

**T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
GÖZ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**TREHALOZ' UN PTERJİUM DOKUSUNDAKİ
FİBROBLASTLARIN ÜZERİNE İNHİBİTÖR ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

**UZMANLIK TEZİ
DR. YASİN DURKAL**

**DANIŞMAN
DOÇ. DR. UĞUR YILMAZ**

DENİZLİ - 2023

**T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
GÖZ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**TREHALOZ' UN PTERJİUM DOKUSUNDAKİ
FİBROBLASTLARIN ÜZERİNE İNHİBİTÖR ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

**UZMANLIK TEZİ
DR. YASİN DURKAL**

**DANIŞMAN
DOÇ. DR. UĞUR YILMAZ**

Bu çalışma Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'nin 19.08.2021 tarih ve 2021TIPF016 nolu kararı ile desteklenmiştir.

DENİZLİ - 2023

TEŞEKKÜR

Asistanlık eğitimim boyunca bilgi ve tecrübesini paylaştan, tez dönemimde emeğini, desteğini esirgemeyen değerli tez danışmanım Doç. Dr. Uğur YILMAZ'a;

Uzmanlık eğitimimde bilgi ve tecrübeleriyle desteğini, hoşgörüsünü ve sabrını esirgemeyen değerli hocalarım başta Prof. Dr. Ebru Nevin ÇETİN olmak üzere Prof. Dr. Gökhan PEKEL, Prof. Dr. Avni Murat AVUNDUK, Doç. Dr. Hüseyin KAYA, Doç. Dr. İbrahim TOPRAK, Dr. Öğr. Üyesi Emine Şeker Ün, Dr. Öğr. Üyesi Osman PARÇA'ya

Birlikte çalıştığımız, uzmanlık eğitimim boyunca dostluk ve arkadaşlıklarını esirgemeyen, çalışmalarımnda desteklerini gördüğüm değerli tüm asistan arkadaşlarıma, değerli hemşire ve personellerimize, iyi ve kötü günleri hep birlikte geçirdiğimiz tüm mesai arkadaşlarıma;

Bugünlere gelmemde büyük emeği olan anne ve babama; her daim yanımda hissettiğim, tüm desteğini sunan sevgili eşim Rabia DURKAL'a ve canım kızım Asel DURKAL'a teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No:

TEŞEKKÜR	IV
İÇİNDEKİLER	V
SİMGELER VE KISALTMALAR	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ	VIII
TABLolar DİZİNİ	X
ÖZET.....	XI
SUMMARY	XII
GİRİŞ VE AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER.....	3
KONJONKTİVA ANATOMİ VE FİZYOLOJİSİ.....	3
Palpebral konjonktiva:.....	3
Bulber konjonktiva:.....	3
Fornix konjonktivasi:	4
Plika semilunaris:	4
TENON KAPSÜLÜ	4
KONJONKTİVA HİSTOLOJİSİ	5
KORNEA ANATOMİSİ VE FİZYOLOJİSİ.....	5
LİMBUS ANATOMİSİ VE FİZYOLOJİSİ	9
PTERJİUM	9
Tanım	9
Ayırıcı Tanı.....	11
Epidemiyoloji ve Etyoloji	12
Patogenez	12
Histopatoloji	18

Klinik Bulgular	20
Pterjiumda Klinik Sınıflandırma	20
Pterjium Gelişimi Sınıflandırması	23
Tedavi.....	24
TREHALOZ	28
GEREÇ VE YÖNTEM	31
BULGULAR.....	38
TARTIŞMA	54
SONUÇ.....	62
KAYNAKLAR	63

SİMGELER VE KISALTMALAR

AZT	: Amniotik Zar Transplantasyonu
B-FGF	: Temel Fibroblast büyüme faktörü
COX2	: Siklooksijenaz2
FC	: Kat değişimi
GO	: Gen Ontoloji
HLA-DR	: İnsan Lökosit Antijeni DR
HPV	: İnsan papilloma virüsü
ICAM1	: Hücreler arası adezyon molekülü 1
KEOGG	: Kyoto Gen ve Genom Ansiklopedisi
LDL	: Düşük Dansiteli Lipoprotein
MMP	: Matriks metalloproteinaz
MSMO1	: Metil Sterol Monooksijenaz 1
MTT	: Hücre Sağ kalım Deneyi
PCR	: Eş zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
TFF	: Trifoile faktör
TGFBR	: Transform Edici Büyüme Faktörü Reseptörü
TNC	: Tenascin
TUNEL	: Tdt mediated dUtp nick and labeling
UV	: Ultraviole
VCAM1	: Vasküler Hücresel adezyon molekülü 1

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No:

Şekil 1: Tip1 Pterjium.....	21
Şekil 2: Tip2 Pterjium.....	22
Şekil 3: Tip 3 Pterjium.....	22
Şekil 4: Pterjium ve konjonktiva dokularının kültür aşamalarındaki 3,6 ve 9.gün görselleri.....	38
Şekil 5: Trehalozun pterjium ve konjonktiva dokularındaki absorbands grafiği	39
Şekil 6: Trehalozun pterjium ve konjonktiva dokularındaki IC50 değerleri	40
Şekil 7: Mitomisin C verilen pterjium ve konjonktival dokudaki absorbands grafiği	42
Şekil 8: Mitomisin C için Pterjium Ve Konjonktival Dokuda IC50 değerleri	43
Şekil 9: 4-5-6-7 ve 8.örnekler arasındaki Hiyerarşik Kümeleye ait Bulgular	44
Şekil 10: 1-2-3-4-5 ve 7.örnekler arasındaki Hiyerarşik Kümeleye ait Bulgular	44
Şekil 11: 4-5-6-7 ve 8.örnekler arasındaki Korelasyon Matrisi Bulgular	45
Şekil 12: 1-2-3-4-5 ve 7.örnekler arasındaki Korelasyon Matrisi Bulguları	45
Şekil 13: 1-2-3-4-5 ve 7.örnekler arasındaki Pearson'ın Korelasyon Katsayısı Bulguları.....	46
Şekil 14: 4-5-6-7 ve 8. örnekler arasındaki Pearson'ın Korelasyon Katsayısı Bulguları.....	46
Şekil 15: örnek 1-2-3-4-5-7'nin Z skoru kullanılarak iki yönlü hiyerarşik kümeleme heatmap ile gösterimi	47
Şekil 16: örnek 4-5-6-7-8'in Z skoru kullanılarak tek yönlü hiyerarşik kümeleme heatmap ile gösterimi	48
Şekil 17: örnek 3 ve 5'in Z skoru kullanılarak iki yönlü hiyerarşik kümeleme heatmap ile gösterimi	49
Şekil 18: örnek 7 ve 8'in Z skoru kullanılarak iki yönlü hiyerarşik kümeleme heatmap ile gösterimi	49
Şekil 19: Trehaloz uygulanan pterjium dokusundaki hücrelerde ifadeleri değişen genlerin rol oynadığı hücresel süreçler	50

Şekil 20: Trehaloz uygulanan pterjium dokusundaki hücrelerde ifadeleri değişen genlerin rol oynadığı hücresel süreçler	50
Şekil 21: Trehaloz uygulanan pterjium dokusundaki hücrelerde ifadeleri değişen genlerin rol oynadığı hücresel süreçler	51
Şekil 22: Trehaloz uygulanan pterjium dokusundaki hücrelerde ifadeleri değişen genlerin rol oynadığı hücresel süreçler	51
Şekil 23: NR4A1,MSMO1,RANBP3L VE Tenastin C genlerinin Pterjium ve Trehaloz uygulanmış Pterjium dokularındaki kat değişiminin Eş-zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu(PCR) ile Doğrulama Sonuçları	53



TABLÖLAR DİZİNİ

Sayfa No:

Tablo 1: İnflamatuar mediatörler ve BF'lerinin pterjium patogenezindeki süreçte rolleri	18
Tablo 2: Örnek Grupları	34
Tablo 3: cDNA dönüştürme reaksiyonları	35
Tablo 4: Reaksiyon Bileşenleri	36
Tablo 5: Reaksiyon Koşulları.....	37
Tablo 6: Trehaloz için kadın ve erkek hastadaki doz bağımlı absorban değerler .	39
Tablo 7: Trehaloz için kadın ve erkek hasta pterjium ve konjonktiva dokularındaki IC50 düzeyi ve güven skoru(R2)	40
Tablo 8: Mitomisin C için kadın ve erkek hastadaki doz bağımlı absorban değerleri.....	41
Tablo 9: Mitomisin C için erkek ve kadın hasta pterjium ve konjonktiva dokularındaki IC50 düzeyi ve Güven skoru(R2)	42
Tablo 10: Pterjium genetiğinde rol oynayan genlerin ekspresyon değişimleri kat sayı cinsinden gösterimi.....	52

ÖZET

Trehaloz' un pterjium dokusundaki fibroblastların üzerine inhibitör etkisinin araştırılması

Dr. Yasin DURKAL

Pterjium şimdiye kadar yapılan çalışmalarla etyolojisi tam olarak aydınlatılamamış, birçok hipotez ortaya konan ancak patogenezinde fibroblast proliferasyonun olduğu dejeneratif bir oküler yüzey bozukluğudur. Tedavisi için genellikle cerrahi eksizyon tercih edilir. Biz çalışmamızda trehalozun fibroblastlar üzerindeki inhibitör etkisini invitro koşullarda incelemek istedik ve bunu hangi hücresel yollarla ve hangi genler üzerinden yaptığını analiz etmeyi amaçladık. Kliniğimize başvuran 3 erkek ve 3 kadın toplamda 6 primer pterjiumlu hastayı çalışmamıza dahil ettik. Önce bu hastaların pterjium ve normal konjontivalarını eksize edilip primer hücre kültür yapıldı. Trehaloz(100, 200, 400, 600 mM) ve mitomisin C(0,5, 1, 2,5 ,5 ,10 ve 20 µl) muamelesi gerçekleştirildi ve 48 saat boyunca 37°C'de %5 CO₂ ve %95 nemli ortamda inkübe edildi. Bu aşamada trehalozun fibroblastların proliferasyonunu inhibe ettiğini gözlemledik. Geneall marka Hybrid-R total RNA izolasyon kiti aracılığıyla ilaç muamele edilmeyen kontrol ve trehaloz, mitomisin C uygulanan pterjium ve konjonktiva hücrelerinin total RNA izolasyonu gerçekleştirildi. Sonrasında bu örneklerden ikisi mikrodizin analizine gönderildi. Pterjiumda normal konjonktivaya oranla ifadesi değişen VIM, FGF7, FGF10, TGFB2, TGB3 MSMO1, Tenascin C, RANBP3L, NR4A1, IGFBP4, CLCA2, SERPIN2, ASPN genleri olarak saptadık. Trehaloz verildiğinde bu genlerdeki değişimler dikkat çekiciydi. Bu genler genel olarak vaskülogenezis, migrasyon, yara iyileşmesi, adezyon, fibroblast proliferasyonu, fibroblast büyüme faktörünün pozitif regülasyonu gibi olaylarda görev alıyorlar ve trehaloz verildiğinde bu genlerin ifadesi pterjium oluşumunu bloke edecek yönde değişti. Ancak çalışmamızda kısıtlı hasta sayısı mevcut olduğundan daha geniş hasta gruplarına ihtiyaç mevcuttur.

Anahtar Kelimeler: pterjium, fibroblast, mikrodizin analizi, trehaloz, mitomisin C

SUMMARY

Investigation of the inhibitory effect of trehalose on fibroblasts in pterygium tissue

Dr. Yasin DURKAL

Pterygium is a degenerative ocular surface disorder, the etiology of which has not been fully elucidated by studies, many hypotheses have been put forward, but in the pathogenesis of fibroblast proliferation. Surgical excision is generally preferred for its treatment. In our study, we aimed to examine the inhibitory effect of trehalose on fibroblasts in vitro and we aimed to analyze which cellular pathways and through which genes it does this. We included a total of 6 patients with primary pterygium, 3 male and 3 female, who applied to our clinic. First, the pterygium and normal conjunctiva of these patients were excised, and primary cell culture was performed. Trehalose(100, 200, 400, 600 mM) and mitomycin C(0.5, 1, 2.5, 5, 10 and 20 µl) were treated and incubated for 48 hours at 37oC in 5% CO₂ and 95% humidity was done. At this stage, we observed that trehalose inhibited the proliferation of fibroblasts. Total RNA isolation of drug-free control and trehalose, mitomycin C-treated pterygium and conjunctival cells were performed using Geneall brand Hybrid-R total RNA isolation kit. Two of these samples were then sent for microarray analysis. We detected VIM, FGF7, FGF10, TGFBR2, TGBR3 MSMO1, Tenascin C, RANBP3L, NR4A1, IGFBP4, CLCA2, SERPIN2, ASPN genes is change in pterygium compared to normal conjunctiva. Changes in these genes were striking when trehalose was given. These genes are generally involved in events such as vasculogenesis, migration, wound healing, adhesion, fibroblast proliferation, positive regulation of fibroblast growth factor, and when trehalose was given, the expression of these genes changed to block the formation of pterygium. However, since the number of patients was limited in our study, larger patient groups are needed.

Key Words: pterygium, fibroblast, microarray analysis, trehalose, mitomycin C

GİRİŞ VE AMAÇ

Pterjium Latince’de kanat anlamı taşıyan, limbal konjonktiva dokusundan köken alarak kornea üzerine üçgen şeklinde kontrolsüz bir biçimde büyümesi ile karakterize yaygın bir göz hastalığıdır. Nazal limbusta temporal limbusa kıyasla daha sık izlenmektedir. (1) Astigmatizmaya neden olması ve ileri vakalarda görsel aksı kapatması nedeniyle görmeyi ciddi bir şekilde etkileyebilir. Pterjium etyolojisi tam olarak bilinmemekle birlikte ultraviole(UV) maruziyeti ile yüksek oranda ilişkili görünmektedir. Ekvatora yakın bölgelerde yaşayanlarda ve UV maruziyeti olanlarda(dış ortamda çalışanlarda) artan bir insidans kaydedilmiştir.(2-3)

Pterjium dokusunun büyümesini patogenezi için var olan çok sayıda teori, etiolojinin belirsizliğinin altını çizmektedir. Sıcak ve kuru iklimlerde ve ekvatora yakın bölgelerde artan prevalans, UV radyasyonu ve kuruluk gibi çevresel faktörlerin rolü olduğunu düşündürmektedir.(1-3) Derideki aktinik keratozlara benzer histopatolojide görülen aktinik değişiklikler de UV radyasyonunun rolünü desteklemektedir. Radyasyonla aktive olan fibroblastların, pterygium ile sonuçlanan aşırı materyal üretimi ile sonuçlanabileceği öne sürülmüştür. Önerilen diğer teoriler arasında kolin eksikliği, inflamasyon, anjiyogenezde disregülasyon, immün sistemi anormallikleri, gözyaşı filmi anormallikleri ve viral bir uyarıcının olası rolü yer alır.(1-3)

Pterjium tedavisinde nüksü engellemek , yanma ve batma gibi kronik irritan yakınmaları gidermek, görme keskinliğini stabil hale getirmek veya düzeltmek başarılı bir tedavinin hedefleridir. Bunun için çeşitli cerrahi yöntemler ve yardımcı tedaviler mevcuttur. , Limbal konjonktival otograft, .çiplak sklera, Mitomisin C uygulamaları konjonktival greft veya flep, amniyotik membran transplantasyonu gibi birçok tedavi kullanılmaktadır. Güncel tedavinin bu kadar çeşitli olması esas olarak pterjium nüksünü azaltmak içindir. Uzun yıllardır tedavide çok sayıdaki çalışmada oldukça farklı ve bazen birbirleriyle çelişen sonuçlar ortaya konmuştur. Bu farklılık ve çelişkileri, pterjium nüksünde çok sayıda faktörün rol oynamasından kaynaklanmaktadır.

Biz alışmamızda trehalozun pterjium ve normal konjonktival dokusundaki fibroblastlar üzerine olan etkisini incelemeyi amaçladık. Bu doğrultuda yaptığımız bu çalışma ile hem pterjiumda hem de trehaloz verilen pterjium dokularında gen düzeyinde ifadesi değişen gen profillerini ortaya koymayı hem de trehalozun tedavide potansiyel bir ajan olarak kullanımını değerlendirmeyi amaçladık.



GENEL BİLGİLER

KONJONKTİVA ANATOMİ VE FİZYOLOJİSİ

Konjonktiva göz kapaklarının iç kısmını ve göz küresini kornea hariç örten mukozal bir dokudur. Gözün serbestçe hareket etmesi için elastik bir yapıya sahiptir. Nervus Trigemius maksiler ve oftalmik dalları ile innerve edilir. Ayrıca lenfatik drenajı da mevcuttur.

Göz kapaklarının marjinal arter arkı tars konjonktivasını, periferik arter arkı ise fornix vebulber konjonktivayı limbusta 4 mm mesafeye kadar besler. Limbusta 7 tane ön siliyer arter korneaya ilerleyerek yüzeysel (konjonktival) ve derin (episkleral) perilimbal plexusu meydana getirir. Ön ve arka konjonktival damarlar arasında anastomoz mevcuttur. Konjonktivanın venleri ise posttarsal plexusla v. Oftalmikaya, az bir kısmı da ekstraoküler kaslarının venlerine dökülürler. Konjonktiva; palpebral, bulber, fornix konjonktivası ve plica semilunaris olmak üzere dört bölümde incelenebilir.(1-3)

Palpebral konjonktiva: Marjinal, tarsal ve orbital kısımlardan meydana gelir.

Marjinal: Göz kapaklarının iç tarafını örter. Kapak serbest kenarında meibomian bezlerinin ağızlarının arkasından başlar, tars konjonktivası ile devam eder. Çok katlı keratinsiz bir epitel yapısı vardır.

Tarsal: Altındaki tarsi çok sıkı yapışıklık gösterir. Epiteli silindirikdir. Burada meibomian bezleri rahatça görülebilir. Tarsal konjonktivada çok sayıda damar vardır.

Orbital: Alt kısmında kapağın müller ve levator palpebra kasları mevcuttur. Silindirik yapı burada da mevcuttur. Yüzeyinde papiller yapılar izlenir.

Bulber konjonktiva: Skleral ve limbal parçalardan oluşur.

Skleral: Göz küresinin sklerasını kaplar. Çok incedir ve bu şekilde skleradaki damarlar rahatlıkla izlenebilir. Hemen altındaki Tenon kapsülü ile yapışıklığı olmadığı için cerrahi girişimlerde kolaylıkla diseke edilir.

Limbak: Bu bölgede altındaki Tenon kapsülüne sıkıca yapışmış olarak izlenir. Limbusta kornea ve konjonktiva epitelleri birbirleriyle devam ederler; aralarındaki sınır düzenli değildir.

Fornix konjonktivası: Glob ile göz kapakları arasındadır. Göz hareketlerinin serbestçe yapılmasına olanak tanı. Fornix; 4 parçadan oluşur;alt, üst, iç ve dış. İç fornix, plica semilunaris ve karunkül ile devam eder. Alt fornix alt rektus kılıflarıyla ilişkilidir ve yukarı bakışta üst fornix, aşağı bakışta alt fornix göz küresiyle birlikte hareket eder. Üst fornix, levator palpebra kılıfları ve üst rektus ile devamlılık gösterir. Konjonktiva ile ilgili lenfatik sistem oküler yüzeydeki immün cevabı regüle eder. Fornikslerde yoğun lenfoid doku mevcuttur.

Plika semilunaris: Üst ve alt kapakların medialde birleştiği bölgede karunkül olarak adlandırılan modifiye bir cilt dokusu mevcuttur. Keratinize olmayan çok katlı yassı epitelle örtülüdür.Yardımcı gözyaşı bezleri ve sebum ile kıl folikülleri de mevcuttur. Karunkülün lateralinde yukarıdan aşağıya doğru vertikal konumlanan konjonktiva katlantısı plica semilunaris olarak isimlendirilmektedir. . Daha alt filogenetik hayvanlarda bulunan 3. göz kapağının eş değeridir. Plica semilunaris gözün lateral rotasyonuna yardımcı olur.(1)

TENON KAPSÜLÜ

Tenon kapsülü, sklera ve konjonktiva arasında olan, sıkı dizilmiş kollajen liflerinden ve fibroblastlardan oluşan, göz küresini kaplayan ince bir zar tabakasıdır. Korneaskleral bileşkenin hemen arkasında konjonktiva ile kaynaşır. Arkada optik sinir kılıfı, arka siliyer damarlar ve sinirler tarafından delinir ve bu bölgede daha incedir. Rektus kaslarını saran intermüsküler membranlar ve tenon kapsülü birleşerek fibröz bir askı ve destek meydana getirirler. Rektus kaslarının göz hareketleri sırasında orbitadaki pozisyonunun sabitlenmesinde rolü vardır. Vorteks venleri Tenon kapsülünden glob ekvatoru bölgesinin komşuluğunda geçer.(2)

KONJONKTİVA HİSTOLOJİSİ

Konjonktiva histolojik olarak stroma ve epitelden oluşur.

Epitel

Konjonktiva epiteli çok katlı silindirik bir epitel tabakasıdır. Limbusta, karunkülde ve mukokutanöz birleşim yeri yakınında çok katlı yassı epitele dönüşür. Karunkül ve plica semilunaris bölgesinde epitelde müsin üreten Goblet hücreleri vardır. Bu goblet hücreleri müsin salgılar ve sonra atrofiye giderler.

Stroma: Zengin damar ağı , yardımcı gözyaşı bezlerini (Krause ve Wolfring) ve sinirler içeren bir bağ dokudan oluşmuştur. Adenoid yüzeyel tabaka lenfoid tabakadan zengindir. Çok sayıda lenfosit içerirken ince retiküler bir tabaka şeklindedir. Daha derinde ise fibröz kat bağ dokudan meydana gelir ve yardımcı gözyaşı bezleri burada izlenebilir. Aksesuar lakrimal bezler olan Krause bezleri alt ve üst fornikte Wolfring bezleri ise üst kapak tarsında mevcuttur. Aksesuar lakrimal bezlerin salgıları ve goblet hücrelerinden salgılanan müsin göz yaşı film tabakasının temel maddeleridir.(1-3)

KORNEA ANATOMİSİ VE FİZYOLOJİSİ

Normal kornea avasküler ve saydam dokudur. Skleranın devamı özelliğinde olup, yarıçapı skleranın yarı çapından küçüktür ve öne doğru bombeleşir. Ayrıca göz optik sisteminin en önemli parçasıdır. Gözün toplam optik gücünün $\frac{3}{4}$ 'ünü oluşturur. Ortalama kornea çapı horizontal ekseninde 12 mm, vertikal ekseninde 11.5 mm'dir. Santral kornea kalınlığı ortalama 0,540 mm'dir. Bu kalınlık periferik gittikçe artar. Korneanın beslenmesi ön tarafta gözyaşı filmi ve limbal damarlar ile sağlanırken, arka tarafta aköz humörün difüzyonu ile sağlanır. Kornea vücuttaki dokular içinde en yoğun sinirsel innervasyona sahip dokudur.. Sinirleri ise duyu siniri olup n. trigeminus'un oftalmik dalından ve uzun siliyer sinirler ile gelen 7 miyelinsiz liflerdir ve ön stromada Bowman zarı altında sonlanırlar. Korneada ağrı ve soğuk reseptörleri, ısı ve dokunma duyusu reseptörlerine göre daha fazladır. Dolayısıyla kornea ağrıya çok duyarlıdır. Korneada lenfatik sistem bulunmamaktadır. (2-3)

Kornea ön yüzeyini kaplayan gözyaşı tabakası, lipid, aköz ve musinden meydana gelir. Göz yaşı bünyesinde biyolojik aktif maddeler, elektrolitler, lizozim, immunoglobulin, glukoz gibi hücrelerin yaşamını ve bütünlüğünü oluşturan maddeler de bulunmaktadır. Göz yaşı tabakasının en önemli görevi korneayı korumaktır. Korneanın nemli kalmasında, beslenmesinde ve epitel bütünlüğünün devamlılığında göz yaşı tabakasının rolü fazladır. Ayrıca göz yaşı tabakası mikroorganizmalara karşı da korneayı savunur.

Kornea histolojik olarak önden arkaya doğru beş katmandan oluşur. Bu katmanlar dıştan içe epitel, bowman, stroma, descemet membranı ve endoteldir.

Epitel:

Epitel çok katlı yassı ve non-keratinize epitelten meydana gelir ve konjonktiva epitelinin devamı niteliği taşır. Yaklaşık kornea tabakasının %10'udur. Yapıları yönünden bazal kat, arakat (kanat hücreleri) ve yüzeyel kat hücreleri olmak üzere üç kattan oluşur. Bazal kat hücrelerinin hemen altında bazal membran vardır. Bazal membran konjonktiva epitelinin bazal membranının devamı özelliğindedir. Hasar gören bazal membran 6 hafta içerisinde yenilenir. Bazal kat hücrelerinin kökeni ise limbus epitelidir. Periferde oluşan hücreler mitozla çoğalarak merkeze, sonra da yüzeye taşınarak kornea epitelinin diğer katlarını meydana getirirler. Bazal hücreler tek katlı silindirik hücrelerden oluşur. Epitelin ½'sini meydana getirirler. Bazal zara hemidesmozomlarla, etrafındaki hücrelere de desmozomlar ile bağlanmışlardır. Ara kat (kanat) hücreler; 2 – 3 sıra şeklinde sıralanmış polihedral hücrelerdir. Ön yüzleri konveks, alt yüzleri bazal kat hücrelerinin biçimini aldığı için konkavdır. Oval nukleusları yüzeye paralel olarak dizilmiştir. Bu hücreler de desmozom ve makula okludenslerle birbirleriyle bağlantı kurarlar. Yüzeysel kat hücreler; 2 sıra şeklinde olup, yassıdırlar. Horizontal nukleusları mevcuttur ve zonula okludenslerle birbirine bağlıdırlar. En dıştaki hücrelerin yüzeyi mikrovillus ve mikropililerle genişlemiştir ve musin absorpsiyonunu sağlayarak korneanın nemlenmesine yardımcı olurlar. Bu hücrelerin yaşam döngüsü birkaç gündür.(1-3)

Kornea epiteli sürekli kendini rejenere eden bir yapıya sahiptir. Hücre yenilenmesi, limbustaki kök hücreler ve bazal epitel hücreleri aracılığı ile

oluşmaktadır. Sağlıklı bir kornea yüzeyi için olmazsa olmaz olan epitelyal kök hücreler, özellikle üst ve alt limbusta, büyük olasılıkla Vogt palisadlarının içindedirler. Bunlar aynı zamanda konjonktival dokunun korneaya doğru ilerlemesine de engel olup bariyer görevi görürler. Limbal kök hücrelerinin yetersizliği ve fonksiyon görememesi; kornea epitel patolojilerine , konjonktiva epitelinin kornea üzerinde ilerleyerek aşırı büyümesine (konjonktivalizasyon) ve vaskülarizasyona sebep olmaktadır. Kornea epitelindeki kök hücreler unipotent yapıya sahiptir. Kök hücrelerinin asimetrik bölünmesi ile meydana gelen iki hücreden biri kök hücre olarak devam eder, diğeri bazal korneal epitel olarak farklılaşır. Kornea epitelinin bütünüyle iyileşmesi yaklaşık bir haftadır.

Bowman membranı

Epitel ile stroma arasında bulunan, hücresel içeriği ve çoğalma yeteneği olmayan ve korneanın şeklini koruyan bir tabakadır. Epitelin bazal membranı bowman membranına düzensiz filamanlar ile sıkıca bağlanır. Elektron mikroskobu ile incelendiğinde, kısa kollajen liflerden oluştuğu izlenir. Bir travma sonrası bu bağlantının yeniden gelişmesi 6 hafta kadar sürebilir. Bu kat kendini onarma kapasitesine sahip değildir ve sonrasında skar dokusu gelişir. Epiteldeki olayların stromaya geçişini durduran önemli bir membrandır(1-3)

Stroma:

Korneanın bowman ve descemet membranı arasında izlenen tabakadır. Kornea kalınlığının %90'ını meydana getirir. İçeriğinde tip 1 kollajen predominanttır, keratan sülfat ve kondroitin sülfat stromanın glikozaminoglikanlarından başlıcalarıdır. Limbustan limbusa doğru yerleşmiş ve birbirine dik açılan yaklaşık 300 adet tip I kollajen lameli içermektedir. Lameller birbirlerini çaprazlayan ağ şeklinde olup, muntazam bir şekilde kesişerek kafes yapısı meydana getirirler. Glikozaminoglikanlar da kollajen lamellerinin düzgün bir tabaka oluşturmasını sağlayarak kornea saydamlığını oluştururlar. Stromanın ayrıca korneanın yaklaşık %78 su içeriğini sağlamaktadır. Göz tansiyonunun çok yüksek olduğu veya endotel patolojisi olan vakalarda stromada su miktarının artması kornea saydamlığının bozulması ile sonuçlanır. Stromada kollajen lifler ve mukoproteinler ile birlikte keratositler de yer

alır. Keratositlerin sayısı azdır. İleri derecede yassı ve kollajen lifleri arasında sıkışık olarak yer alırlar. Görevleri kollajen ve mukoproteini sentez etmektir. Stroma herhangi bir hasar durumunda rejenerasyon yeteneği bulunmamaktadır. Stromal hasar durumunda ise yara bölgesine keratositler göç ederler, fibrositlere dönüşürler, proliferer olup kollajen sentezleyerek skar dokusu oluşumuna yardımcı olurlar. Sitoplazmalarında bulunan glikojen granülleri, damarsız korneanın enerji ihtiyacını karşılar. Ayrıca stromada birkaç lökosit ve makrofaja da rastlanabilir (1-3)

Descemet membranı

Kornea endotelinin bazal membranı olma özelliği taşır. Stroma ile endotel arasındadır ve rejenerasyon yeteneği olan bir tabakadır. Limbusa kadar uzanır ve iridokorneal açıya 2 mm mesafede son bulup Schwalbe çizgisini meydana getirir. Descemet membranı önde ve arkada iki parçadan oluşur. Öndeki stromaya komşu olan kısım intrauterin dönemde kollajen lifler ve glikoproteinden meydana gelir. Arkadaki endotele komşu olan kısım da doğumdan sonraki dönemde endotel tarafından sentezlenir ve yaşlandıkça kalınlaşır. Descemet membranında limbusa komşu periferik birikimler Hassall Henle cisimcikleri olarak isimlendirilir ve 20 yaş üzerindeki kişilerde gözlenir. Descemet membranı elastik olan arka kısmı hasar sonrası endotel tarafından tekrar sentezlenir.(1-3)

Endotel

Santralde geniş ve oval nükleusları olan tek sıra altıgen (hekzagonal) hücrelerden mozaik paternde bir tabakadır. Yaşamın ilk yılında hücreler kübik ve yüksektirler. Sayıları 1 milyon (4000/mm²) civarındadır. Yaşlı bireylerde ise hücreler yassılaştı ve sayıca çok azalmışlardır (2500/mm²). Rejenerasyon yetenekleri mevcut değildir. Endotel hücrelerinin pompa fonksiyonu sayesinde fazla sıvıyı stroma dışına pompalanarak, korneanın saydamlığını sağlar. Endotel hücreleri arasındaki kuvvetli bağlar, ön kamara sıvısının kornea tabakaları içine girmesini durdurur. Travmalarda hasar gördüklerinde mitozla çoğalamadıklarından, açıkta kalan Descemet membranı yüzeyi, komşu endotel hücrelerinin uzaması ve genişlemesiyle doldurulur. Endotelin pompa görevi 14 gün sonra tekrar aktive olur. Herhangi bir

sebepten dolayı endotel hücrelerinin sayısının azalması (500- 600 hc/mm² den az) kornea tabakalarında su miktarının artması ve kornea ödemi ile sonuçlanır (1-3)

LİMBUS ANATOMİSİ VE FİZYOLOJİSİ

Limbus kornea, konjonktiva ve sklera arasında yaklaşık 1-2mm'lik genişlikte bir geçiş zonudur. Limbusta kornea epitelinin düzenli yapısı değişir ve konjonktiva epiteline dönüşmeye başlar. Kornea epiteli, konjonktivaya doğru Vogt palisadları olarak adlandırılan çıkıntılar yapar. Goblet hücreleri ve lenfatik kanallar burada izlenir. Stromal kollajenin düzenli yapısı değişerek hem kornea hem de sklera kollajeninin özellikleri bir arada gözlenir ve şeffaflığını kaybederek skleraya benzer hale dönüşür. Korneada olmayan kan damarları, sinirler ve mast hücreleri skleranın diğer bölgelerine oranla daha sık olarak gözlenir. Bowman membranı yerini düzenli kollajen lifler ve amorf bir maddeye bırakırken, Descemet membranı membranöz niteliğini kaybederek dar bantlara ayrılır ve trabekulum katlarını çevreler. Endotel ise düzenliliğini kaybeder ve trabeküler ağ endotel örtüsüne benzer şekilde değişim gösterir. Bu bölgede sklera üzerinde de ince bir episkleral fibröz doku izlenir.

Limbusun ön sınırı, Bowman membranı bitiş bölgesi ile Descemet membranı sonlanma noktası arasında çizilen bir çizgidir. Arka sınır daha az belirgindir ve sklera mahmuzundan dik ve ön çizgiye paralel olarak çizilen bir hattır. Limbusta olan iki önemli anatomik yapı trabeküler ağ ve Schlemm kanalıdır. Bu iki yapı ön kamaradaki hümmör aközün dışı akım mekanizmasını oluşturur.

Limbal epitelin proliferasyon kabiliyeti periferik ve santral kornea epitelinden fazladır. Limbustaki kök hücreler, kornea epiteli rejenerasyonu açısından çok değerlidir. Alkali yanıklar gibi şiddetli limbal hasara neden olan durumlarda, kornea iyileşmesi ileri derecede bozulur.(3-4)

PTERJİUM

Tanım

Pterjium Milattan önce 4. yüzyılın başlarında Hippocrates ve Milattan sonra 130–200 yılları arasında Galen tarafından bahsedilmiştir. (5). Pterjium üst ve alt kapak arasında, horizontal meridyende ve daha sık olarak nazalde konumlanır. Nadir olarak

hem temporal hemde nazal tarafta aynı anda yer alabilir (5). Vakaların ortalama üçte birinde her iki gözde pterjium saptanabilir. (6).

Pterjium karakteristik olarak üçgen şeklindedir. Baş, boyun ve gövde olmak üzere 3 parçadan oluşmuştur. Baş olarak adlandırılan kısmı en önde yay şeklinde gri-beyaz subepitelyal kornea opasitesidir. Pterjiumun başı bulbusa kuvvetlice yapışmış beyaz, yüzeyden kabarık bir dokudur. Pterjiumun gövdesi yukarıdaki ve aşağıdaki konjonktivadan net hatlarla ayrılmış fibrovasküler bir dokudur (7). İlk olarak pterjium üst ve alt kapak arasında limbusa komşu bulbar konjonktivadan hacimli bir doku olarak ortaya çıkar. Pterjium dokusu ve bitişik konjonktiva üzerinde izlenen radyal vasküler yapılar hızlı bir şekilde gelişen pterjium dokusunun ortaya çıkacağını gösterir. Pterjium dokusu limbusa doğru büyüdükçe konjonktiva dokusu üzerinde zamanla artan bir gerginlik olur. Korneaya doğru ilerleyip büyüyen pterjium ile birlikte yanma, irritasyon, yabancı cisim hissi, sulanma gibi semptomlar ortaya çıkar (6). Fibrovasküler yapının hacim olarak büyük olduğu vakalarda pterjium çok kalın ve hiperemiktir. Bu olgulara pterjium vaskulosum denir. Pterjiyumların bir kısmı korneaya ilerlemezken ,bazıları ilerler. İlerleyen pterjium dokusu tipik olarak belirgin vasküler bir yapı gösterir (6). İleri olgularda pterjiyum dokusu kornea santraline ilerleyip görme aksında saydamlığı bozarak veya korneada düzensiz bir astigmatizmaya neden olarak görmede azalma meydana getirebilir. Bir başka teoriye göre düzensiz astigmatizmaya neden olan şey, pterjiumun baş kısmı önünde biriken gözyaşı olduğudur (8). Pterjiumun baş kısmı görme aksına ilerledikçe ışık hassasiyeti ve kontrast duyarlılığında azalma meydana gelir.(7). İlerleye olgularda semblefaron oluşumu, oküler hareketlerde kısıtlanma ve diplopi izlenebilir. Bazen pterjiumun gelişme sürecinde büyümesi durabilir. Bu durumda lezyonun yükseltisinde ve vasküler yapısında azalma, soluklaşma izlenir. Canlılığını kaybeden pterjium hastanın tüm hayatı süresince bu şekilde kalabileceği gibi tekrar aktive olabilir. Yaşlı ve durağan pterjiumların baş kısımlarının hemen önünde, gözyaşının birikmesi sonucu yüzeysel korneada biriken depozitler, yay biçiminde tipik demir çizgisi (Stacker's line) oluştururlar(6). Pterjium, eksizyonundan sonra sıklıkla tekrarlamasına rağmen malign dönüşüme uğramaz (9). Cerrahiye kozmetik veya semptomatik endikasyonlarla karar verilir. Pterjiyum nüksü cerrahi yapıldıktan sonraki 1 yıl içinde olmakla birlikte daha sık olarak 6–8 hafta içinde izlenmektedir. (10).

Ayırıcı Tanı

Pterjium klinikte pinguekula ve pseudo-pterjium karışabilir. Pinguekula üst ve alt kapak arasında yer alan küçük, limbusta sınırlı, bazen inflamasyon izlenen sarımsı renkte bir lezyon şeklindedir. Cerrahi olarak alınmasına nadiren ihtiyaç duyulur, ancak eksizyon durumunda tekrar nüks izlenmez (6). Her ikisinin de prevalansı ve görünüş, sıklığı yaşla birlikte artmış olarak saptanmıştır. Pinguekula erkek ve kadınlarda eşit sıklıkta görülür. Pinguekulanın etyolojisinde de pterjiumda olduğu gibi ultraviyole ışığı önde gelen sebeplerden gözükmektedir ve tropikal bölgelerde sık görülmektedir. Pterjium pinguekuladan meydana gelebileceği düşünülmektedir. Her iki lezyonun da histopatolojik yapıları benzer özellikler taşımaktadır.

Pseudo-pterjiyum bulbar konjonktivadan ilerleyip kornea üzerine uzanan fibrovasküler bir lezyon olduğunda ilk bakıda pterjiyuma benzer (6). Pterjiyumun aksine pseudo-pterjiyum perifer kornea ülseri, travma, kimyasal yanık, skatrisyel konjonktivit veya cerrahi gibi önceki bir lezyon veya dejenerasyondan sonra meydana gelen , konjonktivada ve korneadaki bir inflamasyona cevap olarak ortaya çıkar. Pseudo-pterjiyum sıklıkla atipik lokalizasyonda izlenir. Pterjiyum gibi kapak aralığında izlenmeyebilir ve her noktada yapışık değildir, sadece başı ile boynu altındaki dokulara yapışık olduğundan gövdesi altından sonda geçirilebilir. Pterjiyum ise tamamen kornea ve konjonktivaya yapışıktır (11,12). Herhangi bir korneal inflamatuvar hastalık pterjiyum gibi fibrovasküler proliferasyona yol açabilir.

Ultraviyole ışınlarına maruziyet ile pterjiyum arasında anlamlı bir ilişki izlenirken, pinguekulada ultraviyolenin etkisi daha zayıftır (13). Pseudo-pterjiyumun tanısında bazı noktalar önemlidir. Bunlar; Kapak aralığı dışındaki herhangi bir bölgede olması, çok sayıda lokalizasyon ve yaygın kornea tutulumu, oküler inflamatuvar bir hikâyenin bulunması, tipik pterjiyumdan farklı olarak gövde, boyun ve baş gibi yapılara sahip olmaması, pterjiyumun baş kısmının altındaki kornea dokusunun incelenmesi. Pseudo-pterjiyumun etiyolojisine bağlı olarak cerrahiye ihtiyaç duyulmayabilir.

Pterjiyumun ayırıcı tanısında edinilmiş limbal kitleler, papillom, skuamöz hücreli konjonktival karsinom, konjonktival melanom ve sebace karsinom da dahil

edilebilir. Pterjiuma klinik olarak benzeyen diğer nadir lezyonlar arasında, epitelyal kist, pyojenik granülom, keratoakantom, adenom, fibrom, fibrokondrom, fibröz histiositom, anjiom, lenfanjiom, kaposi sarkomu, alveolar epiteliom, neurolemmom, malign schwannom, mycosis fungoides, juvenile ksanthogranulom, leukemia, episkleral osseos koristom, ektojik lakrimal doku, lipom, amiloid, mavi nevus, nevus ve limbal dermoid sayılabilir. Bu bahsi geçen lezyonlar pterjiumla kolay kolay karıştırılmazlar.(6)

Epidemiyoloji ve Etyoloji

Pterjium dünyanın her yerinde görülmektedir. Bütün dünyadaki sıklığı toplumdan topluma %7 -%31 arasında değişmekle birlikte kuru ve sıcak iklimlerde daha fazla görülmektedir. (7). Prevalansı ekvator da yaşayanlarda %22 kadar yüksek ve 40 derecedeki enlemin üstündeki bölgelerde %2 den daha azdır (6). Bazı meslek çeşitlerinde pterjium görülme sıklığının daha fazla olduğu saptanmıştır. Açık mekanda çalışılan çiftçilik, balıkçılık, inşaat işçiliği, gemicilik, kaynakçılık bu meslek grupları içerisinde (6). 10 Gözyaşı film tabakası patolojilerine bağlı üst ve alt kapak arasındaki kornea ve konjonktivadaki bölgesel kuruluğun yeni fibroblastik doku büyümesine yol açabileceği teorisi ve pterjiumun rüzgarlı ve kuru iklimlerdeki artmış sıklığı bu hipotezi desteklemektedir (6). 15 yaşından küçük olanlarda pterjium nadiren izlenmektedir. Artan yaşla birlikte pterjiumun izlenme sıklığı artmaktadır. En sık 20–49 yaş aralığında izlenmektedir. Ayrıca 60–70 yaşından daha büyük hastalarda pterjium sıklığında azalma saptanmıştır. Nüks gençlerde daha sık izlenmektedir (10).

Patogenezi

Pterjiumun oluşumu ile ilgili birçok teori ileri sürülmüştür. Lokal gözyaşı film patolojileri, kronik oküler irritasyon, pterjium damar gelişimi faktörünün üretimi ile birlikte var olan kronik inflamasyon, tip 1 aşırı duyarlılığın neden olduğu immünolojik süreçler, herediter faktörler ve güneş ışınları ile hasara uğramış fibroblastların elastik doku ile yer değiştirmesi gibi nedenler gösterilebilir.

Pterjiumun patogenezi için ortaya atılan bu teoriler kesin olarak konsensusa varılmış bir durumda değildir (7). Ne ultraviyole ışığına maruziyet, ne de irritasyon

pterygiumun neden nazal bulbar konjonktivada yerleştiğini açıklamamaktadır. Bu durumu aydınlatmak için birkaç teori ileri sürülmüştür. Bunlar:

1. Gözün temporal bölgesi hali hazırda üst göz kapağı kurvatürü ve uzun kirpikler nedeniyle gölgelenmektedir.
2. Yüksek ışıktaki normal orbikularis kontraksiyonu, temporal bulbar konjonktivada daha fazla bariyer görevi görür.
3. Göze posterolateral alandan gelen ışık temporal periferik kornea tarafından nazal limbusa odaklanır ve bu da nazal limbal kök hücre disfonksiyonuna neden olur (7).

Pterygium patogeneğinde ilk olarak anormal limbal kök hücrelerinin rol oynadığı hipotezinin desteklenmesinde, normal kornea epitelyal bazal membranı boyunca pterygiumun ilerleyen kısmında değişikliğe uğramış limbal epitelyal kök hücrelerinin immunohistokimyasal tekniklerle saptanması yer alır (14). Normal limbal kök hücre topluluğunun korneanın konjonktivalizasyonunu engellemede bariyer görevi gördüğü düşünülmektedir. Saptanan bu kanıtların sonucu olarak pterygium, fonksiyonu değişmiş ve anormal, limbal kök hücrelerinden kaynaklanır.

Sürekli ve uzamış ultraviyole ışığa maruz kalma pterygium patogeneğinde yaygın olarak kabul edilmiş etiyolojik faktördür. Bu tez epidemiyolojik verilerle, ışın uygulanan modellerle ve ultraviyole ile hasara uğramış cildin histopatolojik özellikleri ile de gösterilmiştir. Ancak pterygiumun mekanizmasının açıklanmasında bazı aydınlatılmamış noktalar mevcuttur. Son verilerle genetik mekanizmalar anti-apoptotik mekanizmalar, sitokinler, büyüme faktörleri, ekstrasellüler matriks metalloproteinleri, immünolojik süreçler ve viral enfeksiyonlar patogeneşte gösterilen etkenlerdendir. (15).

İnsan gözü sürekli olarak UV-A (320–100 nm), UV-B (295–320 nm), görülebilir ışık olan 400–700 nm dalga boyundaki güneş ışınına ve yapay ışınlarla maruz kalmaktadır. Genç ve yetişkin gözleri yüksek şiddetteki ortam ışınlarının zararlı etkilerinden antioksidan sistemlerinden dolayı etkin bir şekilde korunurlar. Ayrıca koruyucu pigmentler çevreden yansıyan radyoaktif ışınları absorbe eder ve onların

enerjilerini dağıtarak zarar vermelerini önlerler. Orta yaşlarda antioksidan enzimlerin üretiminde düşüş olur ve koruyucu pigmentler biyokimyasal olarak değışirler (16).

Yapılan güncel çalışmalarda, insan konjonktivalarındaki goblet hücreleri ve nazolakrimal kanaldaki kolumnar epitelyal hücreler Trifoile faktör (TFF peptidi) üretmektedirler. TFF peptidi musin ile birlikte mukoz jelin komponentlerinden birini meydana getirmektedir. TFF1, TFF2, TFF3 olmak üzere üç tipi saptanmıştır ve bunların görevleri hücre dağılımını stimüle etmek, anti-apoptotik özellik ve in vitro epitelyal hücre göçünü ilerletmektir. TFF peptidlerinin üretilmesindeki patolojiler kronik inflamatuvar korneal ve limbal hastalıklara neden olabileceğine ilişkin iddialar mevcuttur (17).

Bazı araştırmacılar pterjiumda ve pterjium hücre kültürlerinde kollajenaz-1'i matriks metaloproteinaz (MMP)-1 vurgulamaktadır. Bu proteaz UV ışınlarına maruz kalındıktan sonra değışikliğe uğramış olarak saptanmıştır. İmmünohistokimyasal çalışmalar p63 pozitif boyanan epitelyal hücrelerle uyumlu olacak şekilde pterjiumda MMP-1 aktivitesini saptamıştır. Normal konjonktiva, kornea ve limbusta MMP-1 aktivitesi oldukça azdır. Pterjiyumda epitel hücrelerinde UVB ışınlarına maruz kaldıklarında doz ve zamanla ilişkili olarak MMP-1 aktivitesinde artış izlenmektedir (18).

Normal konjonktival dokularla pterjium örnekleri arasında epitelyal kök hücrelerinin kanıtı olarak p63 geni birçok araştırmacı tarafından karşılaştırılmıştır. Pterjium ve normal konjonktivada p63 pozitif boyanan hücreler karşılaştırıldığında boyanma miktarı açısından anlamlı bir fark saptanmamıştır. Son çalışmalarla birlikte araştırmacılar, pterjiumun hücrelerdeki proliferatif kapasitenin artımından daha çok hücrel apoptozisin kontrolündeki yetersizlikten kaynaklandığını düşünmektedirler (19).

UV ışınına maruz kalan kornea epiteli apoptozise gider ve oküler yüzeyden uzaklaşır. Yüksek ihtimalle pterjium epiteli ultraviyole ışının uyardığı apoptozise karşı dirençlidir. TUNEL (Tdt-mediated dUTP nick end-labeling) boyama tekniğinde apoptozisin normal konjonktivada tam kat saptanmasına rağmen pterjium bazal

epitelinde sınırlı kaldığı saptanmıştır. Pterjium epitelinde anti-apoptotik protein bcl-2 olduğu halde konjonktivada bu protein saptanmamıştır (20).

Tümör supresör geni p53, hücre siklusunda DNA hasarının ve genomik zayıflığın oluşmasını önlemede etkindir Nükleer boyama yöntemleri ile p53 geninin pterjium bazal membranında bulunduğu saptanmıştır(21). Pterjium ilk evrelerinde p53 geni açısından pozitifdir. Sonraki nükslerde ise izlenmemektedir. UV ışınları p53 geni gibi tümör supresör genlerinde mutasyona neden olmaktadır. Bu genin inaktivasyonu hücre proliferasyonuna ve genomik olarak dayanıksızlığa neden olmaktadır. Pterjiyumlu hastalarda p53 geninin büyük oranda delesyona uğradığı saptanmıştır. Shimmura ve arkadaşları ile Onur ve arkadaşları kontrol grubuna oranla pterjiyumdan elde edilen hücrelerdeki p53 geninin mutasyonunu saptamışlardır. Delesyon sıklıkla tümörlerde görülmesine rağmen, p53 genindeki delesyon veya zayıflama pterjiyum etiyojisinde rol almaktadır (22).

Telomeraz ribonukleoproteinlerin replikasyonunda, telomerin önlenmesinde ve hücre replikasyonunun kısaltılmasında görev alır. Embriyonik hücreler ve erişkin kök hücrelerinde aktif olan bu enzim, normal somatik hücrelerde bulunmamaktadır. Fakat, immortal kanser hücrelerinde yeniden aktive olmaktadır Telomerazlar; germ hücreleri, embriyonik kök hücreler, tek hücreli ökaryotlar ve kanser hücrelerinde bulunmaktadır. Pterjiumda da telomeraz enzim mevcudiyetini gösteren birçok çalışma vardır. Telomeraz aktivitesi UV ışığına maruz kalma ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir (23).

Pterjiumda inflamatuvar öncüsü sitokinler, anjiogenik ve fibrojenik büyüme faktörleri ve onların reseptörlerinde artış saptanmıştır. Bu sitokinler kornea yara iyileşmesinde görev almaktadırlar. Bu proteinlerin bir çoğu pterjiyumun meydana gelmesinde ultraviyole ışınların rolünü destekler şekilde UV etkisi ile yapısal değişikliğe uğramaktadırlar (24).

Pterjiyumun oluşumu ile ilgili çalışmalarda immünolojik süreçlerin etkisi üzerinde durulmuştur. Oküler yüzeydeki mast hücrelerinin, temel fibroblast büyüme faktörü (B-FGF /Basic-fibroblast growth factor) gibi büyüme faktörlerinin potansiyel

kökü olduğu ve UV maruziyeti ile bu faktörlerin aktif hale geldiği belirtilmiştir (25).

Birçok araştırmacı pterjiumda onkojenik virüslerin mevcut olduğunu bildirmiştir. Çalışmalarda insan papilloma virüsü (HPV) enfeksiyonu %24-%54 oranında izlenmiştir (26,27). Bir çalışmada ise HPV'ye ek olarak %22 oranında HSV virüsü de saptanmıştır. Chen ve arkadaşları 65 pterjium vakası üzerinde yaptıkları çalışmada HPV DNA'sını saptayamamışlardır (28). Özetle pterjium oluşum ve gelişiminde onkojenik virüs etkisi daha ispatlanmamıştır (29).

Pterjium kuru göz arasındaki ilişki ise net olarak aydınlatılamamıştır. Bazı araştırmacılar gözyaşı film tabakasındaki değişikliklerin, lakrimal film tabakasındaki düzensizliklerin, küçük Dellen ve epitelyal mikroülserasyonlara neden olacağını, bunun da subkonjonktival fibrovasküler doku proliferasyonuna neden olan bir uyarı olabileceğini savunmaktadırlar.(30).

Çalışmalarda hastaların soy geçmişine bakıldığında pterjiumda otozomal dominant bir kalıtımın olduğunu göstermesine rağmen olgular yaygın olarak sporadik olarak ortaya çıkmaktadır (15). Diğer genetik kalıtım örnekleri olarak otozomal resesif, multifaktöriyel, poligenik örnekler sayılabilir(15). Ayrıca pterjium dokusunda, tümöral dokulara özgü olan kolesterol metabolizmasındaki değişikliği gösteren düşük dansiteli lipoprotein (LDL) reseptörlerinde ve hidroksi metilglutaril koenzim A redüktazda artış izlenmiştir(13).

Patogeneizde suçlanan başka bir iddia limbal kök hücrelerin harabiyetidir. Bir makalede limbal kornea-konjonktival epitel bariyerinin hasar görmesi ile kornea üzerine konjonktivalizasyon başladığı ortaya konmuştur.Pterjium cerrahisinde açık bölgeye amniyon membran veya konjonktiva otogrefti transplantasyonu yapıldığında limbal kök hücreleri ile olumlu yanıt vermiştir.(36-37)

İmmünolojik araştırmalarda pterjium dokularında vasküler hücresel adezyon molekülü-1 (VCAM-1) ,hücreler arası adezyon molekülü-1 (ICAM-1) ve insan lökosit antijeni-DR (HLADR) dahil bazı immünolojik aktivite göstergeleri arttığı ortaya konmuştur.(31-38-39)]. Pterjium dokusunun incelemesi sonucunda lenfosit, dentritik hücre, plazma hücresi, mast hücresi, CD4+ ve CD8+ T hücre sayısında çarpıcı artış

izlenmiştir. (31-38,39) Yapılan bazı araştırmalarda erken dönemde pterjium gelişim sürecinin tip I, III ve IV hipersensitivite reaksiyonlarıyla ilişkili olduğu ortaya konmuş ve pterjium dokularında anormal immünglobulin birikimleri olduğu gösterilmiştir(41,42)

Pterjium patogenezi ile ilgili ortaya atılan ilk iddialardan biri Hill ve Maske tarafından dile getirilen pterjiumun kronik ve inflamatuvar bir olay olduğuna dair hipotezdir (43). Bu hipoteze göre inflamatuvar süreç hangi yolla gelişirse gelişsin, pterjium gelişimi ve büyümesi inflamatuvar mediatörlerle ilişkilidir. Uzamış UV-B maruziyetinde pterjium dokusunda TNF- α , IL-6, IL-8’de artış saptanmıştır (44). UVB maruziyeti sonrasında IL-1 miktarının da arttığı ortaya onmuş ve böylece IL-1’in pterjium dokusundaki diğer inflamatuvar mediatörlerin ve MMP’lerin upregulasyonuna katkı sağladığı iddia edilmiştir.(45)

Son bazı çalışmalarda siklooksijenaz-2’nin (COX2) de pterjiumda aşırı üretildiği ve prostaglandin ürünleri meydana getirerek inflamatuvar sürecin daha da alevlenmesine yol açtığı ortaya konmuştur. (46) Ayrıca, pterjium dokularında inflamasyon ve hücrel farklılaşma sürecinde görev yapan sistatin C ve fosfolipaz D seviyeleri artmıştır (47,48) Pterjium dokusunun proliferatif sürecinde epitel ve fibroblast büyüme faktörleri olan FGF-2 ,HB-EGF, EGF ve PDGF, vaskülarizasyonunda ise VEGF, IL-6, TNF- α , IL-8 ve FGF-2 gibi pro-anjiogenik mediatörler görev alır (49-51)

Araştırmacılardan biri anti anjiogenik faktör olarak görev yapan trombospondin-1 ve endostatinin miktarının azaldığı bildirilmiş ve dolayısıyla pterjium dokusunda vaskülarizasyon artışı geliştiğini savunmaktadır(52,53). Pterjium dokusunda Ets-1 transkripsiyon faktörü üzerinden yeni damar oluşum aşağıda tabloda gösterilmiştir. (Tablo 1) (54)

Tablo 1: İnflamatuvar mediatörler ve büyüme faktörlerinin pterjium patogenezinde süreçte rolleri

IL-1	Diğer mediatörlerin uyarımı ve ekstraselüler matriks modülatörlerinin düzenlenmesi
IL-8	Anjiyogenez, hücre farklılaşması, doku invazyonu, inflamasyon
TNF-α	Anjiyogenez, hücre farklılaşması, doku invazyonu, inflamasyon
HB-EGF	Hücre migrasyonu
VEGF	Anjiyogenez
IL-17	İnflamasyon, fibrozis, anjiyogenez
IGFBP2	Hücre proliferasyonu
COX2	İnflamasyon
Fosfolipaz D	İnflamasyon ve hücre farklılaşması
Sistatin C	Ekstraselüler matriks modülatörlerinin düzenlenmesi
FGF	Hücre proliferasyonu
PDGF	Hücre proliferasyonu
TGF-β	Hücre proliferasyonu ve inflamasyon
IL-6	Anjiyogenez, hücre farklılaşması, doku invazyonu, inflamasyon

IL-17A eksprese eden CD4⁺ T yardımcı 17 (Th17) hücrelerin de fibrozis gelişiminden görev alabileceği üzerine yapılan bazı çalışmalar mevcuttur.(55,56) Pulmoner fibrozisteki fibrotik olaylarda görev alan IL-17' nın pterjium olgularında da arttığı iddia edilmiştir.(57)

Histopatoloji

Pterjiumun histopatolojik yapısını araştıran bir çok araştırmada pterjium oluşumu ve gelişim ile inflamatuvar değişiklikler ve mast hücreleri arasında yakın bir ilişki saptanmıştır. Elektron mikroskopu incelemelerinde pterjiumun çok katlı, ileri derecede diferansiye, prizmatik şekilli epitel hücreleriyle kaplı olduğu izlenmektedir . Mast hücreleri, kimyasal ve immünolojik faktörlerden sonra inflamasyon ve doku fibrozisinde önemli bir görev almaktadır. (58-61) Elektron mikroskopik incelemede fibroblastların sayıca fazlaştığı, aktif bir görünüm sergiledikleri, preelastik ve denatüre elastik liflerde belirgin artış, elastik liflerle birlikte kollajen liflerde de artış

ve dejenerasyon tipik olarak saptanmıştır. Pterjiumda fibroblastlar; çeşitli faktörlere bağlı olarak, metabolik yönden hasara uğramakta, çoğalmakta ve yoğun bir şekilde normal doku iskeletini değiştirmiş dejenere kollajen ve elastik lif sentezi oluşmaktadır. (62,63)

İmpresyon sitolojisi ile yapılan çalışmalarda epitel hücrelerinde, goblet hücre yoğunluğunun artışı ile devam eden skuamöz metaplazi izlenmiştir. Hücrelerde uzama ve genişleme, nukleusta piknotik değişiklikler, bazı olgularda akantozis ve diskeratozis olduğu izlenmiştir. (64)

Pterjiumdaki kollajen ve elastik liflerdeki değişiklikler immünohistokimyasal boyalarla ortaya konmuştur. Aktinik hasara uğramış ve sayıca artmış fibroblastlardan salgılanan yeni fibril prekürsörlerin anormal matürasyonu (elastodisplazi) ve bunların sekonder dejenerasyonu (elastodistrofi) pterjiumun patolojik temelini meydana getirir. (65) Limbal hücrelerin dejenerasyonunu takiben kornea-skleral limbal bariyer kaybolur ve kornea içine invazyon, konjonktival epitel hücrelerinin göçü (konjonktivalizasyon) görülür. Bu süreçte FGF, PDGF, TGF- β , TNF- α , sitokinler, MMP gibi birçok etken rol alır ve bağ dokuda yeniden düzenlenme ve anjiyogenez oluşur (66,67) Pterjium başından Bowman membranı ve epitel bazal membranı arasına fibroblastlar göç eder ve korneal invazyon başlar. Bu süreçten dejenerasyona giden limbal epitelyal bazal hücrelerden sentezlenen vimentin sorumludur. Korneadaki primer hasar Bowman membranında oluşan veziküllerdir. Kornea stromasının yüzeyinde kist şeklinde konjonktiva adacıkları (Fuchs adacıkları) olabilmektedir ve bunlar subepitelyal gri opasiteler şeklinde pterjiumun önündeki korneada izlenmektedir (68,69) Pterjium dokusu korneaya ilerleyerek Bowman membranında Stocker çizgisi meydana getirmekte ve yapılan incelemeler sonucunda Stocker çizgisinin hemosiderin depozitlerinden köken aldığı ortaya çıkmıştır (70) Pterjium dokusunda plazma hücreleri yoğun olarak saptanmıştır. Kollajen fibrillerinden meydana gelen geniş elastoid bantlar izlenmiştir. Ön segment anjiyografisi yapılan bir çalışmada pterjiumun anterior konjonktival dolaşımdan beslendiği saptanmıştır. (71-73) 613199

Klinik Bulgular

Çoğu hasta herhangi bir yakınma göstermezken, polikliniklere gözlerde kızarıklık, batma, yanma hissi, fotofobi, diplopi, görme aksını etkilediği ve astigmatizmaya da neden olduğu için bulanık görme şikayetleri ile başvurumaktadırlar. Yine hastaların büyük bir kısmını kozmetik olarak rahatsız etmekte, kontakt lens kullananlarda kullanım zorluğu ve kuru göz bulgularına neden olmaktadır.

Görme ile ilgili şikayetler daha ileri evre pterjium vakalarında izlenmektedir. Görme aksını örten pterjium olgularında görme keskinliği ve görme alanı büyük ölçüde etkilenmiştir. Daha başlangıç vakalarda ışık saçılması, kontrast sensitive bozukluğu, gece görmede zorlanma gibi yakınmalar hastalar tarafından dile getirilmektedir (74)

Çok ileri ve nüks pterjium olgularında subkonjonktival dokunun medial kantus ve forniks bağ dokusu ile sıkı bağlantılar meydana getirmesi semblefaronu neden olmakta ve hatta bazı vakalarda pterjium medial rektusa kadar uzanarak adezyonlara, göz hareketlerinde kısıtlılığa ve diplopiye neden olmaktadır.

Astigmatizma derecesini belirleyen etkenler olarak pterjiumun büyüklüğü ve invazyon derecesi, korneal elastisite, mekanik kuvvetlerin gücü ve korneanın bu kuvvetlere karşı direnci sayılabilir. Çoğunlukla kurala uygun ve düzensiz astigmatizma izlenmektedir. Bunun nedeni ise pterjiyuma bağlı horizontal planda korneal düzleşme, dikey ekseninde ise dikleştirici kontraktür oluşmasıdır. Hastaların %46'sında 0,5 D'den büyük, %13'ünde ise 4,0 D ve daha büyük kurala uygun astigmatizma olduğu saptanmıştır. Yüksek astigmatizma değerleri cerrahi endikasyon olarak sayılır. Preoperatif astigmatizma ne kadar yüksekse, postoperatif düzelme de o kadar yüksektir.(75,76)

Pterjiumda Klinik Sınıflandırma

Pterjiumda klinik sınıflandırma; lezyonun boyutuna, korneal invazyon yapmasına, optik zon tutulumuna ve vaskülarizasyonuna göre değerlendirilmiştir. Korneal invazyona göre yapılan sınıflamada üç tip pterjium isimlendirilmiştir.

Tip I pterjium

Küçük primer pterjium olmakla birlikte limbusta sonlanır, bazı vakalarda minimal korneal invazyon yapmıştır. Morfolojik olarak Tip 1 pterjiumun üç farklı tipi vardır.

Fibröz

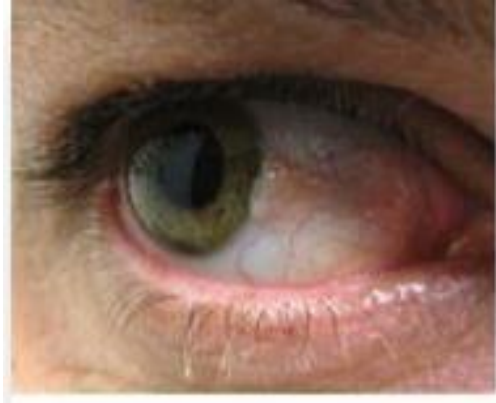
Lezyon küçük ve beyaz renktedir ve bu tip lezyonlarda damarlanma çok az olarak izlenir.

Pinguekular

Baş kısmı korneaya invaze değildir.. Gövde kısmında yatay damarlanma mevcuttur.

Klasik

Pterjium yapısının tüm parçaları mevcuttur. Baş kısmı korneaya invazedir (1-2 mm) (Şekil 1)



Şekil 1: Tip 1 Pterjium(77)

Tip II pterjium

Yaklaşık 2-4 mm korneal invazyon mevcuttur. Optik zon tutulumu yoktur. Gövde kısmında yatay damarlanma mevcuttur. Primer ve nüks pterjiumlar olarak seyredebilir. Hastalar irritatif şikayetler, net görememe şikayeti ile kliniğe başvururlar (Şekil 2).



Şekil 2: Tip 2 pterjium(78)

Tip III pterjium

Korneaya invazyon 4 mm ve daha fazladır,görme kaybına neden olacak şekilde optik zonü da kapatırlar (Şekil 3). Bu tip pterjiumlar primer ve nüks pterjiumlar olarak kliniğe gelebilir. Horizontal rektus kaslarından birinde adezyon yaparak hareket kısıtlılığına neden olur. Fornikslerde adezyona neden olursa semblefaraona meydana gelir (80-83)



Şekil 3: Tip 3 pterjium(79)

Pterjium Gelişimi Sınıflandırması

Pterjium gelişimi sınıflandırması yerleşim yerine ve boyutuna göre beş evre olarak isimlendirilmiştir.

Evre I

Bu evrede belirgin bir lezyon izlenmemektedir. İrritasyona bağlı konjonktivit olarak klinikte karıştırılabilir. Konjonktival damarların çapı ve sayısı ola fazladır. Hastalar kuru göz belirti ve semptomları ile başvururlar.

Evre II

Burada belirgin lezyon mevcuttur. Pinguekula ve pterjium evresi olarak kabul edilir. Anormal vaskülarizasyon ve inflamasyon hakimdir. Hastalar yabancı cisim hissi ve yanma, kaşınma gibi şikayetler ile başvururlar.

Evre III

Burada pterjium başı limbustadır, veya korneaya minimal invazyon başlamıştır. Limbal pterjium olarak kabul edilir. Anormal vaskülarizasyon ve fibroproliferasyon hakimdir. Hastalar evre II'de olan aynı şikayetler ile başvururlar.

Evre IV

Burada 2 mm veya üzerinde korneal invazyon saptanır. Korneal pterjium olarak kabul edilir. Yoğun vaskülarizasyon vardır ve dejeneratif süreç başlamıştır. Granülasyon dokusu Bowman membranı ile kornea epiteli arasına kadar ilerlemiştir. Stocker çizgisi bu evrede görülebilir, ayrıca korneal ödem ve dellen keratopatisi de izlenebilir. İnflamasyon nedeniyle veya korneada sinir uçlarına etki ettiği için ağrı hissi de eşlik edebilir.

Evre V

Birleşik pterjium olarak kabul edilir. Bilateral pterjiumlarda, kimyasal maddelere maruz kalma ve travma sonrası veya nüks pterjiumlarda, hızlı progresyon sonucu görülmektedir. Astigmatizmaya bağlı görme bozuklukları daha çoktur, hastaların şikayetleri daha ciddi ve daha sık olmaktadır.(83)

Tedavi

Tedavide öncelikli olarak konservatif yaklaşımlar ile hareket edilir. Ancak görme keskinliği azalması, görme eksenine doğru büyüme, topikal ilaçlarla giderilemeyen rahatsızlık hissi, oküler hareket bozukluğu gelişmiş ise cerrahi tedavi gerekir. Nüks pterjium vakalarının sıklığı yüksek olup daha agresif gidişat göstermektedir. Dolayısıyla cerrahi öncesi primer eksizyon için gerekli endikasyonlar mutlaka iyice gözden geçirilip ona göre karar verilmelidir. (87) UV maruziyeti için gözlük camları ve lens kaplamaları önerilmektedir Tropikal bölgelerde yaşayanlar için UV – 400 filtreli ve antirefle kaplamalı orta gri lensler, çöl ikliminde yaşayanlar için ise UV filtreli, kahverengi lensleri kullanmaları uygundur. Egzoz gazları, rüzgâr, toz, sigara dumanı, yüzme havuzu suyunda bulunan klor gibi kimyasallar, kuru hava gibi diğer çevresel faktörlerin kronik maruziyetinden önlenmelidir. Göz yaşı film tabakasındaki patolojiler ile pterjium bulguları arasında ilişki saptanmıştır. Gerekiyorsa suni göz yaşı veya siklosporin kullanımı ile oküler yüzeyin hidrasyonu sağlanmalıdır. Pterjium patolojisinde oküler yüzey inflamasyonu bir neden olarak gösterilmiştir ve iritanlara kronik maruziyet inflamasyonu daha da alevlendirmektedir.

Non-streoid antiinflamatuvar ilaçlar: Diklofenak sodyum, ketorolak, indometazin içeren ilaçların kısa süreli olarak uygulanması pterjium medikal tedavisinde önerilmektedir.

Topikal steroid damlalar:deksametazon fosfat, florometalon asetat,, loteprednol etabonat içeren ilaçların kullanımı uygundur.

Topikal dekonjestan damlalar: Nafazolin ve tetrahidrazolin içeren damlalar vazokonstriksiyon yoluyla ve vasküler yapıları inhibe ederek fayda sağlarlar. (86,88,89)

Pterjiumda ana tedavi cerrahidir. Cerrahinin amacı ise pterjium dokusunun oküler yüzeyden tamamen temizlenmesi ve buna bağlı optik ve kozmetik problemlerin giderilmesidir. Cerrahin tecrübesine, pterjiumun yapısına göre çeşitli yöntemler uygulanabilir. Yeni yöntemlerin geliştirilmesi adına yapılan araştırmaların amacı nüks oranlarının yüksek olmasıdır (85,86)

Pterjium dokusu çıkarıldıktan sonra geride kalan skarın ne boyutta ve ne derinlikte olacağı önceden tahmin edilemeyebilir. Özellikle derine penetre olmuş pterjiumlarda rezidüel skarın görme keskinliğini azaltma olasılığı daha yüksektir. Dolayısıyla pterjium dokusunun kornea merkezine ilerlemesini beklemeden eksizyon yapılması, rezidü kornea skarının görme keskinliğini etkileme olasılığını da azaltacaktır. Eksizyon sonrası gelişen skar düzensiz astigmatizmaya neden olursa veya görme keskinliğini etkilediğinde excimer lazer ile tedavi edilebilir. (90)

Pterjiumda yapılacak cerrahi hastadan hastaya değişebilir. Düşük grade pterjiumlarda basit eksizyon seçilebilirken, daha yüksek grade vakalarda ve nüks pterjiumlarda bariyer cerrahileri tercih edilen tekniklerdir. Bariyer cerrahisinde hedef limbus bölgesinde biyolojik ya da mekanik bir bariyer meydana getirerek nüks oranını düşürmektir. Seçilecek tüm yöntemlerde pterjiumun eksize edilmesi genel olarak benzerdir. Skleranın kapatılmasında tercih edilen teknikler farklı olabilir. Sklera kapatılırken primer konjonktival kapama, konjonktival otogreft, amniyotik membran transplantasyonu, lameller ve penetran keratoplasti, konjonktival rotasyon flepleri, limbal konjonktival otogreft, kültüre edilmiş konjonktival epitel transplantasyonu ve müköz membran grefti uygulanmaktadır. (84,86,87,91)

Açık Sklera Tekniği

Bu yöntem pterjium eksize edildikten sonra konjonktivanın, skleral alan açık bırakılarak skleraya sütüre edilmesidir. Fakat nükslerin % 14-82 arasında görülmesi daha sonraki çalışmalarda bu cerrahiye ek adjuvan tedaviyi ya da yeni tekniklerin kullanılmasını zorunlu hale getirmiştir.(92,94-96)

Basit Konjonktival Kapama

Bu yöntemde pterjium dokusu çıkarıldıktan sonra konjonktiva sklera açıklığı kalmayacak şekilde sütüre edilir. Ancak çok yüksek nüks oranları nedeniyle bu yöntem günümüzde terk edilmiştir(92,93)

Konjonktival Otogreft

Pterjium eksize edildikten sonra üst temporal alanda açıkta kalan skleral bölge kadar büyüklükte konjonktiva kalem yardımı ile boyanır ve bu alana subkonjonktival

anestezik ilaç enjeksiyonu uygulanır. Bu teknik, konjonktiva diseksiyonuna yardımcı olur. Sonrasında tenon dokusu alınmadan sadece konjonktiva alınır. Skleral alanı kapatacak boyutlardan 1 mm daha büyük kesilerek hazırlanan serbest konjonktival greft pterjium eksizyonu olan alanın üstüne getirilir, limbus limbusa gelecek şekilde karşı karşıya , 8/0 vikril ile suture edilir (97,98). Bazı vakalarda konjonktival otogreftin sutürasyonu yapılmaz, doku fibrin yapıştırıcılar ile yapıştırılır. Fibrin yapıştırıcısı kullanmanın avantajları kullanım kolaylığı, postoperatif ağrı, yanma, batma, sulanma ve yabancı cisim hissi gibi semptomlarda azalmanın belirgin olması ve operasyonun daha kısa sürede bitirilmesi (99-101)

Konjonktiva-limbal Otogreft

Bu teknikte uygun büyüklükte konjonktiva üst temporal bölgeden alınır, limbal bölge 2-3 saat kadranı uzunluğunda ve limbusu 0.5 mm geçecek şekilde diseke edilerek eksize edilir. Serbest greftin limbal bölümü pterjium bölgesinin limbal bölümüne yaklaştırılır, suture edilir veya yapıştırılır (102)

Amniyotik Zar Transplantasyonu (AZT)

Bu teknikte pterjium dokusu eksize edilir, subkonjonktival fibrozis bütünüyle çıkarılır , üst ve alt forniks ile karunküldeki konjonktiva kenarına enflamasyonu oranını düşürmek ve nüksü azaltmak için 'subkonjonktival triamcinolone' yapılır.(103) Amniyotik zar ile konjonktiva episkleradan 8.0 ile primer suture edilir. Ancak AZT yapılan vakalarda nüks yüksek oranda izlenmektedir(104-106)

Konjonktival Flep Kaydırması

Pterjium dokusu eksize edildikten sonra kalan defekt bölge üst veya alt konjonktivadan kesilen flebin kaydırılması ile suture edilir.(107)

Lameller ve Penetran Keratoplasti

Lameller keratoplasti, pterjium cerrahisinde ileri evre pterjiumlarda akla gelmelidir.. Bu teknik ile doku replasmanı yapılmakta ve bariyer meydana getirilmektedir. En sık tercih edilen greftler, sirküler ve periferik yarım ay ve

greftlerdir..Trepan yardımı ile trepanasyonun ardından keratektomi yapılır ve keratektomi alanından hafif büyük greft ipek suturele fikse edilir ve konjonktiva da suture edilir.(108). Penetran keratoplasti görmeyi azaltan skar dokusu ve incelmanin yoğun olduğu ya da perfore olan olgularda gündeme gelir(93)

Adjuvan Tedavi

Pterjiumda nüksü önlemek için cerrahi tedavilerle birlikte adjuvan tedaviler de kullanılabilir.

Mitomisin C

Mitomisin C hücrede DNA sentezini bloke eder. Mitozu ve hücre bölünmesini durdurur. Bu teknik subkonjonktival doku proliferasyonu ve fibrozisle sonuçlanan fibroblastik aktiviteyi inhibe etmek amacıyla uygulanmaktadır.

İntraoperatif mitomisin C uygulama, pterjium eksize edildikten sonra açıkta kalan skleral bölgeye, %0.01- %0.05 arasındaki dilüsyonda mitomisin damlatılmış sünger parçaları 3-5 dakika arasında bekletilir ve cerrahiye devam edilir.

Postoperatif mitomisin C uygulama, vaka sonrasında %0.01- %0.05 konsantrasyonda dilüe edilerek damla formuna getirilen mitomisin C, farklı tedavi protokollerine göre günde 2 ya da 4 kez, 5 ile 14 gün arasında göze uygulanır. Mitomisin C kullanılan pterjium eksizyonlarında nüks, %0 lara kadar düşerken, özellikle çıplak sklera yöntemi ile uygulandığında %40'lara ulaşmaktadır (109-112)

Thiotepa (Triethylene thiophosphoramide)

Nitrojen mustardın analogu olan alkilleyici bir maddedir. Hızlı çoğalan dokularda mitozu durdurur. Pterjium eksize edildikten sonra %0,05'lik konsantrasyondaki damladan günde 4 kez, 6-8 hafta uygulanır. Bu tedaviden sonra saptanan nüks oranları en yüksek %28 en düşük %0 olarak bildirilmiştir (113,114). Thiotepa, lokal irritasyonlar ve alerjik reaksiyonla birlikte göz kapaklarında siyah pigment birikimlerine ve cildin hiperpigmentasyonuna neden olduğu için günümüzde terkedilmiştir. Bu ilaçla sklera perforasyonu gibi çok ciddi komplikasyonlar da saptanmıştır (115)

5-Florourasil

Timidilat sentetazı inhibe ederek fibroblast proliferasyonunu bloke eder. Pterjium eksizyonundan sonra - 25 mg/ml'lik dilüsyonda, sünger parçalarına emdirilir ve 3-5 dakika çıplak sklera üzerinde uygulanır. Bazı yayınlarda %11-%25 arasında nüks oranları bildirilmiştir (116,117)

Pterjium Cerrahisinin Komplikasyonları

Peroperatif komplikasyonlar

Pterjium başının diseksiyonu sırasında çok derin keratektomi uygulanırsa kornea ve skleral incelme, aşırı koterizasyon, konjonktival otogreftin epitelyal yüzünün altta kalacak şekilde ters dönmesi, iç rektus laserasyonu gibi komplikasyonlar meydana gelebilir.

Postoperatif dönemde

En sık ve önemli komplikasyon nükstür. Haricinde greftte delik, greft altında hemoraji, konjonktival greftte ödem, delleni ülseri, tenon granülomu, greftin retraksiyonu ve nekrozu, astigmatizma, epitelyal inklüzyon kisti görülebilir (92)

TREHALOZ

Trehaloz, iki glikoz molekülünün 1,1-glikozidik bir bağla birbirine bağlandığı indirgeyici olmayan bir disakkarittir. Canlı organizmalardan izole edilmiş ve biyosentezlenmiştir. Bu doğal olarak oluşan disakkarit, biyolojik dünyada yaygındır. Bitkiler aleminin alt sıralarında trehalozun varlığı uzun yıllardır bilinmektedir. Trehaloz, sporlarda, meyve gövdelerinde ve vejetatif hücrelerde meydana gelir, maya ve mantarlarda oldukça yaygındır. Örneğin, Dictyostelium mucoroides sporları ve makrokistlerinin kuru ağırlık bazında %7 kadar trehaloz içerdiği rapor edilmiştir.

Trehaloz seviyeleri, büyüme aşamasına, organizmanın veya hücrenin beslenme durumuna ve çevresel koşullara bağlı olarak belirli hücrelerde büyük ölçüde değişebilir. Böceklerde, trehaloz hemolimf ve göğüs kaslarında önemli bir şekerdir ve uçuş sırasında tüketilir. Bu tür organizmalarda şeker deposu olarak işlev görür.

Anhidrobiyotik organizmalar genellikle yüksek konsantrasyonlarda trehaloz (ve bazen diğer disakkaritler ve oligosakkaritler) içerir. Böylece nematod *Aphelenchus avenae*'nin yavaşça dehidre edildiğinde kuru ağırlığının %20'si kadarını trehaloza dönüştürdüğü gösterir. Bu organizmanın ve diğerlerinin su yokluğunda hayatta kalma yeteneği, trehaloz sentezi ile güçlü bir korelasyon göstermiştir. Trehaloz görüldüğü gibi biyolojik dünyada canlıları dehidrate durumlardan korur.

Dehidrasyon sırasında lipit çift tabakalarının stabilizasyonunu bozmak için iki ana stres, füzyon ve lipit faz geçişleridir. Lazer ışığı saçılımı veya diğer tekniklerle yapılan araştırmalar, trehaloz ve diğer şekerlerin dehidratasyon sırasında veziküller arasındaki füzyonu engellediğini, ancak tek başına füzyonun engellenmesinin kuru vezikülleri korumak için yeterli olmadığını göstermektedir. Dolayısıyla, faz geçişlerini önlemek için trehaloz da gereklidir. Trehalozun diğer bir rolü, hücreleri oksijen radikallerine karşı korumaktır.

Mikobakterilerde ve korinebakterilerde, trehaloz, bir dizi hücre duvarı glikolipidinin temel bileşenidir. Bu trehaloz lipidlerinin en iyi bilineni ve en çok çalışılanı, *M. tuberculosis*'in bir hücre duvarı lipidi olan ve trehaloz-dimikolat verecek şekilde her bir glikozun 6-hidroksil grubuna esterlenmiş yağ asidi mikolik asidi içeren kord faktörüdür.(139)

Takashi Kudo ve ark.(140) yaptığı bir çalışmada trehalozun malign melanom hücre büyümesi üzerindeki inhibitör etkileri incelenmiştir. İnsan malign melanom hücrelerini trehaloz (kontrol/%2,5/%5,0/%7,5/%10,0) içeren bir ortamda kültüre edilid ve büyüme aktivitelerini değerlendirmek için hücre sağkalım deneyi (MTT) kullanıldı. Daha sonra, F334/NJcl-rmu/rmu sıçanlarında subkonjonktival olarak aşılınmış melanom hücrelerine topikal olarak trehaloz damlatıldı, ardından tümör büyümesinin histopatolojik bir değerlendirmesi yapıldı. Akış sitometrisini kullanarak, trehaloz tedavisinden sonra kültürlenmiş melanom hücrelerinde hücre döngüsünün dağılımını, apoptotik hücrelerin oranını ve hücre döngüsü ile ilgili hücre içi faktörleri karşılaştırıldı. MTT çalışması, kültür ortamındaki trehaloz konsantrasyonlarının $\geq$ %5'inin melanom hücrelerinin çoğalmasını önemli ölçüde engellediğini gösterdi. Subkonjonktival olarak aşılınmış melanom hücre kitleleri, kontrollere kıyasla trehaloz uygulanan gözlerde önemli ölçüde daha küçüktü. Akış sitometrisi

analizleri, trehaloz gruplarının hücre kültüründe artan G2/M faz hücreleri ve apoptotik hücre oranlarına sahip olduğunu göstermiştir. Bu hücreler ayrıca hücre döngüsü inhibe edici faktörlerin artan ifadelerini sergiledi.



GEREÇ VE YÖNTEM

1. Çalışmaya dahil edilecek hastaların belirlenmesi ve örnek toplanması

Çalışmaya Haziran 2021- Kasım 2022 Pamukkale Üniversitesi Hastanesi Göz Polikliniğine batma, yanma gözde yabancı cisim hissi ve görmede azalma şikayeti olan ve yapılan biomikroskopik muayenede evre 1-2-3 pterjium saptanan 3 erkek ve 3 bayan hasta dahil edildi. Hastalar çalışma konusunda bilgilendirilerek kendilerinden işleme dair ve doku örneklerinin çalışmaya dahil edilmesine izin verdiklerine dair rıza onam belgeleri alındı. Ameliyatlar topikal (Alcaine®) ve subkonjonktival (Jetokain®) lokal anestezi kombinasyonu altında yapıldı. Aseptik koşullarda göz kapak spekulumu uygulanmasını takiben yaklaşık 0.2 ml'lik lokal anestezi ilaç pterjium dokusu içine enjekte edilip 15 numara bistüri ile pterjium başı korneadan ayrıldıktan sonra limbus hizasından konjonktiva makası ile pterjium altına girilerek alttaki tenonla birlikte skleradan serbestleştirilip doku eksize edildi. Konjonktival greft aynı gözün üst temporal bulber konjonktival bölgesinden subkonjonktival lokal anestezi uygulayarak forniks tarafından başlanılarak makas yardımıyla olabildiğince ince ve tenondan arındırılmış olarak limbusun yaklaşık 2 mm gerisini içine alacak şekilde diseke edildi. Greftin alındığı bölge sütür konmayarak sekonder yara iyileşmesine bırakıldı. Alınmış olan greft epitelyal yüzü üste gelecek şekilde ve limbal kısma uyan kısmı limbusa gelecek şekilde nazaldaki skleral boşluğa yerleştirilerek 8/0 vikril sütürle tek tek konjonktivaya suture edildi. Hastalardan alınan pterjium dokusu ve bu doku yerine yerleştirilen yine aynı hastanın konjonktivasından alınan greftin açıkta kalan skleral bölgeye uyacak şekilde şekillendirilmesi sonrasında kesilen normal konjonktival doku örnekleri steril fosfat tamponlu salin(PBS) solüsyonuna alınarak primer hücre kültürasyonu çalışmalarına geçildi.

2. Primer Pterjium ve Konjonktival dokularından primer hücre kültürü

Çalışma kapsamında belirlenen 3 erkek ve 3 bayan hastalardan elde edilen pterjium ve normal konjonktival dokuları steril hücre kültürü kabinde homojenizasyon solüsyonunda(1:1 oranda 0,25 Trypsin/EDTA ve HBSS(Hanks' Balanced Salt solution)) , bistüri yardımı ile cam petri içerisinde parçalandı. Elde edilen homojenat 15 ml'lik falkona alındıktan sonra 1000x rpm 'de santrifüj edildi.

Supernatan uzaklaştıldıktan sonra hücrelerin bulunduğu pelet (%10 FBS, %1 penisilin/streptomisin içeren DMEM/F12 besiyerinde(Capricorn) T25 flasklara ekimi gerçekleştirildi. Hücrelerin kültürasyonu 37°C'de %5 CO₂ ve %95 nemli ortamda gerçekleştirildi. Kültürasyon boyunca homojenize hücre örneklerinin flask yüzeyine tutunma ve çoğalma durumları günlük kontrol edildi. Hücrelerin flask yüzeyine tutunmaları ile hücrelerin besiyerleri düzenli olarak değiştirildi.

3. Primer Pterjium ve Konjonktival hücrelerinin mitomisin C ve trehaloz ile muamele edilmesi ve IC50 dozlarının belirlenmesi.

%10 FBS içeren DMEM/F12 besiyerinde(Capricorn) T25 flasklarda kültüre edilen pterjium ve konjonktival hücreleri hücre popülasyonunun %50'sini öldüren mitomisin ve trehaloz dozlarını(IC50 değerlerini) belirlemek için hücreler 96 kuyucuklu plaklara 10000 hücre/kuyu olacak şekilde ekildi. Ve son besiyeri miktarı 100 µl'ye tamamlandı. Ardından bir gün tutunmaları için inkübe edildi. Ve ertesi günü hücrelerin besiyerleri değiştirilerek literatürdeki bilgilerden yola çıkarak belirlenen trehaloz(100, 200, 400, 600 mM) ve mitomisin C(0,5, 1, 2,5 ,5 ,10 ve 20 µl) muamelesi gerçekleştirildi ve 48 saat boyunca 37°C'de %5 CO₂ ve %95 nemli ortamda inkübe edildi. İnkübasyon sonunda hücreler MTT protokolü(ROCHE) uygulanarak 560 nm dalga boyunda Promega marka Glomax Multi detection sistem cihazı ile kantitatif olarak hücrelerin sağkalım durumlarının ölçümü gerçekleştirildi.

4. Primer Pterjium ve Konjonktiva hücrelerinin mitomisin C ve trehaloz muamelesi sonrası hücrelerden total RNA izolasyonu

IC50 dozları belirlenen pterjium ve konjonktiva hücreleri total RNA profillerindeki(transkriptomik) değişimi analiz etmek amacıyla hücreler T25 Flasklara 5x10⁵/ml olacak şekilde ekimleri gerçekleştirildi. Hücreler bir gün sonra besiyerleri değiştirilerek besiyeri ortamında IC50 dozlarında mitomisin C ve trehaloz bulunan yeni besiyerleri ile 48 saat 37°C'de %5 CO₂ ve %95 nemli ortamda inkübe edildi. İnkübasyonun ardından hücreler %0,25 Tripsin/EDTA solüsyonu ile birlikte tripsinasyon işleminin ardından 15 ml'lik falkonlarda 5 ml besiyeri ile toplandı. Ardından 1000 xg hızında 5 dk santrifüjleme işleminin ardından hücreler 500 µltrizol(RiboEx, Geneall) ile muamelenin ardından Geneall marka Hybrid-R total RNA izolasyon kiti aracılığıyla ilaç muamele edilmeyen kontrol ve trehaloz,

mitomisin C uygulanan pterjium ve konjonktiva hücrelerinin total RNA izolasyonu gerçekleştirildi. Kit protokolü doğrultusunda gerçekleştirilen işlem basamakları aşağıda belirtilmiştir;

- Trizol eklenen örnekler oda sıcaklığında 5 dk inkübe edildi.
- Üzerine 100 µl kloroform eklendi ve vorteks edilerek 2 dk inkübasyona bırakıldı.
- 12000xg'de 15 dk +4°C'de santrifüj edildikten sonra örneklerde oluşan en üstteki şeffaf faz yeni 1,5 ml'lik ependorf tüpe aktarıldı.
- Şeffaf fazın miktarı ile aynı hacimde RB1 solüsyonu eklendi. Vorteks yapıldı.
- Örnekler mini kolona aktarıldı ve maksimum hızda 30 saniye santrifüj edildi.
- Ardından 500 µl SW1 solüsyonu eklendi ve aynı hızda 30 saniye santrifüj edildi.
- Süzüntü kısım atılarak kolona 500 µl hacimde RNW solüsyonu eklendi. Ve 30 saniye maksimum hızda santrifüj edildi.
- Ardından süzüntü uzaklaştırıldı ve total RNA örneklerinin bağlı bulunduğu mini kolonlar yeni toplama tüplerine alınarak kolonlardaki solüsyon kalıntılarını uzaklaştırmak amacıyla maksimum hızda 1 dk oda sıcaklığında santrifüj edildi.
- Ardından kolonlar yeni 1,5 ml'lik ependorflara alınarak 50 µlultrapurenükleaz-free su kolonlara eklendi ve aynı santrifüj işleminin ardından total RNA örnekleri sonraki işlem basamakları için 1,5'lik ependorf tüplerde -80°C'de saklandı.

5. mRNA mikrodizin ve sonuçların analizi edilmesi

Total RNA örnekleri elde edildikten sonra toplam 6 hastadan(3 erkek, 3 kadın) 2'sine ait (1 erkek,1 Kadın) aşağıda tablo 2'de gruplandırma ve karşılaştırma grupları olarak bahsedilen total RNA örnekleri Makrogen(Güney kore) firmasından hizmet alımı gerçekleştirilerek örneklerin mikrodizin deneyleri gerçekleştirilmiştir.

Tablo 2: Örnek grupları

-
1. Örnek = Hasta(H)-Erkek(E)1 konjonktival
 2. Örnek = H-E1 konjonktival + trehaloz IC50
 3. Örnek = H-E1 Pterjium
 4. Örnek = H-E1 Pterjium mito C
 5. Örnek = H-E1 Pterjium trehaloz IC50
 6. Örnek = H-Kadın(K)1 konjonktival
 7. Örnek = H-K1 Pterjium
 8. Örnek = H-K1 Pterjium trehaloz IC50
-

Çalışma kapsamında Total RNA örneklerinin ND-1000 spektrofotometre (NanoDrop, Güney Kore) ve Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, ABD) cihazları ile saflık ve kalitesi ölçüldü. Totalde 8 örnek mRNA mikrodizin analizine dahil edildi. Illumina HT-12 v4.0 platformu kullanılarak direkt hibridizasyon yöntemi ile mRNA mikrodizin işlemi gerçekleştirildi. RNA örnekleri çip üzerine hibridize edilmeden önce çoğaltıldı ve biotin ile işaretlendi. Hibridizasyon sonrası Cy3-streptavidin ile işaretleme yapıldı ve çip görüntülendi. Illumina HT-12 v4.0 platformu iyi tanımlanmış genler, gen adayları ve sprints varyantlarını içermektedir ve transkriptomun büyük bir kısmını saptayabilmektedir. Her bir mikrodizin sisteminde 47 bin adet prob bulunmaktadır. Problar NCBI RefSeqRelease38 içeriğine göre dizayn edilmiştir. Problar 50-mer uzunluğunda olup artmış bir seçicilik ve hassaslığa sahiptir. Mikrodizin sonucu elde edilen verilen örnekler arasında kat değişimi şeklinde analiz edildi. Gruplar arasında korelasyon analizi ve küme analizleri yapıldı.

Elde edilen mRNA mikrodizin sonuçları Gen ontoloji (GO) ve KEGG Yolak analizleri ile analiz edildi. Gen Ontoloji (GO) Analizi: Farklı ekspresyon gösteren mRNA'ların rol aldığı hücresel, biyolojik ve moleküler açıdan fonksiyonel genleri ve gen gruplarını ortaya koymak amacıyla yapıldı. Her bir analiz için kontrol ve hedef

grup karşılaştırması yapılarak en belirgin farklılık gösteren hücresel süreçler belirlendi. Tüm analizlerin değerlendirmesinde $p<0.05$ değeri anlamlı olarak kabul edildi.

Kyoto Gen ve Genom Ansiklopedisi(KEGG{Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes}) Yolak Analizi: Ekspresyon farklılığı gösteren mRNA'ların birbirleri ile olan ilişki ağını ve hücre metabolizması hakkında bilgi vermek için de KEGG yolak analizi gerçekleştirildi. Her bir analiz için kontrol ve hedef grup karşılaştırması yapılarak yolaklarda en yoğun değme noktası farklılığı gösteren yolaklar belirlendi. Tüm analizlerin değerlendirmesinde $p<0.05$ değeri anlamlı olarak kabul edildi.

6. Total RNA örneklerinden cDNA sentez reaksiyonu

Total RNA örneklerinden yapılan mikrodizin analizlerinin ardından yapılan analizlerin sonucunda belirlenen genlerin ifadelerindeki değişim eş-zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu(Real-time PCR) ile valide edilmeden önce cDNA'ya çevrildi. RNA örneklerini cDNA'ya dönüşümünü gerçekleştirmek için ABM marka OneScript® Plus cDNA sentez kit(ABM, cat.no; G236) aracılığıyla gerçekleştirildi.

cDNA dönüşüm reaksiyonu koşulları tablo 3 de gösterilmiştir

Tablo 3: cDNA dönüşüm reaksiyonu koşulları

Bileşen	Hacim
5X RT solüsyonu	4 µl
dNTP	1 µl
Primer	1 µl
OneScript® Plus RTase	1 µl
Total RNA (1 µg)	2-4 µl
dH ₂ O	11-9 µl

200 µl'lik PCR tüplerine hazırlanan cDNA karışımları PCR cihazında;

55°C'de 15 dk, 85°C'de 5 dk şekilde reaksiyona tabi tutuldu. cDNA'ya dönüşen örnekler -20°C'de saklandı.

7. Total RNA örneklerinden Kantitatif Eş-zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile ekspresyon analizleri

Trehaloz ve mitomisin C ile muamele edilen pterjium ve konjonktival hücrelerindeki ifadeleri değişen genler, mRNA mikrodizin analizleri ile belirlendikten sonra validasyon amacıyla ifadelerindeki değişim çalışmaya dahil edilen 3 kadın ve 3 erkek hastaya ait pterjium ve konjonktival hücrelerinin kontrol, trehaloz ve mitomisin IC50 dozları ile muamele edilmiş gruplarında ifadeleri değişen mRNA'ların değişimleri eş-zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu ile analiz edildi. Reaksiyon Biorad CFX96 cihazında İTaq Universal SybrGreen solüsyonu protokolü doğrultusunda gerçekleştirildi. Gruplar arasında genlerin ifadelerindeki kat değişimi için yapılan analizlerde β -aktin geni iç kontrol geni olarak kullanıldı.

Reaksiyon bileşenleri tablo 4 de gösterilmiştir.

Tablo:4: Reaksiyon Bileşenleri

Bileşen	Hacim
SybrGreen solüsyonu	5 μ l
İleri primer(F)	0,5 μ l
Geri Primer (R)	0,5 μ l
dH ₂ O	3 μ l
cDNA miktarı	1 μ l
Toplam	10 μ l

Reaksiyon döngüsü aşağıdaki tablo 5’de reaksiyon koşullarında her örnek için 3 tekrarlı olarak gerçekleştirildi.

Tablo 5: Reaksiyon koşulları;

Sıcaklık	Süre	Döngü
95°C	30 saniye	1 döngü
95°C	5 saniye	40 döngü
60°C	30 saniye	

8. İstatistiksel Analiz

Gruplar arasındaki karşılaştırmalı analizler için GraphpadPrism 8.0.1 ve SPSS 22.0 programları kullanılarak Onewayanova, paired ve unpaired Student t-testleri uygulanarak gerçekleştirildi. P değerlerinin anlamlılık seviyeleri; *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ve ****p < 0.0001 olarak belirlendi. Eş-zamanlı PCR sonuçlarını analizleri gerçekleştirilirken $\log[2^{-\Delta\Delta Ct}]$ formülü kullanılarak incelenen genler arasındaki kat değişimi analiz edildi.

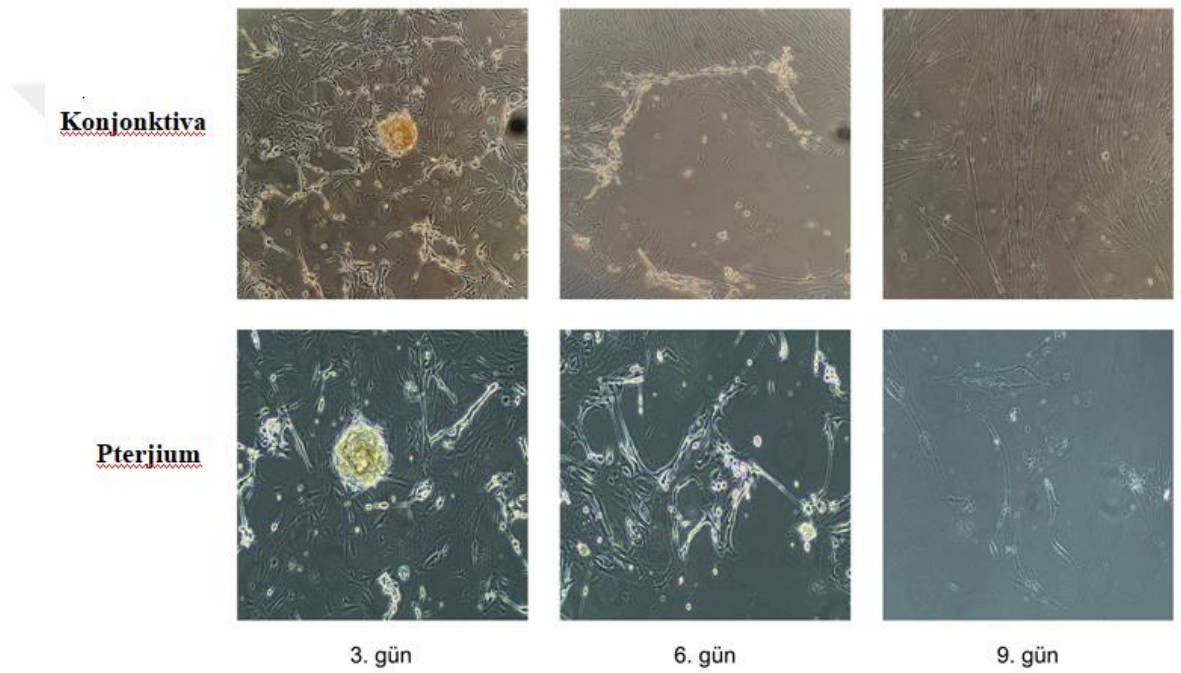
9. Etik Kurul Onayı

Çalışmamız için Pamukkale Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'na başvurulmuş ve etik açıdan sakınca olmadığına dair onay alınmıştır. Sonrasında hastalar çalışma konusunda bilgilendirilerek kendilerinden işleme dair ve doku örneklerinin çalışmaya dahil edilmesine izin verdiklerine dair rıza onam belgeleri alındı.

BULGULAR

1. Hastalardan alınan pterjium ve konjonktival dokuların hücre kültürasyonunun optimizasyon bulguları

6 hastadan alınan pterjium ve normal konjonktivaya ait dokular optimize ortam koşullarında kültüre edildi. Aşağıdaki şekil 4’ deki görsel kültür sırasında 3,6 ve 9. günlere ait pterjium ve konjonktiva hücre kültürüne ait görsellerdir.



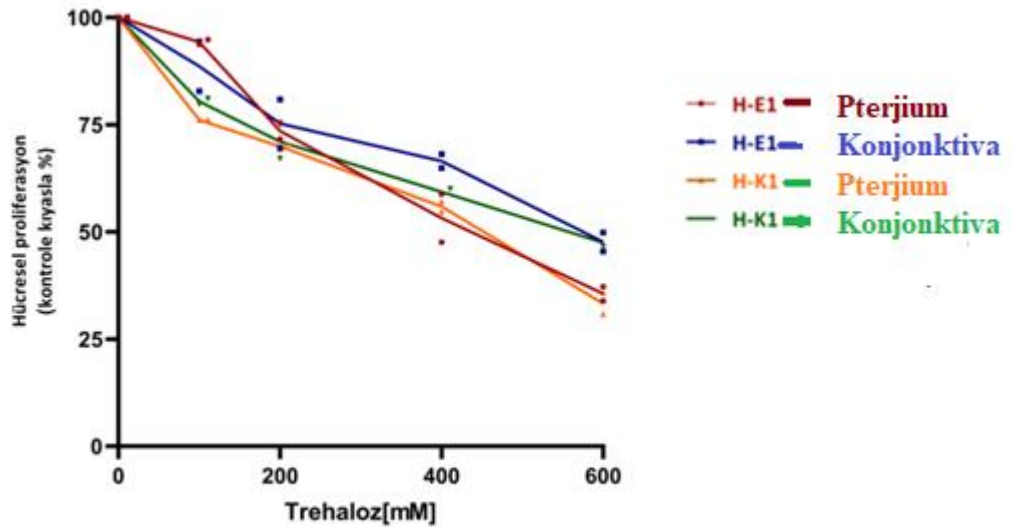
Şekil 4: Pterjium ve Konjonktival dokuların kültürasyon aşamalarındaki 3,6 ve 9. Gün görselleri

2. Pterjium ve konjonktival dokuların Trehaloz Ve Mitomisin C için IC50 dozlarının belirlenmesine ait Bulgular

Yapılan hücre sağkalım deneyleri (MTT) sonucunda Trehaloz verilen pterjium ve konjonktival hücrelerde elde edilen absorbans değerleri tablo 6 ve şekil 5’ de gösterilmiştir

Tablo 6: Trehaloz için kadın ve erkek hastadaki doz bağımlı absorbens değerleri

	H-K1				H-E1			
TREHALO	PTERJİU		KONJONKTİV		PTERJİU		KONJONKTİV	
Z	M		AL		M		AL	
Kontrol	0,54 8	0,55	0,596	0,6	0,52 5	0,51	0,724	0,66
100 mM	0,41 7	0,41 9	0,483	0,479	0,49 8	0,47 8	0,6	0,623
200 mM	0,38	0,38 8	0,4	0,45	0,37 6	0,38 5	0,504	0,534
400 mM	0,3	0,31 4	0,35	0,36	0,25	0,3	0,47	0,45
600 mM	0,16 9	0,19 7	0,288	0,28	0,17 8	0,19	0,361	0,3

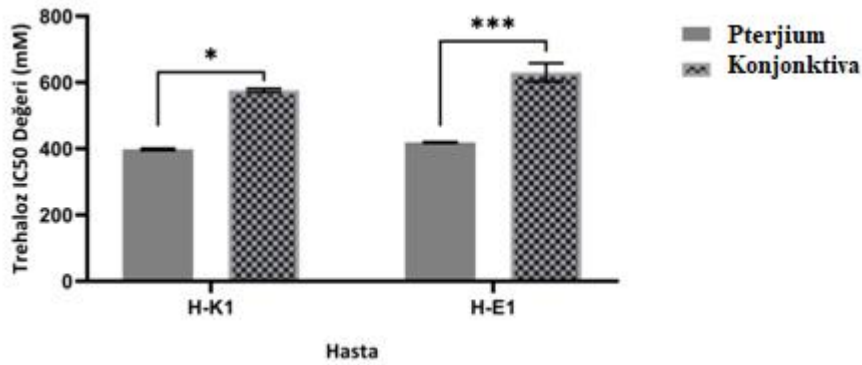


Şekil 5: Trehalozun pterjium ve konjonktival dokudaki absorbens grafiği

Elde edilen absorbens değerlerine bağlı olarak yapılan normalizasyon ve Non-linear Regresyon analizleri sonucunda hesaplanan IC₅₀ değerleri ve güven skorları(R²) değerleri tablo 7 ve şekil 6’da verilmiştir:

Tablo 7: Trehalozun erkek ve kadın hasta pterjium ve konjonktiva dokularındaki IC50 düzeyi ve Güven skoru(R2)

TREHALOZ	H-E1 PTERJİUM	H-E1 KONJONKTİVAL	H-K1 PTERJİUM	H-K1 KONJONKTİVAL
IC50	418,3	610,9	396,3	572
R SQUARED	0,9796	0,9347	0,9543	0,9855



Şekil 6: Trehaloz için Pterjium ve Konjonktival Dokuda IC50 değerleri

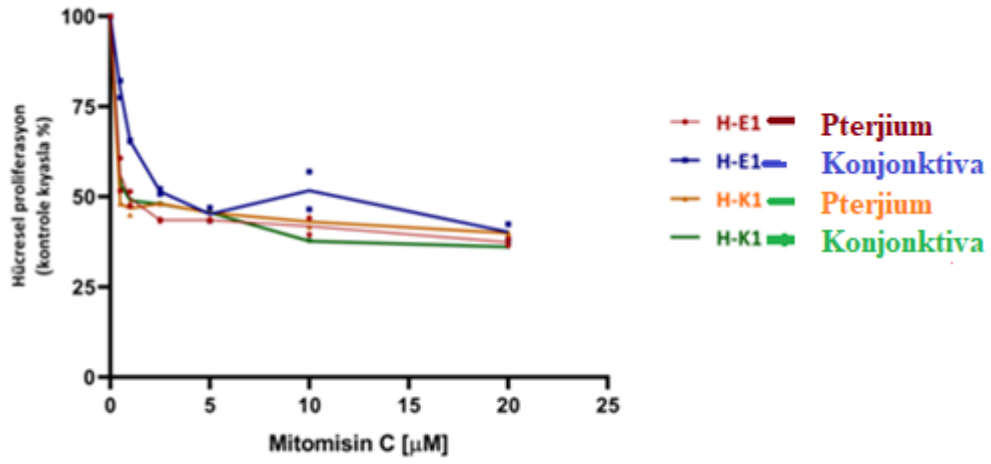
Trehaloz ve mitomisin C için hesaplanan IC50 değerleri H-K1 ve H-E1 hastalarından elde edilen pterjium ve konjonktiva değerleri kendi içlerinde OnewayAnova testi gerçekleştirilerek hesaplanmıştır. Sonuç olarak, H-K1 nolu hastada normal konjonktival hücrelerin pterjium hücrelerine kıyasla trehaloz için hesaplanmış IC50 oranları arasında istatistiksel olarak 1,44 kat (* $p < 0,0168$) fark saptanmıştır. Dolayısıyla, pterjimdeki fibroblastik aktiviteyi inhibe eden dozlarında normal konjonktivada fibroblastik aktiviteyi inhibe edici etkisi görülmemiştir. H-E1 nolu hastada normal konjonktival hücrelerin pterjium hücrelerine kıyasla trehaloz için hesaplanmış IC50 oranları istatistiksel olarak 1,6 kat (* $p < 0,0004$) artmış bulunmuştur. Yani erkek ve kadın cinsiyetlerde, pterjimdeki fibroblastik aktiviteyi inhibe eden dozlarında normal konjonktivada fibroblastik aktiviteyi inhibe edici etkisi

görülmemiştir, kadın cinsiyet ve erkek cinsiyetlerin istatistiksel olarak değerleri birbirine yakın olarak anlamlı bulunmuştur.

Yapılan hücre sağkalım deneyleri (MTT) sonucunda Mitomisin C verilen pterjium ve konjonktival hücrelerde elde edilen absorbens değerleri tablo 8 ve şekil 7’de gösterilmiştir

Tablo 8: Mitomisin C için kadın ve erkek hastadaki doz bağımlı absorbens değerleri

	H-K1				H-E1			
MİTOMİSİN C	PTERJİUM		KONJONKTİVAL		PTERJİUM		KONJONKTİVAL	
	M		AL		M		AL	
kontrol	0,56	0,53	0,59	0,637	0,55	0,52	0,55	0,6
		5				4		
0,5 µM	0,26	0,25	0,311	0,347	0,28	0,31	0,426	0,493
	9	7			4	8		
1 µM	0,25	0,25	0,28	0,321	0,28	0,24	0,361	0,392
	2	9			3	9		
2,5 µM	0,26	0,25	0,276	0,313	0,23	0,22	0,279	0,313
	9	7			8	9		
5 µM	0,24	0,25	0,27	0,289	0,23	0,22	0,258	0,26
	6	2			8	9		
10 µM	0,23	0,23	0,229	0,233	0,21	0,23	0,313	0,279
	3	8			7	1		
20 µM	0,22	0,21	0,211	0,232	0,20	0,2	0,233	0,228
	2	5			1			

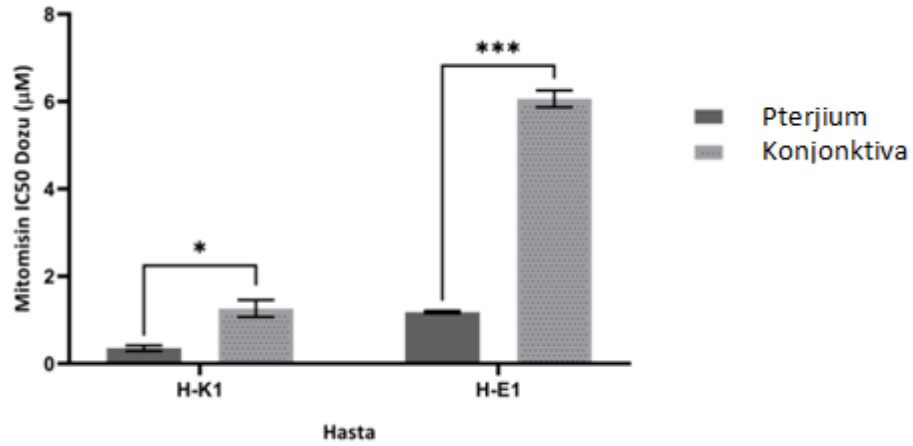


Şekil 7: Mitomisin C verilen pterjium ve konjonktival dokudaki absorbans grafiği

Elde edilen absorbans değerlerine bağlı olarak yapılan normalizasyon ve Non-linear Regresyon analizleri sonucunda hesaplanan IC₅₀ değerleri ve güven skorları(R²) değerleri aşağıda tablo 9 ve şekil 8’de gösterilmiştir.

Tablo 9: Mitomisin C için erkek ve kadın hasta pterjium ve konjonktiva dokularındaki IC₅₀ düzeyi ve Güven skoru(R²)

MİTOMİSİN C	H-E1 PTERJİUM	H-E1 KONJONKTİVAL	H-K1 PTERJİUM	H-K1 KONJONKTİVAL
IC ₅₀	1,159	5,927	0,3109	1,125
R SQUARED	0,9827	0,9151	0,9929	0,9919

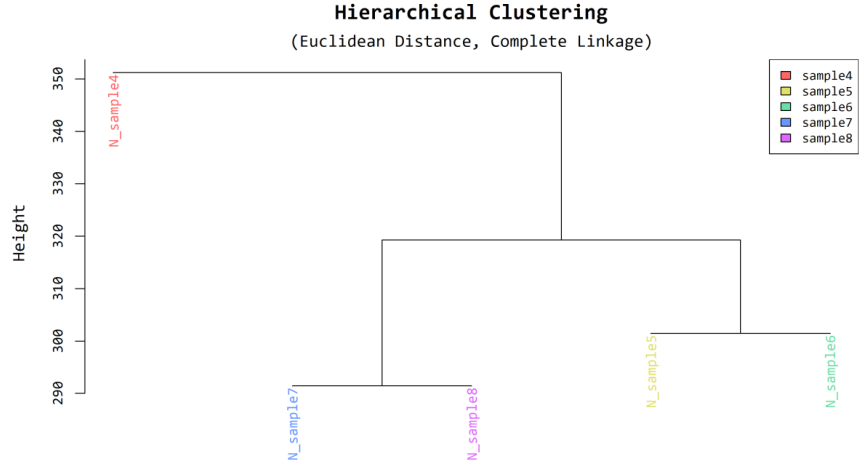


Şekil 8: Mitomisin C için Pterjium ve Konjonktival Dokuda IC50 değerleri

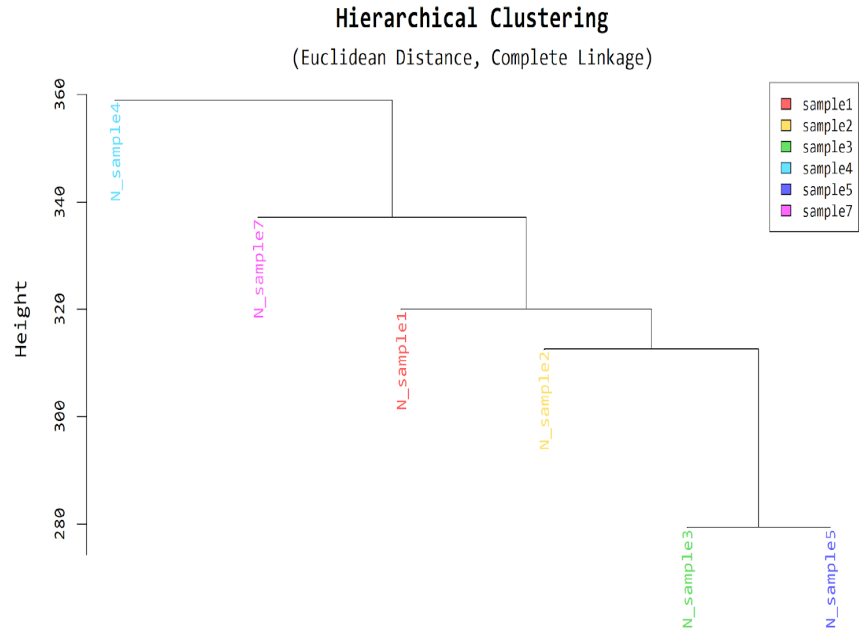
Diğer yandan, H-K1 nolu hastada mitomisin C için normal konjonktival hücrelerin pterjium hücrelerine kıyasla hesaplanmış IC50 oranları, istatistiksel olarak 3,62 kat fark (* $p < 0,0004$) saptanmıştır. H-E1 nolu hastada mitomisin için hesaplanmış IC50 dozu konjonktival hücrelerin pterjium hücrelerine kıyaslandığında istatistiksel olarak 5,14 kat (* $p < 0,0001$) fark saptanmıştır.

3. Mikro dizin ve eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu(Real Time PCR) ile ekspresyon analizi sonuçları

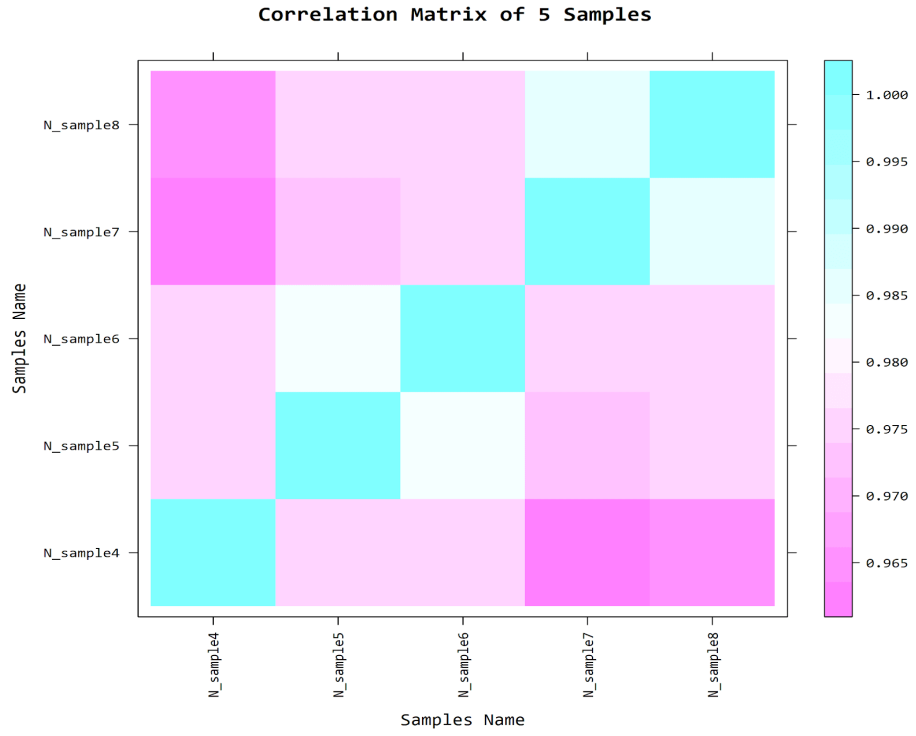
Mikrodizin analizi çalışılan 8 grup arasında yapılan Pearson Korelasyon Katsayısı, Hiyerarşik Kümeleme ve Korelasyon Matrisi analizleri sonucunda, gruplar arasındaki gen profili düzeyinde yakınlık düzeyi ve elde edilen sonuçların anlamlılığı şekil 9-10-11-12-13 ve 14’de gösterilmiştir.



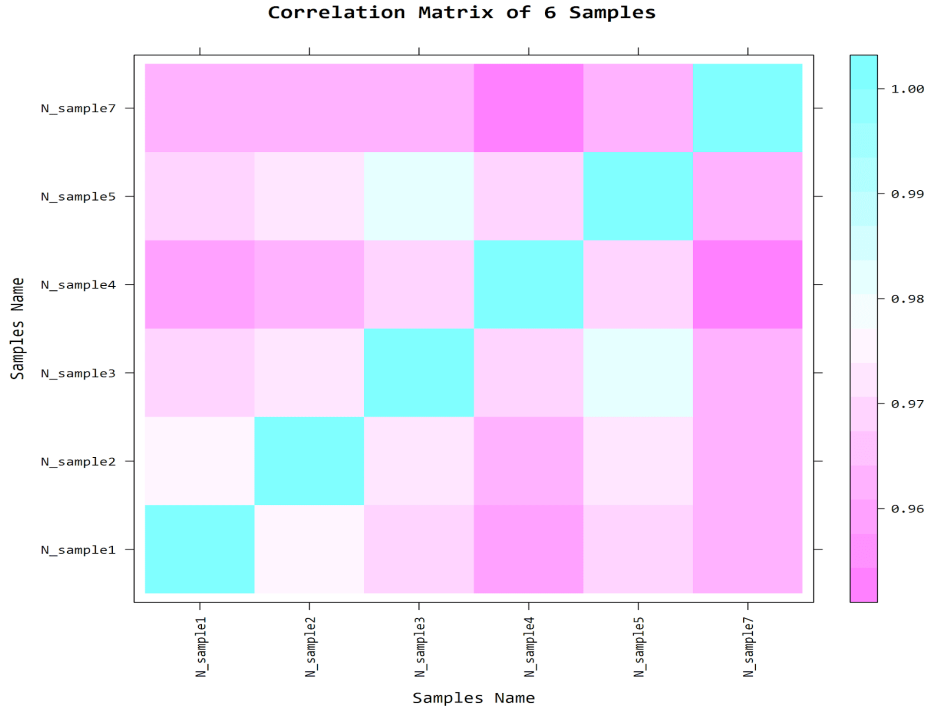
Şekil 9: 4-5-6-7 ve 8.örnekler arasındaki Hiyerarşik Kümeleme ait Bulgular



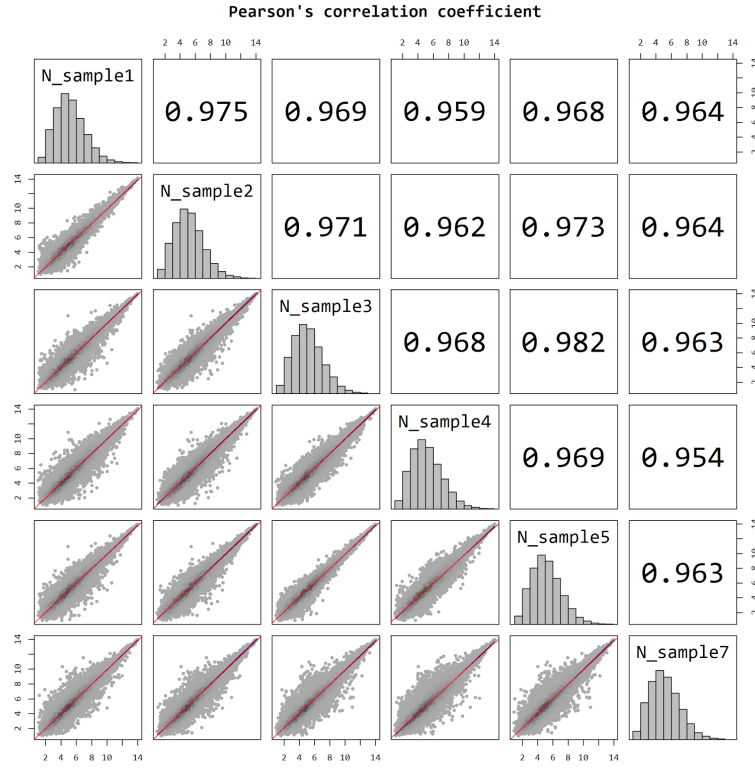
Şekil 10: 1-2-3-4-5 ve 7.örnekler arasındaki Hiyerarşik Kümeleme ait Bulgular



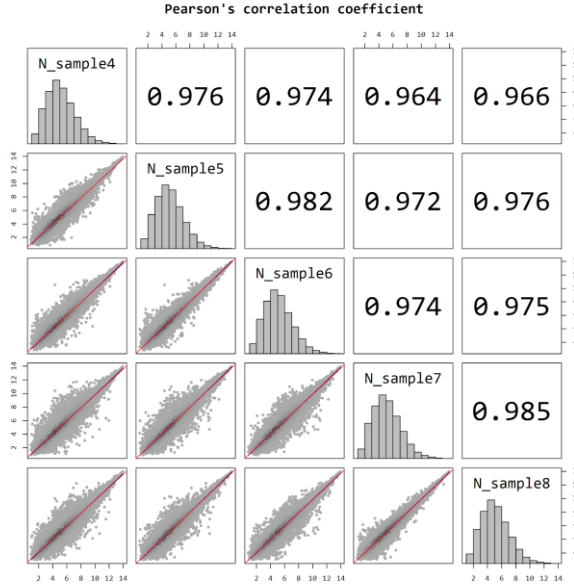
Şekil 11: 4-5-6-7 ve 8.örnekler arasındaki Korelasyon Matrisi Bulguları



Şekil 12: 1-2-3-4-5 ve 7.örnekler arasındaki Korelasyon Matrisi Bulguları

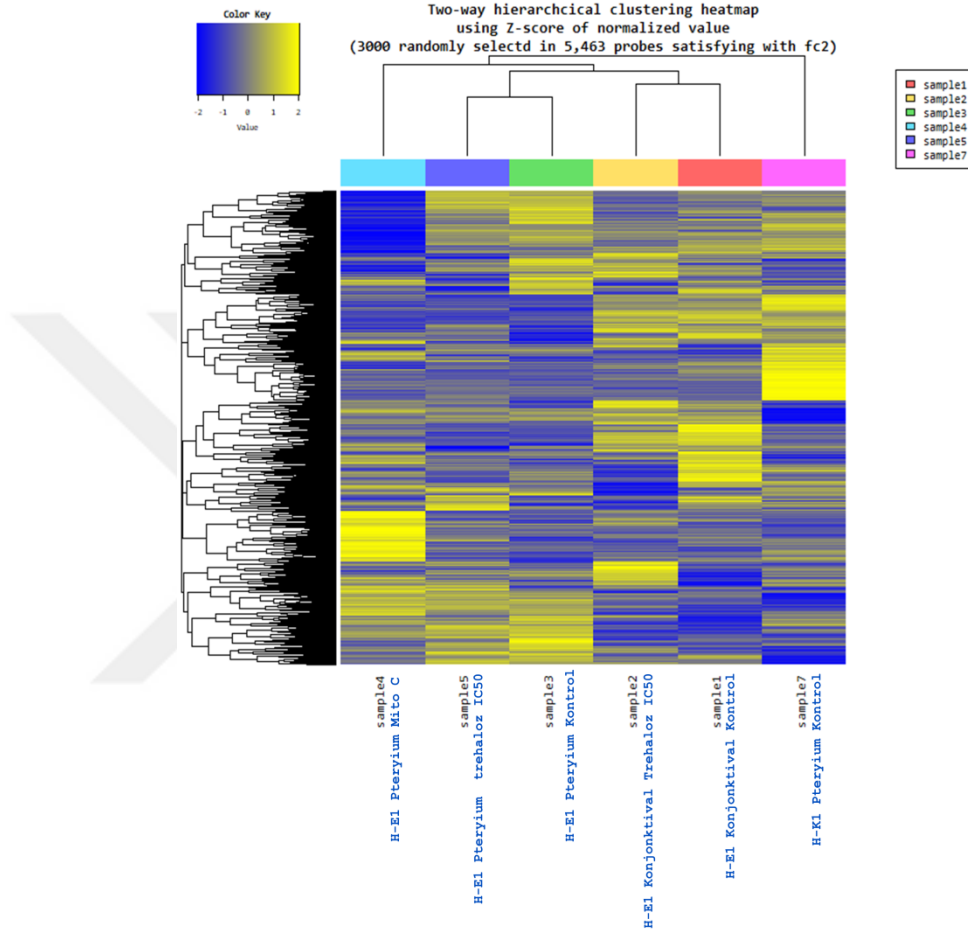


Şekil 13: 1-2-3-4-5 ve 7.örnekler arasındaki Pearson'ın Korelasyon Katsayısı Bulguları

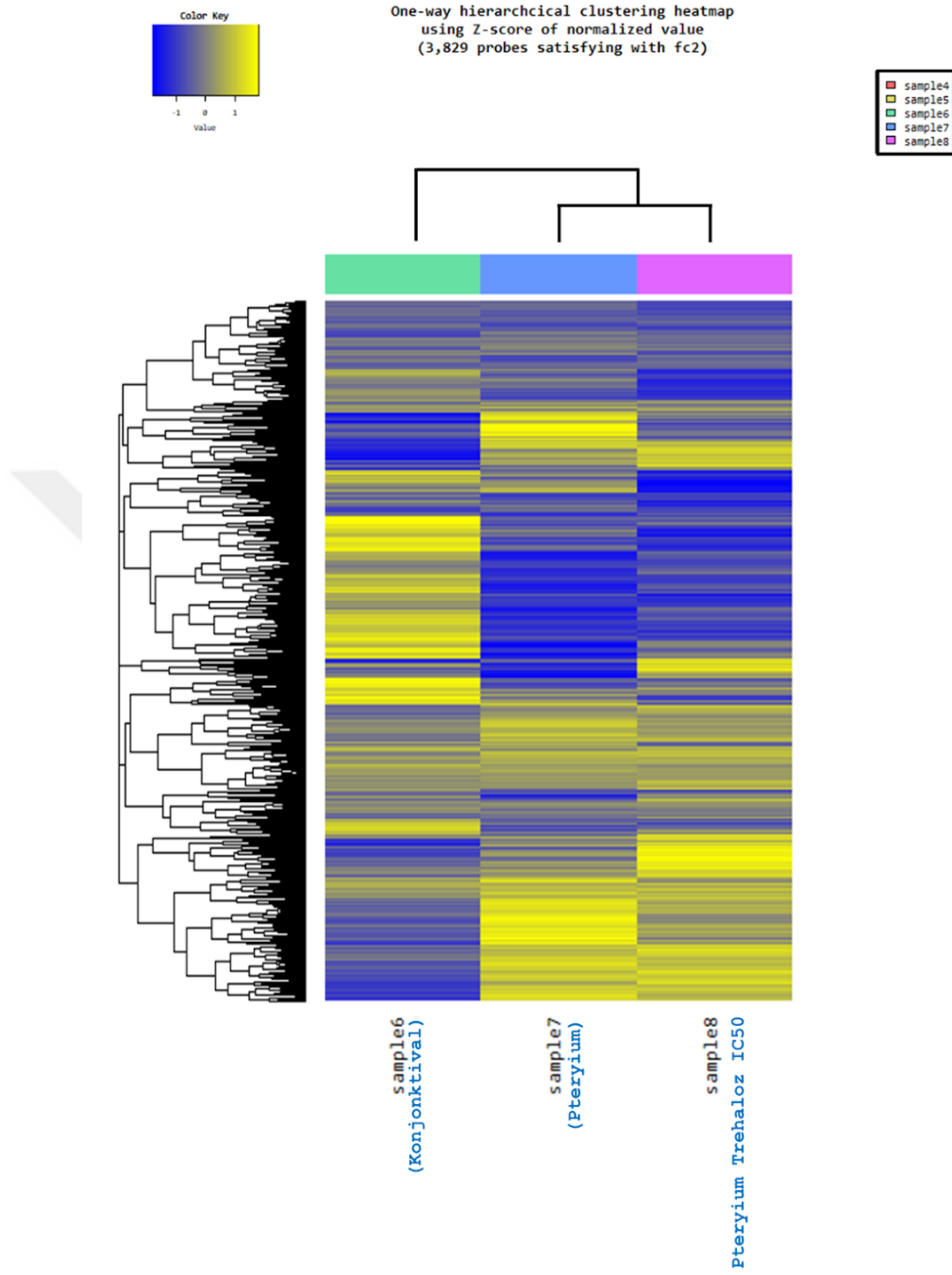


Şekil 14: 4-5-6-7 ve 8. örnekler arasındaki Pearson'ın Korelasyon Katsayısı Bulguları

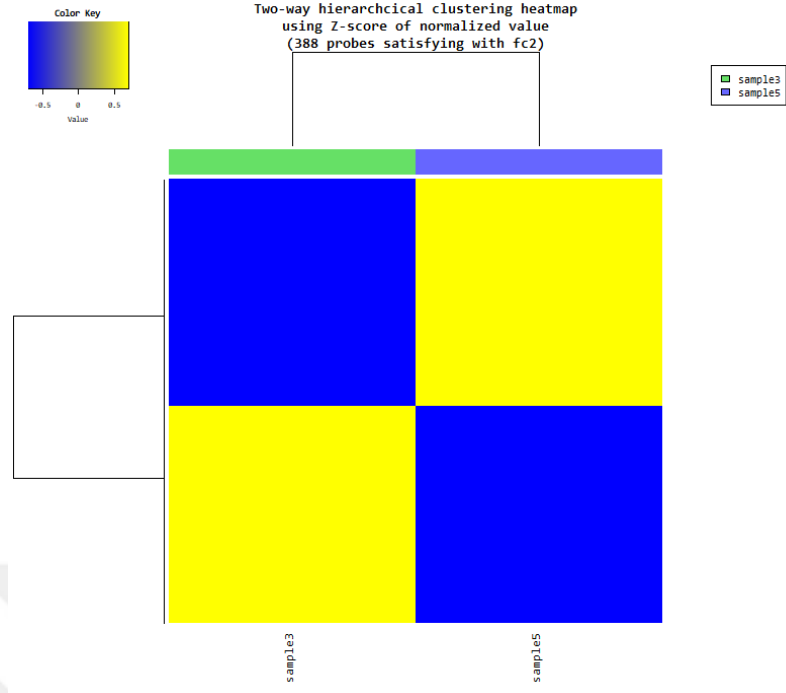
Hastalardan alınan pterjium ve konjonktiva dokusuna belirlenen dozlarda trehaloz uygulanması sonrası, pterjium ve konjonktiva hücrelerinden çalışılan mikrodizin analizi sonucunda genel gen profillerinin ekspresyon değişimleri şekil 15-16-17 ve 18 de gösterilmiştir.



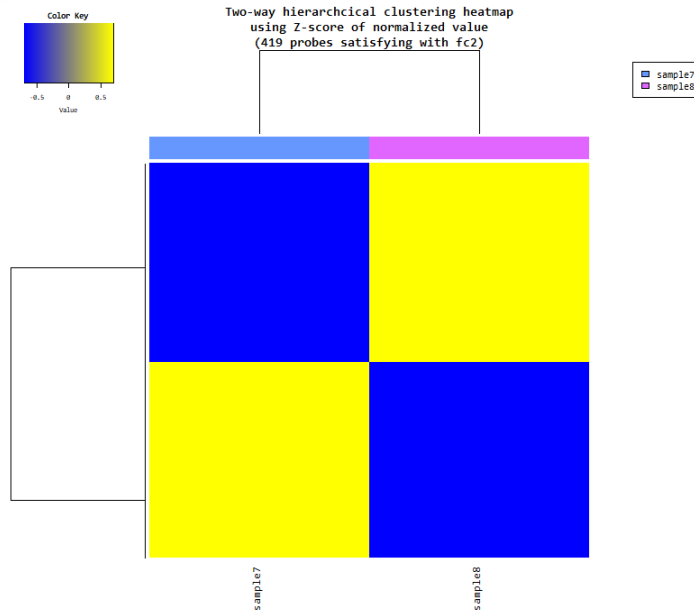
Şekil 15: örnek 1-2-3-4-5-7'nin Z skoru kullanılarak iki yönlü hiyerarşik kümeleme heatmap ile gösterimi



Şekil 16: örnek 4-5-6-7-8'in Z skoru kullanılarak tek yönlü hiyerarşik kümeleme heatmap ile gösterimi

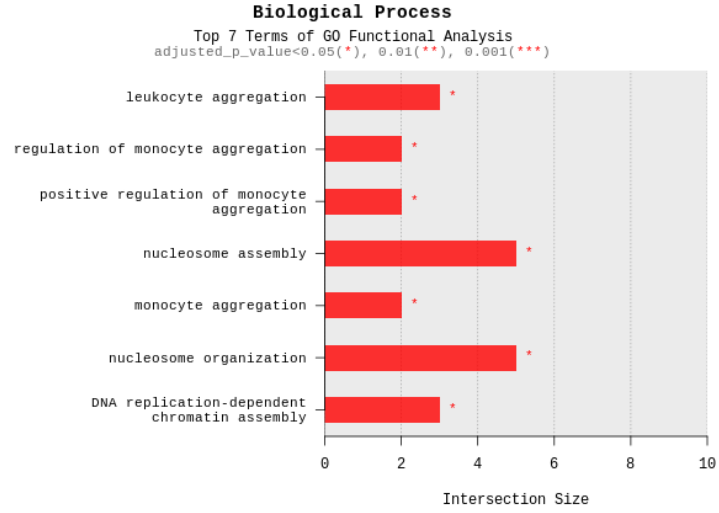


Şekil 17: örnek 3 ve 5'in Z skoru kullanılarak iki yönlü hiyerarşik kümeleme heatmap ile gösterimi

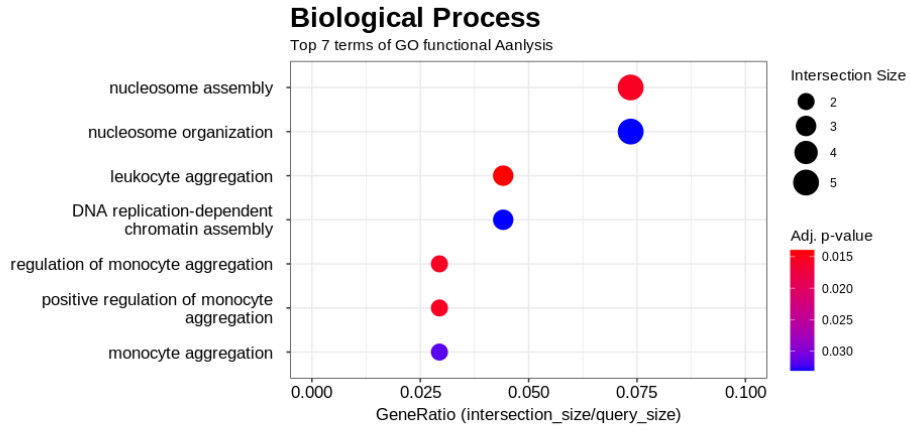


Şekil 18: örnek 7 ve 8'in Z skoru kullanılarak iki yönlü hiyerarşik kümeleme heatmap ile gösterimi

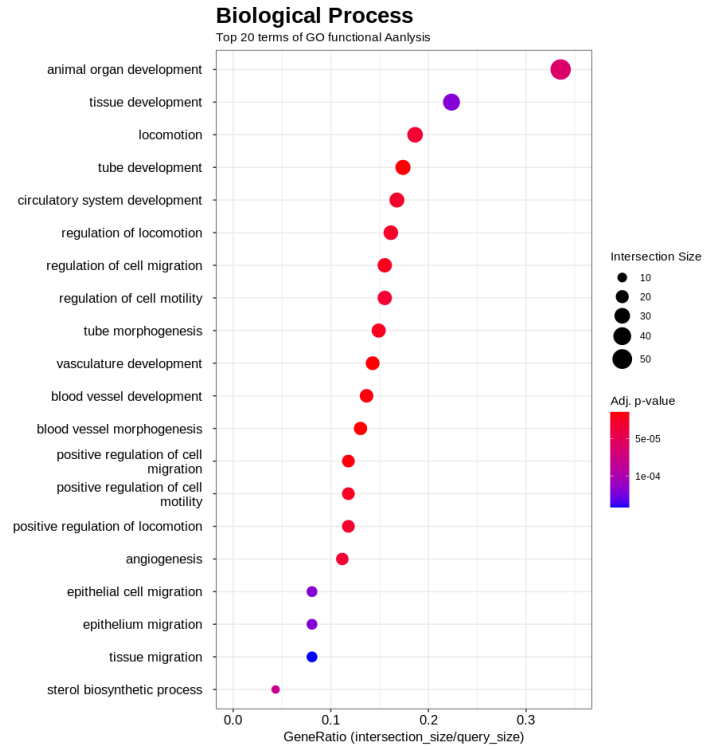
Hastalardan alınan pterjium dokularına Trehaloz uygulanması sonrası hücrelerde ifadeleri değişen genlerin rol oynadığı hücresel süreçler şekil 19-20-21-22’de gösterilmiştir.



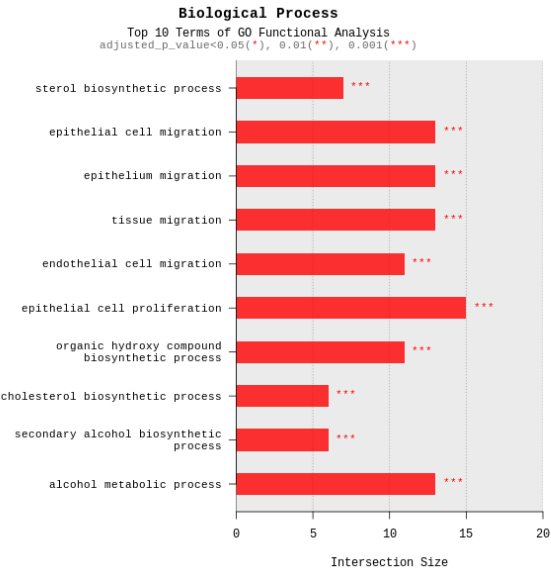
Şekil 19: Trehaloz uygulanan pterjium dokusundaki hücrelerde ifadeleri değişen genlerin rol oynadığı hücresel süreçler



Şekil 20: Trehaloz uygulanan pterjium dokusundaki hücrelerde ifadeleri değişen genlerin rol oynadığı hücresel süreçler



Şekil 21: Trehaloz uygulanan pterjiium dokusundaki hücrelerde ifadeleri değişen genlerin rol oynadığı hücresel süreçler



Şekil 22: Trehaloz uygulanan pterjiium dokusundaki hücrelerde ifadeleri değişen genlerin rol oynadığı hücresel süreçler

4. Mikrodizin gen Sonuçları ve Eş-zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Doğrulama

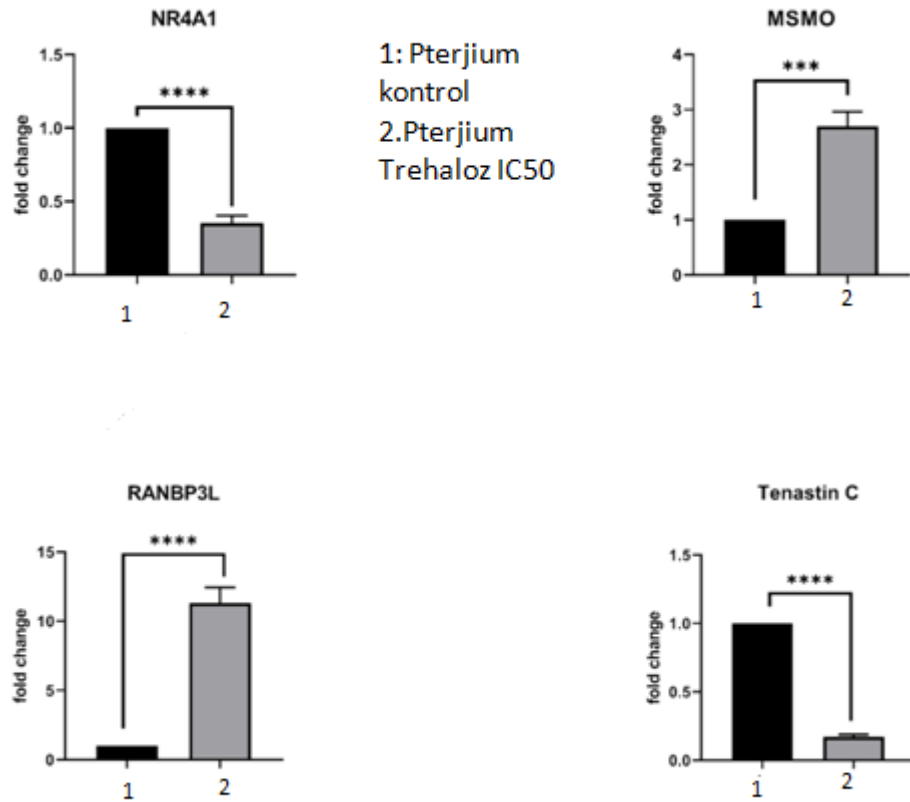
Çalışmaya dahil edilen 3 erkek 3 kadın hastadan alınan pterjium ve konjonktival dokular kültür aşamalarından sonra trehaloz ve mitomisin C uygulanıp yukarıda bahsedildiği gibi 8 örnek şeklinde mikrodizin çalışmasına gönderildi. Mikrodizin çalışmasında çalışmamızla ilgili olabilecek, pterjiumun oluşum ve gelişim mekanizmaları ile ilgili hücresel süreçlerde rol oynayan genler ve bu genlerin ifadelerindeki değişim tablo 10'de gösterilmiştir.

Tablo 10: Pterjium genetiğinde rol oynayan genlerin ekspresyon değişimleri kat sayı cinsinden gösterimi

	Pterjium Trehaloz IC50/ Pterjium kontrol	Pterjium/Konjonktival
NR4A1	-2,723893	3,221204
MSMO	2,495553	-2,6789543
RANBP3L	11,910647	-1,6789543
TNC, Tenastin C	-6,114565	5,1712749
DHCR7	3,229028	1,062402
CXCL8	-2,556464	2,5167815
CXCL12	-2,556465	2,516782
HMOX1	-2,571678	5,465828
CCL2	2,450150	-1,629365
RANBP3L	11,9	-1,67
VIM(Vimentin)	1,23	-1,22
TGFBR2	1,85	-1,65
TGFBR3	5,32	-1,59
ASPN	-5,24	3,19

Mitomisinin çalışmaya dahil edilmesinin sebebi trehalozun, pterjium ve konjonktiva hücrelerinin hücre proliferasyon indekslerine olası etkisinin incelenmesi açısından pozitif kontrol olarak çalışmaya dahil edilmiş olup sahip olduğu etki mekanizmasının trehaloza göre farklı olmasından dolayı transkriptom aşamalarında referans olarak kullanılmamıştır.

Eş-zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu(PCR) ile Doğrulama sonuçları şekil 23’de verilmiştir.



Şekil 23: NR4A1,MSMO1,RANBP3L VE Tenastin C genlerinin Pterjium ve Trehaloz uygulanmış Pterjium dokularındaki kat değişiminin Eş-zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu(PCR) ile Doğrulama Sonuçları

TARTIŞMA

Çalışmamızda tezin ana fikrine yönelik olarak invitro koşullarda pterjium dokusundaki fibroblastların proliferasyonunu trehaloz ile inhibe edildiğini ortaya koyduk. Trehalozun pterjium dokusunda fibroblastların %50 canlılık gösterdiği inhibisyon konsantrasyonu(IC50) olarak 418,3 milimolar(mM) olarak saptadık. Konjonktivadaki fibroblastlar için IC50 değeri ise 610.9 milimolar idi. Buradan hareketle trehalozun pterjiumda güvenilir bir ajan olarak kullanılabileceği, pterjiumda inhibitör etki gösterdiği dozlarda normal konjonktival dokularda inhibitör etki oluşturmadığını ortaya koyduk. Literatürde yapılan çalışmalarla da bizim çalışmamıza benzer şekilde sonuçlar ortaya konmuştur. Toshihiko Matsuo'nun yaptığı çalışmada(118) kuru göz hastalarında trehalozun 4 hafta boyunca topikal olarak kullanılmasından sonra oküler yüzeyin floresein ve rose bengal boyama skorları, gözyaşı filmi kırılma süresi, hyalüronan veya hidroksietilselüloz içeren göz damlalarına kıyasla önemli ölçüde iyileşme saptanmıştır ($P < 0.001$). Herhangi bir yan etki bildirilmemiştir. Trehalozun pterjium dokusundaki inhibitör etkilerini kültür ortamında izleyip saptadıktan sonra bu etkileri hangi hücre içi yollar ve genler üzerinden yaptığına ışık tutabilmek için mikrodizin analizi yaptık. Bu aşamada da çarpıcı ve ileride yapılacak araştırmalara yön verecek sonuçlar bulduk.

Kimio Takeuchi ve ark.(119) trehalozun fibroblastik aktivite üzerindeki etkilerini hem in vitro hem de in vivo olarak inceledikleri çalışmada bizim çalışmamızla uyumlu sonuçlar saptanmıştır. Bu çalışmada in vitro olarak normal insan dermal fibroblastları ve normal insan epidermal keratinositleri, çeşitli konsantrasyonlarda trehaloz içeren ortamlarda kültüre edildi.Trehaloz tarafından değiştirilen vimentin ve α düz kas aktini (α -SMA) ifadeleri, Western blot ile yarı kantitatif olarak ölçüldü. İn vitro deneylerle elde edilen sonuçlar, kültüre edilmiş fibroblastların büyüme aktivitelerinin doza bağlı bir şekilde trehaloz tarafından inhibe edildiğini göstermiştir. Fibroblastlar, trehalozun $\geq$ %5'i olan trehaloz konsantrasyonları tarafından güçlü bir şekilde inhibe edildiği gösterilmiştir. Western Blot tekniği ile Vimentin ve α -SMA ifadeleri ise trehaloz ile azaltılmış olarak saptanmıştır. Yine aynı çalışmada in vivo olarak, basit konjonktival insizyon veya trabekülektomiden sonra tavşan gözlerine topikal olarak %5 veya %10 trehaloz

damlatıldı. Vimentine özgü antikorlar kullanılarak cerrahi yaranın durumu morfolojik ve immünohistokimyasal olarak değerlendirildi. Postoperatif trehaloz uygulaması, kontrollere kıyasla konjonktiva ve sklera arasında daha az sıkı adezyonla sonuçlandı. İmmünohistokimyasal çalışmalar, topikal trehaloz ile tedavi edilen konjonktival yarada izolektin B4, vimentin ve α -SMA boyanmasının azaldığını göstermiştir. Bizim yaptığımız çalışmada pterjium dokusundaki vimentin geni(VIM) ekspresyonlarına bakıldığında, normal konjonktivaya oranla kat sayısının 1,23 olduğu ve bu çalışma ile uyumlu olduğu saptanmıştır. Trehaloz verilen pterjium dokusu ise trehaloz verilmeyen pterjiumdaki VIM geninin kat sayısının -1,22 olduğu yani ekspresyonda azalma olduğu izlenmiştir. Buradan hareketle çalışmamızda trehalozun pterjiumda vimentin ekspresyonunda azalmaya yol açtığı ve bahsedilen çalışmanın sonuçları ile uyumlu olduğu saptanmıştır. Takashi Kudo ve ark. yaptığı bu çalışmada trehalozun vimentin ve α -SMA boyanmasını azaltmakla kalmayıp ayrıca konjonktival yara dokusundaki fibroblastların miyofibroblastlara dönüşümünü de engellediği bildirilmiştir.

Tong ve ark. (120) pterjiumda ifadeleri artan ve azan genleri belirlemeye yönelik yaptıkları çalışmada 4 erkek 4 kadın toplamda 8 primer pterjium hastasını dahil ettikleri çalışmada, pterjium dokusunda CLCA2 geninin kat değişimi(fold change) 2.226 olarak saptanmıştır. Bu gen, kalsiyumla aktive olan klorür kanalı düzenleyici (CLCR) protein ailesinin bir üyesini kodlar. Bu ailenin üyeleri, klorürün plazma zarı boyunca taşınmasını düzenler. Kodlanmış protein, N- ve C-terminal fragmanları üretmek için otoproteolitik olarak işlenir. Bu genin ekspresyonu, DNA hasarına yanıt olarak tümör baskılayıcı protein p53 tarafından düzenlenir. Bu gen fibroblastik hücrelerde iyon taşınması, hücre adezyonu ve klorürün membranlar arası taşınmasını kontrol eder.(121) Bizim yaptığımız çalışmada ise pterjium dokusunda aynı hastadan alınan normal konjonktival dokuya oranla kat değişimi 10.00 olarak saptadık. Aynı hastanın pterjium dokusuna belirlene dozlarda verilen trehaloz sonrasında trehaloz verilen bu pterjium dokusunun hiç trehaloz uygulanmayan kontrol grubu pterjium dokusuna oranla kat değişimi 1.24 olarak saptadık. Kat değişim oranının azalması trehalozun pterjium dokusundaki bu genin ekspresyonunda azalmaya yol açabileceğini ve pterjiumdaki fibroblastlarda iyon taşınması, hücre adezyonunu durdurup pterjium gelişimini bloke edebilir.

Tong ve ark. yaptığı çalışmada(120) pterjium dokusunda aynı hastadan alınan normal konjonktival dokuya oranla ASPN geninin kat değişimi ise 2.903 olarak bulunmuştur. Bu gen, küçük l6sin a4ısından zengin proteoglikan ailesinin 6yesi olan bir kıkırdak h6cre dışı proteini kodlar. Kodlanan protein, kıkırdakta transforme edici b6y6me fakt6r6-beta 1 ile ind6klenen gen ekspresyonunu inhibe ederek kondrojenezini d6zenleyebilir. Bu protein ayrıca kollajen ve kalsiyumu bağlar ve kollajen mineralizasyonunu ind6kleyebilir. Bu genin aspartik asit tekrar b6lgesindeki polimorfizmler, osteoartrit ve ayrıca intervertebral disk hastalığı ile ilişkilidir.(122) Ayrıca bu gen 4alışmamızla ilgili olarak transforme edici b6y6me fakt6r6 resept6r6(TGFBR) sinyal yolunun negatif d6zenlenmesinde 6nemli bir rol oynar. Bizim yaptığımız 4alışmada ise pterjium dokusunda aynı hastadan alınan normal konjonktival dokuya oranla kat değişimi - 5.2457 olarak saptadık. Aynı hastanın pterjium dokusuna belirlediğimiz oranda verdiğimiz trehaloz sonrasında trehaloz verilen bu pterjium dokusunun hi4 trehaloz verilmeyen pterjium dokusuna oranla kat değişimi 3.190 olarak saptadık. Trehaloz verildiğinde artan ASPN geni pterjium dokusunda TGFBR sinyalini negatif y6nde d6zenleyerek fibroblastların proliferasyonunu engelleyebilir.

Tenascin C(TNC) geni uzamsal ve ge4ici olarak sınırlı bir doku dağılımına sahip bir h6cre dışı matriks proteinini kodlar. Bu protein, dis6lfide bağlı alt birimlere sahip homoheksameriktir ve 4oklu EGF benzeri ve fibronektin tip-III alanlarını i4erir. Gelişim, sinaptik plastisite ve n6ronal rejenerasyon sırasında g64 eden n6ronların yanı sıra aksonların y6nlendirilmesinde rol oynar.(123) Yang ve ark.(124) yaptığı bir 4alışmada TNC ekspresyonu, kolorektal karsinom dokularında belirgin şekilde up reg6le edildi ve daha k6t6 klinik sonu4larla ilişkilendirildi. TNC aşırı ekspresyonu, klinik kolorektal karsinom doku 6rneklerinde kanser k6k h6cre benzeri işaretleyici LSD1, h6cre d6ng6s6 belirte4leri CDK4 ve p16 ve hedgehog sinyal yolu ile ilgili genler SMO ve GLI1 ile pozitif olarak ilişkiliydi. Ayrıca TNC geni fokal adezyon ve h6cre dışı matriks-resept6re etkileşimin, h6cre matriks adezyonu, integrinin d6zenlediği h6cre adezyonu sağlayarak h6creysel proliferasyonu d6zenler.(125) Bizim 4alışmamızda TNC geninin ekspresyonunu pterjium dokusunda normal konjonktivaya oranla kat değişimi 5.17 artmış olarak saptadık. Bu pterjium dokusuna trehaloz verildiğinde de, bunun trehaloz verilmeyen pterjium dokusundaki

kat değişimi -6.11 olarak azalmış saptadığ. Yani trehaloz bizim alışmamızda TNC geninde negatif bir ekspresyona yol açtı. Buradan hareketle trehaloz pterjium dokusunda büyüme,korneaya invazyon, hücre adezyonu, hücre dışı matriks organizasyonu, yara dokusuna cevap gibi gelişim basamaklarında inhibisyona yol açabilir.

NR4A1 geni, steroid-tiroid hormonu-retinoid reseptör st ailesinin bir üyesini kodlar. Ekspresyon, insan lenfositlerinde fitohemaglutinin ve yakalanmış fibroblastların serum uyarımı ile indüklenir. Kodlanmış protein, bir nükleer transkripsiyon faktörü olarak işlev görür. Proteinin çekirdekten mitokondriye translokasyonu apoptozu indükler.(126) Drabsch ve ark.(127) yaptığı çalışmada NR4A1'i TGF- β sinyalinin güçlü bir aktivatörü olarak tanımlıyorlar. NR4A1, AXIN2–RNF12/ARKADIA kaynaklı SMAD7 bozulmasını kolaylaştırarak TGF- β /SMAD sinyalini destekler. NR4A1, SMAD7 ve AXIN2 ile etkileşime girer ve güçlü bir şekilde ve doğrudan AXIN2 ifadesini indükler. NR4A1 kaybı, TGF- β ile indüklenen epitelyal-mezenkimal geçişi ve metastazı inhibe ederken, hafif NR4A1 ektopik ekspresyonu, TGF- β 'ya bağımlı bir şekilde metastazı uyarır. nemli olarak, enflamatuvar sitokinler, NR4A1 ekspresyonunu güçlü bir şekilde indükler ve in vitro ve in vivo olarak TGF- β aracılı meme kanseri hücre gn, istilasını ve metastazını güçlendirir.. Özellikle, NR4A1 ekspresyonu, yüksek immün infiltrasyonu olan meme kanseri hastalarında yükselir ve ekspresyonu, fosforile SMAD2 seviyeleri ile zayıf bir şekilde ilişkilidir ve kötü prognozun bir göstergesi olarak gösterilmiştir ve çalışmada meme kanserinde pro-onkojenik TGF- β sinyalinin hiperaktivasyonu için önemli bir belirleyici olarak inflamasyonun neden olduğu NR4A1'i ortaya çıkartılmıştır. Bizim alışmamızda NR4A1 geni pterjium dokusunda normal konjonktivaya oranla kat değişimi 3.22 olarak saptanmıştır. Trehaloz verilen pterjium dokusunda, trehaloz verilmeyen pterjium dokusun oranla kat değişimi -2.72 olarak saptanmıştır. Ancak Tong ve ark.(120) alışmada pterjiumlu hastalardan alınan dokularda, normal konjonktivaya oranla NR4A1 geninde kat değişimi 0.435 olarak saptamışlardır. Bu gen ifadesinde azalma bizim bulgularımızla uyuşmamaktadır. Bu onların yaptığı çalışmada seçilen hastaların farklı pterjium evresinde olmasından kaynaklanmış olabilir.

Çalışmamızda TGFBR2 VE TGFBR3'ün ifadelerine baktığımızda dikkat çekici sonuçlar izlenmektedir. Bilindiği gibi inflamasyon, yara iyileşmesi gibi olaylarda hücrelerde bazı büyüme faktörlerinin üretimi artar. Bunlardan biri de TGF β 'dır. Pterjiumda da üretimi artmış olarak bulunmuştur.(128) TGFBR2 geni tarafından kodlanan protein, bir protein kinaz alanına sahip olan, TGF-beta reseptörü tip-1 ile bir heterodimerik kompleks oluşturan ve TGF-beta'yı bağlayan bir zar-ötesi proteindir. Bu reseptör/ligand kompleksi, daha sonra çekirdeğe giren ve hücre proliferasyonu, hücre döngüsünün durdurulması, yara iyileşmesi, immünsüpresyon ve tümör oluşumu ile ilgili genlerin transkripsiyonunu düzenleyen proteinleri fosforile eder. Ayrıca dokudaki kan damarlarının gelişimi, mezenşimal hücre(fibroblast) proliferasyonu ve TGBR sinyal yolunun düzenlenmesini sağlar. (129) Bizim çalışmamızda pterjium dokusunda normal konjonktivaya oranla TGFBR2 geninin kat sayısı 1,85 olarak saptadık. Trehaloz verilen pterjiumun , hiç bir madde verilmeyen pterjiuma kıyasla kat sayısı ise -1,65 olarak bulunmuştur. TGBFR3 geni ise epitelyal hücrelerin mezenşim hücrelerine geçişi, hücre büyümesi gibi rolleri vardır.(130) Bizim çalışmamızda pterjiumda konjonktivaya oranla TGBFR3'ün geninin ekspresyon kat sayısı 5,32 olarak saptanmıştır. Trehaloz verilen pterjium dokusu, hiçbir madde verilmeyen pterjiumla kıyaslandığında bu kat sayısı -1,59 olarak saptanmıştır. Buradan hareketle pterjium dokusuna trehaloz verildiğinde, TGF β 'nın negatif düzenlenmesini sağlayan NR4A1 geninin ifadesinin artması, TGFBR2 VE TGFBR3'ün ifadelerinin azalması özellikle TGF β sinyal yolağı üzerinden ve yukarıda anlatılan diğer hücre içi ve dışı rollerinden dolayı; trehaloz pterjium gelişimini inhibe edebilir.

ALPL geni, alkalın fosfataz protein ailesinin bir üyesini kodlar. En az dört farklı ancak ilişkili alkalın fosfataz vardır: bağırsak, plasental, plasenta benzeri ve karaciğer/kemik/böbrek (dokuya özgü olmayan). İlk üçü kromozom 2'de birlikte bulunurken, dokuya özgü olmayan form kromozom 1'de bulunur. Bu genin ürünü, herhangi bir özel dokuda eksprese edilmeyen ve bu nedenle, zara bağlı glikozile edilmiş bir enzimdir. Bu enzim kemik mineralizasyonunda rol oynayabilir. Bu gendeki mutasyonlar hipofosfatazyaya yol açabilir.(131) ALPL geni ile ilgili literatürde prostat kanseri ile ilgili olduğuna dair çalışmalar mevcuttur. Rao ve ark.(132) yaptığı çalışmada ALPL ekspresyonu, prostat karsinom hücrelerinde arttığı tespit edilmiştir

Tümörden türetilen ALPL ekspresyonunda veya ALP aktivitesinde bir azalma, hücre ölümünü, mezenkim dokusundan epitelyuma geçişi arttırdı ve migrasyonu azalttı. Bu çalışmada ALPL ekspresyonunda artış saptanmış olup bu artış, migrasyonu azaltmıştır. Bizim çalışmamızda ise pterjium dokusundaki hücrelerde, normal konjonktivaya oranla ALPL ekspresyonunda kat değişimi 8,13 olarak saptanmıştır. Aynı pterjium dokusuna trehaloz verildiğinde ise; trehaloz verilen pterjium dokusundaki ALPL ekspresyonu, trehaloz verilmeyen pterjium dokusuna oranlandığında kat değişimi -1.20 saptanmıştır. Buradan hareketle trehaloz verilen pterjium dokusunda ALPL gen ekspresyonu azalmıştır. Bu gen ekspresyonundaki azalma pterjium dokusunda migrasyonu azaltıp , trehalozun pterjiumun ilerlemesini durdurabileceğini düşündürmektedir.

MSMO1(Metilsterol Monooksijenaz 1) geni , bir protein kodlama genidir. MSMO1 ile ilişkili hastalıklar arasında Mikrosefali, Konjenital Katarakt ve Psoriaziform Dermatit ve Ck Sendromu bulunur . İlgili yollar arasında kolesterol biyosentezi ve metabolizmanın süper yolu vardır . Bu gene ilişkin gen ontolojisi (GO) açıklamaları arasında oksidoredüktaz aktivitesi ve C-4 metilsterol oksidaz aktivitesi yer alır . Bu genin önemli bir paralogu FAXDC2'dir. (133) MSMO1 geninin hücre içi yolaklardaki görevleri ve bu genin ekspresyonundaki değişimlerinde ortaya çıkan tümoral proliferasyonlarla ilgili literatürde çalışmalar mevcuttur. Cao R. ve ark.(134) yaptığı bir çalışmada pankreas karsinomlu olgularda MSMO1 geninin rolünü incelemişlerdir. Kanser metastazındaki temel anahtar epitel-mezenkimal geçiştir(EMT). MSMO1'in pankreas kanser hücre işlevindeki etkisini doğrulamak için, Capan-2, Panc-1 ve SW1990 hücrelerinde RNA girişimini veya negatif kontrolü (NC) transfekte edildiği ve sonuçlarda, EMT benzeri hücre morfolojisi, MSMO1'in negatif eksprese edilmesi ile uyarıldı, hücreler epitel özelliklerini kaybetti ve NC grubu ile karşılaştırıldığında iğ/fibroblast benzeri bir morfoloji saptadılar. Çalışmada özetle MSMO1 geninin negatif ekspresyonun hücre göçünü ve adezyonu artırdığı ortaya konmuştur. Bizim çalışmamızda da pterjium dokusunda MSMO1 geninin kat değişimi, aynı hastadan alınan normal konjonktivaya oranla -2,67 saptandı. Aynı pterjium dokusuna trehaloz uygulandığında kat sayısı, trehaloz verilmeyen pterjiuma oranla 2,49 saptandı. Buradan hareketle trehaloz verilen pterjium dokusunda MSMO1 geninin ekspresyonu artmış olduğu saptanmıştır. Dolayısıyla trehaloz bu gen

üzerinden pterjium hücrelerinde migrasyon ve invazyonu azaltabileceği düşünülmüştür.

RANBP3L geninin epitelyal-mezenkimal hücre farklılaşmasının negatif kontrolü, moleküler fonksiyon düzenlenmesi, hücrel süreçlerin negatif kontrolü, çoklu hücre organizma süreçlerinin kontrolü gibi görevleri vardır.(135) Chernyakov ve ark(136) yaptığı bir çalışmada RANBP3L geninin kaybının yada diğer bir ifadeyle gen ekspresyonundaki azalmanın fare renal hücre modellerinde normal renal hücrelerin renal kanser hücreye fenotipine döndüğünü ortaya koymuştur. Çalışmada tedavide yeni bir seçenek olarak RANBP3L geninin seçilmesinin kanser oluşumunu önlemek için faydalı olabileceği öne sürülmüştür. Benzer şekilde bizim çalışmamızda da pterjium dokusunda RANBP3L geninin kat değişimi, aynı hastadan alınan normal konjonktivaya oranla -1,67 olarak saptandı. Aynı pterjium dokusuna belirlenen dozda trehaloz uygulandığında ise RANBP3L geninin kat değişimi, trehaloz verilmeyen pterjiüma kıyasla 11,9 olarak saptandı. Böylece pterjium dokusunda ifadesi azalan RANBP3L geni, trehaloz verilince önemli oranda artmış oldu. RANBP3L geninin azalması pterjiümda kontrolsüz fibrovasküler çoğalma ile ilişkili olabilir ve trehalozun gen ifadesini artırıcı olan bu etkisi fibrovasküler proliferasyonu inhibe edebilir.

Wei-Ping Zhou ve ark.(128) yaptıkları çalışmada pterjiümda fibroblast büyüme faktörlerinin(FGF) ifadelerinin arttığını ve bu artışın pterjium patogenezinde etkili olduğunu ifade etmiştir. Biz yaptığımız bu çalışmada FGF7 VE FGF10 ile ilgili dikkat çekici sonuçlar saptadık ve literatürle de uyumluydu. Çalışmamızda pterjiümda normal konjonktivaya kıyasla FGF7 geninin ekspresyon kat sayısı 11,02 iken FGF10 geni için bu değer 2,11 olarak saptadık. Pterjium dokusuna trehaloz uygulayıp bunu , hiç bir madde verilmeyen trehalozla kıyasladığımızda FGF7 geni için ekspresyon kat sayısı -1,22 olurken, FGF10 geni için bu değer -1,66 olarak değişti. FGF7 geni FGFR sinyal yolağının aktiflenmesi, kemotaksis, MAPK yolağı aktivasyonu ile fibroblastlarda hücre büyümesi, hücre proliferasyonu ve hücre farklılaşması gibi hücre fonksiyonlarının düzenlenmesinde rol oynayan proteinleri kodlayan genlerin transkripsiyonuna yol açar.(137) FGF10 geni ise anjiyogenez, kan damarı modellenmesi, migrasyon ve fibroblast proliferasyonuna yol açar. (138) Trehaloz

FGF7 ve FGF10 genleri üzerindeki negatif ekspresyon etkisiyle pterjium gelişimini durdurabilir.



SONUÇ

Çalışmamızda toplamda 6 hastadan alınan pterjium dokusu ve normal etkilenmemiş konjonktiva öncelikle primer kültüre edildi. Trehaloz ve mitomisin uyguladığımızda trehalozun pterjium dokusunda fibroblastları in vitro olarak inhibe ettiği ve bu dozlarda normal konjonktival dokuda henüz IC50 dozuna ulaşmadığını ortaya koyduk. Mikrodizin çalışması ve eş-zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu ile de bu inhibitör etkilerin hangi hücre içi yolaklar ve genler üzerinden olabileceğini saptadık.. Özellikle VIM, FGF7, FGF10, TGFBR2, TGBR3 MSMO1, Tenascin C, RANBP3L, NR4A1, IGFBP4, CLCA2, SERPIN2, ASPN, ALPL genlerinde trehaloz verildiğinde çarpıcı ekspresyon değişiklikleri izledik. Yine literatürdeki çalışmalara benzer şekilde pterjiumda ekspresyonları artan ve azalan genleri inceleme ve tespit etme fırsatı bulduk ve sonuçlar da literatürler uyumluydu.

Çalışmamız literatüre katkı olarak ilk kez trehalozun pterjium ve konjonktiva üzerinde mikrodizin analizi yapılarak gen profilini ortaya koymuştur. Çalışmamız literatürde ilk kez trehalozun pterjium dokusu kültüre edildikten sonra invitro koşullarda fibroblastlardaki inhibitör etkisini ortaya koymuştur. Ancak araştırmamız kısıtlı hasta sayısı üzerinde yapılmış olup, geniş hasta gruplarında çalışılmasına ve özellikle trehalozun fibroblastlardaki gen ifadelerinin değişiminin yinelenerek ortaya konmasına ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

1. J. J. Kanski, Clinical Ophthalmology A Systematic Approach, 7th ed (Elsevier, 2016).
2. American Academy of Ophthalmology, Yüzey Hastalıkları ve Kornea (Ankara: Güneş Tıp Kitabevleri, 2012)
3. Ü. Bengisu, Göz Hastalıkları, 4th ed (Ankara: Palme yayıncılık, 1998)
4. B. Bowling, Kanski: Clinical Ophthalmology (2016). <https://doi.org/10.1016/B978-84-9113-003-1/00022-6>
5. Myron Yanoff, Jay S. Duker. (1998), Ophthalmology by Mosby Released: July.
6. Jay H. Krachmer, MD, Mark J. Mannis, MD, Edward J. Holland, MD and David A. Palay, MD. (1998), Cornea Text And Color Atlas CD-ROM; 1 pp.
7. Willam Tasman, Edward A. Jaeger. (2002), Duane's Ophthalmology: Clinical Volume 6 chapter 35.
8. Oldenburg JB et al. (1990), Conjunctival ptergia: mechanism of corneal topographic changes, Cornea 9:200.
9. Steinberg SS, Diagnostic Surgical pathology. (1999), Third edition, Volume 1: 988.
10. Lewallen S. (1989), A randomized trial of conjunctival autografting for pterygium in the tropics. Ophthalmology 96:1612–1614.
11. Taylor HR, West S, Munoz B, et al. (1992), The long-term effects of visible light on the eye. Arch Ophthalmology, 110:99-104.
12. Mackenzie FB, Hirst LW, Battistutta D, Green A. (1992), Risk analysis in the development of pterygia. Ophthalmology, 99:1056–61.
13. Taylor HR, West SK, Rosenthal FS et al. (1989), Corneal changes associated with chronic UV irradiation. Arch Ophthalmol 107:1481.

14. Dushku N, Tyler N, Reid TW. (1993), Immunohistochemical evidence that pterygia arise from altered limbal epithelial basal stem cells, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34:1013.
15. Nick Di Girolamo, Jeanie Chui, Minas T. Coroneo and Denis Wakefield. (2004), Pathogenesis of pterygia: role of cytokines, growth factors, and matrix metalloproteinases; *Progress in Retinal and Eye Research*, Volume 23, Issue 2, March, Pages 195–228.
16. Joan E. Roberts. (2001), Ocular phototoxicity, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, Volume 64, Issues 2–3, 15 November, Pages 136–143.
17. P. Steven, G. Schafer, B. Nolle, M. Hinz, W. Hoffmann and F. Paulsen. (2004), Distribution of TFF peptides in corneal disease and pterygium, *Peptides*, Volume 25, Issue 5, May, Pages 819–825.
18. Di Girolamo, N. Coroneo, M.T. and Wakefield, D. (2003), UVB-elicited induction of MMP–1 expression in human ocular surface epithelial cells is mediated through the ERK1/2 MAPKdependent pathway. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44, pp. 4705–4714
19. P. Sakoonwatanyoo, D. T. H. Tan and D. R. Smith. (2004), Expression of p63 in pterygium and normal conjunctiva *American Journal of ophthalmology*, Volume 137, Issue 6, June, Page 1172.
20. Ren, H. and Wilson, G. (1994), The effect of ultraviolet-B irradiation on the cell shedding rate of the corneal epithelium. *Acta Ophthalmol.* 72, pp. 447–452.
21. Weinstein, O., Rosenthal, G., Zirkin, H., Monos, T., Lifshitz, T. and Argov, S. (2002), Overexpression of p53 tumor suppressor gene in pterygia. *Eye* 16, pp. 619–621.
22. David Reisman, Jennifer Wallace McFadden and Gary Lu. (2004), Loss of heterozygosity and p53 expression in Pterygium, *Cancer Letters*, Volume 206, Issue 1, 31 March, Pages 77–83.

23. Forsyth, N.R., Wright, W.E. and Shay, J.W. (2002), Telomerase and differentiation in multicellular organisms: turn it off, turn it on, and turn it off again. *Differentiation* 69, pp. 188–197.
24. Kinoshita, S., Adachi, W., Sotozono, C., Nishida, K., Yokoi, N., Quantock, A.J. and Okubo, K. (2001), Characteristics of the human ocular surface epithelium. *Prog. Ret. Eye Res.* 20, pp. 639– 673.
25. Zhong, Y. Ding, K. and Ye, W. (2001), The relation between expression of basic fibroblast growth factor and mast cells in pterygium. *Chin. J. Ophthalmol.* 37, pp. 455–57.
26. Detorakis, E.T., Sourvinos, G. and Spandidos, D.A. (2001), Detection of herpes simplex virus and human papilloma virus in ophthalmic pterygium. *Cornea* 20, pp. 164–167.
27. Piras, F., Moore, P.S., Ugalde, J., Perra, M.T., Scarpa, A. and Sirigu, P. (2003), Detection of human papillomavirus DNA in pterygia from different geographical regions. *Br. J. Ophthalmol.* 87, pp. 864–866.
28. Chen, K.H., Hsu, W.M., Cheng, C.C. and Li, Y.S. (2003), Lack of human papillomavirus in pterygium of Chinese patients from Taiwan. *Br. J. Ophthalmol.* 87, pp. 1046–1048.
29. Reid, T.W. and Dushku, N. (2003), Does human papillomavirus cause pterygium. *Br. J. Ophthalmol.* 87, pp. 806–808
30. Thoft RA, Friend J. Biochemical transformation of regenerating ocular surface epithelium, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1977;16:14–20
31. U. Beden, M. Irkeç, D. Orhan, & M. Orhan, The roles of T-lymphocyte subpopulations (CD4 and CD8), intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1),

HLA-DR receptor, and mast cells in etiopathogenesis of pterygium. *Ocular immunology and inflammation*, 11 (2003) 115–22.

32. M. Ishioka, S. Shimmura, Y. Yagi, & K. Tsubota, Pterygium and dry eye. *Ophthalmologica. Journal international d’ophthalmologie. International journal of ophthalmology. Zeitschrift fur Augenheilkunde*, 215 (2001) 209–11. <https://doi.org/10.1159/000050860>.
33. E. T. Detorakis, G. Sourvinos, & D. A. Spandidos, Detection of herpes simplex virus and human papilloma virus in ophthalmic pterygium. *Cornea*, 20 (2001) 164– 7.
34. Chui J, Coroneo MT, Tat LT, Crouch R, Wakefield D, Di Girolamo N. Ophthalmic pterygium: a stem cell disorder with premalignant features. *Am J Pathol*. 2011;178(2):817-27.
35. J. C. Hill & R. Maske, Pathogenesis of pterygium. *Eye*, 3 (1989) 218–226. <https://doi.org/10.1038/eye.1989.31>.
36. M. T. Coroneo, N. Di Girolamo, & D. Wakefield, The pathogenesis of pterygia. *Current opinion in ophthalmology*, 10 (1999) 282–8.
37. M. Gebhardt, R. Mentlein, U. Schaudig, T. Pufe, K. Recker, B. Nölle, K. AlSamir, G. Geerling, & F. P. Paulsen, Differential expression of vascular endothelial growth factor implies the limbal origin of pterygia. *Ophthalmology*, 112 (2005) 1023–30. <https://doi.org/10.1016/j.ophtla.2005.01.023>.
38. M. Aspiotis, E. Tsanou, S. Gorezis, E. Ioachim, A. Skyrilas, M. Stefaniotou, & V. Malamou-Mitsi, Angiogenesis in pterygium: study of microvessel density, vascular endothelial growth factor, and thrombospondin-1. *Eye (London, England)*, 21 (2007) 1095–101.

39. Ioachim-Velogianni E, Tsironi E, Agnantis N, Datseris G, Psilas K. HLA-DR antigen expression in pterygium epithelial cells and lymphocyte subpopulations: an immunohistochemistry study. *Ger J Ophthalmol*. 1995;4(2):123-9. 97
40. Ribatti D, Nico B, Maxia C, Longo V, Murtas D, Mangieri D, et al. Neovascularization and mast cells with tryptase activity increase simultaneously in human pterygium. *J Cell Mol Med*. 2007;11(3):585-9.
41. John-Aryankalayil M, Dushku N, Jaworski CJ, Cox CA, Schultz G, Smith JA, et al. Microarray and protein analysis of human pterygium. *Mol Vis*. 2006;12:55-64.
42. Pinkerton OD, Hokama Y, Shigemura LA. Immunologic basis for the pathogenesis of pterygium. *Am J Ophthalmol*. 1984;98(2):225-8
43. Hill JC, Maske R. Pathogenesis of pterygium. *Eye (Lond)*. 1989;3 (Pt 2):218-26.
44. Di Girolamo N, Kumar RK, Coroneo MT, Wakefield D. UVB-mediated induction of interleukin-6 and -8 in pterygia and cultured human pterygium epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2002;43(11):3430-7.
45. Kria L, Ohira A, Amemiya T. Immunohistochemical localization of basic fibroblast growth factor, platelet derived growth factor, transforming growth factorbeta and tumor necrosis factor-alpha in the pterygium. *Acta Histochem*. 1996;98(2):195-201.
46. Chiang CC, Cheng YW, Lin CL, Lee H, Tsai FJ, Tseng SH, et al. Cyclooxygenase 2 expression in pterygium. *Mol Vis*. 2007;13:635-8.
47. Tong L, Li J, Chew J, Tan D, Beuerman R. Phospholipase D in the human ocular surface and in pterygium. *Cornea*. 2008;27(6):693-8.

48. Barba-Gallardo LF, Ventura-Juarez J, Kershenovich Stalnikowitz D, Gutierrez-Campos R, Torres-Bernal E, Torres-Bernal LF. Over-expression of human cystatin C in pterygium versus healthy conjunctiva. *BMC Ophthalmol.* 2013;13:6.
49. Nolan TM, Di Girolamo N, Coroneo MT, Wakefield D. Proliferative effects of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor on pterygium epithelial cells and fibroblasts. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2004;45(1):110-3.
50. Hoppenreijns VP, Pels E, Vrensen GF, Felten PC, Treffers WF. Platelet-derived growth factor: receptor expression in corneas and effects on corneal cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1993;34(3):637-49.
51. Yoshida S, Ono M, Shono T, Izumi H, Ishibashi T, Suzuki H, et al. Involvement of interleukin-8, vascular endothelial growth factor, and basic fibroblast growth factor in tumor necrosis factor alpha-dependent angiogenesis. *Mol Cell Biol.* 1997;17(7):4015-23.
52. Aspiotis M, Tsanou E, Gorezis S, Ioachim E, Skyras A, Stefaniotou M, et al. Angiogenesis in pterygium: study of microvessel density, vascular endothelial growth factor, and thrombospondin-1. *Eye (Lond).* 2007;21(8):1095-101.
53. Ma DH, Yao JY, Yeh LK, Liang ST, See LC, Chen HT, et al. In vitro antiangiogenic activity in ex vivo expanded human limbal corneal epithelial cells cultivated on human amniotic membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2004;45(8):2586-95.
54. Naib-Majani W, Breipohl W, Shazli EE, Theuerkauf I, Pleyer U, Hahne JC, et al. The Ets-1 transcription factor is involved in pterygial angiogenesis. *Anat Histol Embryol.* 2007;36(2):107-10.

55. Wilson MS, Madala SK, Ramalingam TR, Gochuico BR, Rosas IO, Cheever AW, et al. Bleomycin and IL-1 β -mediated pulmonary fibrosis is IL-17A dependent. *J Exp Med*. 2010;207(3):535-52. 95.
56. Gasse P, Riteau N, Vacher R, Michel ML, Fautrel A, di Padova F, et al. IL-1 and IL-23 mediate early IL-17A production in pulmonary inflammation leading to late fibrosis. *PLoS One*. 2011;6(8):e23185.
57. Huang Y, He H, Sheha H, Tseng SC. Ocular demodicosis as a risk factor of pterygium recurrence. *Ophthalmology*. 2013;120(7):1341-7
58. Roberts DD. Regulation of tumor growth and metastasis by thrombospondin-1. *FASEB J* 1996;10:1183-1191. Nov; 33:1991-1993.
59. Altıntaş AGK, Can B, Onursever N, Onursever A, Saran Y, Can İ. Pterjium Dokusunun Histopatolojik Özelliklerinin Farklı Yöntemlerle İncelenmesi. *MN Oftalmoloji* 2003;10:327-331.
60. Butrus SI, Ashraf MF, Laby Dm, Rabinowitz AI, Tabbara SO, Hidayat AA. Increased Number of mast cells in pterygia. *Am J Ophthalmol* 1995;119:236-7.
61. Ratnakar KS, Goswamy V, Agarwal LP. Mast cells and pterygium. *Acta Ophthalmol* 1976;54:363-8.
62. Arvas S, Öztürk M, Toparlak T, Yolar M, Yetik H, Özkan Ş. Pterjiumlu olgularda ultrastrüktürel değerlendirme. *T Oft Gaz* 2002;32:88-93.
63. Erkıılıç K, Özkırış A, Öner A, İlğün N, Doğan H. Primer ve nüks pterjium cerrahisinde serbest limbal konjonktival otogreftleme yönteminin uzun dönem sonuçları. *T Oft Gaz* 2002;32:215-9.

64. Ansari MW, Rahi HS, Shukla BR. Pseudoelastic nature of pterygium. *Br J Ophthalmol* 1970;54:473-6.
65. P. Austin, F. A. Jakobiec, & T. Iwamoto, Elastodysplasia and elastodystrophy as the pathologic bases of ocular pterygia and pinguecula. *Ophthalmology*, 90 (1983) 96–109.
66. Y. Tekelioglu, A. Turk, A. M. Avunduk, & E. Yulug, Flow cytometrical analysis of adhesion molecules, T-lymphocyte subpopulations and inflammatory markers in pterygium. *Ophthalmologica. Journal international d'ophtalmologie. International journal of ophthalmology. Zeitschrift fur Augenheilkunde*, 220 (2006) 372–8. <https://doi.org/10.1159/000095863>.
67. N. Di Girolamo, D. Wakefield, & M. T. Coroneo, UVB-Mediated Induction of Cytokines and Growth Factors in Pterygium Epithelial Cells Involves Cell Surface Receptors and Intracellular Signaling. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 47 (2006) 2430. <https://doi.org/10.1167/iovs.05-1130>.
68. N. Dushku & T. W. Reid, Immunohistochemical evidence that human pterygia originate from an invasion of vimentin-expressing altered limbal epithelial basal cells. *Current eye research*, 13 (1994) 473–81.
69. N. Dushku & T. W. Reid, P53 expression in altered limbal basal cells of pingueculae, pterygia, and limbal tumors. *Current eye research*, 16 (1997) 1179–92.
70. Y. Arai, S. Makino, & H. Obata, Stocker's line in pterygium. *Journal of General and Family Medicine*, 18 (2017) 92–93. <https://doi.org/10.1002/jgf2.8>.
71. C. M. Chan, P. T. Chew, Z. Alsagoff, J. S. Wong, & D. T. Tan, Vascular patterns in pterygium and conjunctival autografting: a pilot study using indocyanine green

anterior segment angiography. The British journal of ophthalmology, 85 (2001) 350–3.

72. F. van der Zypen, E. van der Zypen, & B. Daicker, Ultrastructural studies on the pterygium. II. Connective tissue, vessels and nerves of the conjunctival part (author's transl). Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie. Albrecht von Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology, 193 (1975) 177–87.

73. R. C. Arffa & M. Grayson, Grayson's diseases of the cornea. (Mosby, 1997).

74 A. Karalezli, Pterjium ve Tedavisi. In P. Aydın O'dwyer, & Y. Aydın Akova, eds., Temel Göz Hast., 3., (Ankara: Güneş Tıp Kitabevleri, 2015), pp. 227–232.

75 A. Lin & G. Stern, Correlation between pterygium size and induced corneal astigmatism. Cornea, 17 (1998) 28–30.

76. R. G. Lindsay & L. Sullivan, Pterygium-induced corneal astigmatism. Clinical & experimental optometry, 84 (2001) 200–203

77. Southern Eye Specialists, <https://southerneye.co.nz/content/uploads/2017/02/Pterygium.pdf>, Erişim tarihi: 4 ocak 2023

78. Ghaz N, Britton J, Ross A.R. , Mohammed I, Hogan E, Said D.G, Dua H.S, Management of primary pterygium with intra-lesional injection of 5-fluorouracil and bevacizumab (Avastin), Eye (Lond), 2019 Nov; 33(11):1776-1783.

79 Pterygium and Its Management, <https://www.uhcnhs.uk/files/Ophthalmology>, Erişim tarihi 4 Ocak 2023

- 80 Kenyon K R, Tseng SCG. Limbal autograft transplantation for ocular surface disorders. *Ophthalmology* 1989; 96:709-23.
81. W. Tasman & E. A. Jaeger, Pterygium. *Duane's Ophthalmol. Clin.* Vol. 6 (2002).
82. J. B. Oldenburg, J. Garbus, J. M. McDonnell, & P. J. McDonnell, Conjunctival pterygia. Mechanism of corneal topographic changes. *Cornea*, 9 (1990) 200–4.
83. A. L. Anduze, Pterygium, A Practical Guide The Management, First (New Delhi: Jaypee Brothers Medical Publishers, 2009)
84. Albert and Jakobiec's Principles and Practice of Ophthalmology. Springer International Publishing, 2020.
85. H. Oguz, I. Uzel, ve L. Hirst, "The treatment of pterygium [2] (multiple letters)", *Survey of Ophthalmology*, c. 49, sayı 1. Elsevier USA, ss. 129–130, 2004, doi: 10.1016/j.survophthal.2003.11.001
86. L. W. Hirst, "The treatment of pterygium", *Surv. Ophthalmol.*, c. 48, sayı 2, ss. 145–180, 2003, doi: 10.1016/S0039-6257(02)00463-0
87. L. P. K. Ang, J. L. L. Chua, ve D. T. H. Tan, "Current concepts and techniques in pterygium treatment", *Curr. Opin. Ophthalmol.*, c. 18, sayı 4, ss. 308–313, 2007, doi: 10.1097/ICU.0b013e3281a7ecbb
88. W. M. Ringsdorf ve E. Cheraskin, "Vitamin C and human wound healing", *Oral Surgery, Oral Med. Oral Pathol.*, c. 53, sayı 3, ss. 231–236, 1982, doi: 10.1016/0030-4220(82)90295-X.
- 89 R. Ariza-Ariza, M. Mestanza-Peralta, ve M. H. Cardiel, "Omega-3 fatty acids in rheumatoid arthritis: An overview", *Semin. Arthritis Rheum.*, c. 27, sayı 6, ss. 366–370, 1998, doi: 10.1016/S0049-0172(98)80016-4.

90. K. H. Tarr ve I. J. Constable, “Late complications of pterygium treatment”, Br. J. Ophthalmol., c. 64, sayı 7, ss. 496–505, 1980, doi: 10.1136/bjo.64.7.496.
91. D. Hacıoğlu ve H. Erdöl, “Developments and current approaches in the treatment of pterygium”, Int. Ophthalmol., c. 37, sayı 4, ss. 1073–1081, 2017, doi: 10.1007/s10792-016-0358-5.
92. Hirst LW. The treatment of pterygium. Surv Ophthalmol 2003; 145-80.
93. Adamis AP, Starck T, Kenyon K. The management of pterygium. Ophthalmol Clin North Am 1990; 3: 611-23.
94. Fernandes M, Sangwan VS, Bansal AK, et al. Outcome of pterygium surgery. Analysis over 14 years. Eye 2005; 19: i 182-90.
95. Yanyalı AC, Talu H, Alp BN, Karabaş L, Ay GM, Çağlar Y. Intraoperative mitomycin C in the treatment of pterygium. Cornea 2000; 19: 471-3.
96. Avisar R, Weinberger D. Pterygium surgery with mitomycin C. How much sclera should be left bare? Cornea 2003; 22: 721-5.
97. Syam PP, Eleftheriadis H, Liu CSC. Inferior conjunctival autograft for primary pterygia. Ophthalmology 2003; 110: 806-10.
98. Massaoutis P, Khemka S, Ayliffe W. Clinical outcome study of modified surgical technique for pterygium excision. Can J Ophthalmol 2006; 41: 704-8.
99. Koranyi G, Seregard S, Koop ED. Cut and paste: No suture, small incision approach to pterygium surgery. Br J Ophthalmol 2004; 88: 911-4.

100. Uy HS, Reyes JMG, Flores JDG, Lim-Bon-Siong R. Comparison of fibrin glue and sutures for attaching conjunctival autografts after pterygium excision. *Ophthalmology* 2005; 112: 667-71.
101. Marticorena J, Rodriguez-Ares MT, Tourino R, et al. Pterygium surgery: conjunctival autograft using a fibrin adhesive. *Cornea* 2006; 25: 34-6.
102. Pfister PR, Sommers CL. Fibrin sealant in corneal stem cell transplantation. *Cornea* 2005; 24: 593-8.
103. Solomon A, Pires RTF, Tseng SCG. Amniotic membrane transplantation after extensive removal of primary and recurrent pterygium. *Ophthalmology* 2001; 108: 449-60.
104. Luanratanakorn P, Ratanapakorn T, Suwan-apichon O, Chack RS. Randomised controlled study of conjunctival autograft versus amniotic membrane graft in pterygium excision. *Br J Ophthalmol* 2006; 90: 1476-80. 29
105. Tananuvat N, Martin T. The results of amniotic membrane transplantation for primary pterygium compared with conjunctival autograft. *Cornea* 2004; 23: 458-63.
106. Franzco RWE, Franzco GRS, Franzco MD, Tole DM. Amniotic membrane grafting in the surgical management of primary pterygium. *Clin Experiment Ophthalmol* 2004; 32: 501-4.
107. Buratto L, Phillips RL, Carito G. Plastic surgery to repair the conjunctiva. In: Buratto L, Phillips RL, Carito G, eds. *Pterygium Surgery*. 1st ed. Thorofare, NJ: Slack; 2000. p. 77-80.
108. Buratto L, Phillips RL, Carito G. Part A. Chapter 1. Introduction. In: Buratto L, Phillips RL, Carito G, eds. *Pterygium Surgery*. Thorofare, NJ: SLACK Inc. 2000: 3-4.

109. Anduze AL. Pterygium surgery with mitomycin-C: Ten-year results. *Ophthalmic Surg Lasers*, 2001; 32: 341-5.
110. Chen PP, Ariyasu RG, Kaza V, LaBree LD, McDonnell PJ. A randomized trial comparing mitomycin C and conjunctival autograft after excision of primary pterygium. *Am J Ophthalmol* 1995; 120: 151-60.
111. Singh G, Wilson MR, Foster CS. Long-term follow-up study of mitomycin eye drops as adjunctive treatment of pterygia and its comparison with conjunctival autograft transplantation. *Cornea* 1990 9: 331-4.
112. Lam DS, Wong AK, Fan DS, et al. Intraoperative mitomycin C to prevent recurrence of pterygium after excision: a 30 month follow-up study. *Ophthalmology* 1998; 105: 901-4.
113. Meacham CT. Triethylene thiophosphoramidate. In the prevention of pterygium recurrence. *Am J Ophthalmol* 1962; 54: 751-3.
114. Ngoy D, Kayembe L. A comparative study of thio-tepa and mitomycin C in the treatment of pterygium. Preliminary results. *J Fr Ophthalmol* 1998; 21: 96- 102.
115. Farrell PL, Smith RE. Bacterial corneal scleritis complicating pterygium excision. *Am J Ophthalmol* 1989; 107: 515-7. 30
116. Bekibebe CO, Baiyeroju AM, Ajayi BGK. 5-Fluorouracil vs. betairradiation in the prevention of pterygium recurrence. *Int J Clin Pract* 2004; 58: 920- 3.
117. Akarsu C, Taner P, Ergin A. 5-Fluorouracil as chemoadjuvant for primary pterygium surgery. *Cornea* 2003; 22: 522-6.

118. Toshihiko Matsuo, Trehalose Versus Hyaluronan or Cellulose in Eyedrops for the Treatment of Dry Eye, Japanese Journal of Ophthalmology, 2004, 48, 321-327
119. Takeuchi K., Nakazawa M., Ebina Y, Sato K, Metoki T, Miyagawa Y., Ito T., Experimental Eye Research, 2010 91, 5, 567-577
120. Tong L., Chew J, Yang H., Leonard P., Tan D., Beuerman R., Distinct gene subsets in pterygia formation and recurrence: dissecting complex biological phenomenon using genome wide expression data, BMC Med Genomics. 2009, 2: 14.
121. National Library Of Medicine, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/9635#summary> 101, erişim tarihi: 01.01.2023
122. Genecards The Human Gene Database, <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ASPN&keywords=aspn>, erişim tarihi: 01.01.2023
123. Genecards The Human Gene Database, <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TNC&keywords=tnc>, erişim tarihi: 01.01.2023
124. Yang Z., Zhang C., Feng Y., Quan M., Cui Y., Xuan Y. Tenascin-C predicts poor outcomes for patients with colorectal cancer and drives cancer stemness via Hedgehog signaling pathway, 2020, Cancer Cell International, 20, 122
125. KYOTO, <https://www.genome.jp/entry/ptr:742736>, erişim tarihi: 01.01.2023
126. Genecards The Human Gene Database, <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=NR4A1&keywords=NR4A1>, erişim tarihi: 01.01.2023

127. Zhou F, Drabsch Y, Dekker T, De Vinusea A.,Li Y., Lukas J, Nuclear receptor NR4A1 promotes breast cancer invasion and metastasis by activating TGF- β signalling, Nature Communications, 5,2014 3388
128. Zhou W.P.,Zhu Y.F.,Zhang B.,Qiu W.Y., Yao Y.F., The role of ultraviolet radiation in the pathogenesis of pterygia, Moleculer Medicine Reports, 2016
129. Genecards The Human Gene Database, <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TGFBR2&keywords=TGFBR2>,erişim tarihi: 01.01.2023
130. Genecards The Human Gene Database, <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TGFBR3&keywords=TGFBR3>,erişim tarihi: 01.01.2023
131. Genecards The Human Gene Database, <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ALPL&keywords=ALPL#function>, ,erişim tarihi: 01.01.2023
132. Rao S.R., Snaith A.E, Marino D, Cheng X., Lwin S.T., Orriss I,Hamdy F.C.,Edwards C.M.,2016,Tumour-derived alkaline phosphatase regulates tumour growth, epithelial plasticity and disease-free survival in metastatic prostate cancer,British Journal of Cancer,volume 116, 227-236
133. Genecards The Human Gene Database, <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MSMO1&keywords=MSMO1>, erişim tarihi: 01.01.2023
134. Cao R., Zhang Z., Tian C.,Sheng W., Dong Q., Dong M., Journol Of Cancer,2022; 13(10):3013-3021.
135. Genecards The Human Gene Database, <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=RUNBP3L&keywords=RUNBP3L#function>, ,erişim tarihi: 01.01.2023

136. Dmitry Chernyakov D. , Groß A. , Fischer A. , Bornkessel N.,Schultheiss C. , Gerloff D. and Edemir B.,Loss of RANBP3L leads to transformation of renal epithelial cells towards a renal clear cell carcinoma like phenotype ,2021,Journal of Experimental & Clinical Cancer Research 40:226
137. Genecards The Human Gene Database, <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=FGF7&keywords=FG7#function>, ,erişim tarihi: 01.01.2023
138. 137.Genecards The Human Gene Database, <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=FGF10&keywords=FG10#function>, ,erişim tarihi: 01.01.2023
139. Elbein A.D., Pan Y.T.,Pastuszak I., Carroll D., New insights on trehalose: a multifunctional molecule, 2003, Glycobiology, Volume 13-4, Sayfa 17R–27R
140. Kudo T. , Takeuchi K. , Ebina Y. , Nakazawa M. , Inhibitory Effects of Trehalose on Malignant Melanoma Cell Growth: Implications for a Novel Topical Anticancer Agent on the Ocular Surface, ISRN Ophtalmology,2012, 968493.