadığı ve insan kornea epitel hücrelerinde *in vitro* etkili olduğu gösterilmiştir. Sağlıklı insan kornea ve konjonktival epitel hücrelerinde histatin 1 ve 3 ekspresyonunun saptanmadığı bildirilmiştir (224). Topikal histatin-1 uygulamasının kornea epitelinde yara iyileşmesi üzerinde etkili olduğu tavşan deneyinde gösterilmiştir (225). Histatin ile yapılan *in vitro* çalışmalar, histidin açısından zengin olan bu proteinlerin, epitelyal hücre migrasyonunu ve yayılmasını uyarak yara iyileşmesini arttırdığını ileri sürmektedir (106,107). Histatin-1 endotelyal hücre adezyonunu, migrasyonunu ve anjiyogenezi teşvik eder (226). Ayrıca, histatinler metaloproteinaz-9'un (MMP-9) güçlü inhibitörleridir ve önemli antimikrobiyal aktiviteye sahiptirler (227). Histatin-1'in ayrıca insan kornea epitel hücrelerinde oluşturulan yaraların iyileşmesinde de etkili olduğu, insan korneası limbal epitel hücrelerinin migrasyonunu artırdığı gösterilmiştir (104). Bizim çalışmamızda insan korneal epitel hücrelerinde histatin-1, -3 ve -5'in varlığı ilk kez gösterilmiştir. Ancak çalışmamızda keratokonus korneal epitel hücrelerinde histatin-1 düzeylerinin sağlıklı donörlerden alınanlarla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik göstermediği belirlenmiştir.

Yaşa bağı makular dejenerasyonu olan hastalardan izole edilen gözyaşı filmi örneklerinde histatin-3'ün upregüle olduğu bildirilmiştir (228). Tekrarlayan koroner olay risk değerlendirmesini için yapılan karşılaştırmalı global proteom analizi kullanarak yeni biyobelirteçlerin belirlenmesi amacıyla 2.332 kişiden oluşan ve bunların 772'sinin KAH'dan etkilenen kişiler olduğu ve 5 yıllık takip süresi boyunca tekrarlayan olayların tanımlandığı bir çalışmadan faydalanılarak yapılan analizde histatin-3'ün tekrarlayan koroner olaylar için risk sınıflandırmasını iyileştirmek için kullanılabilecek potansiyel biyobelirteçlerden biri olabileceği gösterilmiştir (229). Bizim çalışmamızda da keratokonus korneal epitel hücrelerinde histatin-3 düzeylerinin anlamlı olarak arttığı gösterilmiştir. En belirgin artış Evre 1'de saptanmıştır. Evre 1'deki artışın hem kontrol grubu hem de Evre 2 ve 3'den anlamlı olarak fazla bulunması keratokonus hastalarının erken tespitinde biyobelirteç olarak kullanılabileme ihtimalini arttırmaktadır.

Histatin-5'in Sjögren sendromu gibi otoimmün hastalıkları olan hastalarda göz kuruluğunun tedavisinde rapamisin ile birlikte uygulanabileceği belirtilmiştir (107). İnsan oküler yüzeyinde histatin-5 ekspresyonu tespit edilmiştir (230). Çalışmamızda keratokonus korneal epitel hücrelerinde histatin-5 düzeylerinin değişmediği saptanmıştır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmadan elde edilen bulgulara göre aşağıdaki sonuçlar ve öneriler sıralanabilir:

- Keratokonusta evre arttıkça hücre canlılığı azalmakta, korneal epitel hücrelerindeki hasar artmaktadır.
- Keratokonusta NO ve 3-NT düzeylerinin artmış olması nitrozatif stresin göstergesidir ve hücre hasarının oluşmasına katkıda bulunabilir.
- Keratokonusta korneal epitel hücrelerinde mitokondriyal kökenli peptidler önemli rol oynamakta, MOTS-c düzeyleri azalmakta, fakat humanin düzeyleri artmaktadır.
- Keratokonusta korneal epitel hücrelerinde ferroptoz aktif bir mekanizma olarak rol almakta ve hücre hasarına katkıda bulunmaktadır.
- Aşırı NO ve peroksinitrit oluşumunu önleyen veya bu reaktif nitrojen türlerini nötralize edebilecek antioksidan etkili ajanların lokal olarak kullanılması keratokonus tedavisinde katkı sağlayabilir.
- Keratokonus tedavisinde öneri olarak azalan MOTS-c düzeylerinin yerine koyma tedavisiyle lokal olarak göze uygulanarak düzeylerini artırmak ve sitoprotektif etkiyi sağlamak mümkün olabilir.
- Keratokonus tedavisinde lokal olarak demiri bağlayan ajan uygulamasıyla demir düzeylerinin azaltılması ve sonuçta ferroptozun önlenmesine yönelik yeni tedavi prokollerinin geliştirilmesi terapötik etkinin oluşmasına veya evrenin ilerlemesinin önlenmesine katkı sağlayabilir.
- Bu araştırma insan keratokonus korneal epitel hücrelerinde histatin düzeylerinin araştırıldığı ilk çalışmadır. İnsan korneal epitel hücrelerinde histatin-1, -3 ve -5'in varlığı bu çalışma ile gösterilmiştir. Çalışmamızda izole edilen insan keratokonus korneal epitel hücrelerinde histatin-1 ve 5'in düzeylerinde anlamlı bir değişikliğin olmadığı ve evreler arasında da düzeylerin benzer olduğu saptanmıştır. Ancak, insan keratokonus korneal epitel hücrelerinde histatin-3 düzeylerinde anlamlı artışın olduğu, bu artışın özellikle Evre 1 de belirgin olduğu ortaya konmuştur. Evre 2'de de histatin-3 düzeylerindeki anlamlı artış devam etmiştir. Ancak, Evre 3'de histatin-3 düzeyleri kontrol hücrelerinkine benzer düzeyde olduğu bulunmuştur.

- Histopatolojik analizde keratokonusta korneal epitel hücre kalınlığının artış gösterdiği, bu artışın evre ile orantılı olarak yükseldiğini ortaya koymuştur. Histopatolojik skorun da Evre 2 ve 3’de anlamlı olarak yükseldiği belirlenmiştir.



7. KAYNAKLAR

1. Asimellis G, Kaufman EJ. Keratoconus. In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; April 12, 2024. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470435/>
2. Hazafa A, Batool A, Ahmad S, et al. Humanin: A mitochondrial-derived peptide in the treatment of apoptosis-related diseases. *Life Sci.* 2021;264:118679.
3. Cobb LJ, Lee C, Xiao J, et al. Naturally occurring mitochondrial-derived peptides are age-dependent regulators of apoptosis, insulin sensitivity, and inflammatory markers. *Aging (Albany NY).* 2016;8(4):796-809.
4. Khurshid Z, Najeeb S, Mali M, et al. Histatin peptides: Pharmacological functions and their applications in dentistry. *Saudi Pharm J.* 2017;25(1):25-31.
5. Kalmudia S, Son KN, Cao D, et al. Presence of histatin-1 in human tears and association with aqueous deficient dry eye diagnosis: A preliminary study. *Sci Rep.* 2019;9(1):10304.
6. Kenney MC, Brown DJ, Rajeev B. Everett Kinsey lecture. The elusive causes of keratoconus: a working hypothesis. *CLAO J.* 2000;26(1):10-13.
7. Kılınç A, Kılınç K. Ankara. Nitrik Oksit Biyolojik Fonksiyonları ve Toksik Etkileri. Palme Yayıncılık, 245, 2003.
8. Cristina Kenney M, Brown DJ. The cascade hypothesis of keratoconus. *Cont Lens Anterior Eye.* 2003;26(3):139-146.
9. Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, et al. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell.* 2012;149(5):1060-1072.
10. Stockwell BR, Friedmann Angeli JP, Bayir H, et al. Ferroptosis: A regulated cell death nexus linking metabolism, redox biology, and disease. *Cell.* 2017;171(2):273-285.
11. Greenstein SA, Hersh PS. Update on corneal crosslinking for keratoconus and corneal ectasia. *Curr Opin Ophthalmol.* 2024;35(4):273-277.
12. Rabinowitz YS. Keratoconus. *Surv Ophthalmol.* 1998;42(4):297-319.
13. Chwa M, Atilano SR, Reddy V, Jordan N, Kim DW, Kenney MC. Increased stress-induced generation of reactive oxygen species and apoptosis in human keratoconus fibroblasts. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006;47(5):1902-1910.

14. Balmus IM, Alexa AI, Ciuntu RE, et al. Oxidative stress markers dynamics in keratoconus patients' tears before and after corneal collagen crosslinking procedure. *Exp Eye Res.* 2020;190:107897.
15. Loukovitis E, Sfakianakis K, Syrmakesi P, et al. Genetic aspects of keratoconus: A literature review exploring potential genetic contributions and possible genetic relationships with comorbidities. *Ophthalmol Ther.* 2018;7(2):263-292.
16. Özalp O, Atalay E, Yıldırım N. Prevalence and risk factors for keratoconus in a university-based population in Turkey. *J Cataract Refract Surg.* 2021;47(12):1524-1529.
17. Rabinowitz YS. The genetics of keratoconus. *Ophthalmol Clin North Am.* 2003;16(4):607-vii.
18. Aatila M, Lachgar M, Himech H, Kartit A. Transfer learning in keratoconus classification. *International Journal of Online & Biomedical Engineering.* 2022;18(15): 43-58.
19. Li Y, Tan O, Brass R, Weiss JL, Huang D. Corneal epithelial thickness mapping by Fourier-domain optical coherence tomography in normal and keratoconic eyes. *Ophthalmology.* 2012;119(12):2425-2433.
20. Mathew JH, Goosey JD, Bergmanson JP. Quantified histopathology of the keratoconic cornea. *Optom Vis Sci.* 2011;88(8):988-997.
21. Reinstein DZ, Archer TJ, Gobbe M. Corneal epithelial thickness profile in the diagnosis of keratoconus. *J Refract Surg.* 2009;25(7):604-610.
22. Crespo Millas S, López JC, García-Lagarto E, et al. Histological patterns of epithelial alterations in keratoconus. *J Ophthalmol.* 2020;2020:1468258.
23. Scroggs MW, Proia AD. Histopathological variation in keratoconus. *Cornea.* 1992;11(6):553-559.
24. Weed KH, MacEwen CJ, Cox A, McGhee CN. Quantitative analysis of corneal microstructure in keratoconus utilising *in vivo* confocal microscopy. *Eye (Lond).* 2007;21(5):614-623.
25. Sawaguchi S, Fukuchi T, Abe H, Kaiya T, Sugar J, Yue BY. Three-dimensional scanning electron microscopic study of keratoconus corneas. *Arch Ophthalmol.* 1998;116(1):62-68.

26. Sherwin T, Brookes NH, Loh IP, Poole CA, Clover GM. Cellular incursion into Bowman's membrane in the peripheral cone of the keratoconic cornea. *Exp Eye Res.* 2002;74(4):473-482.
27. Sherwin T, Brookes NH. Morphological changes in keratoconus: pathology or pathogenesis. *Clin Exp Ophthalmol.* 2004;32(2):211-217.
28. Erie JC, Patel SV, McLaren JW, Nau CB, Hodge DO, Bourne WM. Keratocyte density in keratoconus. A confocal microscopy study(a). *Am J Ophthalmol.* 2002;134(5):689-695.
29. Fernandes BF, Logan P, Zajdenweber ME, Santos LN, Cheema DP, Burnier MN Jr. Histopathological study of 49 cases of keratoconus. *Pathology.* 2008;40(6):623-626.
30. Sturbaum CW, Peiffer RL Jr. Pathology of corneal endothelium in keratoconus. *Ophthalmologica.* 1993;206(4):192-208.
31. Sawaguchi S, Yue BY, Sugar J, Gilboy JE. Lysosomal enzyme abnormalities in keratoconus. *Arch Ophthalmol.* 1989;107(10):1507-1510.
32. Kim WJ, Rabinowitz YS, Meisler DM, Wilson SE. Keratocyte apoptosis associated with keratoconus. *Exp Eye Res.* 1999;69(5):475-481.
33. Hwang DG. The intrastromal corneal ring segment: current status and review of US phase II clinical results. *Ophthalmology Clinics Of North America* 1997;10:591-8.
34. Wojcik KA, Kaminska A, Blasiak J, Szaflik J, Szaflik JP. Oxidative stress in the pathogenesis of keratoconus and Fuchs endothelial corneal dystrophy. *Int J Mol Sci.* 2013;14(9):19294-19308.
35. Lema I, Durán JA. Inflammatory molecules in the tears of patients with keratoconus. *Ophthalmology.* 2005;112(4):654-659.
36. Shetty R, Vunnava KP, Dhamodaran K, et al. Characterization of corneal epithelial cells in keratoconus. *Transl Vis Sci Technol.* 2018;8(1):2.
37. Navel V, Malecaze J, Pereira B, et al. Oxidative and antioxidative stress markers in keratoconus: a systematic review and meta-analysis. *Acta Ophthalmol.* 2021;99(6):e777-e794.

38. Abu-Amero KK, Kondkar AA, Azad TA, Sultan T, Kalantan H, Al-Muammar AM. Keratoconus is associated with increased copy number of mitochondrial DNA. *Mol Vis*. 2014;20:1203-1208.
39. Hao XD, Chen ZL, Qu ML, Zhao XW, Li SX, Chen P. Decreased integrity, content, and increased transcript level of mitochondrial DNA are associated with keratoconus. *PLoS One*. 2016;11(10):e0165580.
40. Khaled ML, Helwa I, Drewry M, Seremwe M, Estes A, Liu Y. Molecular and histopathological changes associated with keratoconus. *Biomed Res Int*. 2017;2017:7803029.
41. Tuft SJ, Hassan H, George S, Frazer DG, Willoughby CE, Liskova P. Keratoconus in 18 pairs of twins. *Acta Ophthalmol*. 2012;90:e482–6.
42. Nowak DM, Gajecka M. The genetics of keratoconus. *Middle East Afr J Ophthalmol*. 2011;18:2–6.
43. McComish BJ, Sahebjada S, Bykhovskaya Y, et al. Association of genetic variation with keratoconus. *JAMA Ophthalmol*. 2020;138:174–181.
44. Johnson DH, Bourne WM, Campbell RJ. The ultrastructure of Descemet's membrane. I. Changes with age in normal corneas. *Arch Ophthalmol*. 1982;100(12):1942-1947.
45. Eran P, Almogit A, David Z, et al. The D144E substitution in the VSX1 gene: a non-pathogenic variant or a disease causing mutation? *Ophthalmic Genet*. 2008;29(2):53-59.
46. Gajecka M, Radhakrishna U, Winters D, et al. Localization of a gene for keratoconus to a 5.6-Mb interval on 13q32. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2009;50(4):1531-1539.
47. Burdon KP, Macgregor S, Bykhovskaya Y, et al. Association of polymorphisms in the hepatocyte growth factor gene promoter with keratoconus. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011;52(11):8514-8519.
48. Zhang L, Jia R, Li H, et al. Insight into the double-edged role of ferroptosis in disease. *Biomolecules*. 2021;11(12):1790.
49. Wheeler J, Hauser MA, Afshari NA, Allingham RR, Liu Y. The genetics of keratoconus: A review. *Reprod Syst Sex Disord*. 2012;(Suppl 6):001.

50. Cuellar-Partida G, Springelkamp H, Lucas SE, et al. WNT10A exonic variant increases the risk of keratoconus by decreasing corneal thickness. *Hum Mol Genet.* 2015;24(17):5060-5068.
51. Gao X, Nannini DR, Corrao K, et al. Genome-wide association study identifies WNT7B as a novel locus for central corneal thickness in Latinos. *Hum Mol Genet.* 2016;25(22):5035-5045.
52. Salomão M, Hoffling-Lima AL, Lopes B, et al. Recent developments in keratoconus diagnosis. *Expert Review of Ophthalmology.* 2018;13:329–341.
53. Wang Y, Rabinowitz YS, Rotter JI, Yang H. Genetic epidemiological study of keratoconus: evidence for major gene determination. *Am J Med Genet.* 2000;93(5):403-409.
54. Toprak I, Kucukatay V, Yildirim C, Kilic-Toprak E, Kilic-Erkek O. Increased systemic oxidative stress in patients with keratoconus. *Eye (Lond).* 2014;28(3):285-289.
55. Jafri B, Lichter H, Stulting RD. Asymmetric keratoconus attributed to eye rubbing. *Cornea.* 2004;23(6):560-564.
56. Bawazeer AM, Hodge WG, Lorimer B. Atopy and keratoconus: a multivariate analysis. *Br J Ophthalmol.* 2000;84(8):834-836.
57. Fodor M, Kolozsvári BL, Petrovski G, et al. Effect of contact lens wear on the release of tear mediators in keratoconus. *Eye Contact Lens.* 2013;39(2):147-152.
58. Alio JL, Vega-Estrada A, Sanz P, et al. Corneal morphologic characteristics in patients with Down syndrome. *JAMA Ophthalmol.* 2018;136(9):971-978.
59. Imbornoni LM, Wise RE, Taravella MJ, Hickey F, McCourt EA. Keratoconus and corneal morphology in patients with Down syndrome at a pediatric hospital. *J AAPOS.* 2020;24(3):140.e1-140.e5.
60. Spoerl E, Zubaty V, Raiskup-Wolf F, Pillunat LE. Oestrogen-induced changes in biomechanics in the cornea as a possible reason for keratectasia. *Br J Ophthalmol.* 2007;91:1547–550.
61. Torres-Netto EA, Randleman JB, Hafezi NL, Hafezi F. Late-onset progression of keratoconus after therapy with selective tissue estrogenic activity regulator. *J Cataract Refract Surg.* 2019;45:101–4.

62. Lee R, Hafezi F, Randleman JB. Bilateral keratoconus induced by secondary hypothyroidism after radioactive iodine therapy. *J Refract Surg.* 2018;34:351–3.
63. Al-Mahrouqi H, Oraba SB, Al-Habsi S, et al. Retinoscopy as a screening tool for keratoconus. *Cornea.* 2019;38(4):442-445.
64. Buddi R, Lin B, Atilano SR, Zorapapel NC, Kenney MC, Brown DJ. Evidence of oxidative stress in human corneal diseases. *J Histochem Cytochem.* 2002;50(3):341-51.
65. Moramarco A, Gardini L, Iannetta D, Versura P, Fontana L. Post penetrating keratoplasty ectasia: Incidence, risk factors, clinical features, and treatment options. *J Clin Med.* 2022;11(10):2678.
66. Vazirani J, Basu S. Keratoconus: current perspectives. *Clin Ophthalmol.* 2013;7:2019-2030.
67. Sinjab MM. Keratoconus: A historical and prospective review. *Oman J Ophthalmol.* 2023;16(3):401-414.
68. Vohra V, Tuteja S, Gurnani B, Chawla H. Collagen Cross Linking for Keratoconus. In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; June 11, 2023. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK562271/>
69. Santodomingo-Rubido J, Carracedo G, Suzaki A, Villa-Collar C, Vincent SJ, Wolffsohn JS. Keratoconus: An updated review. *Cont Lens Anterior Eye.* 2022;45(3):101559.
70. Cavas-Martínez F, De la Cruz Sánchez E, Nieto Martínez J, Fernández Cañavate FJ, Fernández-Pacheco DG. Corneal topography in keratoconus: state of the art. *Eye Vis (Lond).* 2016;3:5.
71. Atalay E, Özalp O, Yıldırım N. Advances in the diagnosis and treatment of keratoconus. *Ther Adv Ophthalmol.* 2021;13:25158414211012796.
72. Kamiya K, Ishii R, Shimizu K, Igarashi A. Evaluation of corneal elevation, pachymetry and keratometry in keratoconic eyes with respect to the stage of Amsler-Krumeich classification. *Br J Ophthalmol.* 2014;98(4):459-463.
73. Mohammadpour M, Heidari Z, Hashemi H. Updates on managements for keratoconus. *J Curr Ophthalmol.* 2018;30(2):110-124.

74. Kumanomido T, Kamiya K, Takahashi M, et al. Clinical evaluation of flat peripheral curve design with aspherical-curve and multi-curve hard contact lenses for keratoconus. *PLoS One*. 2022;17(2):e0263506.
75. Downie LE, Lindsay RG. Contact lens management of keratoconus. *Clin Exp Optom*. 2015;98(4):299-311.
76. Angelo L, Gokul Boptom A, McGhee C, Ziaei M. Corneal crosslinking: Present and future. *Asia Pac J Ophthalmol (Phila)*. 2022;11(5):441-452.
77. Erdinest N, London N, Landau D, Barbara R, Barbara A, Naroo SA. Higher order aberrations in keratoconus. *Int Ophthalmol*. 2024;44(1):172.
78. Srivatsa S, Jacob S, Agarwal A. Contact lens assisted corneal cross linking in thin ectatic corneas - A review. *Indian J Ophthalmol*. 2020;68(12):2773-2778.
79. Gurnani B, Kaur K. Penetrating Keratoplasty. In: *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; June 11, 2023. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK592388/>
80. Nanavaty MA, Vijjan KS, Yvon C. Deep anterior lamellar keratoplasty: A surgeon's guide. *J Curr Ophthalmol*. 2018;30(4):297-310.
81. Tong CM, van Dijk K, Melles GRJ. Update on Bowman layer transplantation. *Curr Opin Ophthalmol*. 2019;30(4):249-255.
82. Jhanji V, Santra M, Riau AK, et al. Combined therapy using human corneal stromal stem cells and quiescent keratocytes to prevent corneal scarring after injury. *Int J Mol Sci*. 2022;23(13):6980.
83. Cadenas E, Davies KJ. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic Biol Med*. 2000;29(3-4):222-230.
84. Mobbs CV, Mastaitis JW, Zhang M, Isoda F, Cheng H, Yen K. Secrets of the lac operon. Glucose hysteresis as a mechanism in dietary restriction, aging and disease. *Interdiscip Top Gerontol*. 2007;35:39-68.
85. Calvo SE, Clauser KR, Mootha VK. MitoCarta2.0: an updated inventory of mammalian mitochondrial proteins. *Nucleic Acids Res*. 2016;44(D1):D1251-D1257.
86. Smith AC, Blackshaw JA, Robinson AJ. MitoMiner: A data warehouse for mitochondrial proteomics data. *Nucleic Acids Res*. 2012;40(Database issue):D1160-D1167.

87. Miller KB, Rosenwasser LJ, Bessette JA, Beer DJ, Rocklin RE. Rapid desensitisation for desferrioxamine anaphylactic reaction. *Lancet*. 1981;1(8228):1059.
88. Hashimoto Y, Niikura T, Tajima H, et al. A rescue factor abolishing neuronal cell death by a wide spectrum of familial Alzheimer's disease genes and Abeta. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001;98(11):6336-6341.
89. Luciano F, Zhai D, Zhu X, et al. Cytoprotective peptide humanin binds and inhibits proapoptotic Bcl-2/Bax family protein BimEL. *J Biol Chem*. 2005;280(16):15825-15835.
90. Bachar AR, Scheffer L, Schroeder AS, et al. Humanin is expressed in human vascular walls and has a cytoprotective effect against oxidized LDL-induced oxidative stress. *Cardiovasc Res*. 2010;88(2):360-366.
91. Oh YK, Bachar AR, Zacharias DG, et al. Humanin preserves endothelial function and prevents atherosclerotic plaque progression in hypercholesterolemic ApoE deficient mice. *Atherosclerosis*. 2011;219(1):65-73.
92. Zuccato CF, Asad AS, Nicola Candia AJ, et al. Mitochondrial-derived peptide humanin as therapeutic target in cancer and degenerative diseases. *Expert Opin Ther Targets*. 2019;23(2):117-126.
93. Logan IS. Pseudogenization of the Humanin gene is common in the mitochondrial DNA of many vertebrates. *Zool Res*. 2017;38(4):198-202.
94. Gottardo MF, Pidre ML, Zuccato C, et al. Baculovirus-based gene silencing of Humanin for the treatment of pituitary tumors. *Apoptosis*. 2018;23(2):143-151.
95. Gottardo MF, Moreno Ayala M, Ferraris J, et al. Humanin inhibits apoptosis in pituitary tumor cells through several signaling pathways including NF- κ B activation. *J Cell Commun Signal*. 2017;11(4):329-340.
96. Qin Q, Delrio S, Wan J, et al. Downregulation of circulating MOTS-c levels in patients with coronary endothelial dysfunction. *Int J Cardiol*. 2018;254:23-27.
97. Xinqiang Y, Quan C, Yuanyuan J, Hanmei X. Protective effect of MOTS-c on acute lung injury induced by lipopolysaccharide in mice. *Int Immunopharmacol*. 2020;80:106174.
98. Merry TL, Chan A, Woodhead JST, et al. Mitochondrial-derived peptides in energy metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2020;319(4):E659-E666.

99. Hay DI. The isolation from human parotid saliva of a tyrosine-rich acidic peptide which exhibits high affinity for hydroxyapatite surfaces. *Arch Oral Biol.* 1973;18(12):1531-1541.
100. Oppenheim FG, Xu T, McMillian FM, et al. Histatins, a novel family of histidine-rich proteins in human parotid secretion. Isolation, characterization, primary structure, and fungistatic effects on *Candida albicans*. *J Biol Chem.* 1988;263(16):7472-7477.
101. Helmerhorst EJ, Van't Hof W, Veerman EC, Simoons-Smit I, Nieuw Amerongen AV. Synthetic histatin analogues with broad-spectrum antimicrobial activity. *Biochem J.* 1997;326 (Pt 1)(Pt 1):39-45.
102. Nikawa H, Jin C, Makihira S, Hamada T, Samaranayake LP. Susceptibility of *Candida albicans* isolates from the oral cavities of HIV-positive patients to histatin-5. *J Prosthet Dent.* 2002;88(3):263-267.
103. Cabras T, Patamia M, Melino S, et al. Pro-oxidant activity of histatin 5 related Cu(II)-model peptide probed by mass spectrometry. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;358(1):277-284.
104. Shah D, Ali M, Shukla D, Jain S, Aakalu VK. Effects of histatin-1 peptide on human corneal epithelial cells. *PLoS One.* 2017;12(5):e0178030.
105. Oudhoff MJ, Bolscher JG, Nazmi K, et al. Histatins are the major wound-closure stimulating factors in human saliva as identified in a cell culture assay. *FASEB J.* 2008;22(11):3805-3812.
106. Oudhoff MJ, Kroeze KL, Nazmi K, et al. Structure-activity analysis of histatin, a potent wound healing peptide from human saliva: cyclization of histatin potentiates molar activity 1,000-fold. *FASEB J.* 2009;23(11):3928-3935.
107. Sharma P, Chaudhary M, Khanna G, Rishi P, Kaur IP. Envisaging antifungal potential of histatin 5: A physiological salivary peptide. *J Fungi (Basel).* 2021;7(12):1070.
108. Puri S, Edgerton M. How does it kill? Understanding the candidacidal mechanism of salivary histatin 5. *Eukaryot Cell.* 2014;13(8):958-964.
109. Blotnick E, Sol A, Bachrach G, Muhlrach A. Interactions of histatin-3 and histatin-5 with actin. *BMC Biochem.* 2017;18(1):3.

110. Sun P, Shi A, Shen C, Liu Y, Wu G, Feng J. Human salivary histatin-1 (Hst1) promotes bone morphogenetic protein 2 (BMP2)-induced osteogenesis and angiogenesis. *FEBS Open Bio*. 2020;10(8):1503-1515.
111. van Dijk IA, Nazmi K, Bolscher JG, Veerman EC, Stap J. Histatin-1, a histidine-rich peptide in human saliva, promotes cell-substrate and cell-cell adhesion. *FASEB J*. 2015;29(8):3124-3132.
112. van Dijk IA, Ferrando ML, van der Wijk AE, et al. Human salivary peptide histatin-1 stimulates epithelial and endothelial cell adhesion and barrier function. *FASEB J*. 2017;31(9):3922-3933.
113. Arden GB, Wonke B, Kennedy C, Huehns ER. Ocular changes in patients undergoing long-term desferrioxamine treatment. *Br J Ophthalmol*. 1984;68(12):873-877.
114. Atlan N, Dinçel A, Koca C. Diabetes mellitus ve oksidatif stres. *Türk Biyokimya Dergisi*. 2006;31(2):51-6.
115. Wei Y, C Pang. The Role of Mitochondria in human aging process. *Biotech International*. 2005;17:8-13.
116. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. Mini-review. *Chem. Biol. Interact*. 2006;160:1–40.
117. Hoshino Y, Mishima M. Antioxidants & redox signaling redox-based therapeutics for lung diseases. *Antioxid. Redox. Signal*. 2008;10:701–704.
118. Atilano SR, Coskun P, Chwa M, et al. Accumulation of mitochondrial DNA damage in keratoconus corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2005;46(4):1256-1263.
119. Olofsson EM, Marklund SL, Pedrosa-Domellöf F, Behndig A. Interleukin-1alpha downregulates extracellular-superoxide dismutase in human corneal keratoconus stromal cells. *Mol Vis*. 2007;13:1285-1290.
120. Arnal E, Peris-Martínez C, Menezo JL, Johnsen-Soriano S, Romero FJ. Oxidative stress in keratoconus? *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011;52(12):8592-8597.

121. Chwa M, Atilano SR, Hertzog D, et al. Hypersensitive response to oxidative stress in keratoconus corneal fibroblasts. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2008;49(10):4361-4369.
122. Halliwell B, Gutteridge JM, Cross CE. Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? *J Lab Clin Med.* 1992;119(6):598-620.
123. Halliwell B. Biochemistry of oxidative stress. *Biochem Soc Trans.* 2007;35(Pt 5):1147-1150.
124. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine.* 4th. Oxford, UK: Clarendon Press; 2007.
125. Valko M, Izakovic M, Mazur M, et al. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol. Cell Biochem.* 2004;266:37–56.
126. Genestra M. Oxyl radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants. Review. *Cell Signal.* 2007; 19:1807–1819.
127. Valko M, Leibfritz D, Moncola J, et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. Review. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2007;39:44–84.
128. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. Review. *Physiol. Rev.* 2002; 82:47–95.
129. Frei B. Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: mechanisms of action. *Am J Med.* 1994;97(3A):5S-13S; discussion 22S-28S.
130. Gupta RK, Patel AK, Shah N, et al. Oxidative stress and antioxidants in disease and cancer: A review. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2014;15:4405-4409.
131. Dündar Y, Aslan R. Hücre moleküler statüsünün anlaşılması ve fizyolojik önem açısından radikaller, antioksidanlar. *İnsizyon Cerrahi Tıp Bil Derg.* 1999;2(2):134-42.
132. Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C. Free radicals, antioxidants in disease and health. *Int J Biomed Sci.* 2008;4(2):89-96.
133. Valko M, Morris H, Cronin MTD. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr. Med. Chem.* 2005;12:1161–1208.
134. Gutteridge JM. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem.* 1995;41:1819-1828.

135. Young I, Woodside J. Antioxidants in health and disease. *J. Clin. Pathol.* 2001; 54:176–186.
136. Willcox JK, Ash SL, Catignani GL. Antioxidants and prevention of chronic disease. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2004;44(4):275-95.
137. Wenk J, Brenneisen P, Meewes C, et al. UV-induced oxidative stress and photoaging. *Curr Probl Dermatol.* 2001;29:83-94.
138. Becquet F, Courtois Y, Goureau O. Nitric oxide in the eye: multifaceted roles and diverse outcomes. *Surv Ophthalmol.* 1997;42(1):71-82.
139. Demiryürek AT, Cakici I, Kanzik I. Peroxynitrite: a putative cytotoxin. *Pharmacol Toxicol.* 1998;82(3):113-117.
140. Demiryürek AT, Karamsetty MR, McPhaden AR, Wadsworth RM, Kane KA, MacLean MR. Accumulation of nitrotyrosine correlates with endothelial NO synthase in pulmonary resistance arteries during chronic hypoxia in the rat. *Pulm Pharmacol Ther.* 2000;13(4):157-165.
141. Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol.* 1996;271(5 Pt 1):C1424-C1437.
142. Kooy NW, Lewis SJ, Royall JA, Ye YZ, Kelly DR, Beckman JS. Extensive tyrosine nitration in human myocardial inflammation: evidence for the presence of peroxynitrite. *Crit Care Med.* 1997;25(5):812-819.
143. Murphy MP, Packer MA, Scarlett JL, Martin SW. Peroxynitrite: a biologically significant oxidant. *Gen Pharmacol.* 1998;31(2):179-186.
144. Kooy NW, Royall JA, Ye YZ, Kelly DR, Beckman JS. Evidence for *in vivo* peroxynitrite production in human acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med.* 1995;151(4):1250-1254.
145. Cross AH, Manning PT, Stern MK, Misko TP. Evidence for the production of peroxynitrite in inflammatory CNS demyelination. *J Neuroimmunol.* 1997;80(1-2):121-130.
146. Saleh D, Barnes PJ, Giaid A. Increased production of the potent oxidant peroxynitrite in the lungs of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997;155(5):1763-1769.

147. Estrada C, Gómez C, Martín-Nieto J, De Frutos T, Jiménez A, Villalobo A. Nitric oxide reversibly inhibits the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase. *Biochem J.* 1997;326 (Pt 2)(Pt 2):369-376.
148. Go YM, Patel RP, Maland MC, et al. Evidence for peroxynitrite as a signaling molecule in flow-dependent activation of c-Jun NH(2)-terminal kinase. *Am J Physiol.* 1999;277(4):H1647-H1653.
149. Jope RS, Zhang L, Song L. Peroxynitrite modulates the activation of p38 and extracellular regulated kinases in PC12 cells. *Arch Biochem Biophys.* 2000;376(2):365-370.
150. Kiroychewa M, Ahmed F, Anthony GM, Szabo C, Southan GJ, Bank N. Mitogen-activated protein kinase phosphorylation in kidneys of beta(s) sickle cell mice. *J Am Soc Nephrol.* 2000;11(6):1026-1032.
151. Beckman JS. Oxidative damage and tyrosine nitration from peroxynitrite. *Chem Res Toxicol.* 1996;9(5):836-844.
152. Szabó C, Ohshima H. DNA damage induced by peroxynitrite: subsequent biological effects. *Nitric Oxide.* 1997;1(5):373-385.
153. Brittenham GM, Griffith PM, Nienhuis AW, et al. Efficacy of deferoxamine in preventing complications of iron overload in patients with thalassemia major. *N Engl J Med.* 1994 ;331(9):567-73.
154. Demiryürek Ş, Turan N, Demiryürek AT. Peroksinitritin akciğerlerdeki etkileri ve akciğer hastalıklarındaki rolü. *Genel Tıp Dergisi* 2004;14 (4):163-169.
155. Therond P. Oxidative stress and damages to biomolecules (lipids, proteins, DNA). *Ann Pharm Fr.* 2006;64(6):383-9.
156. Kooy NW, Lewis SJ. Nitrotyrosine attenuates the hemodynamic effects of adrenoceptor agonists *in vivo*: relevance to the pathophysiology of peroxynitrite. *Eur J Pharmacol.* 1996;310(2-3):155-161.
157. Fukuyama N, Takebayashi Y, Hida M, Ishida H, Ichimori K, Nakazawa H. Clinical evidence of peroxynitrite formation in chronic renal failure patients with septic shock. *Free Radic Biol Med.* 1997;22(5):771-774.
158. Yücel EM, Konduk BT, Saracaloglu A, et al. Investigation of Dynamic Thiol/Disulfide Homeostasis and Nitrosative Stress in Patients with Wilson Disease. *Turk J Gastroenterol.* 2021;32(9):765-773.

159. Behndig A, Karlsson K, Johansson BO, Brännström T, Marklund SL. Superoxide dismutase isoenzymes in the normal and diseased human cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001;42(10):2293-2296.
160. Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic Biol Med.* 2002;33(3):337-349.
161. Pappa A, Estey T, Manzer R, Brown D, Vasiliou V. Human aldehyde dehydrogenase 3A1 (ALDH3A1): biochemical characterization and immunohistochemical localization in the cornea. *Biochem J.* 2003;376(Pt 3):615-623.
162. Nuriel T, Deeb RS, Hajjar DP, Gross SS. Protein 3-nitrotyrosine in complex biological samples: quantification by high-pressure liquid chromatography/electrochemical detection and emergence of proteomic approaches for unbiased identification of modification sites. *Methods Enzymol.* 2008;441:1-17.
163. Curieses Andrés CM, Pérez de la Lastra JM, Andrés Juan C, Plou FJ, Pérez-Lebeña E. From reactive species to disease development: Effect of oxidants and antioxidants on the cellular biomarkers. *J Biochem Mol Toxicol.* 2023;37(11):e23455.
164. Younus DA. Romatoid artritlerde oksidatif stres seviyelerinin ve bazı antioksidan enzim faaliyetlerinin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Van; 2019.
165. Salman KA, Ashraf S. Reactive oxygen species: A link between chronic inflammation and cancer. *Asia-Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology.* 2013;21(2):42-9.
166. Cherubini A, Ruggiero C, Polidori MC, Mecocci P. Potential markers of oxidative stress in stroke. *Free Radic Biol Med.* 2005;39(7):841-852.
167. Moujalled D, Strasser A, Liddell JR. Molecular mechanisms of cell death in neurological diseases. *Cell Death Differ.* 2021;28(7):2029-2044.

168. Yang WS, Stockwell BR. Synthetic lethal screening identifies compounds activating iron-dependent, nonapoptotic cell death in oncogenic-RAS-harboring cancer cells. *Chem Biol.* 2008;15(3):234-245.
169. Gkouvatsos K, Papanikolaou G, Pantopoulos K. Regulation of iron transport and the role of transferrin. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1820(3):188-202.
170. Candelaria PV, Leoh LS, Penichet ML, Daniels-Wells TR. Antibodies Targeting the Transferrin Receptor 1 (TfR1) as Direct Anti-cancer Agents. *Front Immunol.* 2021;12:607692.
171. Asano T, Komatsu M, Yamaguchi-Iwai Y, Ishikawa F, Mizushima N, Iwai K. Distinct mechanisms of ferritin delivery to lysosomes in iron-depleted and iron-replete cells. *Mol Cell Biol.* 2011;31(10):2040-2052.
172. Feng H, Schorpp K, Jin J, et al. Transferrin receptor is a specific ferroptosis marker. *Cell Rep.* 2020;30(10):3411-3423.e7.
173. Wakil SJ, Abu-Elheiga LA. Fatty acid metabolism: target for metabolic syndrome. *J Lipid Res.* 2009;50 Suppl(Suppl):S138-S143.
174. Grevengoed TJ, Klett EL, Coleman RA. Acyl-CoA metabolism and partitioning. *Annu Rev Nutr.* 2014;34:1-30.
175. Cui Y, Zhang Y, Zhao X, et al. ACSL4 exacerbates ischemic stroke by promoting ferroptosis-induced brain injury and neuroinflammation. *Brain Behav Immun.* 2021;93:312-321.
176. Yuan H, Li X, Zhang X, Kang R, Tang D. Identification of ACSL4 as a biomarker and contributor of ferroptosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016;478(3):1338-1343.
177. Halliwell B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. *Am J Med.* 1991;91(3C):14S-22S.
178. Mateos R, Lecumberri E, Ramos S, Goya L, Bravo L. Determination of malondialdehyde (MDA) by high-performance liquid chromatography in serum and liver as a biomarker for oxidative stress. Application to a rat model for hypercholesterolemia and evaluation of the effect of diets rich in phenolic antioxidants from fruits. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2005;827(1):76-82.

179. Angeli JPF, Shah R, Pratt DA, Conrad M. Ferroptosis Inhibition: Mechanisms and Opportunities. *Trends Pharmacol Sci.* 2017;38(5):489-498.
180. Liu Z, Lv X, Song E, Song Y. Fostered Nrf2 expression antagonizes iron overload and glutathione depletion to promote resistance of neuron-like cells to ferroptosis. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2020;407:115241.
181. La Rosa P, Petrillo S, Turchi R, et al. The Nrf2 induction prevents ferroptosis in Friedreich's Ataxia. *Redox Biol.* 2021;38:101791.
182. Mbah NE, Lyssiotis CA. Metabolic regulation of ferroptosis in the tumor microenvironment. *J Biol Chem.* 2022;298(3):101617.
183. Dixon SJ, Stockwell BR. The role of iron and reactive oxygen species in cell death. *Nat Chem Biol.* 2014;10(1):9-17.
184. Friedmann Angeli JP, Schneider M, Proneth B, et al. Inactivation of the ferroptosis regulator GPX4 triggers acute renal failure in mice. *Nat Cell Biol.* 2014;16(12):1180-1191.
185. Doll S, Freitas FP, Shah R, et al. FSP1 is a glutathione-independent ferroptosis suppressor. *Nature.* 2019;575(7784):693-698.
186. Stockwell BR. A powerful cell-protection system prevents cell death by ferroptosis. *Nature.* 2019;575(7784):597-598.
187. Bersuker K, Hendricks JM, Li Z, et al. The CoQ oxidoreductase FSP1 acts parallel to GPX4 to inhibit ferroptosis. *Nature.* 2019;575(7784):688-692.
188. Rhee SG, Kil IS. Multiple functions and regulation of mammalian peroxiredoxins. *Annu Rev Biochem.* 2017;86:749-775.
189. Lovatt M, Adnan K, Kocaba V, Dirisamer M, Peh GSL, Mehta JS. Peroxiredoxin-1 regulates lipid peroxidation in corneal endothelial cells. *Redox Biol.* 2020;30:101417.
190. Li X, Zhuang X, Qiao T. Role of ferroptosis in the process of acute radiation-induced lung injury in mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 2019;519(2):240-245.
191. Guo N. Identification of ACSL4 as a biomarker and contributor of ferroptosis in clear cell renal cell carcinoma. *Transl Cancer Res.* 2022;11(8):2688-2699.

192. Fan Z, Cai L, Wang S, Wang J, Chen B. Baicalin prevents myocardial ischemia/reperfusion injury through inhibiting ACSL4 mediated ferroptosis. *Front Pharmacol.* 2021;12:628988.
193. Hacıoglu C, Kar F. Capsaicin induces redox imbalance and ferroptosis through ACSL4/GPx4 signaling pathways in U87-MG and U251 glioblastoma cells. *Metab Brain Dis.* 2023;38(2):393-408.
194. Li D, Song C, Zhang J, Zhao X. ROS and iron homeostasis dependent ferroptosis play a vital role in 5-Fluorouracil induced cardiotoxicity *in vitro* and *in vivo*. *Toxicology.* 2022;468:153113.
195. Cighetti G, Duca L, Bortone L, et al. Oxidative status and malondialdehyde in beta-thalassaemia patients. *Eur J Clin Invest.* 2002;32 Suppl 1:55-60.
196. Colin J, Cochener B, Savary G, Malet F. Correcting keratoconus with intracorneal rings. *J Cataract Refract Surg.* 2000;26(8):1117-1122.
197. Seyyar SA, Mete A, Kimyon S, Tıskaoğlu NS. Outcomes of customized topographic guided epithelial debridement for corneal collagen cross-linking. *Int Ophthalmol.* 2022;42(4):1273-1280.
198. Tokur O, Aksoy A. *In vitro* sitotoksosite testleri. *Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 2017;6(1):112-118.
199. Mete AÖ, Koçak K, Saracaloglu A, Demiryürek S, Altınbaş Ö, Demiryürek AT. Effects of antiviral drug therapy on dynamic thiol/disulphide homeostasis and nitric oxide levels in COVID-19 patients. *Eur J Pharmacol.* 2021;907:174306.
200. Kaya-Ugur B, Erkutlu I, Saracaloglu A, Geyik AM, Demiryürek S, Demiryürek AT. Comparison of serum dynamic thiol/disulphide homeostasis and nitric oxide levels of total intravenous vs inhaled anaesthesia in endoscopic transsphenoidal pituitary surgery. *Int J Clin Pract.* 2021;75(9):e14485.
201. Villarroel P, Le Blanc S, Arredondo M. Interleukin-6 and lipopolysaccharide modulate hepcidin mRNA expression by HepG2 cells. *Biol Trace Elem Res.* 2012;150(1-3):496-501.
202. Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 1990;186:421-431.

203. Serbecic N, Beutelspacher SC. Anti-oxidative vitamins prevent lipid- peroxidation and apoptosis in corneal endothelial cells. *Cell Tissue Res.* 2005;320(3):465-475.
204. Fagerholm P, Hamberg-Nyström H, Tengroth B. Wound healing and myopic regression following photorefractive keratectomy. *Acta Ophthalmol (Copenh).* 1994;72(2):229-34.
205. Sezen AY. Kornea epitel iyileşmesinde topikal insan serumu, amnion sıvısı, umbilikal kord serumu ve anne sütü etkinliklerinin karşılaştırılması. Tıpta uzmanlık tezi, Başkent Üniversitesi, Ankara; 2017.
206. Ferrari G, Rama P. The keratoconus enigma: A review with emphasis on pathogenesis. *Ocul Surf.* 2020;18(3):363-373.
207. Nunnari J, Suomalainen A. Mitochondria: in sickness and in health. *Cell.* 2012;148:1145–1159.
208. Kong BS, Lee C, Cho YM. Mitochondrial-encoded peptide MOTS-c, diabetes, and aging-related diseases. *Diabetes Metab J.* 2023;47(3):315-324.
209. Zhou B, Kreuzer J, Kumsta C, et al. Mitochondrial permeability uncouples elevated autophagy and lifespan extension. *Cell.* 2019; 177:299–314.e16.
210. Muzumdar RH, Huffman DM, Atzmon G, et al. Humanin: a novel central regulator of peripheral insulin action. *PLoS One.* 2009;4(7):e6334.
211. Yong CQY, Tang BL. A mitochondrial encoded messenger at the nucleus. *Cells.* 2018;7(8):105.
212. Chen Z, Zhao GH, Zhang YK, Shen GS, Xu YJ, Xu NW. Research on the correlation of diabetes mellitus complicated with osteoporosis with lipid metabolism, adipokines and inflammatory factors and its regression analysis. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2017;21(17):3900-3905.
213. Jiang J, Chang X, Nie Y, et al. Peripheral administration of a cell-penetrating MOTS-c analogue enhances memory and attenuates A β 1-42- or LPS-induced memory impairment through inhibiting neuroinflammation. *ACS Chem Neurosci.* 2021;12(9):1506-1518.
214. Kim SK, Tran LT, NamKoong C, et al. Mitochondria-derived peptide SHLP2 regulates energy homeostasis through the activation of hypothalamic neurons. *Nat Commun.* 2023;14(1):4321.

215. D'Souza RF, Woodhead JST, Hedges CP, et al. Increased expression of the mitochondrial derived peptide, MOTS-c, in skeletal muscle of healthy aging men is associated with myofiber composition. *Aging (Albany NY)*. 2020;12(6):5244-5258.
216. Shen C, Wang J, Feng M, et al. The mitochondrial-derived peptide MOTS-c attenuates oxidative stress injury and the inflammatory response of H9c2 cells through the Nrf2/ARE and NF- κ B pathways. *Cardiovasc Eng Technol*. 2022;13(5):651-661.
217. Wu J, Xiao D, Yu K, Shalamu K, He B, Zhang M. The protective effect of the mitochondrial-derived peptide MOTS-c on LPS-induced septic cardiomyopathy. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2023;55(2):285-294.
218. Kriszt Á, Losonczy G, Berta A, Takács L. Presence of Fleischer ring and prominent corneal nerves in keratoconus relatives and normal controls. *Int J Ophthalmol*. 2015;8(5):922-927.
219. Masood F, Chang JH, Akbar A, et al. Therapeutic strategies for restoring perturbed corneal epithelial homeostasis in limbal stem cell deficiency: Current trends and future directions. *Cells*. 2022;11(20):3247.
220. Inamochi A, Miyai T, Usui T, Aihara M, Yamagami S. Effects of corneal epithelial superficial keratectomy in patients with focal limbal stem cell disease. *Am J Ophthalmol Case Rep*. 2021;25:101239.
221. Sykakis E, Carley F, Irion L, Denton J, Hillarby MC. An in depth analysis of histopathological characteristics found in keratoconus. *Pathology*. 2012;44(3):234-239.
222. Sorbara L, Lopez JCL, Gorbet M, et al. Impact of contact lens wear on epithelial alterations in keratoconus. *J Optom*. 2021;14(1):37-43.
223. Wang Y, Ning R, Li K, et al. Repeatability of epithelium thickness measured by an AS-OCT in different grades of keratoconus and compared to AS-OCT/Placido topography. *Am J Ophthalmol*. 2024;265:213-223.
224. Huang LC, Jean D, Proske RJ, Reins RY, McDermott AM. Ocular surface expression and *in vitro* activity of antimicrobial peptides. *Curr Eye Res*. 2007;32(7-8):595-609.

225. Oydanich M, Epstein SP, Gadaria-Rathod N, Guers JJ, Fernandez KB, Asbell PA. *In vivo* efficacy of histatin-1 in a rabbit animal model. *Curr Eye Res.* 2018;43(10):1215-1220.
226. Torres P, Díaz J, Arce M, et al. The salivary peptide histatin-1 promotes endothelial cell adhesion, migration, and angiogenesis. *FASEB J.* 2017;31(11):4946-4958.
227. Melino S, Santone C, Di Nardo P, Sarkar B. Histatins: salivary peptides with copper(II)- and zinc(II)-binding motifs: perspectives for biomedical applications. *FEBS J.* 2014;281(3):657-672.
228. Winiarczyk M, Kaarniranta K, Winiarczyk S, Adaszek Ł, Winiarczyk D, Mackiewicz J. Tear film proteome in age-related macular degeneration. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2018;256(6):1127-1139.
229. Ghatge M, Sharma A, Maity S, Kakkar VV, Vangala RK. Danger-recognizing proteins, β -defensin-128 and histatin-3, as potential biomarkers of recurrent coronary events. *Int J Mol Med.* 2017;40(2):531-538.
230. Steele PS, Jumblatt MM, Smith NB, Pierce WM. Detection of histatin 5 in normal human Schirmer strip samples by mass spectroscopy. *Investigative ophthalmology & visual science.* 2002;43(13):98.