



Pterijyumda Küçük GTP Bağlayıcı Protein Rac'ın Ekspresyon Analizi

Expression Analysis of the Small GTP-Binding Protein Rac in Pterygium

İD Ahmet Saracaloğlu*, İD Şeniz Demiryürek**, İD Kıvanç Güngör***, İD Betül Düzen****, İD Ömer Eronat*****,
İD Ebru Temiz*****, İD Abdullah Tuncay Demiryürek*

*Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, Gaziantep, Türkiye

**Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, Gaziantep, Türkiye

***Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi, Göz Hastalıkları Anabilim Dalı, Gaziantep, Türkiye

****Gaziantep Dr. Ersin Arslan Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Göz Hastalıkları Kliniği, Gaziantep, Türkiye

*****Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, Gaziantep, Türkiye

*****Harran Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Tıbbi Tanıtım ve Pazarlama, Şanlıurfa, Türkiye

Öz

Amaç: Rac1, Rac2 ve Rac3 ekspresyonlarının pterijyum dokusundaki rollerini belirlemek ve bu ekspresyonları normal konjonktival doku ile karşılaştırmak.

Gereç ve Yöntem: Primer pterijyumlu 78 hasta çalışmaya alındı. Kontrol dokusu olarak pterijyum operasyonu sırasında alınan sağlıklı konjonktival greft örnekleri kullanıldı. Genomik mRNA'da gen ekspresyonları analizi için BioMark HD dinamik dizi sisteminde gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi kullanıldı. Protein ekspresyonları, western blot ve immünohistokimyasal yöntemler kullanılarak analiz edildi.

Bulgular: Pterijyum dokularında *RAC1*, *RAC2* ve *RAC3* gen ekspresyonu, kontrol örnekleriyle karşılaştırıldığında belirgin bir şekilde yükselmedi ($p>0,05$). Çok düşük düzeyde *RAC1* gen ekspresyonu gözlemlendi, Rac2 ve Rac3 proteinleri ile ileri protein ekspresyon analizleri yapıldı. Western blot ve immünohistokimyasal analizleri, pterijyum dokularında Rac2 ve Rac3 protein ekspresyonlarında anlamlı bir değişiklik kaydedilmediğini ortaya koydu ($p>0,05$).

Sonuç: Bu, Rac proteinlerinin pterijyumdaki katkısını belirleyen ilk çalışmadır. Sonuçlarımız, küçük GTP bağlayıcı protein Rac'ın pterijyum patogenezinde yer almayabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Pterijyum, Rac, gen ekspresyonu, protein ekspresyonu, immünohistokimyasal analiz

Abstract

Objectives: To determine the roles of small GTP-binding proteins Rac1, Rac2, and Rac3 expression in pterygial tissue and to compare these expressions with normal conjunctival tissue.

Materials and Methods: Seventy-eight patients with primary pterygium were enrolled. Healthy conjunctival graft specimens obtained during pterygium surgery were used as control tissue. The real-time polymerase chain reaction method on the BioMark HD dynamic array system was utilized in genomic mRNA for the gene expression analysis. Protein expressions were analyzed using western blot and immunohistochemical methods.

Results: *RAC1*, *RAC2*, and *RAC3* gene expressions in pterygial tissues were not markedly elevated when compared to the control specimens ($p>0.05$). As a very low level of *RAC1* gene expression was observed, further protein expression analysis was performed for the Rac2 and Rac3 proteins. Western blot and immunohistochemical analysis of Rac2 and Rac3 protein expression revealed no significant differences between pterygial and healthy tissues ($p>0.05$).

Conclusion: This is the first study to identify the contribution of Rac proteins in pterygium. Our results indicate that the small GTP-binding protein Rac may not be involved in pterygium pathogenesis.

Keywords: Pterygium, Rac, gene expression, protein expression, immunohistochemical analysis

Cite this article as: Saracaloğlu A, Demiryürek Ş, Güngör K, Düzen B, Eronat Ö, Temiz E, Demiryürek AT. Expression Analysis of the Small GTP-Binding Protein Rac in Pterygium.
Turk J Ophthalmol 2023;53:343-348

Yazışma Adresi/Address for Correspondence: Abdullah Tuncay Demiryürek, Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, Gaziantep, Türkiye

E-posta: atdemiryurek@gmail.com ORCID-ID: orcid.org/0000-0002-9994-8541

Geliş Tarihi/Received: 06.03.2023 Kabul Tarihi/Accepted: 06.05.2023

DOI: 10.4274/tjo.galenos.2023.93765

Giriş

Pterijyum, korneada anormal konjonktival fibrovasküler doku büyümesi ile karakterize iyi huylu ve sık görülen bir oküler yüzey hastalığıdır. Patolojik olarak pterijyum proliferatif, invaziv ve oldukça vaskülarize bir dokudur. Pterijyumun konjonktival dejeneratif ve proliferatif bir hastalık olduğu kabul edilmektedir. Pterijyum ve neoplazi arasında çeşitli ortak özelliklerin bulunması nedeniyle pterijyum, neoplastik benzeri büyüme lezyonu olarak kabul edilmektedir.¹ Enflamasyon, ultraviyole ışına maruziyet ve kronik iritasyon gibi birçok

çevresel faktörün patogeneze rol oynadığı varsayılmıştır.² Pterijyum etiolojisinde genetik faktörler de önemlidir.³ Ancak pterijyum gelişimine neden olan moleküler mekanizmalar tam olarak anlaşılamamıştır. Giderek artan veriler, birçok büyüme faktörünün pterijyum patogeneze doğrudan veya dolaylı olarak katkıda bulunabileceğini göstermektedir.⁴ Bazı çalışmalarda siklooksijenaz, vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF) ve çeşitli proenflamatuvar sitokinlerin pterijyum gelişimi ile ilişkili olduğu bildirilmiştir.^{5,6,7}

Düşük molekül ağırlıklı (20-30 kDa) küçük GTPazlar guanin nükleotidlerini bağlayan ve guanozin trifosfatı (GTP) guanozin difosfata hidrolize eden monomerik G-proteinleridir. Küçük GTPazlardan oluşan insan Ras ailesi, fonksiyonel ve sekans benzerliklerine göre beş ana alt aileye (Rho, RAS, Arf/sar, Rab, Ran) ve "sınıflandırılmamış" proteinlere ayrılan 166 proteinden oluşur.⁸ Küçük GTPazlardan oluşan Rho ailesi, Rac1, Rac2 ve Rac3 dahil olmak üzere 20 proteinden oluşan bir ailedir. Farklı genler tarafından kodlanan üç farklı memeli Rac izoformunun amino asit dizileri arasında %89 ile %92 arasında benzerlik bulunur.⁹ Rho GTPazın VEGF ile indüklenen hücre göçünde rol alan proteinleri aktive ettiği ve VEGF sinyalleşmesinin kemotaksis sırasında Rac aktivasyonuna ihtiyaç duyduğu bildirilmiştir.^{10,11} Rac aktivasyonu ayrıca endotelial hücre fokal adezyonunda ve stres lifi oluşumunda bir artışa neden olur.¹¹ Etkin hücre hareketi ve migrasyonu için Rac aktivitesi çok önemlidir.^{12,13} Bu etkiler pterijyumda konjonktiva dokusunun kanat benzeri veya üçgen şekilli doku büyümesine katkıda bulunabilir. Fagositik ve fagositik olmayan hücrelerde bulunan nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) oksidaz enzimi Rac tarafından düzenlenen bir komplekstir ve hücre içi sinyalleme ve doğuştan gelen bağışıklıkta reaktif oksijen türlerinin (ROS) ortaya çıkmasını sağlar.¹⁴ Rac proteinleri fagositik hücrelerdeki oksidatif patlamayı düzenleyebildiğinden ve ROS üretiminde rol oynadığından, Rac pterijyum gelişiminin enflamatuvar süreçlerine katkıda bulunabilir.^{15,16} Rac ailesi üyelerinin belirli hücre işlevlerinde çeşitli rolleri olsa da, pterijyum patofizyolojisindeki rolleri karakterize edilmemiştir. Bu nedenle, bu araştırmanın amacı, pterijyum dokusunda küçük GTP bağlayıcı proteinler Rac1, Rac2 ve Rac3'ün ekspresyonunu değerlendirmektir.

Gereç ve Yöntem

Hastalar

Bu prospektif çalışma Gaziantep Üniversitesi Hastanesi, Göz Hastalıkları Anabilim Dalı ve Gaziantep Dr. Ersin Arslan Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Göz Hastalıkları Kliniği'nde gerçekleştirildi. Çalışma için Gaziantep Üniversitesi Yerel Klinik Etik Kurul'dan onay alındı (karar no: 2017/312, tarih: 11.09.2017) ve çalışma boyunca Helsinki Bildirgesi'nin ilkelerine bağlı kalındı. Pterijyum örnekleri, primer pterijyumlu 78 ardışık hastadan (40 erkek ve 38 kadın) ameliyat sırasında toplandı. Pterijyum eksizyonu ve konjonktival otogreft transferi ameliyatı sırasında superior temporal bulber konjonktivadan normal konjonktival doku örnekleri alındı.¹⁷ Her hastaya rutin

göz muayenesi yapıldı. Hastaların çalışmaya dahil edilme kriterleri: (1) 18 yaşından büyük olmak; (2) primer evre 2 veya 3 pterijyum varlığı; ve (3) çalışmaya gönüllü olarak katılarak bilgilendirilmiş yazılı onam vermek.

Araştırmaya dahil edilmeme kriterleri ise: (1) Pterijyum eksizyonu, vitrektomi, trabekülektomi, katarakt ekstraksiyonu ve şaşılık ameliyatı gibi geçirilmiş göz cerrahisi öyküsü; (2) son üç ay içinde kimyasal yaralanma veya konjonktival laserasyon gibi travma öyküsü; (3) başka konjonktival veya korneal patoloji varlığı; (4) Sjögren sendromu gibi başka oküler yüzey hastalığı olması; (5) konjonktivit gibi enfeksiyon varlığı; (6) immünosupresan, mitomisin C veya kortikosteroidler gibi topikal ilaç kullanımı öyküsü; ve (7) şu anda veya daha önce kontakt lens kullanılması olarak belirlendi.

Gen Ekspresyonu Analizi

Total RNA, üreticinin talimatlarına göre miRNeasy Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Almanya) kullanılarak dokulardan izole edildi. RNA'nın saflığı ve konsantrasyonu spektrofotometrik olarak (Epoch, BioTek, Winooski, VT, ABD) ölçüldü. RNA'dan cDNA sentezi, Ipsogen RT Kiti (Qiagen, Hilden, Almanya) kullanılarak üretici tarafından önerilen protokole uygun şekilde gerçekleştirildi. RAC primerleri ile polimeraz zincir reaksiyonu ölçümleri BioMark HD sistemi (Fluidigm, South San Francisco, CA, ABD) kullanılarak yapıldı. Her genin ekspresyonu ölçüldü ve mesajcı RNA (mRNA) ekspresyonu belirlendi. β -aktin (*ACTB*) internal kontrol için referans gen olarak kullanıldı. Rölatif mRNA seviyeleri $2^{-\Delta\Delta C_t}$ yöntemi kullanılarak şu formüle göre ölçüldü: $\Delta\Delta C_t = \Delta C_{t,RAC} - \Delta C_{t,ACTB}$. Bu formülde C_t eşik döngüsünü ifade etmektedir.¹⁷

Western Blot Analizi

Donuk doku örnekleri, doku homojenizatörü (Tissue Lyser LT, Qiagen, Hilden, Almanya) kullanılarak HEPES tamponunda homojenize edildi ve analiz edilene kadar -80 °C'de saklandı. Protein konsantrasyonları Bradford yöntemi (Thermo Fisher Scientific, IL, ABD) ile belirlendi. Protein örnekleri, bir örnek tamponu (5 μ L) ve HEPES tamponu ile inkübe edildi ve 95 °C'de 5 dakika ısıtıldı. Daha sonra, doku örneklerinden alınan 20 μ g protein, %10 sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jellerde yürütüldü ve gece boyunca 4 °C'de poliviniliden diflorür (PVDF) membranlara elektroblotlandı. Yağsız kuru süt ile uygun şekilde bloke edilip ve yıkandıktan sonra, membranlar gece boyunca Rac2 (sc -517424, SantaCruz Biotechnology, Dallas, TX, ABD, 1/300) veya Rac3 (ab124943, Abcam, Cambridge, İngiltere, 1/1000) primer antikolarını içeren solüsyonda 4 °C'de bekletildi. β -aktin (sc -47778, SantaCruz Biotechnology, Dallas, TX, ABD, 1/1000) antikoru yükleme kontrolü olarak kullanıldı. Daha sonra PVDF membranlar sekonder antikolar ile 90 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi (Rac2 için anti-mouse immunoglobulin G [IgG] 1/1000, sc-516102, SantaCruz Biotechnology, Dallas, TX, ABD, veya Rac3 için keçi anti-tavşan horseradish peroksidaz, 1/3000, ab6721, Abcam, İngiltere). Antikor reaktif bantlar, artırılmış kemilüminesans sinyaller (Super Signal West Pico, kat. no. 34080, Thermo Fisher Scientific, IL, ABD) kullanılarak görselleştirildi. Bantların

yoğunlukları bir jel görüntü analiz sistemi (ChemiDoc XRS+ Imager, Bio-Rad, Hercules, CA, ABD) kullanılarak kaydedildi, daha sonra β -aktin seviyeleri ile normalize edildi.¹⁷

İmmünohistokimyasal Analiz

İmmünohistokimyasal çalışmaları gerçekleştirmek için, formalinle fikse edilmiş ve parafine gömülmüş doku blokları, bir mikrotom kullanılarak 5 μ m kalınlıkta kesildi. Rac2 (PA5-29281, poliklonal tavşan IgG, Thermo Fisher Scientific, Rockford, ABD, 1/100) ve Rac3 (EPR6679B, tavşan monoklonal anti-Rac3 antikor, Abcam, Cambridge, ABD, 1/100) antikorları otomatik immünohistokimya boyama cihazı (Ventana, Bench Mark Ultra Auto-Stainer, Roche Diagnostics, IN, USA) kullanılarak uygulandı. Rac2 ve Rac3 immünreaktiviteilerinin yoğunluğu 0-3 derecelendirme ölçeğinde skorlandı. Tek bir araştırmacı (O.E.) tüm örneklemeleri tutarlılık açısından skorladı. Boyanma miktarı şiddeti şu şekilde derecelendirildi: 0, < %10 veya negatif; 1+, %11 ila 20; 2+, %21 ila 75; 3+, > %75.¹⁷

İstatistiksel Analiz

Veriler ortalama $\pm$ standart hata veya yüzde olarak sunuldu. Verilerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov-Smirnov testi ile değerlendirildi. İki grubun ortalama değerlerini uygun şekilde karşılaştırmak için eşleştirilmemiş Student t-testi veya Mann-Whitney U testi kullanıldı. Gen ekspresyon analizi için QIAGEN GeneGlobe çevirim için yazılımı (<http://www.qiagen.com/geneglobe>) kullanıldı. Tüm sonuçlar kat değişim olarak sunuldu, 0,001 ile 0,5 arasındaki değerler anlamlı downregülasyon ve 2,0'ın üzerindeki değerler anlamlı upregülasyon olarak kabul edildi.¹⁸ İmmünohistokimyasal skorlar arasındaki anlamlı değişimi belirlemek için Mann-Whitney U testi kullanıldı. Korelasyonlar, Spearman sıra korelasyon testi ile araştırıldı. İstatistikler GraphPad Instat (sürüm 3,05, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, ABD) kullanılarak yapıldı. P değerinin 0,05'ten küçük olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

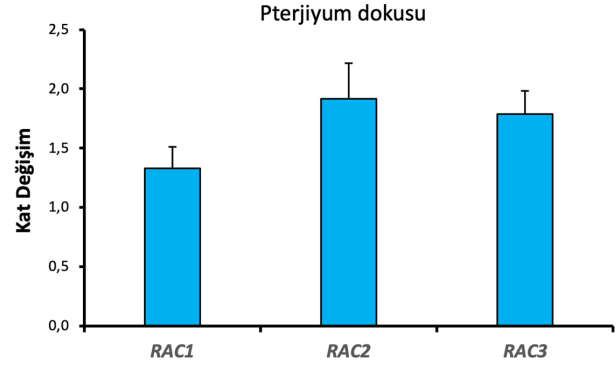
Bulgular

Yetmiş sekiz pterijyum hastasının cinsiyet dağılımı yaklaşık eşitti (40 erkek [%51,3] ve 38 kadın [%48,7]). Hastaların ortalama yaşı $52,4 \pm 1,4$ yıl (aralık 29-72 yıl) idi. Kontrollerle karşılaştırıldığında pterijyum dokularında *RAC1*, *RAC2* ve *RAC3* gen ekspresyonu açısından belirgin bir fark yoktu ($n=30$, p değerleri *RAC1*, *RAC2* ve *RAC3* için sırasıyla 0,819, 0,326 ve 0,112 idi, [Şekil 1](#)). *RAC1* ekspresyonu çok düşük düzeyde olduğundan, ileri analizler Rac2 ve Rac3 proteinleri ile yapıldı. Western blot analizinde, pterijyum dokularında Rac2 ve Rac3 protein ekspresyonunda kontrollere kıyasla belirgin bir fark yoktu ($n=30$, p değerleri Rac2 ve Rac3 için sırasıyla 0,330 ve 0,309 idi, [Şekil 2](#)).

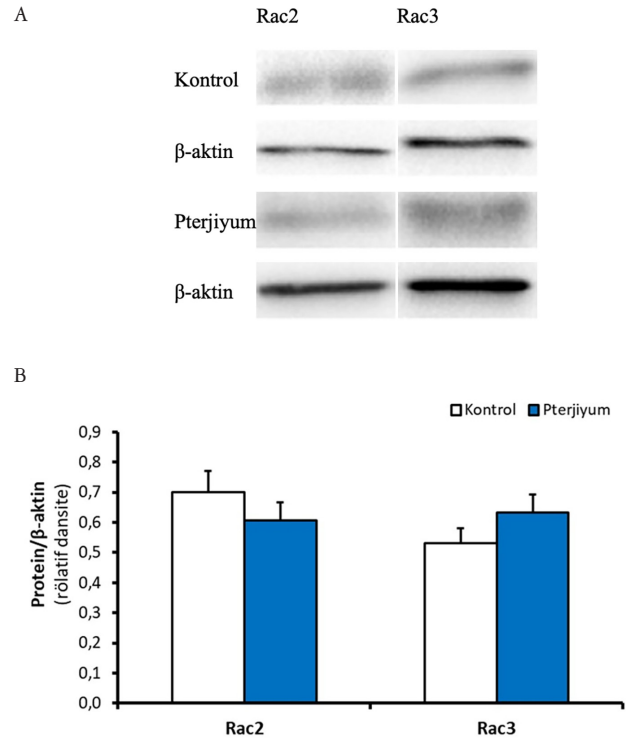
İmmünohistokimyasal kesitlerde, esas olarak pterijyum epitel ve kapiller endotel hücrelerinde lokalize olan Rac2 ([Şekil 3A, B](#)) ve Rac3 ([Şekil 3C, D](#)) boyanması zayıftı. Pterijyum dokusunda hemen hemen hiç stromal hücre boyanması izlenmedi. Ancak, bu hücreler kontrol örneklerinde Rac2 veya Rac3 antikorları ile boyandı ([Şekil 3](#)). Pterijyum dokusunda Rac2 veya Rac3 upregülasyonu için eğilim olmasına rağmen, bu

artışlar istatistiksel anlamlılık göstermedi (p değerleri Rac2 ve Rac3 için sırasıyla 0,2113 ve 0,2524, [Şekil 4](#)).

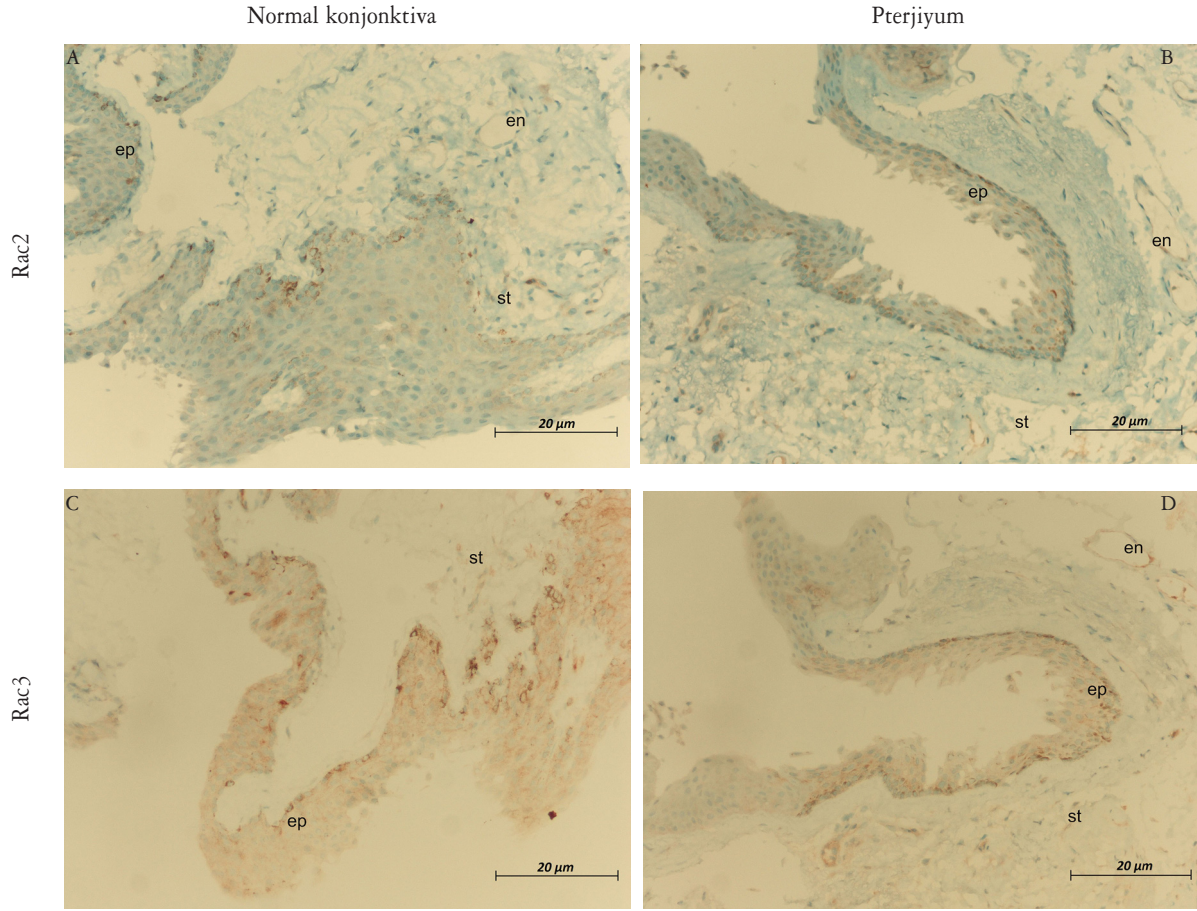
Korelasyon analizinde *RAC1* ve *RAC2* gen ekspresyonları arasında ($r=0,606$, $r^2=0,367$, $p<0,001$) ve *RAC2* ve *RAC3* gen ekspresyonları arasında ($r=0,367$, $r^2=0,135$, $p=0,046$) pozitif korelasyon olduğu bulundu. Gen ve protein ekspresyonları arasında anlamlı korelasyon saptanmadı (Rac2 için $p=0,239$, Rac3 için $p=0,609$). Rac2 ve Rac3 protein ekspresyonları arasında da anlamlı korelasyon yoktu ($r^2=0,012$, $p=0,531$).



Şekil 1. Pterijyum dokusunda *RAC1*, *RAC2* ve *RAC3* gen ekspresyonlarının karşılaştırılması ($n=30$). Değerler ortalama $\pm$ SH olarak verildi
SH: Standart hata

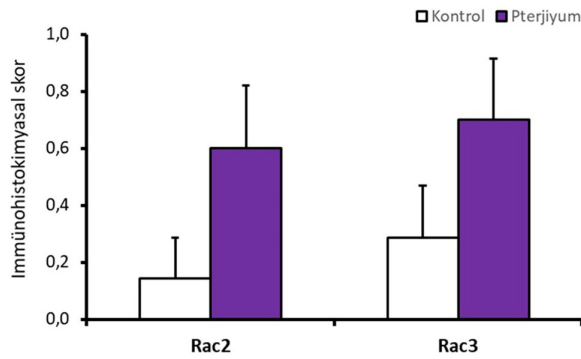


Şekil 2. Örnek western blotting bantları (A) ve konjonktival otogrefti (kontrol, $n=36$) ve pterijyum dokusunda ($n=38$) Rac2 ve Rac3 protein ekspresyonunun karşılaştırılması (B). Değerler ortalama $\pm$ SH olarak verildi
SH: Standart hata



Şekil 3. Rac2 ve Rac3 boyamasının immünohistokimyasal görüntüleri. İnsan normal konjonktiva dokusu (sol) ve pterijyumda (sağ) Rac2 (üst) ve Rac3'ün (alt) immün boyanması

ep: Epitelyum, en: Endotel, st: Stroma



Şekil 4. Konjonktival otogreft (kontrol, n=7) ve pterijyum dokusunda (n=10) Rac2 ve Rac3 protein ekspresyonu immünohistokimyasal skorların karşılaştırılması. Değerler ortalama $\pm$ SH olarak verildi

SH: Standart hata

Tartışma

Çalışmamızda normal konjonktival dokulara göre primer pterijyum örneklerinde *RAC1*, *RAC2* ve *RAC3* gen ekspresyonu

anlamlı düzeyde değişmemiştir. Ayrıca, protein ekspresyonunda bir artış gözlenmedi. Bu bulgular, gen ekspresyonunun ve posttranslasyonel Rac protein yapımının, pterijyum gelişiminde veya oküler yüzeyde pterijyum büyümesinin düzenlenmesinde rol oynamadığını göstermektedir. Her ne kadar çeşitli çalışmalarda hücrel bağışıklık ve enflamatuvar yanıtın pterijyum oluşumunda çok önemli bir rol oynadığı bildirilmiş olsa da,^{19,20} sonuçlarımız Rac proteinlerinin pterijyum gelişiminin enflamatuvar sürecine katkıda bulunduğu fikrini desteklememektedir.

Rac aktivitesi hücre hareketi için gereklidir.¹² Rac'ın genellikle ilk hücre-hücre temas, hücre-matris adezyonu ve hücrel transformasyonun düzenleyicisi olduğu kabul edilmektedir.^{21,22,23} Rac'ın, fibroblastlarda lamellipodia ve membran kıvrımlarını ("membrane ruffles") uyardığı bilinmektedir ve Rac sinyalleme hücre migrasyonu için gereklidir.¹³ Skarlaşma ve fibrozis süreçlerinde rol alan fibroblastların, pterijyumun ilerlemesine katkıda bulunabileceği bilinmektedir.²⁴ Rac'ın epitel hücrelerinde lamellipodial uzantıların gelişimini modüle ettiği ve komşu hücreler arasındaki etkileşimleri kolaylaştırdığı düşünülmektedir.^{21,22} Rac GTPazları kemotaktik migrasyonda

polaritenin sürdürülmesi veya oluşturulması için de önemlidir.²⁵ Bu nedenle, Rac hücre polarizasyonunu ve göçünü kontrol ediyor olabilir.¹² Sitokinler, hücre dışı matriks bileşenleri ve büyüme faktörleri tarafından tetiklenen lamellipodium uzaması için Rac gereklidir.¹² Rac'ın tüm bu özellikleri, pterijyumda görülen konjonktival dokunun kornea üzerinde kanat şeklinde büyümesine katkıda bulunabilir.

En çok araştırılmış Rac izoformu olan Rac1, gen ekspresyonunu, hücreler arası adezyon, hücre döngüsü, hücre yayılımına ve membran kıvrılmasına yardımcı olmak için aktin hücre iskeletinin organizasyonunu modüle eder.²⁶ Rac proteinlerinin ekspresyon düzeyi ve doku dağılımı önemli ölçüde farklılık gösterir. Rac1 ve Rac3 farklı dokularda yüksek miktarda eksprese edilir ve bu nedenle çok çeşitli hücresel fonksiyonları modüle ederken, Rac2 büyük ölçüde hematopoietik hücrelerde eksprese edilir.^{27,28,29} Ayrıca, Rac2 makrofajlarda fagositoz için gereklidir.³⁰ Rac2'nin özellikle kemotaksiyi, hücreler farklılaşmayı, proliferasyonu, aktin yeniden modellenmesini ve nötrofillerde süperoksit ve kinaz aktivasyonunu düzenlediği düşünülmektedir.^{29,31,32} Rac2, makrofajlarda siklooksigenaz-2 ekspresyonunda önemli rol oynar,³³ ve siklooksigenaz-2 ekspresyonu da pterijyum patogeneziyle ilişkilidir.⁵ Rac1 ve Rac2, süperoksit üreten NADPH oksidazın düzenleyici bir bileşeni olarak hareket eder ve fagositik hücrelerde oksidatif patlamayı düzenler.¹⁵ Rac, ROS üretimine doğrudan katkıda bulunur.¹⁶ ICAM-2 ve ICAM-3 gen ve protein ekspresyonlarının pterijyum dokusunda anlamlı artış gösterdiğine ait kanıtlar vardır¹⁷ ve ICAM-2 Rac1 sinyalleme yoluyla N-kaderin lokalizasyonunu ve vasküler geçirgenliği düzenleyebilir.³⁴ Bununla birlikte, bu çalışmadaki bulgularımız, RAC1 gen ekspresyonunun pterijyum dokusunda belirgin şekilde değişmediğini göstermiştir.

Verilerimiz, RAC2 geninin ve Rac2 proteininin pterijyum dokusunda eksprese edildiğini göstermiştir, bu da Rac2'nin hematopoietik hücrelerle sınırlı olmadığına işaret etmektedir. Bu görüşü destekleyen iki raporda vasküler düz kas hücrelerinde (VDKH) Rac2 ekspresyonu gösterilmiştir.^{35,36} Rac2 ekspresyonu sakin veya normal koşullar altında tespit edilemese de, ekspresyonu VDKH'nin enflamatuvar sitokinlerle indüklenmesiyle uyarılır. Rac2'nin aşırı ekspresyonu VDKH göçünü ve hücre içi süperoksit anlamalı önemli ölçüde artırır.³⁶ VDKH'de tümör nekroz faktörü- α ve dönüştürücü büyüme faktörü- β 'nin Rac2 ekspresyonunu artırabildiği gösterilmiştir.³⁶ Bu büyüme faktörleri pterijyum dokusunda da mevcuttur.⁴ Rac2, endotel hücrelerinde eksprese edilir ve ayrıca endotel hücre göçü için gerekli bir sinyaldir.³⁷ Rac2 insan bronşiyal epitel hücrelerinde de bulunur ve Rac2 artışı NADPH oksidaz aktivitesi ve hücre içi ROS yapımının artmasına neden olur.³⁸ Ayrıca Rac2 tümör hücrelerinde eksprese edilir. Malign beyin tümörlerinde Rac2'nin ekspresyonunun azaldığı bildirilmesine rağmen, baş ve boyun skuamöz hücreli karsinomda aşırı eksprese olduğu gösterilmiştir.^{39,40} Pterijyum tümör benzeri özellikler gösterebilir ve neoplastik benzeri bir büyüme bozukluğu olduğu ileri sürülmüştür.⁴¹

Rac3 en az çalışılan Rac izoformudur. Sonuçlarımız ilk kez Rac3 ekspresyonunun pterijyum dokusunda tespit edilebilir

olduğunu göstermektedir. Her ne kadar Rac3 stres aktivasyon yoluyla ve tümör büyümesinde rol alabilse de, pterijyum patogeneziye katkısı şu anda bilinmemektedir.^{9,42}

Çalışmanın Kısıtlılıkları

Çalışmamızın ana kısıtlılığı hasta sayısının düşük olmasıdır. Daha büyük örneklem sayısı ile yapılacak ileri çalışmalar bu hastalığın hücresel özelliklerine ışık tutmaya yardımcı olabilir.

Sonuç

Bu çalışma, pterijyumda küçük GTP bağlayıcı proteinler Rac1, Rac2 ve Rac3'ün gen ekspresyonunu gösteren ilk çalışmadır. Bununla birlikte, gen ve protein ekspresyonları normal konjonktival dokudan farklı bulunmamıştır, bu da Rac proteinlerinin pterijyum gelişiminde rol oynamayabileceğini düşündürmektedir. Pterijyumda Rac aracılı fonksiyonlarda rol oynayan sinyal yolları henüz bilinmemektedir ve bu proteinlerin her birinin pterijyumdaki rolünün aydınlatılması için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

Etik

Etik Kurul Onayı: Çalışma için Gaziantep Üniversitesi Yerel Klinik Etik Kurul'dan onay alınmıştır (karar no: 2017/312, tarih: 11.09.2017).

Hasta Onayı: Alınmıştır.

Hakem Değerlendirmesi: Editörler kurulu ve editörler kurulu dışında olan kişiler tarafından değerlendirilmiştir.

Yazarlık Katkıları

Cerrahi ve Medikal Uygulama: K.G., B.D., Konsept: A.T.D., Dizayn: A.S., A.T.D., Veri Toplama veya İşleme: K.G., B.D., Ş.D., Analiz veya Yorumlama: A.S., Ö.E., E.T., Literatür Arama: K.G., Ş.D., A.T.D., Yazan: A.T.D.

Çıkar Çatışması: Yazarlar tarafından çıkar çatışması bildirilmemiştir.

Finansal Destek: Bu çalışma Gaziantep Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından (TE.DT.17/45) desteklenmiştir.

Kaynaklar

- Martín-López J, Pérez-Rico C, Benito-Martínez S, Pérez-Köhler B, Buján J, Pascual G. The Role of the Stromal Extracellular Matrix in the Development of Pterygium Pathology: An Update. *J Clin Med*. 2021;10:5930.
- Van Acker SI, Van den Bogerd B, Haagdoorns M, Siozopoulou V, Ní Dhubbghaill S, Pintelon I, Koppen C. Pterygium-The Good, the Bad, and the Ugly. *Cells*. 2021;10:1567.
- Anguria P, Kitinya J, Ntuli S, Carmichael T. The role of heredity in pterygium development. *Int J Ophthalmol*. 2014;7:563-573.
- Kria L, Ohira A, Amemiya T. Immunohistochemical localization of basic fibroblast growth factor, platelet derived growth factor, transforming growth factor-beta and tumor necrosis factor-alpha in the pterygium. *Acta Histochem*. 1996;98:195-201.
- Adiguzel U, Karabacak T, Sari A, Oz O, Cinel L. Cyclooxygenase-2 expression in primary and recurrent pterygium. *Eur J Ophthalmol*. 2007;17:879-884.
- Park CY, Choi JS, Lee SJ, Hwang SW, Kim EJ, Chuck RS. Cyclooxygenase-2-expressing macrophages in human pterygium co-express vascular endothelial growth factor. *Mol Vis*. 2011;17:3468-3480.
- Martín-López J, Pérez-Rico C, García-Hondurilla N, Buján J, Pascual G. Elevated blood/lymphatic vessel ratio in pterygium and its relationship with vascular endothelial growth factor (VEGF) distribution. *Histol Histopathol*. 2019;34:917-929.

8. Loirand G, Sauzeau V, Pacaud P. Small G proteins in the cardiovascular system: physiological and pathological aspects. *Physiol Rev*. 2013;93:1659-1720.
9. Haataja L, Groffen J, Heisterkamp N. Characterization of RAC3, a novel member of the Rho family. *J Biol Chem*. 1997;272:20384-20388.
10. Shimizu A, Zankov DP, Kurokawa-Seo M, Ogita H. Vascular Endothelial Growth Factor-A Exerts Diverse Cellular Effects via Small G Proteins, Rho and Rap. *Int J Mol Sci*. 2018;19:1203.
11. Soga N, Namba N, McAllister S, Cornelius L, Teitelbaum SL, Dowdy SE, Kawamura J, Hruska KA. Rho family GTPases regulate VEGF-stimulated endothelial cell motility. *Exp Cell Res*. 2001;269:73-87.
12. Hall A. Rho GTPases and the control of cell behaviour. *Biochem Soc Trans*. 2005;33:891-895.
13. Ridley AJ, Paterson HF, Johnston CL, Diekmann D, Hall A. The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell*. 1992;70:401-410.
14. Diebold BA, Fowler B, Lu J, Dinauer MC, Bokoch GM. Antagonistic cross-talk between Rac and Cdc42 GTPases regulates generation of reactive oxygen species. *J Biol Chem*. 2004;279:28136-28142.
15. Dinauer MC. Regulation of neutrophil function by Rac GTPases. *Curr Opin Hematol*. 2003;10:8-15.
16. Karki P, Birukov KG. Rho and Reactive Oxygen Species at Crossroads of Endothelial Permeability and Inflammation. *Antioxid Redox Signal*. 2019;31:1009-1022.
17. Demiryürek S, Saracaloglu A, Kimyon S, Mete A, Eronat O, Temiz E, Nacarkahya G, Tunca ZS, Düzen B, Saygili O, Güngör K, Karakök M, Demiryürek AT. Increased Expressions of ICAM-2 and ICAM-3 in Pterygium. *Curr Eye Res*. 2019;44:645-650.
18. Alptekin M, Eroglu S, Tutar E, Sencan S, Geyik MA, Ulasli M, Demiryurek AT, Camci C. Gene expressions of TRP channels in glioblastoma multiforme and relation with survival. *Tumour Biol*. 2015;36:9209-9213.
19. Beden U, Irkeç M, Orhan D, Orhan M. The roles of T-lymphocyte subpopulations (CD4 and CD8), intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), HLA-DR receptor, and mast cells in etiopathogenesis of pterygium. *Ocul Immunol Inflamm*. 2003;11:115-122.
20. Tekelioglu Y, Turk A, Avunduk AM, Yulug E. Flow cytometrical analysis of adhesion molecules, T-lymphocyte subpopulations and inflammatory markers in pterygium. *Ophthalmologica*. 2006;220:372-378.
21. Yap AS, Kovacs EM. Direct cadherin-activated cell signaling: a view from the plasma membrane. *J Cell Biol*. 2003;160:11-16.
22. Mège RM, Gavard J, Lambert M. Regulation of cell-cell junctions by the cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol*. 2006;18:541-548.
23. Mack NA, Whalley HJ, Castillo-Lluva S, Malliri A. The diverse roles of Rac signaling in tumorigenesis. *Cell Cycle*. 2011;10:1571-1581.
24. Kim KW, Park SH, Kim JC. Fibroblast biology in pterygia. *Exp Eye Res*. 2016;142:32-39.
25. Steffen A, Ladwein M, Dimchev GA, Hein A, Schwenkmezger L, Arens S, Ladwein KI, Margit Holleboom J, Schur F, Victor Small J, Schwarz J, Gerhard R, Faix J, Stradal TE, Brakebusch C, Rottner K. Rac function is crucial for cell migration but is not required for spreading and focal adhesion formation. *J Cell Sci*. 2013;126:4572-4588.
26. Machacek M, Hodgson L, Welch C, Elliott H, Pertz O, Nalbant P, Abell A, Johnson GL, Hahn KM, Danuser G. Coordination of Rho GTPase activities during cell protrusion. *Nature*. 2009;461:99-103.
27. Didsbury J, Weber RF, Bokoch GM, Evans T, Snyderman R. Rac, a novel ras-related family of proteins that are botulinum toxin substrates. *J Biol Chem*. 1989;264:16378-16382.
28. Quinn MT, Evans T, Loetterle LR, Jesaitis AJ, Bokoch GM. Translocation of Rac correlates with NADPH oxidase activation. Evidence for equimolar translocation of oxidase components. *J Biol Chem*. 1993;268:20983-20987.
29. Werner E. GTPases and reactive oxygen species: switches for killing and signaling. *J Cell Sci*. 2004;117:143-153.
30. Yamauchi A, Kim C, Li S, Marchal CC, Towe J, Atkinson SJ, Dinauer MC. Rac2-deficient murine macrophages have selective defects in superoxide production and phagocytosis of opsonized particles. *J Immunol*. 2004;173:5971-5979.
31. Kim C, Dinauer MC. Rac2 is an essential regulator of neutrophil nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase activation in response to specific signaling pathways. *J Immunol*. 2001;166:1223-1232.
32. Filippi MD, Harris CE, Meller J, Gu Y, Zheng Y, Williams DA. Localization of Rac2 via the C terminus and aspartic acid 150 specifies superoxide generation, actin polarity and chemotaxis in neutrophils. *Nat Immunol*. 2004;5:744-751.
33. Azim AC, Cao H, Gao X, Joo M, Malik AB, van Breemen RB, Sadikot RT, Park G, Christman JW. Regulation of cyclooxygenase-2 expression by small GTPase Rac2 in bone marrow macrophages. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2007;293:668-673.
34. Amsellem V, Dryden NH, Martinelli R, Gavins F, Almagro LO, Birdsey GM, Haskard DO, Mason JC, Turowski P, Randi AM. ICAM-2 regulates vascular permeability and N-cadherin localization through ezrin-radixin-moesin (ERM) proteins and Rac-1 signalling. *Cell Commun Signal*. 2014;12:12.
35. Patterson C, Ruef J, Madamanchi NR, Barry-Lane P, Hu Z, Horaist C, Ballinger CA, Brasier AR, Bode C, Runge MS. Stimulation of a vascular smooth muscle cell NAD(P)H oxidase by thrombin. Evidence that p47(phox) may participate in forming this oxidase in vitro and in vivo. *J Biol Chem*. 1999;274:19814-19822.
36. Tian Y, Autieri MV. Cytokine expression and AIF-1-mediated activation of Rac2 in vascular smooth muscle cells: a role for Rac2 in VSMC activation. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2007;292:841-849.
37. De P, Peng Q, Traktuev DO, Li W, Yoder MC, March KL, Durden DL. Expression of RAC2 in endothelial cells is required for the postnatal neovascular response. *Exp Cell Res*. 2009;315:248-263.
38. Tan S, Pei W, Huang H, Zhou G, Hu W. Additive effects of simulated microgravity and ionizing radiation in cell death, induction of ROS and expression of RAC2 in human bronchial epithelial cells. *NPJ Microgravity*. 2020;6:34.
39. Hwang SL, Lieu AS, Chang JH, Cheng TS, Cheng CY, Lee KS, Lin CL, Howng SL, Hong YR. Rac2 expression and mutation in human brain tumors. *Acta Neurochir (Wien)*. 2005;147:551-554.
40. Abraham MT, Kuriakose MA, Sacks PG, Yee H, Chiriboga L, Bearer EL, Delacure MD. Motility-related proteins as markers for head and neck squamous cell cancer. *Laryngoscope*. 2001;111:1285-1289.
41. 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;178:817-827.
42. Hwang SL, Chang JH, Cheng TS, Sy WD, Lieu AS, Lin CL, Lee KS, Howng SL, Hong YR. Expression of Rac3 in human brain tumors. *J Clin Neurosci*. 2005;12:571-574.