



T.C.

**KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
PLASTİK REKONSTRÜKTİF VE ESTETİK CERRAHİ A.D.**

**NÖROFİBROMATOZİSLİ HASTALARDA GÖRÜLEN ATROFİK
SKAR İLE YARA İYİLEŞMESİ VE EKSTRASELLÜLER
MATRİKS ELEMANLARININ İLİŞKİLERİ, NÖROFİBROMLU
DOKUDAKİ DAMAR ENDOTELİ VE DAMAR DÜZ KASINDAKİ
DEĞİŞİKLİKLERİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Dr. Osman Ünsal DEMİR

UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Yrd. Doç. Dr. Elif SARI

KIRIKKALE

2015



T.C.

**KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
PLASTİK REKONSTRÜKTİF VE ESTETİK CERRAHİ A.D.**

**NÖROFİBROMATOZİSLİ HASTALARDA GÖRÜLEN ATROFİK
SKAR İLE YARA İYİLEŞMESİ VE EKSTRASELLÜLER
MATRİKS ELEMANLARININ İLİŞKİLERİ, NÖROFİBROMLU
DOKUDAKİ DAMAR ENDOTELİ VE DAMAR DÜZ KASINDAKİ
DEĞİŞİKLİKLERİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Dr. Osman Ünsal DEMİR

UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Yrd. Doç. Dr. Elif SARI

KIRIKKALE

2015

Uzmanlık Öğrencisinin Adı: *Dr. Osman Ünsal DEMİR*

Çalışmanın Başlığı: Nörofibromatozisli Hastalarda Görülen Atrofik Skar ile Yara İyileşmesi ve Ekstrasellüler Matriks Elemanlarının İlişkileri, Nörofibromlu Dokudaki Damar Endoteli ve Damar Düz Kasındaki Değişikliklerin Değerlendirilmesi

Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesinde “Plastik Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Uzmanlık Eğitimi” çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma aşağıda belirtilen jüri üyeleri tarafından uzmanlık tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 09 /03/ 2015

Yrd. Doç. Dr.Elif SARI

Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi
Plastik Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi
Anabilim Dalı
Jüri Başkanı

Prof. Dr. Ali Teoman TELLİOĞLU
Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi
Plastik Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi
Anabilim Dalı Başkanı
Üye

Doç. Dr. Bülent BAKAR
Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi
Beyin ve Sinir Cerrahisi
Anabilim Dalı
Üye

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	i
ÖNSÖZ	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	vi
GRAFİKLER	viii
TABLolar	ix
RESİMLER.....	x
ÖZET.....	xiii
ABSTRACT	xv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Nörofibromatozis (NF)-I.....	3
2.1.1. Tanı	4
2.1.2. Ayırıcı Tanı	5
2.1.3. Klinik Özellikler.....	6
2.1.4. Nörofibromatozisin Etkilediği Organ ve Sistemler.....	8
2.1.4.1. Deri.....	8
2.1.4.1.1. Nörofibromlar	10
2.1.4.1.2. Malign Periferik Sinir Kılıfı Tümörleri	11
2.1.4.1.3. Glomus Tümörleri.....	12
2.1.4.2. Santral Sinir Sistemi.....	12
2.1.4.2.1. Nörolojik Sorunlar	12
2.1.4.2.2. Kognitif Sorunlar ve Davranışsal Güçlükler....	13
2.1.4.2.3. Santral Sinir Sistemi Tümörleri	14
2.1.4.2.4. Optik Yolak Gliomaları.....	14
2.1.4.3. Ortopedik Sorunlar.....	15
2.1.4.4. Kardiyovasküler Sorunlar	16
2.1.4.5. Gastrointestinal Sorunlar.....	17
2.1.4.6. Psikiyatrik Sorunlar.....	17
2.1.4.7. Doğum Kontrolü ve Gebelik.....	17

2.1.4.8. Genetik Danışmanlık.....	17
2.2. Yara İyileşmesi.....	18
2.2.1. İnflamatuar Faz	19
2.2.2. Proliferatif Faz	19
2.2.3. Matürasyon (Yeniden modelleme) Fazı.....	22
2.3. Keloid ve Hipertrofik Skar.....	24
2.3.1. Keloid ve Hipertrofik Skar Nedenleri	26
2.3.2. Keloid ve Hipertrofik Skar Tedavisinde Kullanılan Yöntemler	28
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	32
3.1. Etik Kurul Onayı ve Finansal Destek	32
3.2. Çalışma Grubunun Seçimi	32
3.3. Cerrahi Prosedür.....	34
3.4. Laboratuvar Analizleri	34
3.4.1. Dokudan Hücre İzolasyonu ve Fibroblast Kültürü	34
3.4.2. Scratch Assay	35
3.4.3. Human Wound Healing Real Time PCR Array	35
3.4.4. İmmünohistokimyasal Değerlendirme	35
3.4.5. Farklılaşma Değerlendirmesi	36
3.5. İstatistiksel Analiz.....	36
4. BULGULAR.....	37
4.1. Scratch Assay	37
4.1.1. SB-Normal Deri Grubu	37
4.1.2. NF-Normal Deri Grubu.....	39
4.1.3. NF Grubu	40
4.2. İmmünohistokimyasal Değerlendirme	43
4.2.1. SMA (Smooth muscle actin alpha)	43
4.2.2. Calponin	44
4.2.3. Platelet Kökenli Büyüme Faktörü Reseptörü Alfa (Platelet-derived growth factor receptor [PDGFR] alpha)	45
4.2.4. Fibroblast Büyüme Faktörü (Fibroblast Growth Factor=FGF).....	46
4.2.5. Tip I Kollajen	48

4.2.6. MHC (Myosin heavy chain)	49
4.2.7. Tip III Kollajen	50
4.3. Yara İyileşmesi Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR).....	51
5. TARTIŞMA	52
5.1. Scratch Assay.....	52
5.2. İmmunohistokimyasal analiz.....	53
5.3. PCR gen analizi.....	57
6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	59
7. KAYNAKLAR	60
8. EKLER.....	81

ÖNSÖZ

Asistanlık eğitimimin büyük bölümünde mesleki tecrübe ve bilgi birikimleriyle beni aydınlatan ve mesleğimi en iyi şekilde gerçekleştirmem konusunda beni eğiten, desteklerini esirgemeyen çok değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. İbrahim VARGEL'e, Sayın Doç. Dr. Tarık ÇAVUŞOĞLU'na ve Sayın Doç. Dr. İlker YAZICI'ya,

Asistanlık eğitimimin son dönemlerinde beraber çalışma fırsatı ve şansı bulduğum, mesleğime farklı bakış açısı ve tecrübe kazandıran çok değerli hocam Anabilim Dalı Başkanım Sayın Yrd. Doç. Dr. Elif SARI'ya,

Birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum çalışma arkadaşlarım Dr. Sevin FARİZ, Dr. Esen KARAKAYA, Dr. Cahit VURAL, Dr. Murat GÜREL, Dr. Kağan BEKİRCAN'a

Tezimin hazırlanmasında bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen tez danışmanım Anabilim Dalı Başkanım Sayın Yrd. Doç. Dr. Elif SARI'ya,

Tez projemin iskeletini oluştururken bilgi ve deneyimleriyle bana yön veren proje yöneticim Sayın Doç. Dr. Tarık ÇAVUŞOĞLU'na, fikirlerini ve yardımlarını hiç esirgemeyen Sayın Prof. Dr. İbrahim VARGEL'e, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Pediatrik Nöroloji Anabilim Dalından Sayın Prof. Dr. Banu ANLAR'a, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Pediatrik Hematoloji/Onkoloji Anabilim Dalı, Kök Hücre Laboratuvarından Sayın Prof. Dr. Duygu Uçkan ÇETİNKAYA'ya, kök hücre oluşturulmasında desteğini sıklıkla gördüğüm Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Kök Hücre Bilimleri Laboratuvarından Sayın Uzman Biyolog İrem Akar Soycan'a,

Tezimin kök hücre oluşturulması, scracth assay testi kısımlarında yardımını ve samimiyetini esirgemeneyen Kırıkkale Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarından Sayın Prof. Dr. Mustafa TÜRK'e,

Tezimin RT-PCR array, cDNA eldesi ve immunohistokimya kısımlarında titiz ve hassas davranışlarıyla yardımlarını esirgemeyen Kırıkkale Üniversitesi Patoloji Anabilim Dalından Dr. Fatma Benli TANRIKULU'na, Muharrem ATLI'ya, Selahattin GÖNAYLI'ya, Nisa TANDOĞAN'a, Uğur ESEN'e, Yasin DİLBAZ'a,

Tez jürimde bulunan, tıp fakültesine yeni başladığım dönemde tanışma fırsatı bulduğum dönem koordinatörlüğümüzü yapan ayrıca kişiliği ve cerrahisi ile Plastik Cerrahi sevgisini bana aşıl原因ayan Sayın hocam Prof. Dr. Ali Teoman TELLİOĞLU'na,

Yine tez jürimde bulunan ve fazlasıyla yardımlarını gördüğüm Sayın Doç. Dr. Bülent BAKAR'a

Asistanlık eğitimim boyunca her sıkıştığım da yardımına koşan arkadaşlarım, kardeşlerim Dr. İbrahim KALA'ya, Dr. Yasin HABİPOĞLU'na, Dr. Umut Orkun ÇELEBİ'ye

Klinikte ve ameliyathane'de desteklerini esirgemeyen Hemşire Nagihan GÜRÜN ve Handan SOYUPEK'e, diğer hemşire arkadaşlara ve yardımcı personele,

Tıp Fakültesine başladığım ilk günden beri her daim bana inanan, güvenen ve her konuda destekleyen babam Faruk DEMİR'e, annem Gülay DEMİR'e, kardeşlerim Caner DEMİR'e ve Mustafa Bilal DEMİR'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Biliyorum ki bu saydığım insanlar meslek hayatım boyunca desteklerini hiçbir zaman benden esirgemeyecekler ve ben onların bu desteğini her zaman hissedeceğim.

Dr. Osman Ünsal DEMİR

2015

KISALTMALAR

CGH	: Comparative Genomic Hybridization
CTGF	: Connective Tissue Growth Factor
DAB	: 3,3'diaminobenzidine
DHPLC	: Denaturing High-Performance Liquid Chromatography
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagles Medium
ECM	: Extracellular Matrix
EDTA	: Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
EGF	: Epidermal Growth Factor
FBS	: Fetal Bovine Serum
FGF	: Fibroblast Growth Factor
FISH	: Fluorescence in situ Hybridization
IQ	: Intelligent Quotient
GAG	: Glikozaminoglikan
Maks	: Maksimum
Med	: Medyan
Min	: Minimum
MHC	: Myosin Heavy Chain
MLPA	: Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification
MMP	: Matrix Metalloproteinase
MPNST	: Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumors
MRG	: Manyetik Rezonans Görüntüleme
MS	: Milattan Sonra
NF-I	: Nörofibromatozis Tip I
NGF	: Neural Growth Factor
NIH	: The National Institutes of Health
OPG	: Optic Pathway Glioma
Ort	: Ortalama
PCR	: Polymerase Chain Reaction
PDGF	: Platelet-Derived Growth Factor
SPSS	: Statistical Packages for the Social Science
SS	: Standart Sapma
TGF	: Transforming Growth Factor
TIMP	: Tissue İnhibitor Of Metalloproteinase

TNF : Tumor Necrosis Factor
UBO : Unidentified Bright Objects
VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

GRAFİKLER

Grafik 4.1. 5, 15 ve 30. saatlerde SB-Normal deri, NF-Normal deri ve NF gruplarında gözlenen yaklaşım yüzdelerinin çizgi grafiği	42
---	----

TABLULAR

Tablo 2.1.	Nörofibromatozis-I tanı ölçütleri	3
Tablo 2.2.	Nörofibromatozis-I'in ayırıcı tanısı	4
Tablo 2.3.	Nörofibromatozis-I'i olan çocukların değerlendirilmesi	7
Tablo 2.4.	Nörofibromatozis-I'in majör klinik manifestasyonlarının sıklıkları ve başlangıç yaşları	9
Tablo 4.1.	5, 15 ve 30. saatlerde SB-Normal deri, NF-Normal deri ve NF gruplarında gözlenen yaklaşım yüzdelerinin karşılaştırılması	42
Tablo 4.2.	Üç grubun PDGFR tümör, PDGFR kapiller endotel, PDGFR kaslı damar endoteli, PDGFR kaslı damar duvarı değerlerinin karşılaştırılması	46
Tablo 4.3.	Üç grubun FGF tümör, FGF kapiller endotel, FGF kaslı damar endoteli ve FGF kaslı damar duvarı değerlerinin karşılaştırılması	47
Tablo 4.4.	Üç grubun tümör stroma kollajeni ve stromal hücre intensitesi değerlerinin karşılaştırılması	48
Tablo 4.5.	Üç grubun tümör stromal kollajen I ve stromal hücresel yaygınlık (%) sıklıkları	49
Tablo 4.6.	SB-Normal deri ile NF grupları arasında PCR sonuçlarının karşılaştırılması sonrasında istatistiksel anlamlı fark çıkan genlerin tablosu	51
Tablo 4.7.	SB- Normal deri ile NF-Normal deri grupları arasında PCR sonuçlarının karşılaştırılması sonrasında istatistiksel anlamlı fark çıkan genlerin tablosu	51

RESİMLER

- Resim 4.1.** SB-Normal Deri/ Olgu 1: 5. Saat: hasarlı bölgeye doğru hücre sel göç ve hücre uzantılarında belirginleşme saptandı; 15. saat: hücrelerin % 10-20 oranında hasarlı bölgeye göç ettiği ve tutunduğu, fibriler bir özellik gösterdikleri gözlemlendi; 30. Saat: hücre yönlenmesi ve proliferasyon olmasına rağmen hasarlı bölgenin sadece %20-%30 oranında hücrelerce doldurulduğu, %1-2 oranında yüzeyden kalktığı ve morfolojik olarak şekillerinde yuvarlaklaşma gözlemlendi. 37
- Resim 4.2.** SB-Normal Deri/ Olgu 2: 5. Saat: hasarlı bölgeye doğru hücre sel göç ve hücre uzantılarının belirginleştiği gözlemlendi; 15.saat: hasarlı bölgenin kapatılması çok daha belirgin ve karakteristik özellik gösterdi (%90 oranında); 30. saat: hasarlı bölgenin neredeyse tamamı hücreler tarafından doldurulduğu ve diğer bölgelerle aynı hücre yoğunluğuna geldiği gözlemlendi. 38
- Resim 4.3.** SB-Normal Deri/ Olgu 3: 5. Saat: hasarlı bölgeye doğru hücre sel göç ve hücre uzantılarının belirginleştiği gözlemlendi; 15.saat: hasarlı bölgeye hücre sel göç, % 50 oranında hasarlı bölgenin kapandığı ve hücrelerin sitoplazmik uzantılarının birbirleriyle teması dikkati çekti; 30.saat: hasarlı bölgenin hücrelerce % 70 oranında doldurulduğu gözlemlendi. 38
- Resim 4.4.** SB-Normal Deri/ Olgu 4: 5. Saat: hasarlı bölgeye doğru hücre sel göç ve hücre uzantılarının belirginleştiği gözlemlendi; 15. Saat: hücre sel göç ve proliferasyon ile % 40 oranında hasarlı bölgenin doldurulduğu gözlemlendi; 30. Saat: hasarlı bölgenin % 50 oranında kapandığı gözlemlendi. 39
- Resim 4.5.** NF-Normal Deri/ Olgu 1: 5. Saat: hasarlı bölgeye hücre göçü gözlenmediği gibi % 1-2 oranında hücrelerin yuvarlaklaştığı ve plate tabanından kalktığı gözlemlendi; 15. Saat: hasarlı bölgede % 10'a yakın oranda hücre artışı tespit edildi. 39

- Resim 4.6.** NF-Normal Deri/ Olgu 2: 5. Saat: hücre yoğunluğu kontrol grubuna göre daha düşük olmakla birlikte hasarlı bölgeye doğru hücrelerin sitoplazmik uzantıları gözlemlendi; 15. Saat: plate genelinde hücre sayısında artış ve hasarlı bölgede % 30-40 oranında kapanma gözlemlendi; 30. Saat: hücre sayısında artış ve % 70 oranında kapanma gözlemlendi. 40
- Resim 4.7.** NF/ Olgu 1: 5. Saat: hücre yoğunluğunda artış olmamakla birlikte bazı hücrelerin sitoplazmik uzantıları dikkat çekti; 15. saat: hasarlı bölgenin bazı kısımlarında % 30-40 oranında ve plate genelinde hücre yoğunluğunda artış gözlemlendi; 30. saat: proliferasyon devam etmekte birlikte 15. Saat ile arasında ciddi bir değişiklik gözlenmedi..... 40
- Resim 4.8.** NF/ Olgu 2: 5. Saat: ciddi hücre yönelmesi ve sitoplazmik uzantılar saptandı; 15.saat: hücrelerin hasarlı bölgeye göçü ve hasarlı bölgedeki hücre yoğunluğu dikkat çekti. Hasarlı bölgede % 30-40 oranında daralma gözlemlendi; 30.saat: daralma % 60 oranında tespit edildi..... 41
- Resim 4.9.** NF/ Olgu 3: 5. Saat: hasarlı bölgeye doğru fibriler uzantılar gözlemlendi; 5.saat: hücre yoğunluğunda artış ve % 50-60 oranında daralma saptandı; 30.saat: yer yer hasarlı bölge kapanmış ve hücre yönelmesi dikkat çekici, hücre yoğunluğunun neredeyse ikinci katına çıktığı gözlemlendi. 41
- Resim 4.10.** SB-Normal deri, NF-Normal deri ve NF gruplarında gözlenen SMA pozitifliği. 43
- Resim 4.11.** SB-Normal deri, NF-Normal deri ve NF gruplarında gözlenen vasküler yapıların özelliklerini gösteren SMA boyanma paternleri. . 43
- Resim 4.12.** Derin dermis lokalizasyonunda kalın ve geniş cidarlı damarlar çevresinde schwannom hücrelerini gösteren SMA boyanma paternleri. 44
- Resim 4.13.** Calponinle yapılan immunohistokimyasal boyamada musküler yapıdaki kalın cidarlı arter ve venler..... 44

Resim 4.14.	SB-Normal deri, NF-Normal deri ve NF gruplarındaki calponin boyanma paterni.....	45
Resim 4.15.	SB-Normal deri, NF-Normal deri ve NF gruplarındaki PDGFR boyanma paterni.....	45
Resim 4.16.	Kapiller ve geniş cidarlı damarlarda FGF boyanma paterni	46
Resim 4.17.	SB-Normal deri, NF-Normal deri ve NF gruplarındaki FGF boyanma paterni.....	47
Resim 4.18.	SB-Normal deri, NF-Normal deri ve NF gruplarındaki tip I kollajen boyanma paterni	48
Resim 4.19.	NF grubunda MHC boyanma paterni.....	49
Resim 4.20.	SB-Normal deri, NF-Normal deri ve NF gruplarındaki MHC boyanma paterni.....	50
Resim 4.21.	SB-Normal deri ve NF gruplarındaki tip III kollajen boyanma paterni.	50

ÖZET

Demir, O. Ü. Nörofibromatozisli Hastalarda Görülen Atrofik Skar İle Yara İyileşmesi ve Ekstrasellüler Matriks Elemanlarının İlişkileri, Nörofibromlu Dokudaki Damar Endoteli ve Damar Düz Kasındaki Değişikliklerin Değerlendirilmesi. Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Plastik Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, Kırıkkale, 2015.

Nörofibromatozis tip I (NF-I), “café-au-lait” lekeleri ve nörofibromlarla karakterize otozomal dominant bir bozukluktur. Vasküler NF-1 lezyonları, çevredeki kan damarları ve yumuşak dokunun kırılğan doğası nedeniyle cerrahi hemostazın güçleşmesine bağlı olarak letal komplikasyonlara neden olabilmektedir. NF-I hastalarında, kötü yara iyileşmesine karşın hipertrofik skar veya keloid oluşumu gözlenmemektedir. Bu çalışmanın amacı, yara iyileşmesi sırasında skar oluşumu ve bozuk hemostazla ilişkili olan parametreleri immünohistokimyasal olarak, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve "scratch assay" yöntemleri kullanılarak incelemek ve değerlendirmek olmuştur. Çalışma için Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Yerel Etik Kurulu'ndan 15.04.2013 tarihinde 08/09 karar numarası ile yazılı onay alınmıştır ve Helsinki Deklarasyonu'na [142] ve İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu'na [143] uygun şekilde yürütülmüştür.

Bu amaçla “scratch assay” testi için NF-I tanısı konulmuş 3 hastanın nörofibrom dokularından, NF-I tanısı konulmuş 2 hastanın nörofibrom olmayan sağlam deri dokusundan ve 4 adet herhangi bir hastalığı bulunmayan sağlıklı bireylerden deri doku örnekleri alınmıştır. İmmünohistokimyasal çalışma için NF-I tanısı konulmuş 5 hastanın nörofibrom dokularından, NF-I tanısı konulmuş 5 hastanın nörofibrom olmayan sağlam deri dokusundan ve 3 adet herhangi bir hastalığı bulunmayan sağlıklı bireylerden deri doku örnekleri alınmış, Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı tarafından nörofibrom tanısı konulmuş ve klinik olarak NF-I tanısı almış 8 hastanın eskiye ait patoloji örnekleri de çalışmaya dahil edilmiştir. PCR çalışması için NF-I tanısı konulmuş 5 hastanın nörofibrom dokularından, NF-I tanısı konulmuş 3 hastanın nörofibrom olmayan sağlam deri dokusundan ve 2 adet herhangi bir hastalığı bulunmayan sağlıklı bireylerden deri

dokuları alınmıştır. Elde edilen laboratuvar verilerine istatistiksel analiz yöntemleri uygulanmıştır.

Çalışma sonunda "Scratch assay"de, sağlıklı birey (SB)-Normal deri, NF-Normal deri ve NF lezyonu arasında yaklaşım yüzdeleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı (tüm karşılaştırmalar için $p>0.05$). Üç gruptaki doku örneklerinin kapiller endotel, kaslı damar endoteli ve kaslı damar duvarındaki platelet kökenli büyüme faktörü reseptörü (PDGFR), fibroblast büyüme faktörü (FGF), tümör stroma kollajeni ve stromal hücre intensitesi değerleri arasında istatistiksel olarak fark yoktu (tüm karşılaştırmalar için $p>0.05$). PCR sonuçlarına göre; NF-I lezyonu ve NF-I olgularının sağlam deri fibroblastlarında katepsin G geninin (CTSG), fibrinojen alfa zincir geninin (FGA), interferon- γ geninin (IFNG) ve IL-2 geninin (IL2) ekspresyonu sağlıklı bireylerin deri fibroblastlarına göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu.

Sonuç olarak bu parametreler genel bir çerçevede NF-1'de anormal fibroblastik aktivitede artış olabileceğini ancak bu aktivite artışının keloid veya hipertrofik skar gibi anormalliklere neden olabilecek düzeylere ulaşmadığını düşündürmüştür.

Ayrıca bu çalışma sonuçları NF-1'de kanamaya yatkınlığı artıran süreçlerin patolojik anjiyogenez ve trombotik aktivitedeki bozulmalarla ilişkili olabileceğini düşündürmüştür.

Anahtar Kelimeler : Nörofibromatozis, yara iyileşmesi, anormal skar, hemostaz

ABSTRACT

Demir, O. Ü. The Evaluation of Relationships Between Atrophic Scar with Wound Healing and Extracellular Matrixin Patients with Neurofibromatosis; and Changes in Vascular Endothelium and Smooth Muscle in Neurofibroma Tissue. Kırıkkale University, Faculty of Medicine, Department of Plastic Reconstructive and Aesthetic Surgery. Thesis of Speciality, 2014.

Neurofibromatosis type 1 (NF-1) is an autosomal dominant disorder characterized with café-au-lait spots and neurofibroma. Vascular NF-1 lesions can cause lethal complications because surgical heamostasis is difficult to achieve due to the fragile nature of the surrounding blood vessels and soft tissue. In patients with NF-1, hypertrophic scars and keloid formation has not been observed in spite of the poor wound healing. The aim of the present study was to investigate and evaluate the parameters related to scar formation and heamostasis during wound healing in patients with NF-1 by using the immunohistochemical methods, scratch assay and real time polymerase chain reaction (PCR). The study, has been approved by Local Ethical Committee of Kırıkkale University Medical Faculty on 15.04.2013 (Approval no: 08/09).

For this purpose, in scratch assay, tissue specimens were obtained from neurofibroma of 3 patients with NF-I, healthy skin of 2 patients with NF-I and skin of 4 healthy individuals. For PCR analysis, the specimens were obtained from neurofibroma of 5 patients with NF-I, healthy skin of 3 patients with NF-I and skin of 2 healthy individuals. In immunohistochemical evaluation, the specimens were obtained from neurofibroma of 5 patients with NF-I, healthy skin of 5 patients with NF-I and skin of 3 healthy individuals. Old pathology specimens of 8 patients with NF-I, which had been histologically diagnosed as neurofibroma by Department of Pathology Kırıkkale University, were used. Laboratory data were analyzed by statistical methods.

In scratch assay, there was no difference between healthy individual (HI)-normal skin, NF-normal skin and NF lesion in terms of closure percentage ($p>0.05$)

for all comparisons). There was no difference among the groups in terms of capillary endothelium, vascular endothelium with muscle and vascular wall with muscle, in terms of platelet derived growth factor receptor (PDGFR), fibroblast growth factor (FGF), tumor stroma collagen and stromal cell intensity ($p > 0.05$ for all comparisons). Quantitative real-time PCR performed to the fibroblast cell lines revealed that cathepsin G (CTSG), fibrinogen alpha chain (FGA), interferon- γ (IFNG) ve IL-2 (IL2) levels of the healthy individuals were significantly higher than NF-1 lesion and normal skin fibroblasts of patients with NF-1 ($p < 0.05$).

When these parameters were evaluated in a general framework, it was suggested that abnormal fibroblastic activity may increase in NF-1, but this activity increase can not reach the level which causes abnormality such as hypertrophic scar and keloid.

Additionally, it may be suggested that process inducing bleeding diathesis may be associated with impairment in angiogenesis and thrombotic activity

Key Words : Neurofibromatosis, wound healing, abnormal scar, haemostasis

1. GİRİŞ

Nörofibromatozis Tip I (NF-I), çeşitli fenotipleri olan, otozomal dominant genetik bir hastalıktır ve “von Recklinghausen hastalığı” olarak da bilinir [1, 2]. Toplumda en sık rastlanan nörokutanöz sendromdur ve hastalığın nedeni 17. kromozomda meydana gelen bir mutasyondur [3-5].

NF-I’de nörofibrom dokularının yaklaşık %70’nin kollajen olduğu [6, 7] nörofibroma fibroblastlarının çoğunlukla tip I ve III kollajen sentezlediği ve normal deri fibroblastları ile karşılaştırıldığında erken pasajlardaki fibroblastların daha yüksek miktarda kollajen sentezledikleri görülmüştür [6-8]. Çalışmalar, fibroblastların nörofibroma patogeneziye yol açtıklarını işaret eder niteliktedir. Nörofibromin ekspresyonu normal fibroblastlarda da görülmektedir ve derideki yara iyileşmelerinde artış göstermektedir [9]. Oysa NF-I olgularında keloid veya hipertrofik skar gelişimi gözlenmemektedir [10]. NF-I knockout farelerle yapılan deneylerde, fibroblastlar tarafından gerçekleştirilen yara iyileşmesinin anormal olduğu gözlenmiştir. Ancak nörofibromalardaki fibroblastların tümör mikroçevresine cevap olarak mı, yoksa NF-I mutasyonu sonucu olarak mı anormal davranış sergiledikleri hala aydınlatılamamıştır [11].

Bu nedenle fibroblast aktivitesini (ve/veya yara iyileşmesi) etkileyebilecek parametrelerin değerlendirilmesi gerekir. Platelet kökenli büyüme faktörü (Platelet Derived Growth Factor=PDGF), patolojik skar/keloid oluşumunda önemli bir role sahiptir [12, 13]. Keloid fibroblastlarında, kollajen üretiminin arttığı [14] ve keloid lezyonunda tip I prokollajen üretiminin yüksek olduğu gösterilmiştir [15]. FGF’nin, keloid fibroblastlarda kollajen ekspresyonunu azalttığı bulunmuştur [16].

Keloid dokusunda, PDGF gen (PDGFA) ekspresyonu yüksek bulunmuştur [17]. Anormal skardan elde edilen fibroblastlarda tip I kollajen düzeylerinin normal derideki fibroblastlardan yüksek olduğu saptanmıştır [18]. İnterferon (IFN)- γ , keloid oluşumu sırasında tümör büyüme faktörü (Tumour Growth Factor=TGF)- β tarafından indüklenen tip I kollajen üretimini inhibe edememektedir [19]. Hipertrofik

skar ve keloid olgularında, sistemik bir yanıt olarak interlökin (IL)-2 ve IL-6 düzeylerinin arttığına dair kanıtlar vardır [20, 21].

NF-1 rezeksiyonlarında tümörün fazla kanlanması kaynaklanan sıklıkla yaşamı tehdit eden intraoperatif ve postoperatif kanama komplikasyonu sıklıkla [22]. Kanamanın, anormal vaskülarizasyon veya trombotik süreçte bir aksama ile ilişkili olup olmadığı bilinmemektedir.

Anjiyogenez ile ilişkili bir faktör olan fibroblast büyüme faktörü (Fibroblast Growth Factor=FGF) [23], endotel hücrelerinin kan damarı yapılarına dönüştürüldüğü süreçte önemli bir role sahiptir [24]. Vasküler endotelyal büyüme faktörü (Vascular Endothelial Growth Factor=VEGF) de, anjiyogenezde etkin bir faktördür [25]. Katepsin G, platelet trombus oluşumunu bozarak antitrombotik etki gösterir [26]. Fibrinojen alfa zincir geni (FGA), hepatositlerde fibrinojen ekspresyonu ile [27] ve FGA delesyonu afibrinojenemi ile ilişkilendirilmektedir [28].

Bu çalışmada hipertrofik skar ve keloidin görülmediği NF-I nörofibrom dokusundaki fibroblast ve fibroblastlarca üretilen kollajen tip ve miktarındaki değişikliklerin skar formasyonu üzerine etkileri araştırılmıştır. Ayrıca bu çalışmanın tersden gelim ile Plastik Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahinin temel uğraşlarının başında gelen skar dokusunun oluşumuna dair ipuçlarına ulaşılarak hipertrofik skar ve keloid patogenezi anlamaya yardımcı olacağı düşünülmüştür. Nörofibromlu dokudaki kanama eğiliminin veya normalden fazla kanamanın altında yatabilecek nedenlerin araştırılması da bu çalışmada amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Nörofibromatozis (NF)-I

Milattan sonra (MS) 1000. yıldan sonraki tarihlere ait el yazmalarında, tanısının nörofibromatozis olduğu tahmin edilen bireylerden söz edilmektedir [29]. Ancak, 1881 yılında von Recklinghausen bu benign tümörün periferik sinir kılıfından kaynaklandığını gösterene kadar nörofibroma terimi kullanılmamıştır [30]. Bu hastalığa katkıları nedeniyle bu klinik tabloya von Recklinghausen'nin adı verilmiştir. Ancak, nörofibromatozisin farklı formları 20. yy sonlarına kadar ayırt edilmemiştir (Tablo 2.1).

Tablo 2.1. Nörofibromatozis-I'in ayırıcı tanısı.

Nörofibromatozis-I'in Ayırıcı Tanısı
<ul style="list-style-type: none">• Nörofibromatozisin diğer formları<ul style="list-style-type: none">○ Segmental/mozaiik NF-I○ Watson sendromu○ Otozomal dominant multipl café au lait lekeleri, tek başına○ Nörofibromatozis-II○ Schwannomatosis• Café au lait lekeleri gözlenen diğer klinik durumlar<ul style="list-style-type: none">○ McCune-Albright sendromu○ DNA tamir sendromları○ Kolonun herediter nonpolipozis kanserine neden olan genlerin birinde homozigosite• NF-I ile karışan pigmente maküllerle giden klinik durumlar<ul style="list-style-type: none">○ LEOPARD sendromu○ Nörokutanöz melanozis○ Peutz-Jeghers sendromu○ Piebaldizm• Lokalize aşırı büyüme sendromları<ul style="list-style-type: none">○ Klippel-Trenauny-Weber sendromu○ Proteus sendromu• Nörofibromalarla karışan tümörler<ul style="list-style-type: none">○ Lipomatozis○ Fibromatozis○ Multipl endokrin neoplazi tip 2B

"The National Institutes of Health (NIH) Consensus Development Conference" tarafından NF-I için tanı ölçütleri geliştirilmiştir. Bu ölçütlerde deri, kemik ve sinir sisteminin tutulumu vurgulanmıştır [31]. 1990 yılında NF-I geni 17q11.2 kromozomundan klonlanmıştır [32, 33]. Bu genin ürünü olan

"nörofibromin", sinir sisteminde yüksek düzeyde eksprese edilmekte ve tümör baskılayıcı olarak işlev görmektedir. Mutasyona bağlı gelişen nörofibromin kaybı benign ve malign tümör gelişim riskini artırmaktadır [34-36].

2.1.1. Tanı

NF-I insidansı, 2500-3000 doğumda birdir. Tanı, klinik değerlendirmeye ve bu durumun iki veya daha fazla ölçütün varlığına dayanarak konur [31, 37] (**Tablo 2.2**). Bu tanı ölçütleri klinik açıdan kullanışlıdır ancak mozaik/segmental NF-I'i olan bazı bireylerin tanı ölçütlerini tam olarak karşılanmadığı da akılda tutulmalıdır. Bu olgularda, altı veya daha fazla café au lait lekesi, deri katlantısı (aksilla veya kasık) çillenmesi veya nörofibromlar gözlenir. Ancak, deri manifestasyonları vücudun sınırlı bir bölgesinde gözlenmektedir [38].

Tablo 2.2. Nörofibromatozis-I tanı ölçütleri.

NIH consensus development conference 1988 [31]
<ul style="list-style-type: none">• 6 veya daha fazla sayıda café au lait makülleri (çocuklarda >0.5 cm ve erişkinlerde >1.5 cm)• 2 veya daha fazla sayıda kutanöz/subkutanöz nörofibroma veya bir adet pleksiform nörofibrom• Aksilla veya kasıkta çillenme• Optik sinir gliomu• 2 veya daha fazla sayıda Lisch nodülü (yarıklı lamba muayenesinde iris hamartomları)• Kemik displazisi (sfenoid kanat displazisi, uzun kemiklerde eğilme±psödoartrozis)• Birinci derece akrabada NF-I varlığı

NF-I olgularının yaklaşık yarısında NF-I aile öyküsü yoktur [39]. Tek başına altı adet café au lait öyküsü olan ve aile öyküsü olmayan çocuklar NF-I olguları ile aynı şekilde izlenmelidir. Çünkü, bu hastaların % 95'inde NF-I gelişir [40]. Bazen geç ergenlik veya erken 20'li yaşlara kadar NF-I'in diğer bulguları gelişmeyebilir. Bu çocuklarda, Lisch nodüllerini saptamak amacıyla yarıklı lamba muayenesi yardımcı olacaktır. "NF-I mutasyonel analizi" tanı belirsizliği olan bazı olgularda ve prenatal tanı sürecinde tanıyı netleştirmeye yardımcı olabilir. Ancak, genetik testlerin rutin olarak kullanılması önerilmemektedir ve genetik testler öncesinde uzman

konsultasyonu önemlidir. Ayrıca, NF-I tanısı net olan bireylerde asemptomatik kutanöz nörofibrom biyopsisi yapılmamalıdır [41].

T2 ağırlıklı beyin manyetik rezonans görüntüleme (MRG) hiperintens lezyonlar (UBO), aberan miyelinizasyon veya gliozisten kaynaklanıyor olabilir. Bu bulgular, NF-I için patognomoniktir; en sık 8-16 yaş arasındaki çocuklarda oluşur ve erişkinlikte kaybolma eğilimindedir [42]. Bu lezyonlar, hafif kognitif kötüleşmeye neden olabilir [43-45]. Bu lezyonların varlığı, NF-I tanısı konmasına yardımcı olabilir fakat genel anestezi altında MRG küçük çocuklarda bu lezyonları saptamak amacıyla kullanılmamalıdır [46].

2.1.2. Ayırıcı Tanı

NF-I'in ayırıcı tanısında; diğer nörofibromatozis tipleri, café au lait lekelerine neden olan diğer durumlar veya café au lait lekeleriyle karışabilecek pigment değişiklikleri akılda tutulmalıdır. Aynı şekilde, tümörler veya lokalize vücut bölgesi büyümeleri, NF tanısında akılda tutulması gereken diğer klinik durumlardır [47-53] (**Tablo 2.1**).

Genel toplumun % 10'nun vücudunda bir veya iki adet café au lait lekesi oluşabileceği bilinmektedir. Vücudunda 3-5 adet café au lait lekesi oluşan çocuklar, NF-I'in diğer bulguları olmasa bile bir nörofibromatozis kliniğinde izlenmelidir. Bu olguların mozaik NF-I veya NF-II olgusu olabileceği unutulmamalıdır. Mozaik NF-I, NF-I genindeki somatik mutasyonun bir sonucu olarak ortaya çıkar. Bu durumda, etkilenen beden bölgesinin oranı, mutasyonun embriyonik gelişimin hangi döneminde olduğu ile ilişkilidir [38]. NF-I tipinin belirlenmesi önemlidir. Çünkü, segmental NF-I komplikasyonları görece daha nadirdir ve çocuklardaki rekürrens riski daha düşüktür. Kolonun herediter non-polipozis kanserine neden olan genlerden birindeki homozigosite, café au lait lekelerinin oluşmasına neden olur ve birinci dereceden akrabalarındaki etkilenme ile ilişkili olabilir. Bu durumda etkilenen akrabalar kardeşlerdir. Ebeveynler normaldir [48].

NF-I'in klasik formdan farklı ve ailelerdeki tek tip fenotiple prezente olan tipi Watson sendromudur. Watson sendromu; pulmoner stenozis, kognitif kötüleşme,

café au lait lekeleri ve varsa az sayıda nörofibroma ile karakterizedir [47]. Nörofibromatozis- Noonan sendromunun her iki sendromun özellikleriyle ortaya çıkan farklı bir fenotip olduğuna dair açık kanıt yoktur. NF-I'i olan bazı bireylerde, Noonan sendromundakine benzer biçimde fasiyal özellikler gözlenebilir. Bu karakteristikler aile içinde paralellik göstermez. Moleküler çalışmalar, nörofibromatozis-Noonan sendromunun NF-I genindeki mutasyondan kaynaklandığını göstermiştir. Bu mutasyon, klasik NF-I olgularında da gösterilmiştir [49].

NF-II, otozomal dominant nörokutanöz bir hastalıktır. NF-II, klinik ve genetik olarak NF-I'den farklı bir tablodur ve yaklaşık 1:25.000 sıklıkta ortaya çıkar [50]. NF-II'nin nedeni 22q11.2 kromozomundaki inaktive edici mutasyonlardır ve bilateral vestibüler schwannoma ile karakterizedir [51, 52]. Etkilenen bireylerde diğer kranial sinirlerde, spinal, periferik ve kutanöz sinirlerde de schwannomalar gelişebilir. Café au lait lekeleri, NF-I'dekinden daha az sayıdadır ve deri lezyonları ağırlıklı olarak schwannomalardır. Santral sinir sistemi menenjiomları ve gliomaları gözlenebilir. Hastaların çoğunda, yarıklı lamba muayenesi ile subkapsüler lens opasiteleri görülür [52].

Schwannomatoziste vestibüler schwannomalar veya NF-II'nin oftalmolojik özellikleri olmaksızın subkutanöz, periferik sinir veya spinal schwannomalar oluşur [53].

Gövdede, proksimal uylukta ve distal kolda primer olarak gelişen multipl lipomlar otozomal dominant geçişlidir. Bu durumda kutanöz nörofibromların schwannoma ve lipomlardan ayırıcı tanısını yapabilmek amacıyla biyopsi gereklidir [41].

2.1.3. Klinik Özellikler

NF-I tanısı tıbbi biyoloji ve genetik uzmanı, çocuk doktoru, nörolog ve dermatolog gibi NF-I tanısında deneyimli bir ekip tarafından değerlendirilmelidir. Literatürde NF-I ile ilişkili komplikasyonların büyük bölümünün saptanması amacıyla rutin tarama önerilmemektedir. Ancak, çocuklar görme bozukluğundan

yakınmadıklarından, küçük çocuklarda görme değerlendirilmesi yapılmalıdır. Ayrıca, NF-I tanısı konmuş çocuklarda öğrenme sorunları ve davranışsal sorunların yüksek sıklıkta olduğu düşünüldüğünde, çocuklar mutlaka yakından izlenmelidir. Beyin ve spinal MRG, toraks ve abdomen rutin görüntülemesi asemptomatik tümörlerin saptanmasını sağlar [41]. (**Tablo 2.3**).

Tablo 2.3. Nörofibromatozis-I'i olan çocukların değerlendirilmesi.

Nörofibromatozis-I'i Olan Çocukların Değerlendirilmesi
<ul style="list-style-type: none">• Gelişim ve okuldaki ilerleme• Yedi yaşına kadar görme belirtileri, görme keskinliği ve fundoskopik muayene (optik yolak glioma, glokom)• Baş çevresi (tümör veya hidrosefali düşündürülen hızlı artış)• Boy (anormal pubertal gelişme)• Vücut ağırlığı (anormal pubertal gelişme)• Pubertal gelişme (hipofiz/hipotalamik lezyona bağlı gecikmiş/prekoks puberte)• Kan basıncı (renal arter stenozu, feokromasitoma)• Kardiyovasküler muayene (konjenital kalp hastalığı, özellikle pulmoner stenoz)• Omurga değerlendirmesi (skolyoz±altta yatan pleksiform nörofibromalar)• Derinin değerlendirilmesi (kutanöz, subkutanöz ve pleksiform nörofibromalar)• Özgül belirtilerin varlığında sistem muayenesi

Tedavinin ana ilkesi yaş grubuna özgü monitörizasyon ve hasta eğitimidir. Tüm yaş gruplarında malign periferik sinir kılıfı tümörleri gibi ağır hastalık komplikasyonları vizitler sırasında ortaya çıkabilir. NF-I tanısı konmuş bireyler olağan dışı bir durumla (yakınma vb.) karşılaştıklarında bu durum klinisyen tarafından dikkatli bir biçimde değerlendirilmelidir. NF-I komplike olmamışsa, çocuklar yılda bir kez değerlendirilmelidir. Koordinasyonu kolaylaştırması amacıyla bu değerlendirmenin bir çocuk doktoru tarafından yapılması önemlidir. Yaşlı erişkinler kliniğe yılda bir kez başvurmalarıdır. Genç erişkinler (16-25 yaş), NF-I ve

olası komplikasyonları hakkında eğitilmelidirler. NF-I tanısı konmuş genç erişkinlerde hastalık kalıtımı ve psikolojik destek önemlidir [41].

Yirmili yaşların ortasından sonraki izlem sıklığı hastanın tercihinine ve hastalığın şiddetine bağlıdır. Ağır hastalığı olan erişkinler genellikle yaşamın bu döneminde farkedilmektedir ve bir NF-I kliniğinde yaşam boyu izlemi gerekmektedir. Hafif şiddette hastalığı olan erişkinlerde komplikasyon riski çok daha düşüktür. Bu olgular, uzman bir NF-I kliniğinde izlemi kabul etmezlerse, olağandışı herhangi bir durumda kliniğe başvurularını şiddetle önerilmelidir. Asemptomatik erişkinlerde yıllık kan basıncı ölçümü yapılmalıdır. Bu olguları özellikle malign periferik sinir kılıfı tümörleri ve spinal kord basısı olmak üzere olağan dışı belirtiler konusunda da bilgilendirmek gerekir.

2.1.4. Nörofibromatozisin Etkilediği Organ ve Sistemler

NF-I'in manifestasyonları yaygındır ve bir çok organ sistemi etkileyebilir [40] (**Tablo 2.4**).

2.1.4.1. Deri

Café au lait lekeleri ve deri katlantısı çillenmesi, genellikle komplikasyonlara neden olmaz. Ancak, bazı hastalar bu pigmentasyonun görünümü ile ilgili psikolojik sıkıntı bildirebilirler ve bu hastalara deri kamuflaj önerileri ile yardımcı olunabilir. Café au lait lekelerinin tedavisinde lazer uygulamasının rutin kullanımını destekleyen kanıtlar yoktur [41].

NF-I'de, hipopigmente maküller café au lait lekeleriyle birlikte bulunabilir ve bu maküller de vücutta café au lait lekelerine benzer bir dağılım gösterebilirler [41]. Naevus anaemicus ve benign kiraz anjiomları (Campbell de Morgan lekeleri), NF-I'de genel toplumdan daha sık görülür. Bu lezyonlar yaştan bağımsızdır. Juvenil ksantogranülomlar benign portakal papülleridir ve küçük çocukların % 1'inde başta ve gövdede geçici olarak ortaya çıkarlar. NF-I tanısı konmuş veya ksantogranülomları olan çocuklarda kronik myeloid lösemi riskinin arttığı ileri sürülmüştür. Ancak bu grupta rutin hematolojik değerlendirme önerilmemektedir ve yakın zamanda yapılmış bir izlem çalışmasının sonuçları, NF-I ve

ksantogranülomaları olan 14 çocukta herhangi bir hematolojik malignansi saptanmadığını göstermiştir [54].

Tablo 2.4. Nörofibromatozis-I'in majör klinik manifestasyonlarının sıklıkları ve başlangıç yaşları.

Klinik manifestasyon	Sıklık (%)	Başlangıç yaşı
Café au lait lekeleri	>99	Doğumdan 12 yaşa kadar
Deri katlantısı çillenmesi	85	3 yaştan ergenliğe kadar
Lisch nodülleri	90-95	>3 yaş
Kutanöz nörofibromalar	>99	>7 yaş (genellikle geç ergenlikte)
Pleksiform nörofibromalar	30 (gözle)-50 (görüntüleme)	Doğumdan 18 yaşa kadar
Şekil bozukluğuna neden olan pleksiform nörofibromalar	3-5	Doğumdan 5 yaşa kadar
Malign periferik sinir kılıfı tümörü	2-5 (yaşam boyu risk % 8-13)	5-75 yaş
Skolyoz	10	Doğumdan 18 yaşa kadar
Cerrahi gerektiren skolyoz	5	Doğumdan 18 yaşa kadar
Tibia psödoartrozu	2	Doğumdan 3 yaşa kadar
Renal arter stenozu	2	Yaşam boyu
Feokromasitoma	2	>10 yaş
Ağır kognitif bozulma (IQ<70)	4-8	Doğum
Öğrenme sorunları	30-60	Doğum
Epilepsi	6-7	Yaşam boyu
Optik yolak glioma	15 (sadece) % 5'i semptomatik	Doğumdan 7 yaşa kadar (30 yaşına kadar)
Serebral glioma	2-3	Yaşam boyu
Sfenoid kanat displazisi	<1	Konjenital
Aqueduct stenozu	1.5	Yaşam boyu

2.1.4.1.1. Nörofibromlar

Nörofibromlar benign, periferik sinir kılıfı tümörleridir ve fokal kutanöz, subkutanöz, diffüz veya nodüler plexiform lezyonlar biçiminde olabilir. NF-I olgularının büyük bölümünde kutanöz nörofibromlar vardır. Bu lezyonlar genellikle geç ergenlik veya erken yirmili yaşlarda gelişir. Nadiren, erken çocuklukta da ortaya çıkabilir [40, 55]. Bazı lezyonlar başlangıçta morumsu renktedir ve büyüdükçe pedinküle olabilir. Nörofibromların sayısı bireyler ve aileler arasında değişkenlik gösterir [40, 55]. Bu deri tümörlerinin malign değişime uğradığını gösteren kanıt yoktur. Fakat sıklıkla kozmetik sorunlara, geçici ağrı ve kaşınmaya neden olur. İritasyon, antihistaminiklere genellikle yanıt vermez. Mast hücresi stabilizatörlerinin yararı belirsizdir. Aşırı sıcaktan korunmalı ve yumuşatıcı kremler kullanılmalıdır [41].

Kutanöz nörofibromlar yukarıda sözü edilen herhangi bir soruna neden olduğunda eksize edilmelidir. Nörofibromları deneyimli cerrahlar çıkarmalıdır ve yüzde ve boyundaki nörofibromlar plastik cerrahlara danışılmalıdır. Sorunlu nörofibromların çıkartılmasında karbondioksit lazerin cerrahi çıkarmaya üstün olup olmadığı kanıtlanmamıştır fakat bazı küçük lezyonlarda lazer yardımcı olabilir. Cerrahi çıkarmadan sonra hipertrofik skar ve nörofibrom rekürrens riski vardır [41]. Subkutanöz nörofibromlar palpasyonla saptanabilir ve hassastırlar. Etkilenen sinirin dağılımında karıncalanmaya neden olabilir [55]. Nadiren malign değişim oluşabilir. Cerrahi çıkarma düşünüldüğünde, -çıkarma bazı durumlarda nörolojik defisite neden olacağından- NF-I uzmanlarına veya yumuşak doku tümörü/periferik sinir cerrahlarına danışılmalıdır [41].

Pleksiform nörofibromlar önemli morbiditeye neden olur. Çünkü bu nörofibromlar diffüzdür ve sinir boyunca büyürler. Ek olarak, bu lezyonlar gelişirken çok sayıda sinir ağrı tutulabilir. Lezyonlar nodüler olabilir. Sinir kökünde çok sayıda birbirinden ayrı tümörler gelişebilir. Pleksiform nörofibromlar çevredeki yumuşak dokuyu infiltre ederler ve daha nadir olarak kemik hipertrofisi gözlenebilir [55]. Büyük pigmentasyon alanları sıklıkla derin yerleşimli nörofibromların varlığına işaret eder. Büyüme hızı kestirilebilir değildir ve özellikle ergenlerde hızlı büyüme dönemlerini takiben göreceli inaktif dönemler izlenir. Şekil bozukluğuna neden olan

fasiyal pleksiform nörofibromlar yaşamın ilk üç yılında ortaya çıkabilir [40]. Benign pleksiform nörofibromların cerrahi olarak çıkartılması genellikle çok güçtür. Bunun nedeni tümörün çevredeki dokulara ve sinirlere invazyonu ve tümörün kalıtsal vasküler doğasıdır. Cerrahi çıkarım sırasında hayatı tehdit eden kanama oluşabilir. Bu durum özellikle fasiyal pleksiform nörofibromlarda gözlenir. Pleksiform nörofibromların büyümesi üzerine etkili olduğu düşünülen tedaviler farnesil transferaz inhibitörleri, antianjiyogenezis ilaçları ve fibroblast inhibitörleri olarak sıralanabilir [56]. Günümüzde bu ilaçların semptomatik pleksiform nörofibroması olan hastalarda herhangi bir nedenle kullanımını destekleyecek yeterli kanıt yoktur. Sekonder malignite riski nedeniyle benign tümörlerde radyoterapi kontrendikedir [41].

2.1.4.1.2. Malign Periferik Sinir Kılıfı Tümörleri

NF-I'de yaşam boyu malign periferik sinir kılıfı tümörleri (MPNST) gelişme riski % 8-13 arasındadır. MPNST, özellikle, 20-35 yaş aralığındaki bireylerde daha siktir [57]. Bu kanserlerin saptanması güçtür. Yaygın metastaz gözlenir ve prognozu kötüdür [58]. MPNST, -genellikle değişmez bir biçimde- var olan pleksiform nörofibromalardan köken alır. NF-I hastaları subkutanöz veya pleksiform nörofibromayla ilişkili aşağıdaki belirti ve/veya bulgulardan herhangi biri geliştiğinde acil olarak değerlendirmelidir:

- Bir aydan daha uzun süren veya uykuyu bozan persistan ağrı,
- Yeni veya nedeni açıklanamayan nörolojik defisit,
- Sfinkter bozuklukları,
- Yumuşak-sert nörofibroma dokusu,
- Nörofibromanın boyutlarında hızlı artış [58].

Pleksiform nörofibromaya bağlı bulgular kolayca saptanamaz [41].

Adjuvan radyoterapiyle tedavi edilen, bireysel veya ailesel kanser öyküsü, optik sinir gliomu, tam gen delesyonu, multipl subkutanöz nörofibromaları veya nörofibromatöz nöropatisi olan bireyler MPNST gelişimi açısından risk altındadır ve bu bireyler klinik olarak yakından izlenmelidir [58-62]. “¹⁸FFlorodeoksiglukoz” pozitron emisyon tomografisi MPNST'den köken alan benign pleksiform

nörofibromlardaki farklılaşmada kullanışlı bir tanısal gereçtir ve hücrelerdeki glikoz metabolizmasının hesaplanmasına olanak sağlar [63]. Tedavinin amacı tümörsüz sınırlarla tümörün tam olarak çıkartılmasıdır. Beş cm'den daha büyük, yüksek dereceli ve tam olarak eksize edilmemiş MPNST tümörlerinde adjuvan radyoterapi kullanılabilir. Metastatik hastalığı olan hastalarda ifosfamid ve doksorubisin palyatif olarak uygulanır. Sözü edilen son tedavi yaklaşımları tümörün boyutunu küçülterek cerrahi hazırlık yapılması açısından da yararlıdır [58].

2.1.4.1.3. Glomus Tümörleri

Yakın zamanda yapılan bir çalışmada, glomus tümörleri ve NF-I arasında bir ilişki olduğu bildirilmiştir. Glomus cisimleri küçük, dermal, enkapsüle arteriovenöz anastomozlardır. Bu cisimler en sık parmak ucunda gözlenmekte, periferik kan akımını ve buna bağlı olarak vücut sıcaklığını regüle etmektedir. Glomus tümörleri genellikle soliterdir fakat NF-I tanısı konmuş bireylerde çoklu lezyonlar da gözlenmiştir [64]. Lezyon en sık subungual olarak yerleşir ve ağrı, soğuk duyarlılığı ve lokalize sızı ile kendini gösterebilir. Belirtiler subkutanöz nörofibromların neden olduğu belirtilerden ayırt edilmelidir. Bu durumda tedavi tümörün lokal eksizyonudur [41].

2.1.4.2. Santral Sinir Sistemi

2.1.4.2.1. Nörolojik Sorunlar

NF-I'de "aqueduct" stenozu, tümörler veya konjenital malformasyonlar nedeniyle nörolojik komplikasyonlar görülebilir [65]. Sfenoid kanat displazisine bağlı kafatası deformitelerinde temporal lob orbitaya fitiklaştığından nabızlı ekzoftalmusa neden olabilir. Omurga biçimini bozan ağır skolyoz omurilik basısı ve solunum sıkıntısı ile sonuçlanabilir [40]. Genelde nörolojik sekeller, periferik ve spinal sinirlere veya spinal korda basının bir sonucudur.

Epilepsi genellikle hafiftir ve NF-I olgularının yaklaşık % 6-7'sinde ortaya çıkar. Epilepsi, altta yatan kortikal disjenezi ile ilişkili olabilir [66]. Karotid arter stenozu/oklüzyonu, hemoraji ve anevrizma gibi serebrovasküler hastalıklar NF-I vaskülopatisinin bir sonucu olarak ortaya çıkar [67]. NF-I'deki kognitif bozukluğun

nedenleri olan nörofibromatoz, nöropati ve multipl sklerozis tam olarak açıklanamamış durumlar değildir [62, 68, 69].

NF-I olgularının nörolojik muayenesi yılda bir kez yapılmalıdır. Herhangi bir açıklanamayan nörolojik bulgu veya belirti varlığında tıbbi değerlendirme yapılması önemlidir. Akut veya ilerleyici duyuşsal ve motor defisit; inkoordinasyon bozukluğu veya sfinkter bozukluğu intrakranial lezyon veya spinal kord basısının göstergesi olabilmektedir. Sabah uyanma sonrasında baş ağrısı, kusma, bilinç değışikliğı intrakranial basıncın arttığını akla getirilmelidir.

2.1.4.2.2. Kognitif Sorunlar ve Davranışsal Güçlükler

NF-I'deki en sık nörolojik komplikasyon bilişsel sorunlardır ve zeka düzeyinde (IQ) azalma ile kendini gösterir. Bu azalma, genellikle orta düzeydedir. Ağır entelektüel defisit (IQ < 70 puan) nadirdir [59, 70, 71]. NF-I tanısı konmuş çocukların % 30-60'ında özgül öğrenme güçlükleri gözlenmiştir [68, 70-72]. Özgül öğrenme güçlüğü olan çocuklar tam akademik başarı gösteremezler. Bu durum kültürel veya sosyoekonomik faktörlerden bağımsızdır. NF-I'de aşikar nörolojik genetik veya genel tıbbi sorunlar olmasa bile özgül öğrenme güçlüğü olan çocuklarda akademik başarıda azalma gözlenir. Özgül öğrenme güçlüğü, normal veya daha nadiren ortalamanın üzerinde zekaya sahip çocuklarda da belirgindir. Okuma-yazma güçlükleri, görsel uzaysal dikkat sorunları, işlem belleğı ile ilişkili sorunlar ve dikkat defisitleri gözlenebilir. Davranışsal sorunlar ise uyku bozuklukları, sosyalleşmede bozulma, düşük özsaygı ve sosyal işaretlerin yanlış yorumlanması şeklinde sıralanabilir. NF-I'de dikkat eksikliği hiperaktivite bozukluğu ve otistik spektrum bozukluklarının sıklığı artmıştır [73, 74].

İdeal olan ayrıntılı gelişimsel değerlendirmenin mümkün olan en kısa sürede yapılmasıdır. Okuldaki ilerleme yıllık değerlendirmenin önemli bir parçasıdır. Ek olarak aktivite, distraktibilite, sosyal etkileşim ve ince ve kaba motor beceriler mutlaka değerlendirilmelidir. NF-I tanısı konmuş çocuklarda sıklıkla giyinme, kalem tutma, sıçrama, koşma ve bisiklete binme becerilerinde akranlarına göre güçlükler vardır. Ligament laksitesi, ince ve kaba motor becerilerinin gelişiminin gecikmesine katkıda bulunur. Özellikle erken dönemde olmak üzere özgül öğrenme güçlüğüne

yönelik girişimlerin sağlanması önemlidir. Öğretmen, eğitim psikoloğu ve diğer sağlık hizmeti verenler arasındaki koordinasyon önemlidir. Dikkat eksikliği olan çocuklar metilfenidatla sıklıkla iyi yanıt verir. Bilişsel davranışçı terapi yardımcı olabilir [70, 74].

NF-I'de bilişsel bozulmanın patogenezi tam olarak açıklanamamıştır ve beyindeki T2 hiperintensitelerinin nedeni açık değildir [70, 71, 74, 75]. Yakın zamanda yapılan ve fare NF-I modelini değerlendiren bir çalışmada, özgül bir HMG-CoA redüktaz (kolesterol biyosentezinde hız belirleyici) inhibitörü olan lovastatinin dikkat eksikliği ve görsel uzaysal bozulmaları geriye döndürebildiği gösterilmiştir [65, 75]. Günümüzde, NF-I'i olan çocuklarda statin grubu ilaçların güvenilirliğini ve tolerabilitesini araştıran klinik çalışmalar devam etmektedir. Artan yaşla birlikte motor becerilerde düzelme olmasına karşın bilişsel bozulma erişkinlikte de ilerleme eğilimindedir [41].

2.1.4.2.3. Santral Sinir Sistemi Tümörleri

Glioma NF-I'deki baskın tümör tipidir ve sinir sisteminin her bölgesinde oluşabilir. En sık optik yolaklar beyin sapı ve cerebellum tutulur [65]. Beyin sapı gliomaları diffüz veya fokal tümörler olarak karşımıza çıkabilir ve bazen agresif bir davranışa sahip olsa da NF-I'de genel toplumdan daha yavaş bir gidişe sahiptir [65, 76]. Piloitik astrositomların sonuçları daha benign olmakla birlikte yüksek dereceli astrositomlar semptomatik ve ilerleyici tümörlerdir [65, 76]. Yakın zamanda yapılan bir çalışmada, erişkin başlangıçlı semptomatik tümörlerin ve optik yolak dışında yerleşen gliomaların azalmış sağ kalım süresiyle ilişkili olduğu gösterilmiştir. Menenjiyomlar ve vestibüler schwannomlar NF2'nin karakteristik özellikleridir ve NF-I'de sık gözlenen tümörler değildir [41].

2.1.4.2.4. Optik Yolak/Sinir Gliomaları

Optik yolak gliomaları (OPG), derece I pilositik astrositomlardır. NF-I tanısı konan çocukların % 15'inde gelişir [77]. Bu tümörler sıklıkla asemptomatiktir ve genel toplumdaki aynı tümörden daha yavaş seyirlidir ancak bazı tümörler görme keskinliğinde bozulma, anormal renkli görme, görme alanı kaybı, şaşılık, pupiller anormallikler, soluk optik disk, piroptoz ve hipotalamik işlev bozukluğuna neden

olabilir. Semptomatik OPG riski yedi yaşın altındaki çocuklarda en yüksektir ve yaşlı bireylerde tıbbi girişim gerektiren tümör gelişimi nadirdir [77, 78]. Küçük çocuklar glioma ilerleyene kadar görme bozukluğundan yakınmazlar ve bazı durumlarda sadece bilateral görme kaybı olduğunda görme sorunlarının farkına varabilirler. Ebeveynler görme problemlerinin olası işaretleriyle ilgili bilgilendirilmelidir. Çocuklarda küçük oyuncakları tutamama ve nesnelere çarpma gibi durumlar farkedildiğinde görme sorunlarından şüphe edilmelidir. Küçük çocuklarda ve özellikle bilişsel defisitleri olanlarda, görme değerlendirmesi sıklıkla sorunlu bir süreçtir. Görme keskinliğinin değerlendirilmesinde üç yaş, renkli görmenin değerlendirilmesinde beş yaş ve görme alanı değerlendirilmesinde sekiz yaş kesme noktasıdır. Yine de, küçük çocuklarda OPG gelişim riskinin yüksek olduğu akılda tutularak yedi yaş altındaki çocukların görme keskinliğinin fundoskopik muayene ile (optik disk solukluğu ve elevasyon) yılda bir kez yapılması önerilmektedir. Çocuk uygun yaşa geldiğinde renkli görme ve görme alanının bazal bir değerlendirmesinin yapılması uygundur. Görmede progresif bozulma veya piroptosis yoksa OPG’de beyin MRG taraması endike değildir. OPG lezyonunun saptanmasında diffüzyon tensör görüntüleme fare modelinde başarılı sonuçlar elde edilmesini sağlamıştır [79]. OPG tedavisinde uzman önerisi alınmalıdır ve tedavi genellikle vinkristin ve cisplatinum ile yapılır [80]. Bazı durumlarda ağır piroptoz veya yaygın kiazma gliomlarının çıkartılması amacıyla cerrahi uygulanabilir. Radyoterapi ikincil malignite potansiyeli, nöropsikolojik, vasküler ve endokrin kötü sonuçlar nedeniyle küçük çocuklarda önerilmemektedir. Rapamisin in vitro ortamda astrosit büyümesini azaltmaktadır ve OPG tedavisinde umut vaat etmektedir [81].

Nörofibromlar periferik sinirler, spinal sinir kökleri ve spinal korda bası yaparak nörolojik belirtilere neden olur. Yüksek servikal bölgedeki nörofibromların omurilik basısı yapma olasılığı daha yüksektir. Yine de radyolojik olarak omurilik basısı saptanan birçok bireyde nörolojik defisit yoktur ve cerrahi gerekmez [41].

2.1.4.3. Ortopedik Sorunlar

NF-I tanısı konmuş bireylerin yaklaşık % 2’sinde özellikle tibia olmak üzere uzun kemiklerde eğilme ve/veya psödoartroz gelişir [40]. Bu bozukluğa kemik oluşumunun intrinsik bir defekti neden olmaktadır ve eğilme yaşamın ilk birkaç

ayında daha belirgindir. Spontan veya küçük travmalardan sonra kırıklar oluşur ve iyileşme gecikir. Cerrahi genellikle gereklidir ve bazı olgularda, etkilenen ekstremitenin amputasyonu gerekebilir. İnfantlar uzun kemiklerde eğiklik olup olmadığı yönünde muayene edilmelidir. Klinisyenler olası kaza dışı yaralanmalar için küçük çocukları değerlendirirken psödoartroz olasılığını düşünmelidirler [41].

NF-I'i olan çocuklarda yılda bir kez omurga değerlendirilmesi gerekir ve skolyoz ile ilgili klinik kanıt saptanan bireyler uzman bir ortopediste yönlendirilmelidir. NF-I kemik devamlılığının bozulmasına neden olur ve buna bağlı olarak kemik mineral densitesinde azalma gözlenir [82]. NF-I'deki skolyoz, idiyopatik ve distrofikdir. Skolyoz en sık alt servikal ve üst torakal omurgayı tutar. [40, 83]. Distrofik eğim ek olarak kifozla ilişkilidir ve idiyopatik olgulardan daha erken başlangıçlıdır. Distrofi tipik olarak 4-6 segmenti kapsar ve vertebra cisimlerinin ve aynı zamanda kostaların distorsiyonuna neden olur. Hızlı ilerleyen bir tablodur ve erken dönemde spinal füzyon uygulanması gerekir [41].

2.1.4.4. Kardiyovasküler Sorunlar

NF-I'de konjenital kalp hastalıklarından özellikle pulmoner arter stenozu ve hipertansiyon gözlenir [67]. Ayrıntılı bir kardiyovasküler sistem muayenesi ve açıklanamayan bir üfürüm varlığında kardiyolog tarafından değerlendirme yapılmalıdır. Kan basıncı yıllık olarak kontrol edilmelidir ve kan basıncının 140/90 mm Hg 'dan daha düşük olması sağlanmalıdır [41].

NF-I olgularının yaklaşık % 2'sinde renal arter stenozu görülür. Hipertansif çocuklarda, genç erişkinlerde, gebelerde ve refrakter hipertansiyonu olan yaşlı bireylerde NF-I tanısı düşünülmelidir [40, 67]. Renal arter stenozu bilateral olabilir Renal arter stenozu küçük veya büyük damarların stenozu, anevrizma formasyonu veya bitişik bir tümörün ekstrinsik basısı ile gelişebilir. Tedavisinde antihipertansifler, perkütan transluminal anjiyoplasti ve cerrahi uygulanmaktadır. Cerrahiye takiben rekürren stenozla ilgili sonuçlar değişkendir [84].

NF-I olgularının yaklaşık % 2'sinde feokromositoma gelişir ve bu tümörlerin % 12'si maligndir [85]. Klinik olarak, hipertansiyon/ paroksizmal hipertansiyon,

çarpıntı, baş ağrısı, baş dönmesi veya terleme görülebilir. Yirmi dört saatlik idrarda katekolamin miktarları değerlendirilmelidir. İlişkili belirtilerin varlığında hastanın semptomatik olduğu dönemde idrar örneği alınması uygundur. Tedavisinde cerrahiden önce alfa ve beta blokörler kullanılabilir [40].

2.1.4.5. Gastrointestinal Sorunlar

Karında şişme, ağrı, dispepsi, hemoraji ve konstipasyon gastrointestinal bir nörofibromayı düşündürülebilir. Karsinoid tümörler duodenuma yerleşir ve yüzde "flushing", diyare, sağ taraflı kardiyak lezyonlar, fasial telenjiektaziler ve bronkokonstriksiyon oluşabilir [86]. Tanı serotonin metaboliti olan 5-hidroksiindoleasetik asitin idrardaki artmış düzeyleri ile konur. NF-I olgularında, gastrointestinal stromal tümörler ve gastrointestinal kanalın en sık mezenşimal tümörleri gözlenir [87].

2.1.4.6. Psikiyatrik Sorunlar

Psikiyatrik sorunlar vücutta nörofibromalara bağlı olarak gelişen biçim bozuklukları ve hastalığın karmaşık ve kestirilemez doğası ile ilişkilidir. Anksiyete ve depresyon belirtileri sıktır. İntihar girişimi, psikoz ve sosyopatik davranışların sıklığı artmıştır [68, 88].

2.1.4.7. Doğum Kontrolü ve Gebelik

Nörofibromaların % 75'inde progesteron reseptörleri olduğu bilinmektedir [89]. Ancak, oral kontraseptif veya tek başına progesteron içeren doğum kontrolü ilaçlarının nörofibromanın büyümesine katkısı olup olmadığı tartışmalıdır [90]. NF-I'de; ölü doğum oranında artış, intrauterin büyüme geriliğinde artış, sezaryen oranında artış gibi perinatal komplikasyonlar bildirilmiştir [91]. Gebelik sırasında nörofibromaların boyutlarının büyüdüğü ve sayılarının arttığı da bilinmektedir [92].

2.1.4.8. Genetik Danışmanlık

NF-I'i olan bireylerde NF-I % 50 olasılıkla bir sonraki kuşağa aktarılır. Ancak klinik tablonun ve/veya komplikasyonların aile içinde bile kestirilemediği bilinmektedir [47]. Yaşam boyu morbiditeyi artıran veya erken mortaliteye neden

olan komplikasyonların varlığında dikkatli olunmalıdır. Şiddetli etkilenen çocukların oranı 1/12' dir [41].

Ailede ilk kez etkilenen bireyin ebeveynleri kutanöz lezyonlar ve Lisch nodülleri açısından muayene edilmelidir. Bazen bir ebeveynin de NF-I'in segmental / mozaik bir formu saptanabilir. Ebeveynlerde az sayıda sağlık sorunu olmasına karşın, bu ebeveynlerin klasik NF-I'i olan bir çocuğa sahip olma riski artmıştır. NF-I'in klinik bulgularının yokluğunda diğer çocuğun NF-I ile doğması oldukça düşük bir olasılıktır (%1'den az) [41].

Olguların yaklaşık % 85-95'inde -moleküler tekniklerin kombinasyonları (denaturing high-performance liquid chromatography [DHPLC], direkt sekanslama, fluorescence in situ hybridization [FISH], multiplex ligation-dependent probe amplification [MLPA] ve comparative genomic hybridization [CGH] array) kullanılarak- NF-I gen mutasyonu saptanabilir [93, 94]. Koryonik villus örnekleme veya amniyosentezden elde edilen fetal DNA ekstraktı kullanarak direk mutasyon testi ile prenatal tanılama yapmak mümkündür. Alternatif olarak iki veya daha fazla bireyin etkilendiği ailelerde DNA belirteçleri prenatal tanı konması amacıyla kullanılabilir. İmplantasyon öncesinde genetik tanı mümkündür. Üç günlük embriyodan elde edilen tek hücrelerdeki genetik materyal kullanılarak NF-I mutasyonu saptanabilir [95].

2.2. Yara İyileşmesi

Doku yaralanması sonrası gelişen bir dizi olay doku bütünlüğünü yeniden sağlamayı amaçlar. Memelilerde bu olaylar dizisi kemik ve bazı durumlarda karaciğer dokusu dışında skar ve fibrozis oluşumuyla sonlanır [96].

Yara iyileşmesi inflamasyon, proliferasyon ve matürasyon (yeniden modelleme) fazlarını içerir. İnflamatuar fazda hemostaz sağlanır ve bunu inflamatuvar içeriğin bölgeye göçü izler. Proliferasyon fazında fibroplazi, granülasyon, kontraksiyon ve epitelizasyon gerçekleşir. Yeniden modelleme (matürasyon) fazı skar matürasyonu olarak da bilinir [96].

2.2.1. İnflamatuar Faz

İnflamasyon fazı yara iyileşmesi sürecinin ilk aşamasıdır. Yaralanmayı takiben yara bölgesindeki yıkıma uğramış damarlar hemen daralır. Özellikle subendotelden olmak üzere hasarlı dokudan tromboplastik doku ürünleri salınır. Trombositler kümelenerek ilk hemostatik tıkaçı oluşturur. Pıhtılaşma ve kompleman sistemleri harekete geçer. İntrinsik ve ekstrinsik pıhtılaşma sistemleri protrombinin trombine dönüşerek aktive olmasını sağlar. Aktive trombin, fibrinojeni daha sonra polimerize olarak kalıcı pıhtıyı oluşturan fibrine dönüştürür. Trombusun oluşumunu takiben hemostaz sağlanır. Kümelenmiş trombositler degranüle olarak inflamatuvar hücreleri yara bölgesine yönlendiren kemoaktif maddeleri, fibroblast aktivasyon faktörlerini ve vazokonstriktörleri ortama salarlar. Hemostazı takiben koagülasyon ve kompleman sisteminin ürünlerinin etkisiyle damarlar dilate olur ve permabiliteleri artar. Bu, inflamatuvar hücrelerin hasarlı bölgeye geçişini artırır. Hasarlı bölgeye ilk gelen inflamatuvar hücreler arasında nötrofiller çoğunluktadır. Nötrofiller hücre yıkım ürünlerini, yabancı cisimleri ve bakterileri yara bölgesinden uzaklaştırır. İki-üç gün içinde inflamatuvar hücreler arasında monosit hakimiyeti görülür. Kanda dolaşan monositler yara bölgesine göç eder ve makrofajlara dönüşür. Bu makrofajlar doku makrofajlarıyla beraber onarım sürecini yönetir. Makrofajlar doku ve bakteri yıkım ürünlerini fagosite eder ve büyüme faktörleri salgırlar. Bu büyüme faktörleri endotelial hücreleri, fibroblastları ve keratinositleri aktive ederek bu hücrelerin onarım sürecindeki görevlerini yerine getirmelerini sağlar. Makrofajlardan salınan 20'den fazla sitokin ve büyüme faktörü saptanmıştır. Monosit ve makrofajların yaradan uzaklaştırılması yara iyileşmesinde önemli derecede yavaşlamaya, fibroblast proliferasyonunun gecikmesine ve anjiogenezin bozulmasına yol açar [96-98].

2.2.2. Proliferatif Faz

(1) Granülasyon dokusu oluşumu

Yaralanmadan yaklaşık 4 gün sonra, geçici ekstrasellüler matriks (ECM), granülasyon dokusuyla yer değiştirmeye başlar. Kapillerlerin invazyonuyla ilişkilendirilen bu morfolojik değişim aynı zamanda bölgede hücresel düzeyde dermisin kalıcı elemanlarının oluşumu ile kendini gösterir. Bunlar fibroblastlar ve fibroblastlar tarafından oluşturulan kollajen ve kan damarlarıdır. Granülasyon

dokusundaki makrofajların ürettikleri büyüme faktörleri ve sitokinler, inflamasyon fazı ile proliferatif faz arasında köprü görevi görür [99].

Fibroblastlar yara iyileşmesinde görev alan en önemli mezenkimal hücrelerdir [100]. Hem “üretim” hem de “mekanik” görevleri vardır. Fibroblastlar geçici matriksin yerini alacak olan kollajen kökenli matriksin üretiminden sorumludur. Mekanik görevleri ise kontraktıl özellikleri yoluyla yara kontraksiyonunu sağlamalarıdır.

(2) Migrasyon

İnflamasyon fazından proliferatif faza geçişi sağlayan faktörlerden biri sitokinler ve büyüme faktörleridir. Fibroblast migrasyonu PDGF, nöral büyüme faktörü (Neural Growth Factor=NGF), TGF- β , bağ dokusu büyüme faktörü (Connective Tissue Growth Factor=CTGF) ve Cysteine-zengin anjiyojenik indükleyici 61 (Cysteine-rich angiogenic inducer 61=Cyr-61) tarafından stimüle edilir [101]. Aynı zamanda geçici matriksin içeriğinde yer alan fibronektin de fibroblastları yara bölgesine çeker [102]. Yara bölgesine göç eden fibroblastlar iki farklı hücreden köken alırlar. Bunlardan biri yaraya yakın bölgelerde farklılaşan hücrelerdir. Diğeri ise fibroblastlara makrofaj ürünlerinin stimülasyonu ile farklılaşan yakın bölgedeki mezankimal hücrelerdir [97, 100].

Hücre yüzeyinde bulunan integrinler fibroblastlarla ECM arasındaki ilişkiyi kolaylaştırır [97]. İntegrinler hücre dışına, membrana ve hücre içine uzantıları olan transmembranöz reseptörlerdir. İntegrinler onarım sırasında hücre fonksiyonunu kontrol eden düzenleyicilerdir [103]. Heterodimerik yapıdadırlar ve birbiriyle ilişkiye girerek aktif protein reseptörünü oluşturan α ve β alt üniteleri vardır. İntegrin ligandları büyüme faktörleri, kollajen ve elastini kapsayan ECM bileşenleridir. Ligandın bağlanmasını takiben integrin reseptörünün sitoplazmik reseptöründe fosforilasyon meydana gelir ve bu fosforilasyon bir dizi sinyal iletimi zincirini harekete geçirerek gen ekspresyonunu değiştirir ve yeni hücre fonksiyonun meydana gelmesini sağlar.

Fibroblastların yara bölgesine göçü düzensiz bir şekilde değildir. Fibroblastlar yara bölgesine fibrillere paralel olarak hareket ederler. Fibroblastlar bu göçleri sırasında hücrel yıkım ürünleri ve matriks fibrilleriyle karşılaşır. Bu engelleri çeşitli matriks metalloproteinazları (MMP) yardımıyla aşarlar. Şimdiye kadar 24 farklı MMP tanımlanmıştır [104]. Bunlardan MMP-1, MMP-2 ve MMP-3, TGF- β tarafından, MMP-19 ise tümör nekrotize edici (Tumor Necrosis Factor=TNF)- α tarafından stimüle edilirler. MMP'lerin anjiogenez ve fibroblast göçünde önemli rolleri vardır. Aynı zamanda MMP'ler tümör invazyonuyla da ilişkilendirilmiştir [97]. Bir grup olarak MMP'ler ECM'yi tanıma ve yıkma yeteneğine sahiptirler. Bu, MMP'lerin çok incelikli bir şekilde düzenlenmelerini gerektirir. Bu düzenleme ilk olarak hücre içi üretim aşamasında gen ekspresyonu ile olur. Hücre içinde üretilen MMP'ler proenzimler ve zimojenler halinde hücre dışına salınır. Hücre dışındaki ikinci düzenleme ekstrasellüler aktivasyon sırasında olur. Üçüncü düzenleme doku matriks metalloproteinaz inhibitörleri (TIMP) aracılığıyla sağlanır [104, 105].

Son yapılan çalışmalar anormal MMP ve TIMP oranlarını aşırı fibrozisin rol oynadığı skleroderma, keloid ve hipertrofik skar gibi durumlarla ilişkilendirmiştir. Yapılan çalışmalarda, hipertrofik skar ve keloidlerde MMP-2, MMP-3, MMP-13 düzeylerinin arttığı gösterilmiştir [106-108]. Fujiwara, benzer bir çalışmada, keloid fibroblastlarında tip I kollajen ve MMP-1, MMP-2, TIMP-1 düzeylerinde artış saptamıştır. Fujiwara, keloid fibroblastlardaki artmış migratuar aktiviteyi, MMP düzeyindeki artışla ilişkilendirmiştir. [14].

(3) ECM üretimi ve büyüme faktörlerinin salınması

Fibroblastlar kalıcı ekstrasellüler matriks elemanlarını (kollajen, glikozaminoglikan [GAG], proteoglikan) ve büyüme faktörlerini üretmekten sorumludurlar. Kollajen üretimi doku hasarının yaklaşık 3-5. gününde başlar ve PDGF, TGF- β , epidermal büyüme faktörü (Epidermal Growth Factor=EGF), IGF1, FGF-2, CTGF, Cyr-61, sfingozin-1-fosfat (Sphingosine-1-phosphate=S1P) tarafından stimüle edilirler [100].

Kollajen sentezinde ilk aşama bir kollajen prekürsörü olan prokollajenin sentez edilmesidir [97]. Bu işlem membrana bağlı ribozomlarda meydana gelir. Prokollajen suda kolaylıkla çözünür ve bu özelliği onun hücre içerisinde rahatça taşınabilmesi için gereklidir. Hücre içi prokollajen sentezinde en önemli aşama lizin ve prolinin endoplazmik retikulumda hidrosilasyonudur. Bu aşama, prokollajen moleküllerinin sonradan hücre dışında meydana gelecek agregasyonu ve fibrillerin oluşumu için gereklidir. Prokollajen zincirleri hücre dışına salınmalarını takiben hücre dışında bir dizi enzimatik işlemde geçerek fibrilleri oluşturmak üzere birleşirler.

Proliferatif fazda gerçekleşen diğer bir olay da anjiogenezdir [98]. Doku hasarının 2. gününde endotelial hücreler geçici ECM üzerinde fibroblastlara benzer şekilde göç ederler. Endotelial hücrelerin hareketi VEGF, FGF, anjiopietin ve TGF- β tarafından stimüle edilir [97]. Ayrıca ECM'nin kendisi de endotelial hücreler için bir stimülandır. Endotelial hücreler üzerlerinde bulunan integrin reseptörleri sayesinde ECM'yi tanırlar. VEGF, FGF ve TGF- β bu reseptörlerin hücre yüzeyindeki sayısını artırır.

MMP'ler anjiogenezde önemli görev alırlar [104]. MMP'lerin görevi bazal membranın yıkımı ve ECM'nin endotelial hücrelerin geçişine izin verecek şekilde yıkımıdır. MMP-1, MMP-2, MMP-9, MT-MMP ve MMP-19 anjiogenezde rol alan en önemli matriks metalloproteinazlardır [97]. MMP-1 tip I kollajen matriks içine endotelial hücre migrasyonu için gereklidir [109]. MMP-2 endotelial hücre yüzeyindeki integrinler aracılığıyla endotelial hücrelere yapışır ve endotelial hücreler ilerlerken önlerine çıkan geçici ECM'yi parçalayarak endotelial hücrelerin ilerlemelerini sağlar [97].

2.2.3. Matürasyon (Yeniden modelleme) Fazı

Matürasyon fazı yara iyileşmesinin en uzun süren aşamasıdır. Yaranın granülasyon dokusuyla dolup keratinosit migrasyonu ile reepitelizasyon sağlanmasını takiben başlar. Yara iyileşmesinin her aşamasında olduğu gibi bu aşama da diğerleriyle binişiktir [96].

İnsanlarda yara matürasyonu -klinik olarak- yara kontraksiyonu kızarıklık ve yara kalınlığında azalma, yara kuvvetinde artma ile karakterizedir. Yara kontraksiyonu yaralanmayı takiben 4-5. günde başlar [96-98]. Yara kontraksiyonu myofibroblastlar sayesinde sağlanır. Myofibroblastlar hücre içi aktin filamentleri içeren fibroblastlardır ve bu hücreler kontraksiyon özelliği gösterirler. Myofibroblastlar üzerlerindeki integrin molekülleri sayesinde ECM'ye tutunurlar.

Matürasyon fazında yara kalınlığı azalırken yaranın tensil (gerilmeye dayanım) kuvveti artar [97]. Bu ECM'nin yeniden modellenmesiyle ilişkilidir. Net kollajen üretimi yaralanmadan sonra ortalama 21. güne kadar sürekli bir artış gösterir. Bu aşamadan sonra kollajen sentezinde bir azalma gözlenir [96]. ECM'deki artmış kollajen miktarının geri beslemeyle fibroblastlardaki kollajen sentezini azalttığı düşünülmektedir [110]. Bunu yanında IFN- γ ve TNF- α fibroblastların kollajen sentezini azaltmada etkilidir [111]. Yara iyileşmesinin 21. gününde maksimum kollajen miktarına ulaşılsa da yaranın tensil kuvveti normalin ancak % 20'si kadardır. Altıncı haftada yaranın tensil kuvveti olmasi gerekenin % 80'ine ulaşır. Yirmi birinci günle 6. hafta arasında geçen ve yara kuvvetinin arttığı bu dönemde gerçekleşen temel olay kollajen yıkımı ve yeniden düzenlenmesidir [96, 97].

Kollajen yıkımı esas olarak MMP ve TIMP üretimi ile ilişkilendirilmiştir. ECM yeniden modellenmesi aşamasından önce MMP-2, MMP-1, MMP-9 ve TIMP-1 düzeylerinde bir azalma gözlenir [112]. Bu nedenle MMP'lerin ve TIMP'lerin uyumlu bir şekilde üretilmesi sağlıklı yara matürasyonu açısından önemlidir. Matürasyon fazında ECM niteliğinde belirgin değişiklikler meydana gelir. Zamanla Tip I kollajen miktarı artarken Tip III kollajen, proteoglikan ve su miktarı azalır. Kollajen fibrillerinin kalınlığı ve interfibriller bağlanma atar ve fibriller yeniden düzenlenir. Yara iyileşmesinin erken dönemlerine kollajen fibrilleri düzensiz şekilde dizilmişlerdir. Bu, iyileşmenin erken dönemindeki yüksek kollajen miktarına rağmen yara kuvvetindeki zayıflığı açıklar [113].

Skar matürasyonu ile beraber klinik olarak gözlemlenen kızarıklık azalışı yara içindeki kapillerlerin yoğunluğunun değiştiğini gösterir. Matür skar granülasyon dokusuna oranla daha az kapiller damar içermektedir [99].

2.3. Keloid ve Hipertrofik Skar

Keloid ve hipertrofik skarlar aşırı skar oluşumunun klinik olarak görülen iki farklı türüdür.

Keloidler genetik olarak eğilimli kişilerde cilt yaralanmasını takiben anormal yara iyileşmesinin sonucu olarak ortaya çıkan fibröz aşırı büyümelelerdir [114]. Normal skarların aksine gerileme göstermezler. Keloidler insan dışındaki diğer canlılarda görülmeyen [115], benign dermal fibroproliferatif tümörler olarak tanımlanabilir. Nasıl ve neden oluştukları kesin olarak bilinmese de yara iyileşme sürecinin sonlandırılmasındaki bir yetersizliğe bağlı olduğu düşünülmektedir. Skar bölgesinde fazla miktarda kollajen oluşur ve bu kollajen oluşumu yara sınırlarını aşar. Bazı çalışmalar keloidlerden elde edilen fibroblastların normal fibroblastlarla karşılaştırıldığında daha fazla miktarda kollajen ürettiklerini göstermektedir [116, 117]. Bunun yanında hipertrofik skarlar keloidlerden yara bölgesinin sınırları içinde kalmalarıyla ayrılırlar. Normal dokuyu etrafa doğru iterek büyüseler de yara etrafındaki normal dokuyu invaze etmezler [118, 119].

Hem hipertrofik skarlar hem de keloidler her iki cinste de benzer oranlarda görülür. Her ikisinin de en sık görüldüğü yaşam dönemi ikinci dekattır. Her ırkta görülmekle birlikte esmer tenlilerde daha sık görülme eğilimindedir. Hipertrofik skarlar zamanla regresyon gösterebilirler ancak keloidler regresyon göstermezler. Hipertrofik skarlar ve keloidlerin tedavisi için sıklıkla cerrahi eksizyon ve sonrasında steroid ve/veya silikon tabaka uygulaması kullanılır. Bu tedavi sonrasında keloidlerde rekürrens % 45-100 arasında görülürken hipertrofik skarlarda rekürrens çok daha nadirdir [120].

Keloid ve hipertrofik skarlar için pek çok risk faktörü ortaya atılmış olsa da etyolojisinde şu ana kadar açıkça ortaya konmuş tek önemli risk faktörü ailesel yatkınlıktır. Keloid hastalığında kalıtımın otozomal resesif yolla geçtiği

düşünülmektedir, ancak şu ana kadar bu durumdan sorumlu tutulabilecek bir gen saptanamamıştır [119].

Keloid ve hipertrofik skarlar normal skar dokusundan histolojik olarak gözlenebilen zengin damarlanmaları, yüksek mezankimal hücre yoğunlukları, inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve kalınlaşmış epidermal hücre tabakası ile ayrılırlar. Her iki lezyonda da fibroblast aktivesi baskındır. Keloidler sıkıca paketlenmiş sayısız fibrilden oluşan büyük ve kalın kollajen lifleri içerirler. Hipertrofik skarlarda ise fibroblastik hücreler, küçük damarlar ve rastgele organize olmuş ince kollajen fiberlerden oluşan nodüler yapılar görülür. Bu nodüler yapılar hipertrofik skarlarda hemen her zaman görünse de, keloidlerde nadiren görülür. Keloid ve hipertrofik skarların vasküler yapıları benzerdir. Birçok küçük oklüde damar içerirler. Sadece keloidlere özgü olan ve hipertrofik skarlarda bulunmayan ayırıcı histolojik bulgu geniş, eozinofilik, hyalin benzeri kollajen lifleridir. Bunlara keloidal kollajen adı verilir. Ancak keloidin bu ayırıcı histolojik bulgusunun her zaman görülmesi olanaklı değildir. Keloidal kollajen keloid doku örneklerinin yalnızca % 55'inde saptanabilir [121].

Keloid oluşumunun patogenezi hala açıklığa kavuşmuş değildir. Keloidlerden elde edilen fibroblastların aşırı miktarda Tip I prokollajen ürettiği, fazla miktarda VEGF, TGF β 1/ β 2, PDGF α reseptör ekspresyonu gösterdiği ve büyüme faktörlerine daha az ihtiyaç duyduğu bilinmektedir [114]. Prolin hidrosilaz aktivitesiyle ölçülen kollajen sentezi hemen hemen 20 kat artmış bulunur [120]. Keloid fibroblastların apoptozis yetenekleri de normale göre kısıtlıdır ve apoptozisle ilgili genlerde azalma mevcuttur. Kültüre edilmiş fibroblastların normal fibroblastlara göre daha fazla kollajen ve matriks metalloproteinazları ürettikleri gösterilmiştir [14]. Keloid fibroblastlarının proliferasyon hızları hipertrofik skarlara göre daha yüksektir [122]. Normal skarlarda bulunan bir negatif geri besleme mekanizması fibroblastların aşırı çoğalmasını engellemektedir. Bronson, matür skarlardan elde edilen fibroblastların normal yara iyileşmesinde fibroblast proliferasyonunu baskılayabildiğini göstermiştir [123]. Bu negatif geri besleme mekanizmasının çalışmaması hipertrofik skarlarda ve keloidlerde abartılı yara iyileşmesini açıklayabilir.

2.3.1. Keloid ve Hipertrofik Skar Nedenleri

(1) Anormal Fibroblast Aktivitesi

Hipertrofik skarlardan ve keloidlerden elde edilen fibroblastlar değişik özellikler göstermektedir. Hipertrofik skarlarda bulunan fibroblastların bazal kollajen üretim düzeyinde orta dereceli bir artış vardır. Ancak büyüme faktörlerine olan yanıtlar normal fibroblastlara benzerdir. Bunun aksine keloid fibroblastları yüksek düzeylerde kollajen, elastin, fibronektin ve proteoglikan üretirler. Bunun yanında büyüme faktörlerine karşı daha duyarlıdırlar. Keloid fibroblastları esas olarak Tip I kollajen üretirler ve artmış proliferasyon kapasiteleri vardır [98].

(2) Büyüme Faktörleri ve Diğer Sitokinlerin Düzeylerinde Artma

TGF- β 'nın üç alt tipi mevcuttur (β 1, β 2, β 3). Keloid skarlarda TGF- β 1 ve β 2 düzeyleri artar. TGF- β 1, artmış kollajen ve fibronektin senteziyle ilişkilendirilmektedir. Ayrıca keloid fibroblast membranları üzerinde VEGF, TGF- β 1/ β 2, PDGF reseptörlerinin daha fazla miktarda bulunduğu bildirilmiştir [114].

(3) Apoptoziste Azalma

Apoptozis embriyogenezde dokuların şekillenmesinde ve hücre yenilenmesinde önemli rol oynamaktadır. Çalışmalar apoptozis sürecinin yara olgunlaşmasında da önemli rol oynadığını göstermektedir. Keloidlerden elde edilen fibroblastların apoptozis yeteneklerinde azalma olduğu gösterilmiştir. Daha sonra, apoptozisle ilgili olan p53, p63 ve p73 genleri üzerinde durulmuştur. P53 geninin keloid ve hipertrofik skarlardaki fibroblastlarca normal skarlara göre daha yüksek miktarda üretildiği gösterilmiştir. Bu durum, artmış kollajen sentezine karşı apoptozisin artması şeklinde bir yanıt olarak düşünülmüştür. Ancak keloid fibroblastlarda üretilen p53 geninin defektif olduğu gösterilmiştir. Böylece defektif p53 geninin apoptozis fonksiyonunun bozuk olmasının keloid oluşumunda etkili olduğu düşünülmüştür. Bunun yanında normal deride fark edilemeyecek miktarlarda üretilen p63 geninin keloid fibroblastlarda aşırı yüksek miktarlarda sentezlendiği gösterilmiştir [124].

(4) Plazminojen Aktivatör İnhibitörü-1 Düzeyinde Artma

Fibrin yara iyileşmesindeki inflamatuvar hücre migrasyonunda, kollajen sentezinde ve granülasyon dokusunun oluşumunda önemli rol oynar. Plazmin tarafından parçalanır. Plazmin düzeyleri ürokinaz ve plazminojen aktivatör tarafından arttırılırken plazminojen aktivatör inhibitörü (PAI)-1 ile azaltılır. Keloid fibroblastında artmış düzeylerde PAI-1 ve azalmış ürokinaz düzeyleri gözlenmektedir. Bu tablo kollajenin uzaklaştırılmasında bir eksikliğe yol açıp skar oluşumunu arttırabilir [125].

(5) Hipoksi

Keloidlerin histolojik incelemesinde oklüde damarlar ve damar duvarında dizili şişmiş endotel hücreleri görülür. Hipoksinin keloid skar oluşumuna nasıl yol açabileceği tam olarak netlik kazanmamıştır. VEGF hipoksiye cevap olarak fibroblastlardan salınır. Keloidlerde VEGF salınımının arttığını destekleyen net kanıtlar yoktur [126].

(6) Sebum'a Karşı İmmun Reaksiyon

Keloid skarların sebuma karşı bir reaksiyona bağlı gelişebileceği düşünülmüştür. Bunu destekleyen bulgular keloid skarların adolesan çağda daha sık karşılaşılan bir klinik durum olması, pilosebaceöz ünitelerin bulunmadığı avuç içi ve ayak tabanında çok nadir görülmesi, sebace bezlerin aktivitesinin fazla olduğu bölgelerde spontan keloid skarlarla karşılaştırılması, bazen keloid skara komşu bir bölgede yaralanma sonrası keloid oluşumu gözlenmemesidir. Bu görüşü destekleyen araştırmacılar keloid skar oluşumundan pilosebaceöz birimlerin rastgele hasarını sorumlu tutmaktadır [127].

(7) Onkojenler

Keloidler mezankimal tümörler olarak düşünülebilir. Keloid fibroblastların gli-1 onkojenini içerdiği ve Gli-1 proteini ürettiği gösterilmiştir. Bu onkojen normal dokudan ve hipertrofik olmayan skarlardan elde edilen fibroblastlar tarafından sentez edilmezler. Rapamisin ve takrolimus keloidlere karşı etkili olduğu bilinen ilaçlardır. Bu ajanların Gli-1 proteinin hedefi olan cis-trans-prolil izomeraz reseptörünü bağladıkları da gösterilmiştir [98].

2.3.2. Keloid ve Hipertrofik Skar Tedavisinde Kullanılan Yöntemler

Keloid ve hipertrofik skarların tedavisinde eksizyon, steroidler, bası tedavisi, silikon tabaka, radyoterapi, kriyoterapi, IFN, lazer, vitamin A ve imiquimod % 5'lik krem kullanılmaktadır.

(1) Eksizyon

Keloidlerin eksizyonu tek başına başarılı bir tedavi yöntemi değildir. Rekürrens oranları % 45 ile % 95 arasında değişir. Genellikle diğer tedavi yöntemleriyle birlikte kullanılır[127].

(2) Steroidler

Kolay kullanımları ve elde edilebilir olmaları, kolay tolere edilebilmeleri ve semptomları azaltmadaki başarıları nedeniyle keloid ve hipertrofik skarların tedavisinde en sık kullanılan yöntemlerden biri intralezyonel steroid uygulamalarıdır. Bu amaçla sıklıkla kullanılan steroid triamsinolon asetoniddir. 40 mg/ml'lik dozu 4-6 hafta aralıklarla üç kez uygulanır. Bu uygulamaya skarda düzleşme sağlanıncaya kadar devam edilebilir. Tek başına kullanımı keloidin doku miktarını azaltabilmekle birlikte tamamen yok etmez. Preoperatif bir veya birkaç doz sonrası keloidin cerrahi eksizyonu ve steroid tedavisine postoperatif dönemde de devam edilmesi sık kullanılan bir tedavi yaklaşımıdır. İntralezyonel steroid kullanımının yan etkileri atrofi, hipopigmentasyon, depigmentasyon, telenjektazi ve deri nekrozudur. Steroid kullanımına bağlı sistemik etkiler bu tedavilerde nadiren ortaya çıkmaktadır [96-98, 117, 118, 127, 128].

Steroidler fibroblast büyümesini azaltarak ve alpha 2-makroglobulini inhibe ederek kollajen yıkımını arttırlar. Triamsinolon normal ve keloid fibroblast kültürlerinde TGF- β 1 düzeylerini azaltmakta ve kollajen sentezi üzerine negatif etkisi olan bFGF'yi arttırmaktadır [129]. Genel olarak bu tedavi yaklaşımı sonrasında rekürrens oranları % 50'nin altındadır [114].

(3) Bası tedavisi

Bası tedavisi özellikle yanık sonrası oluşan keloid ve hipertrofik skarların tedavisinde etkili bir yöntemdir. Bu tedavi yöntemi genellikle diğer tedavi

yöntemleriyle birlikte kullanılır. Dört-altı ay boyunca günde 18-24 saat kullanılması gerekmektedir. Özellikle kulak lobülündeki keloidlerin tedavisinde bası yapıcı küpelerin başarılı kullanımları bildirilmiştir. Uygun basınç düzeyi 24 mmHg ile 30 mmHg arasındadır [98, 127].

(4) Silikon kullanımı

Silikon tabaka ve silikon içeren pomadlar hipertrofik skarların küçültülmesi ve yeni hipertrofik skarların oluşumunun engellenmesi amacıyla yaygın şekilde kullanılmaktadır. Tedavi edici etkileri birçok çalışmada bildirilmiştir [98, 130]. Silikon tabaka kullanımının etki mekanizması bilinmemektedir. Silikon tabaka uygulamasının yara üzerinde basınç, ısı, oksijen miktarı gibi parametrelerde değişiklik oluşturmadığı bildirilmiştir. Etkisinin skar hidrasyonunun artırılmasına bağlı olduğu düşünülmektedir [127].

(5) Radyoterapi

Radyoterapinin keloid rekürrens oranını etkin bir biçimde azalttığı bilinmektedir. Kuramsal olarak malignensiye yol açma riski nedeniyle kullanımı kısıtlıdır [127]. Radyoterapinin etkisini apoptozisi arttırarak gösterdiği düşünülmektedir. Kültüre keloid fibroblast hücreleri ile yapılan bir çalışmada 8 Gy dozunda verilen gamma ışınlarının keloid fibroblastlarda apoptozisi iki kat arttırdığı gösterilmiştir [131]. Radyoterapinin tek başına kullanımının keloid tedavisindeki yeri tartışmalıdır. Rekürrens oranları % 50-100 arası bildirilmiştir. Ancak, keloid eksizyonu sonrası adjuvan radyoterapinin rekürrensi önleme oranı uzun süreli izlemde % 65-99 arasındadır [127, 132, 133]. Radyoterapinin bu hastalarda karsinogenez riskini arttırdığı unutulmamalıdır [114]. Literatürde radyoterapiyle keloid tedavisi sonrası gelişen malignitelerle ilgili çok az sayıda yayın vardır [134, 135].

(6) Krioterapi

Keloid ve hipertrofik skarların tedavisi için geliştirilen intralezyonel krioterapi cihazı lezyon boyutlarında yaklaşık % 50 oranında küçülme sağlamaktadır. Tedavi öncesi ve sonrası yapılan histolojik analizler karşılaştırıldığında skar organizasyonunda düzelme görülmektedir [136].

(7) Sitokinler

Intralezyonel IFN uygulamasının keloid ve hipertrofik skarların tedavisinde yararlı olduğuna dair kanıtlar vardır. İnterferonlar, fibroblastların kollajen sentezleme yeteneğini engellerler [98]. Özellikle IFN- α -2b keloidlerdeki kollajen ve glikozaminoglikan düzeyini normal düzeylere getirir. Baş ağrısı, grip benzeri semptomlar ve miyalji tedavinin sık görülen komplikasyonlarıdır. İnterferon ile ilgili yapılan çalışmalar çelişkili sonuçlar göstermiştir. Retrospektif bir çalışmada, eksizyon ile IFN- α -2b'nin tedavi sonuçları karşılaştırmış, IFN (% 18.7) ve eksizyon (% 51.1) tedavisinin rekürrens oranları posteksizyonel steroid tedavisine göre (% 58.4) anlamlı derecede düşük bulunmuştur [137]. Karbon dioksit lazer ve IFN- α -2b kombinasyonunda üç yıllık rekürrens oranı % 0 olarak bildirmiştir [138]. Diğer bir çalışmada, IFN- α -2b tedavisi ile rekürrens oranı % 54, buna karşılık triamsinolon tedavisi ile rekürrens oranı % 15 olarak bulunmuştur [138].

(8) Lazer

Karbon dioksit lazer eksizyon uygulamasının keloid ve hipertrofik skarların tedavisinde rekürrens oranları % 50 üstündedir ve bu yöntemin basit eksizyona üstünlüğü yoktur. Maliyetinin yüksek olması her ne kadar az kan kaybı ve azalmış postoperatif ağrı gibi avantajlarının olmasına rağmen kullanımını sınırlandırmaktadır. "585-nm pulsed dye" lazer uygulamasında etkinlik oranı % 75 olarak bildirilmiştir. Bu lazer uygulaması, hemoglobin moleküllerinin selektif termolizisine yol açarak mikrovasküler hasara ve koagülatif nekroza yol açmaktadır. Melanin pigmentinin hemoglobinle bu konuda yarışması, keloidlerin daha çok görüldüğü esmer renkli kişilerde bu yöntemin etkinliğini azaltmaktadır [98].

(9) Vitaminler

Oral vitamin A'nın keloid skarların görünümünde gelişme yarattığı gözlemine dayanarak % 0.05'lik retinoik asidin yara iyileşmesine ve anormal skar oluşumuna etkisini araştıran bazı çalışmalar yapılmış ve olumlu sonuçlar elde edilmekle birlikte vitamin A'nın deriden absorbe edilebilmesi ve buna bağlı gelişebilecek hipervitaminoz ve teratojenik etkiler nedeniyle kullanımı önerilmemektedir [130].

(10) İmiquimod

İmiquimod genital siğiller, bazal hücreli karsinom (BCC) ve aktinik keratoz tedavisi için geliştirilmiş immun sistemi modifiye edici topikal (% 5 krem) bir ajandır. Etkisi proinflamatuvar sitokinlerin, özellikle de IFN- α 'nın stimulasyonudur. İnterferon- α kollajen yıkımını arttırır. İmiquimod bunun yanında apoptozisle ilgili genlerin ekspresyonunu arttırmaktadır. Bu özellikleri nedeniyle imiquimod keloid ve hipertrofik skarların tedavisinde kullanılmıştır. İmiquimod kremin rekürrense engel olduğunu gösteren çalışmalar vardır [139, 140]. Yakın zamanda yapılan başka bir çalışmada, redüksiyon mammoplasti sonrası imiquimod kullanılan hastalardaki skar kalitesinin kullanılmayan hastalara göre daha iyi olduğu bildirilmiştir [141]. İmiquimod % 5 krem ile yapılan çalışmalar olumlu sonuçlar vermiş olsa da hem bu çalışmaların azlığı ve yapılan çalışmalardaki örnek yetersizliği hem de takip süresinin görece kısalığı nedeniyle kesin etkileri hakkında karar vermek için henüz erken görünmektedir [114].

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Etik Kurul Onayı ve Finansal Destek

Çalışma için Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Yerel Etik Kurulu'ndan 15.04.2013 tarihinde 08/09 karar numarası ile yazılı onay alınmıştır ve Helsinki Deklarasyonu'na [142] ve İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu'na [143] uygun şekilde yürütülmüştür. Bu çalışma aynı zamanda Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Destek fonu tarafından desteklenmiştir. (Proje no: 2013/58). Ayrıca hastalardan bilgilendirmeye ait onay formu (concent form) alınmıştır.

3.2. Çalışma Grubunun Seçimi

“Scraeth assay” testi için toplam 7 kişi alınmış olup bunlar üzerinden üç çalışma grubu aşağıdaki şekilde oluşturulmuştur:

- SB-Normal deri grubu (n:4, sağlıklı yetişkin gönüllü kişilerin sağlam deri dokularından oluşturulmuştur)
- NF-Normal deri grubu (n:2; NIH kriterlerine göre belirlenen özelliklerden en az ikisini taşıması nedeni ile NF-I tanısı konmuş, çalışmaya gönüllü olarak katılan, plastik cerrahi girişim yapılmış olan hastaların nörofibromu olmayan deri dokularından oluşturulmuştur)
- NF grubu (n:3; NIH kriterlerine göre belirlenen özelliklerden en az ikisini taşıması nedeni ile NF-I tanısı konmuş, çalışmaya gönüllü olarak katılan, plastik cerrahi girişim yapılmış olan hastaların patolojik deri dokularından oluşturulmuştur)

Eksize edilen deri ve yumuşak dokulardan primer hücre kültürleri yapıldı.

İmmunohistokimyasal çalışma için Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı tarafından nörofibrom tanısı konulmuş ve klinik olarak NF-I tanısı almış 8 hastanın eskiye ait patoloji örnekleri kullanılmıştır. Ayrıca çalışmanın “scraeth assay” testi için alınmış olan 3 sağlıklı insanın ve 5 NF tanısı almış hastanın deri dokuları da bu immunohistokimyasal analiz için kullanılmıştır. Çalışma için oluşturulan çalışma grupları aşağıda sıralanmıştır:

- SB-Normal deri grubu (n:3, sağlıklı yetişkin gönüllü kişilerin sağlam deri dokularından oluşturulmuştur)

- NF-Normal deri grubu (n:5; NIH kriterlerine göre belirlenen özelliklerden en az ikisini taşıması nedeni ile NF-I tanısı konmuş, çalışmaya gönüllü olarak katılan, plastik cerrahi girişim yapılmış olan hastaların nörofibromu olmayan deri dokularından oluşturulmuştur)
- NF grubu (n:13; 5 tane NIH kriterlerine göre belirlenen özelliklerden en az ikisini taşıması nedeni ile NF-I tanısı konmuş, çalışmaya gönüllü olarak katılan, plastik cerrahi girişim yapılmış olan hastaların patolojik deri dokularından ve 8 tane eskiye ait patoloji örneklerinden oluşturulmuştur)

“Human Wound healing Real time PCR array” için, NIH kriterlerine göre belirlenen özelliklerden en az ikisini taşıması nedeni ile NF-I tanısı konmuş, çalışmaya gönüllü olarak katılan, plastik cerrahi girişim yapılmış olan hastaların nörofibromu olmayan deri dokuları ve nörofibrom dokuları kullanılmıştır. Ayrıca yine bu analiz için Kırıkkale Üniversitesi Plastik ve Rekonstrüktif Cerrahi Anabilim Dalı tarafından değişik endikasyonlarla, sağlıklı dokularında düzeltici ameliyatlara yapılan sağlıklı bireylerden alınan sağlam deri dokuları da kullanılmıştır. Çalışma için oluşturulan gruplar aşağıda sıralanmıştır:

- SB-Normal deri grubu (n:2; sağlıklı yetişkin gönüllü kişilerin sağlam deri dokularından oluşturulmuştur)
- NF-Normal deri grubu (n:3; NIH kriterlerine göre belirlenen özelliklerden en az ikisini taşıması nedeni ile NF-I tanısı konmuş, çalışmaya gönüllü olarak katılan, plastik cerrahi girişim yapılmış olan hastaların nörofibromu olmayan deri dokularından oluşturulmuştur)
- NF grubu (n:5; NIH kriterlerine göre belirlenen özelliklerden en az ikisini taşıması nedeni ile NF-I tanısı konmuş, çalışmaya gönüllü olarak katılan, plastik cerrahi girişim yapılmış olan hastaların deri dokularından oluşturulmuştur)

Ayrıca Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Kök Hücre Bilimleri Laboratuvarından NF-Normal deri grubuna 1 adet ve NF grubuna 2 adet pasaj1’ de primer hücre kültür serisi ilgili birimin izni alınarak ilave edilip analize eklenmiştir

(Proje adı: Nörofibromatozis1 (NF) hastalarında kemik iliği ve doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin özelliklerinin belirlenmesi; TÜBİTAK projesi)

3.3. Cerrahi Prosedür

NIH kriterlerine göre belirlenen özelliklerden en az ikisini taşıması nedeni ile NF-I tanısı konmuş, çalışmaya gönüllü olarak katılan hastalardan NF ve NF-Normal deri grupları için lokal anestezi altında uygun saha temizliğini takiben hasta örtülerek nörofibromlu alandan estetik ünitelere uygun şekilde eliptik eksizyon yapıldı. Cilt kanama kontrolünü takiben primer onarıldı. Uygun pansumanları yapıldı. Ameliyat tamamlandı. Hastalar postopertif poliklinik kontrollerine çağırıldı. Eksizyon alanı içerisine sağlam deri alanı dahil edilerek gerekli olan örnekler nörofibrom ve sağlam deri alanlarından alındı.

3.4. Laboratuvar Analizleri

3.4.1. Dokudan Hücre İzolasyonu ve Fibroblast Kültürü

Hastalardan steril şartlarda alınan dokular laboratuvar ortamında steril bistüriler yardımıyla küçük parçalara ayrılıp 1mg/ml kollagenaz enzimi ile 2 saat muamele edildi. Daha sonra dokular 25cm²'lik flaslara ekildi. Üzerine % 89 Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM; Biological Industries, İsrail), % 10 FBS (Fetal Bovine Serum), % 1 penisilin streptomisin içeren besiyeri eklenerek bir hafta 37 °C'de % 5 CO₂'lik etüvde inkübe edildi. Yeterli sayıda hücre izole olduktan sonra flaslara tutunmuş olan hücrelerin vasatları atılıp 0.5 ml tripsin-etilen diamin tetra asetik asit (EDTA) ile muamele edilerek 4 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonunda hücreler kontrol edilip kalkmayan hücreler mekanik güç uygulanarak kaldırıldı. Steril falkon tüpe aktarılan hücrelerin üzerine tripsin aktivasyonunu inhibe etmek için 1 ml serum içeren besiyeri eklendi. Daha sonra 2500 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi. Elde edilen pellet üzerine her flask için 3 ml besiyeri eklenerek yeni flaslara pasajlandı. Yaklaşık 4 pasajdan sonra yeterli sayıya ulaşan hücre pelletleri diğer çalışmalarda kullanmak üzere donduruldu. Dokudan hücre izolasyonu ve fibroblast kültürleri Kırıkkale Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı ve Hacettepe Üniversitesi Kök Hücre Laboratuvarlarında yapılmıştır.

3.4.2. Scratch Assay

Yukarıda tarif edilen pasajlamanın ardından yeterli sayıya ulaşan hücreler 24 well plate'lere her bir kuyucukta 3.0×10^4 hücre olacak şekilde ekildi. 24 saat inkübe edilerek hücrelerin kuyucuklara tutunması sağlandı. 24 saat sonunda, kuyucuklara tutunan hücrelerin tam ortasından steril eküvyon ile kuyucuktaki hücreleri ikiye ayıracak şekilde çizgi atılarak hasar verildi. Beşer saat aralıklarla 30 saat boyunca hücrelerin iyileşmesi takip edildi.

3.4.3. Human Wound Healing Real Time PCR Array

Tip-1 Nörofibromatozis hastalığı olan kişilerin nörofibrom ve sağlam derisinden, sağlıklı kişilerin sağlam derilerinden total RNA eldesi için RNeasy Mini Kit (Qiagen, ABD) kullanıldı. RT2 First Strand Kit (Qiagen, ABD) ile 2 µg RNA kullanılarak hipoksi ile ilişkili 84 genin real-time PCR analizinde kullanılmak üzere cDNA sentezlendi.

Human Wound Healing Real Time PCR Array (yara iyileşmesine yanıtta rol alan 84 anahtar geni kesitler) kullanılarak yara iyileşmesi, doku hasarı ve onarımını içeren odaklanılmış gen panelindeki ekspresyonlar analize edildi. Gerçek Zamanlı (Real-time) Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) RT2profiler PCR array (PAHS-121ZR-Human Wound Healing Real Time PCR Array, Qiagen) ile RT2 Real Time SYBR Green PCR Master Mix kullanılarak real-time PCR işlemleri (ATQ firmasının Ankara'daki Biyoteknoloji Laboratuvarlarında gözetimli olarak) gerçekleştirildi.

3.4.4. İmmünohistokimyasal Değerlendirme

Doku örneklerinden ve doku takibine alınan hücre hattı peletlerine ait parafin bloklardan 5 µ kalınlığında hazırlanan kesitler patoloji anabilim dalında bulunan otomatize sistem immunhistokimya boyama cihazı (Bond) yardımıyla DAB kromojeni kullanılarak boyandı. Boyanma sonuçları Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalında öğretim üyesi bir uzman patolog tarafından değerlendirildi ve skorlandı.

İmmünohistokimyasal yöntemle boyanmış kesitlerde izlenen PDGFR, FGF ve Tip-1 kollajen hücre sayıları ile değerlendirme yapıldı. Skorlar PDGFR, FGF ve Tip-1 kollajen hücre sayıları, her bir kesitte 10 adet mikroskobik alanda ($\times 10$

büyütmede) yapılan boyanmış hücre sayımından elde edilen hücre sayılarının ortalaması olarak belirlendi.

3.4.5. Farklılaşma Değerlendirmesi

Damar endotel farklılaşması FGF (bs-0217R, Bioss, Massachusetts) ve PDGFR alpha (bs-0231R, Bioss, Massachusetts) ile; damar düz kas farklılaşması smooth muscle actin alpha (PA0943, Leica, UK), Calponin (PA0416, Leica, UK) ve myosin heavy chain (smooth muscle) (PA0493, Leica, UK) ile; kollajen farklılaşması tip I kollajen (bs-0578R, Bioss, Massachusetts) ve tip III kollajen (bs-0549R, Bioss, Massachusetts) antikorları ile değerlendirildi.

3.5. İstatistiksel Analiz

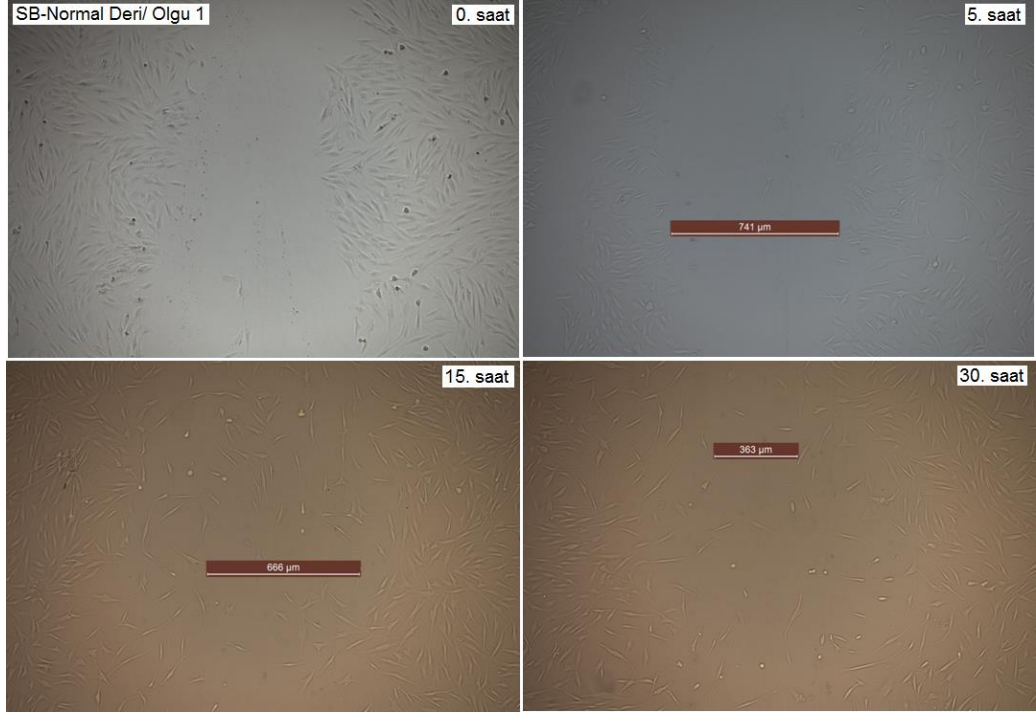
Çalışmadan elde edilen tüm sayısal veriler ve skorlar “Statistical Packages for the Social Science” (SPSS) 13.0 kullanılarak istatistiksel yönden analiz edildi. Tanımlayıcı istatistiksel analizler yapıldıktan sonra (frekans, yüzde dağılımı, ortalama±standart sapma), üç grubun karşılaştırılmasında değerler anormal dağıldığı ve homojen olmadığından Kruskal Wallis Testi kullanıldı. Tüm testlerde $p \leq 0.05$ değeri anlamlı olarak kabul edildi.

Diğer yandan PCR data analizi SABiosciences’a ait online PCR Array Data analizi yazılımı kullanılarak gerçekleştirildi. Tüm örnekler beş “housekeeping” genin (*ACTB*, *B2M*, *GAPDH*, *HPRT1*, *RPLP0*) düzeylerine göre normalize edildi. $p < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi ve Rotor Gene cihazında çalışıldığı için firma önerisiyle cut-off Ct değeri 33 olarak seçildi.

4. BULGULAR

4.1. Scratch Assay

4.1.1. SB-Normal Deri Grubu



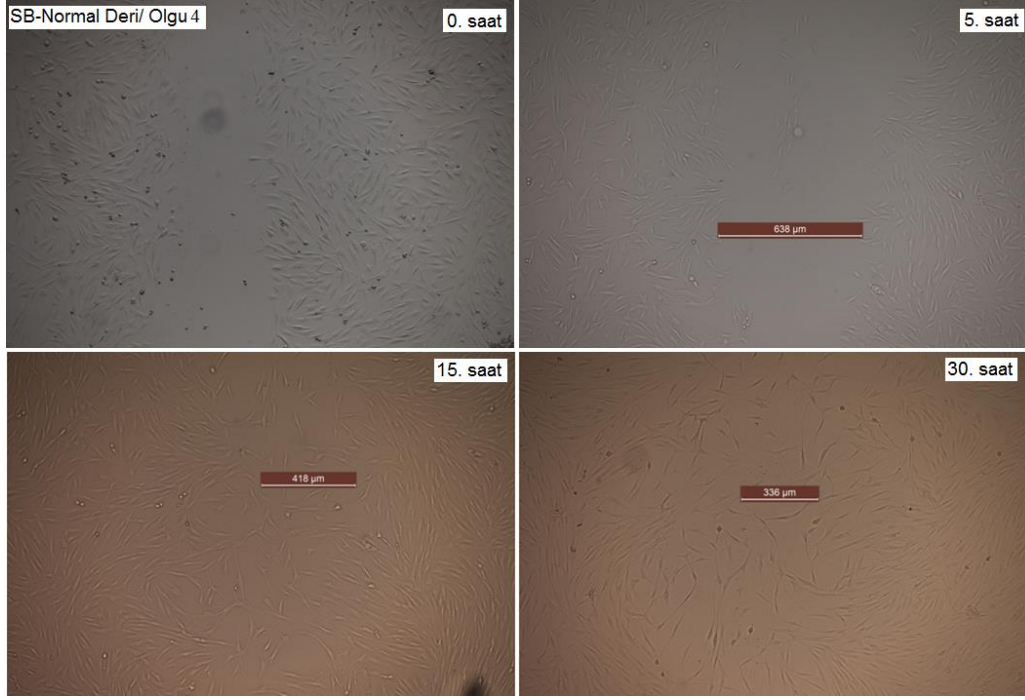
Resim 4.1. SB-Normal Deri/ Olgu 1: 5. Saat: hasarlı bölgeye doğru hücresel göç ve hücre uzantılarında belirginleşme saptandı; 15. saat: hücrelerin % 10-20 oranında hasarlı bölgeye göç ettiği ve tutunduğu, fibriler bir özellik gösterdikleri gözlemlendi; 30. Saat: hücre yönelmesi ve proliferasyon olmasına rağmen hasarlı bölgenin sadece %20-%30 oranında hücrelerce doldurulduğu, %1-2 oranında yüzeyden kalktığı ve morfolojik olarak şekillerinde yuvarlaklaşma gözlemlendi.



Resim 4.2. SB-Normal Deri/ Olgu 2: 5. Saat: hasarlı bölgeye doğru hücre sel göç ve hücre uzantılarının belirginleştiği gözlemlendi; 15.saat: hasarlı bölgenin kapatılması çok daha belirgin ve karakteristik özellik gösterdi (%90 oranında); 30. saat: hasarlı bölgenin neredeyse tamamı hücreler tarafından doldurulduğu ve diğer bölgelerle aynı hücre yoğunluğuna geldiği gözlemlendi.



Resim 4.3. SB-Normal Deri/ Olgu 3: 5. Saat: hasarlı bölgeye doğru hücre sel göç ve hücre uzantılarının belirginleştiği gözlemlendi; 15.saat: hasarlı bölgeye hücre sel göç, % 50 oranında hasarlı bölgenin kapandığı ve hücrelerin sitoplazmik uzantılarının birbirleriyle teması dikkati çekti; 30.saat: hasarlı bölgenin hücrelerce % 70 oranında doldurulduğu gözlemlendi.



Resim 4.4. SB-Normal Deri/ Olgu 4: 5. Saat: hasarlı bölgeye doğru hücrel göç ve hücre uzantılarının belirginleştiği gözlemlendi; 15. Saat: hücrel göç ve proliferasyon ile % 40 oranında hasarlı bölgenin doldurulduğu gözlemlendi; 30. Saat: hasarlı bölgenin % 50 oranında kapandığı gözlemlendi.

4.1.2. NF-Normal Deri Grubu



Resim 4.5. NF-Normal Deri/ Olgu 1: 5. Saat: hasarlı bölgeye hücre göçü gözlenmediği gibi % 1-2 oranında hücrelerin yuvarlaklaştığı ve plate tabanından kalktığı gözlemlendi; 15. Saat: hasarlı bölgede % 10'a yakın oranda hücre artışı tespit edildi.

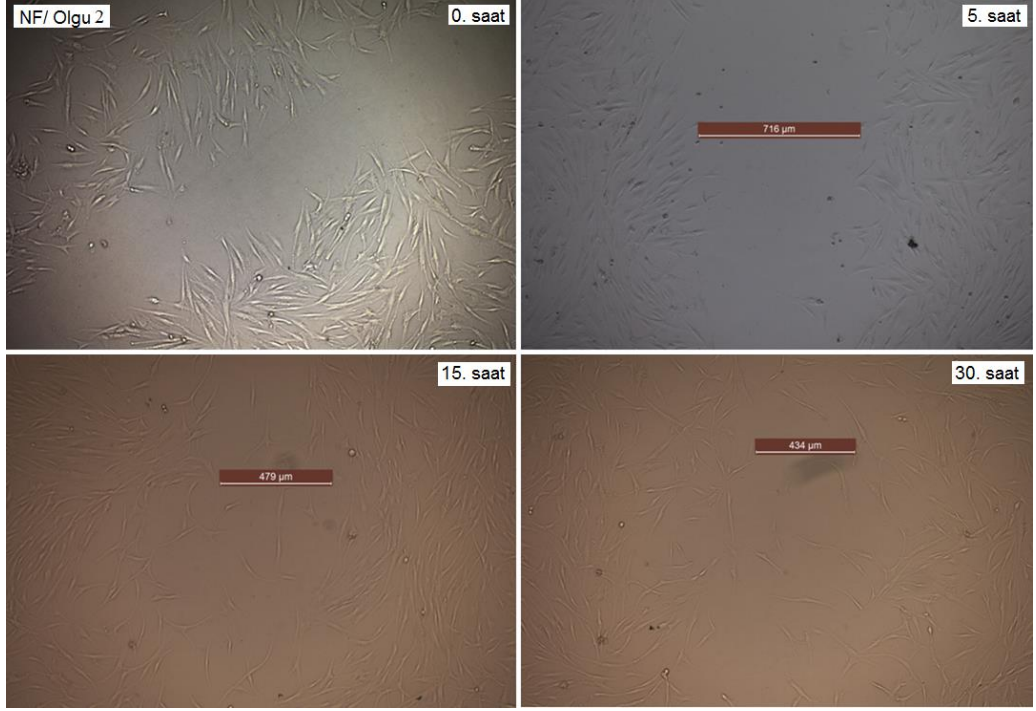


Resim 4.6. NF-Normal Deri/ Olgu 2: 5. Saat: hücre yoğunluğu kontrol grubuna göre daha düşük olmakla birlikte hasarlı bölgeye doğru hücrelerin sitoplazmik uzantıları gözlemlendi; 15. Saat: plate genelinde hücre sayısında artış ve hasarlı bölgede % 30-40 oranında kapanma gözlemlendi; 30. Saat: hücre sayısında artış ve % 70 oranında kapanma gözlemlendi.

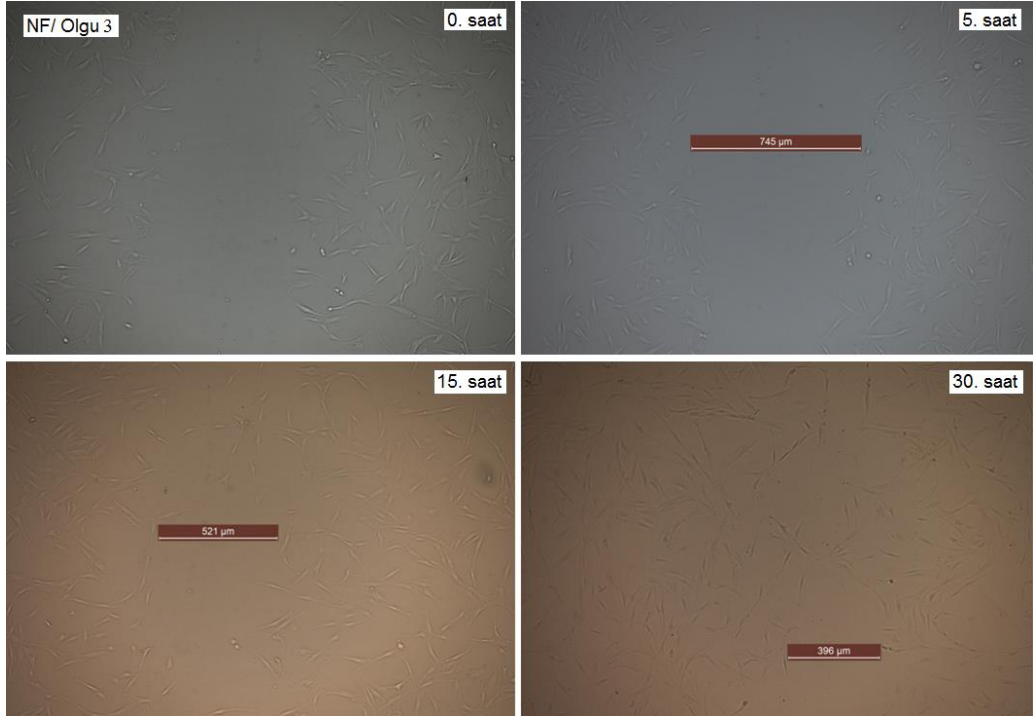
4.1.3. NF Grubu



Resim 4.7. NF/ Olgu 1: 5. Saat: hücre yoğunluğunda artış olmamakla birlikte bazı hücrelerin sitoplazmik uzantıları dikkat çekti; 15. saat: hasarlı bölgenin bazı kısımlarında % 30-40 oranında ve plate genelinde hücre yoğunluğunda artış gözlemlendi; 30. saat: proliferasyon devam etmekle birlikte 15. Saat ile arasında ciddi bir değişiklik gözlenmedi.



Resim 4.8. NF/ Olgu 2: 5. Saat: ciddi hücre yönelmesi ve sitoplazmik uzantılar saptandı; 15.saat: hücrelerin hasarlı bölgeye göçü ve hasarlı bölgedeki hücre yoğunluğu dikkat çekti. Hasarlı bölgede % 30-40 oranında daralma gözlemlendi; 30.saat: daralma % 60 oranında tespit edildi.



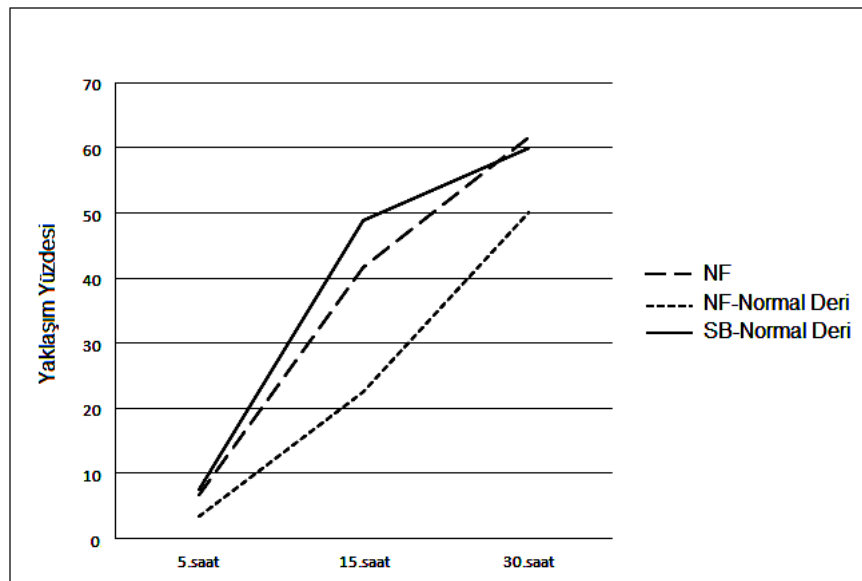
Resim 4.9. NF/ Olgu 3: 5. Saat: hasarlı bölgeye doğru fibriler uzantılar gözlemlendi; 5.saat: hücre yoğunluğunda artış ve % 50-60 oranında daralma saptandı; 30.saat: yer yer hasarlı bölge kapanmış ve hücre yönelmesi dikkat çekici, hücre yoğunluğunun neredeyse ikinci katına çıktığı gözlemlendi.

Kruskal-Wallis testine göre 5, 15 ve 30. saatlerde SB-Normal deri, NF-Normal deri ve NF gruplarından gözlenen yaklaşım yüzdeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir (tüm karşılaştırmalar için $p>0.05$) (**Tablo 4.1. ve Grafik 4.1.**).

Tablo 4.1. 5, 15 ve 30. saatlerde SB-Normal deri, NF-Normal deri ve NF gruplarında gözlenen yaklaşım yüzdelerinin karşılaştırılması.

"Scratch Assay"	GRUP	Ort	Yaklaşım (%)		
			SS	Med	p
5. saat	NF	6.7	2.9	5	0.246
	NF-Normal Deri	3.5	2.1	3.5	
	SB-Normal Deri	7.5	2.9	7.5	
15. saat	NF	41.7	11.6	35	0.313
	NF-Normal Deri	22.5	17.7	22.5	
	SB-Normal Deri	48.8	31.2	45	
30. saat	NF	61.7	22.6	60	0.903
	NF-Normal Deri	50	28.3	50	
	SB-Normal Deri	60	29.7	60	

Kruskal-Wallis Test, $p<0.05$

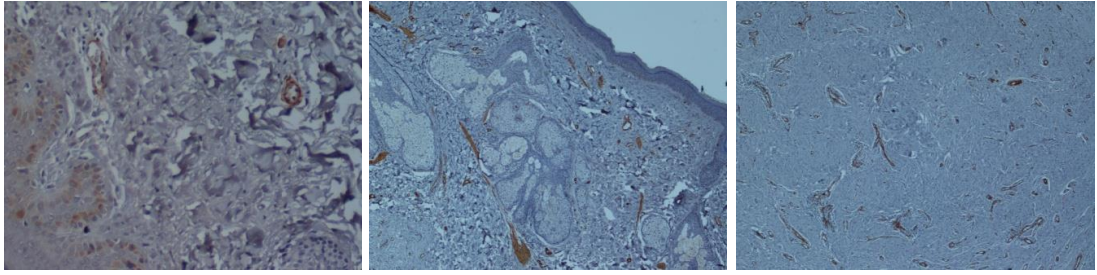


Grafik 4.1. 5, 15 ve 30. saatlerde SB-Normal deri, NF-Normal deri ve NF gruplarında gözlenen yaklaşım yüzdelerinin çizgi grafiği.

4.2. İmmünohistokimyasal Değerlendirme

4.2.1. SMA (Smooth muscle actin alpha)

SMA boyaması tümörlerdeki damar yayılımını göstermek için kullanılmaktadır. Çalışma örneklerimizin SMA boyasında çok sayıda hem küçük hem de büyük çaplı damarlarda belirgin artışın olduğu saptanmıştır ancak tümörlerde belirgin SMA pozitifliği gözlenmemiştir (**Resim 4.10**).



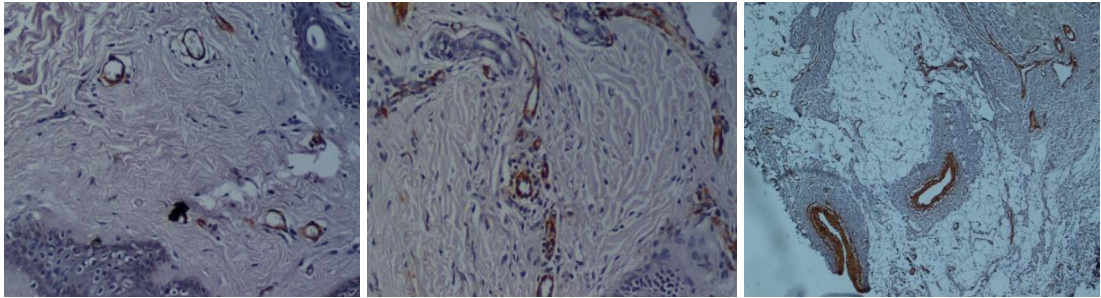
SB-Normal deri

NF-Normal deri

NF

Resim 4.10. SB-Normal deri, NF-Normal deri ve NF gruplarında gözlenen SMA pozitifliği.

Bu boyama yöntemi ile vasküler yapılar çok sayıda demonstre edilmiştir. Tümör dokusu komşuluğundaki normal dokuda vasküler yoğunluk az olmakla birlikte bir kısım geniş kalınlıktaki damar yapıları dikkati çekmektedir (**Resim 4.11**).



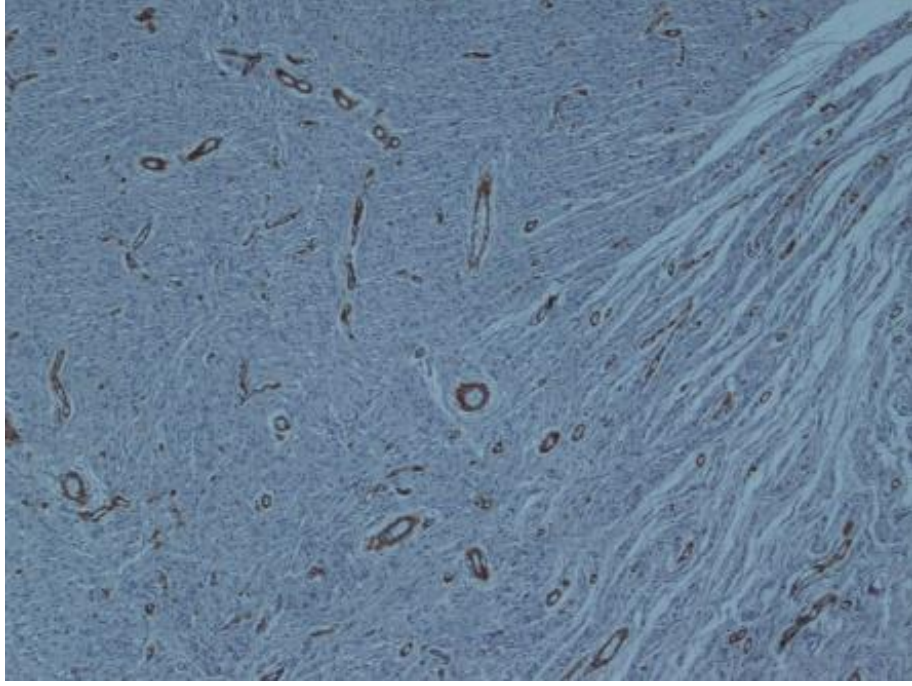
SB-Normal deri

NF-Normal deri

NF

Resim 4.11. SB-Normal deri, NF-Normal deri ve NF gruplarında gözlenen vasküler yapıların özelliklerini gösteren SMA boyanma paternleri

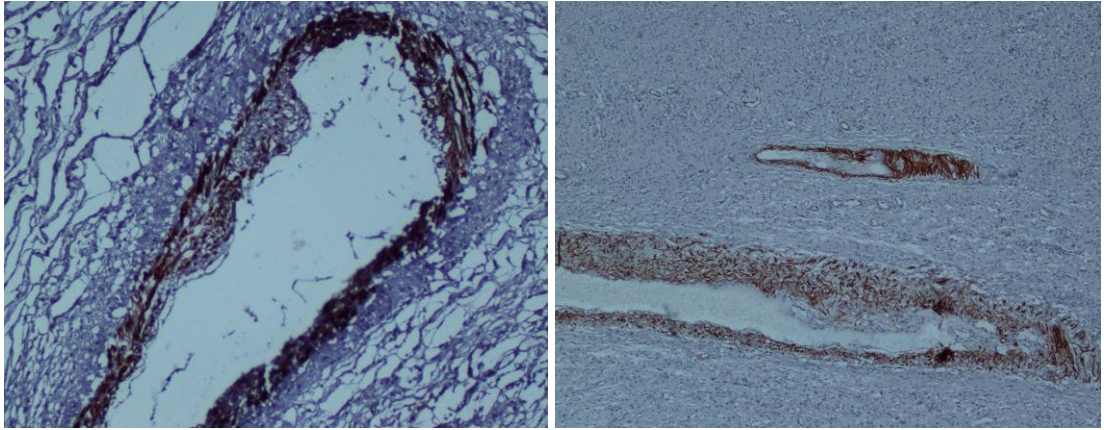
Derin dermis lokalizasyonunda kalın ve geniş cidarlı damarların çevresinin schwannom hücreleri ile sarıldığı ve yakın ilişkili olduğu gözlenmiştir. Bir kısmı müküler olan çok sayıda damar yapısı gözlenmiştir (**Resim 4.12**).



Resim 4.12. Derin dermis lokalizasyonunda kalın ve geniş cidarlı damarlar çevresinde schwannom hücrelerini gösteren SMA boyanma paternleri

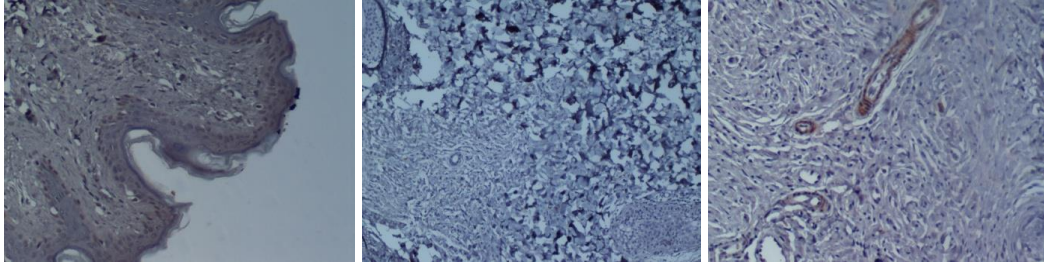
4.2.2. Calponin

Calponin immunohistokimyasal boyası genellikle kapiller damarlardan çok musküler yapıdaki kalın cidarlı arter ve venleri demonstre etmektedir (**Resim 4.13**).



Resim 4.13. Calponinle yapılan immunohistokimyasal boyamada musküler yapıdaki kalın cidarlı arter ve venler.

Calponin ile boyanan tümör dokusu içerisinde vaskülarite artışı olduğu ve büyük çaplı damarların NF dokusu çevresinde belirgin artış gösterdiği gözlenmiştir (**Resim 4.14**).



SB-Normal deri

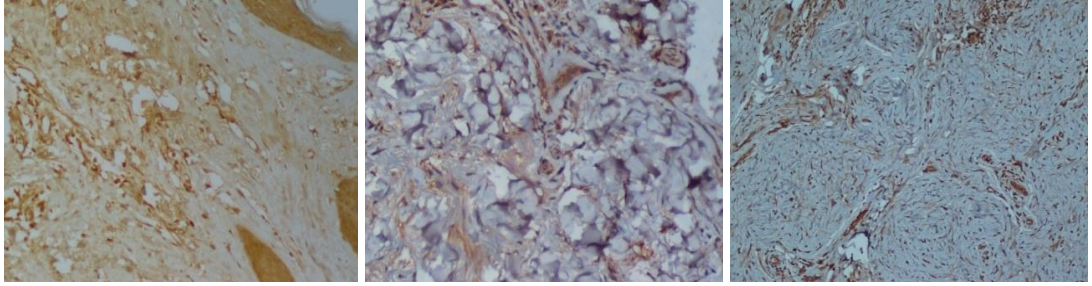
NF-Normal deri

NF

Resim 4.14. SB-Normal deri, NF-Normal deri ve NF gruplarındaki calponin boyanma paterni.

4.2.3. Platelet Kökenli Büyüme Faktörü Reseptörü Alfa (Platelet-derived growth factor receptor [PDGFR] alpha)

Bu boyama yönteminde tümör dokusunun damar endotelinde ekspresyon artışı gözlenmekle birlikte tümör hücrelerinin de yer yer fokal boyandığı gözlenmiştir (**Resim 4.15**).



SB-Normal deri

NF-Normal deri

NF

Resim 4.15. SB-Normal deri, NF-Normal deri ve NF gruplarındaki PDGFR boyanma paterni.

Skor sonuçlarına uygulanan Kruskal-Wallis testi sonunda üç gruptaki bireylerin PDGFR kapiller endotel değerleri ($p=0.09$), PDGFR kaslı damar endotel değerleri ($p=0.432$) ve PDGFR kaslı damar duvarı değerleri ($p=0.961$) arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır (**Tablo 4.2**).

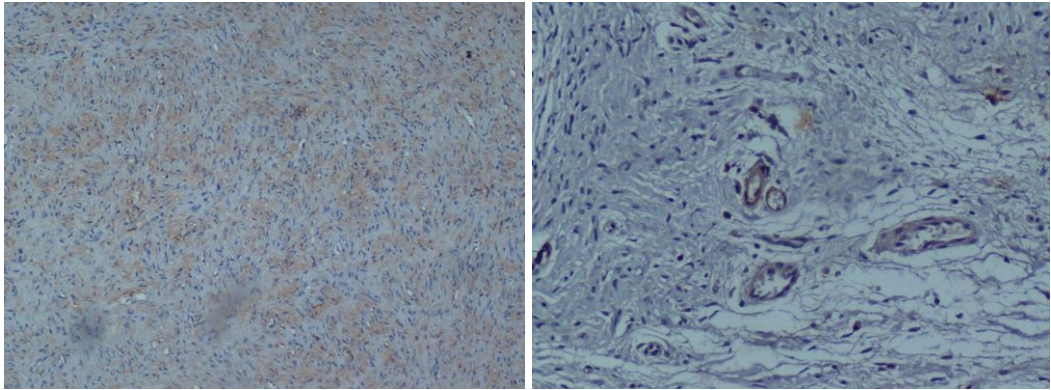
Tablo 4.2. Üç grubun PDGFR tümör, PDGFR kapiller endotel, PDGFR kaslı damar endoteli, PDGFR kaslı damar duvarı değerlerinin karşılaştırılması.

PDGFR	GRUP	Med	Min	Maks	p
Tümör	NF	1	1	3	
	NF-Normal Deri				
	SB-Normal Deri				
Kapiller Endotel	NF	2	1	2	
	NF-Normal Deri	1	1	2	0.090
	SB-Normal Deri	1	1	1	
Kaslı Damar Endoteli	NF	1.5	1	2	
	NF-Normal Deri	1	1	2	0.432
	SB-Normal Deri	1	1	1	
Kaslı Damar Duvarı	NF	1.5	0	2	
	NF-Normal Deri	2	0	2	0.961
	SB-Normal Deri	1.5	1	2	

Kruskal-Wallis Test, $p < 0.05$

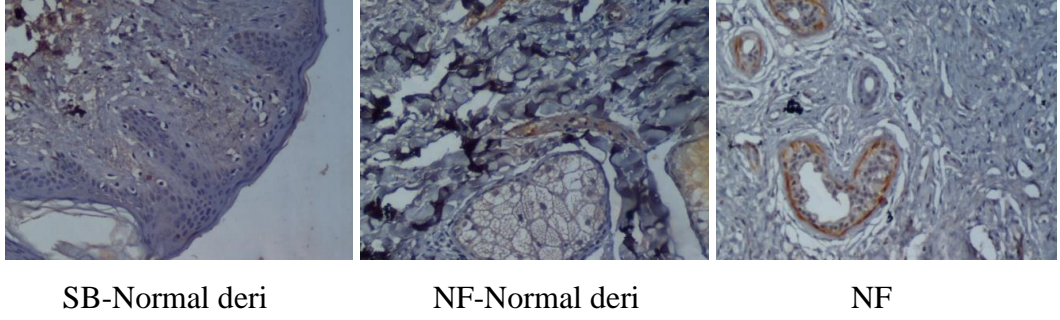
4.2.4. Fibroblast Büyüme Faktörü (Fibroblast Growth Factor=FGF)

Genellikle FGF ekspresyonu olmamakla birlikte kapiller ve geniş cidarlı damarlarda fokal çok az sayıda pozitiflik gözlenmiştir (**Resim 4.16**).



Resim 4.16. Kapiller ve geniş cidarlı damarlarda FGF boyanma paterni.

Diffüz ancak zayıf pozitiflik ve tümör doku içerisinde damar endotelde FGF reseptör pozitifliği gözlenmiştir (**Resim 4.17**).



Resim 4.17. SB-Normal deri, NF-Normal deri ve NF gruplarındaki FGF boyanma paterni.

Skor sonuçlarına uygulanan Kruskal-Wallis testi sonunda üç gruptaki bireylerin FGF kapiller endotel değerleri ($p=0.361$); FGF kaslı damar endotel değerleri ($p=0.834$) ve FGF kaslı damar duvarı değerleri ($p=0.468$) arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır (**Şekil 4.3**).

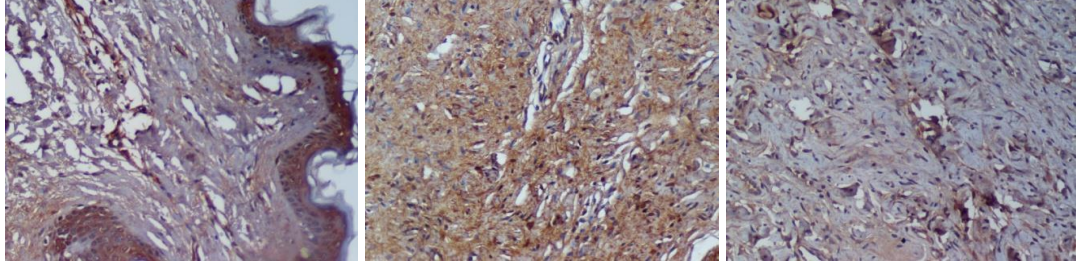
Tablo 4.3. Üç grubun FGF tümör, FGF kapiller endotel, FGF kaslı damar endoteli ve FGF kaslı damar duvarı değerlerinin karşılaştırılması.

FGF	GRUP	Med	Min	Maks	p
Tümör	NF	0	0	2	
	NF-Normal Deri				
	SB-Normal Deri				
Kapiller Endotel	NF	0	0	1	
	NF-Normal Deri	0	0	1	0.361
	SB-Normal Deri	0	0	1	
Kaslı Damar Endoteli	NF	0	0	1	
	NF-Normal Deri	0	0	0	0.834
	SB-Normal Deri	0	0	0	
Kaslı Damar Duvarı	NF	1		3	
	NF-Normal Deri	2	1	2	0.468
	SB-Normal Deri	2	2	2	

Kruskal-Wallis Test, $p<0.05$

4.2.5. Tip I Kollajen

Tip I kollajen antikoru ile boyanma sonrası nörofibromlu dokularda Kollajen Tip-1'in yaygın eksprese olduğu dikkat çekmiştir. Zaman zaman tümör hücrelerinde pozitiflik gözlenmiştir (**Resim 4.18**).



SB-Normal deri

NF-Normal deri

NF

Resim 4.18. SB-Normal deri, NF-Normal deri ve NF gruplarındaki tip I kollajen boyanma paterni.

Skor sonuçlarına uygulanan Kruskal-Wallis testi sonunda üç gruptaki bireylerin tümör stroma kollajeni değerleri ($p=0.789$) ve stromal hücre intensitesi değerleri (0-3 arasında) ($p=0.881$) arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır (**Tablo 4.4**).

Tablo 4.4. Üç grubun tümör stroma kollajeni ve stromal hücre yoğunluğu değerlerinin karşılaştırılması.

	GRUP	Med	Min	Maks	p
Tümör Stroma Kollajeni	NF	1	0	2	0.789
	NF-Normal Deri	1	1	1	
	SB-Normal Deri	1	1	1	
Stromal Hücre İntensitesi	NF	2	0	3	0.881
	NF-Normal Deri	2	1	3	
	SB-Normal Deri	2	2	2	

Kruskal-Wallis Test, $p<0.05$

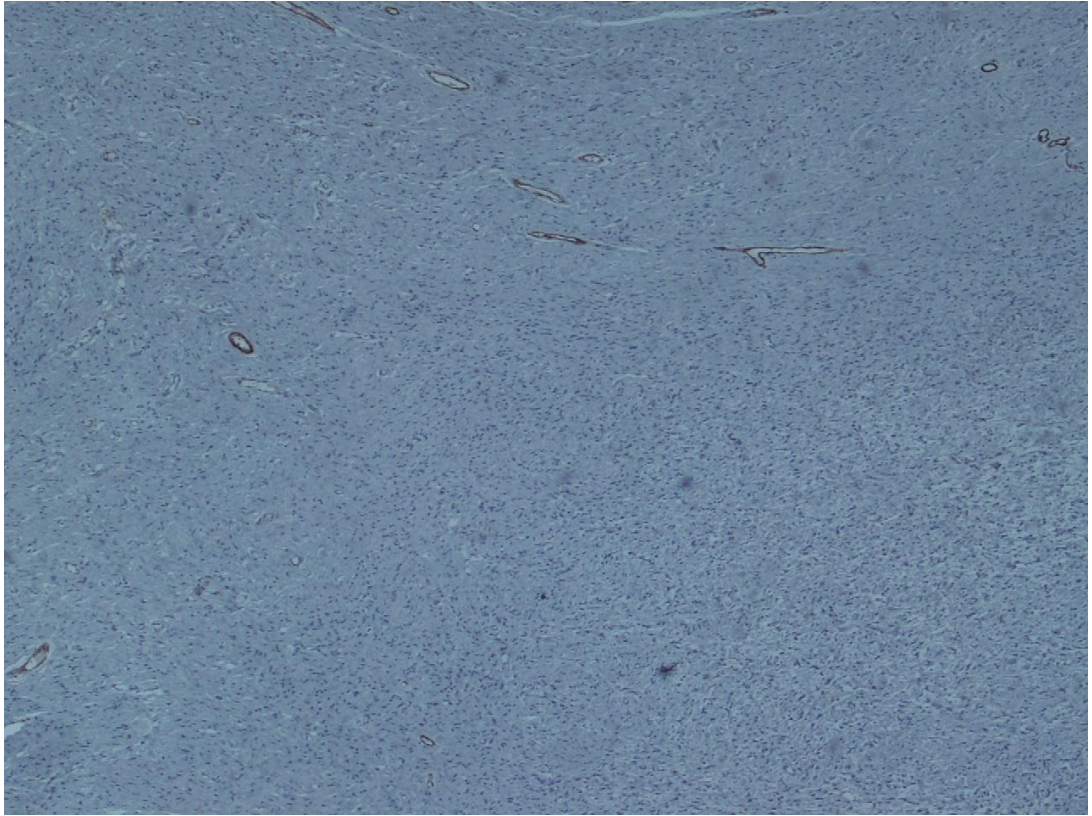
Üç grubun tümör stromal kollajen I ve stromal hücresel yoğunluk (%) değerleri **Tablo 4.5**'te gösterilmiştir.

Tablo 4.5. Üç grubun tümör stromal kollajen tip I ve stromal hücresel yoğunluk (%) değerleri.

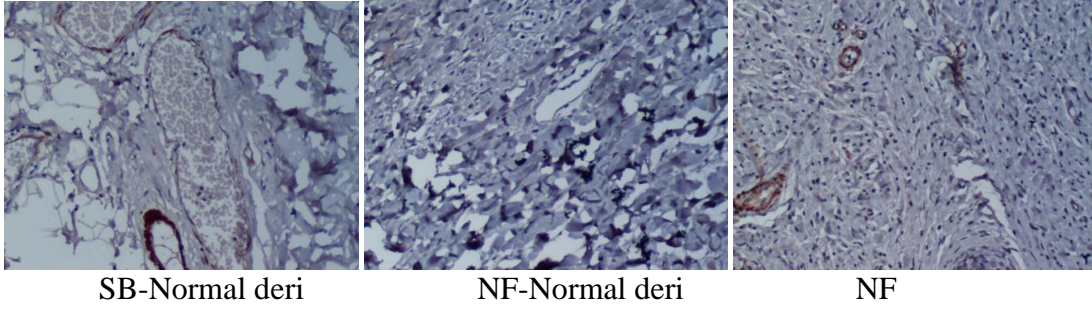
		GRUP					
		NF		NF-Normal Deri		SB-Normal Deri	
		(n)	(%)	(n)	(%)	(n)	(%)
Tümör Stromal	Yok	2	15.4	0	0	0	0
Kollajen I	Fokal	5	38.5	3	60	1	50
	Yaygın	6	46.2	2	40	1	50
Stromal Hücresel	<% 10	4	30.8	1	20	0	0
Yoğunluk	% 10-29	6	46.2	1	20	1	50
	% 30-49	1	7.7	3	60	1	50
	% 50-69	2	15.4	0	0	0	0
	>% 70	0	0	0	0	0	0

4.2.6. MHC (Myosin Heavy Chain):

Geniş cidarlı damarları gösteren MHC antikoruna kalponin benzeri pozitiflik gösterdi. Müsküler arter ve venleri demostre etti. (**Resim 4.19.** ve **Resim 4.20.**)



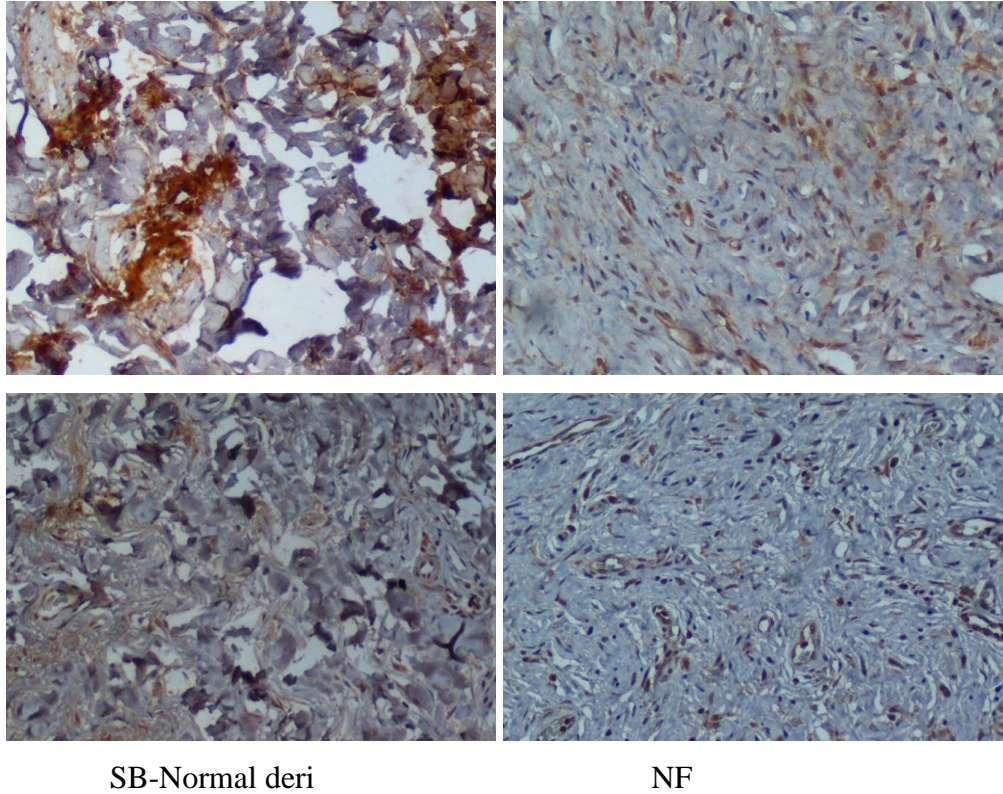
Resim 4.19. NF grubunda MHC boyanma paterni.



Resim 4.20. SB-Normal deri, NF-Normal deri ve NF gruplarındaki MHC boyanma paterni.

4.2.7. Tip III Kollajen

Tip III kollajen antikoru kullanılarak yapılan boyamada stromada hafif pozitiflik dikkati çekmiştir. Hücrelerde de yer yer pozitiflik gözlenmiş ancak gruplar arasında belirgin fark izlenmemiştir.



Resim 4.21. SB-Normal deri ve NF gruplarındaki tip III kollajen boyanma paterni.

4.3. Yara İyileşmesi Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

PCR sonuçlarına göre; NF-I lezyonu ve NF-I olgularının sağlam deri fibroblastlarında katepsin G geninin (CTSG), fibrinojen alfa zincir geninin (FGA), interferon- γ geninin (IFNG) ve IL-2 geninin (IL2) ekspresyonu sağlıklı bireylerin deri fibroblastlarına göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek saptanmıştır (**Tablo 4.6 ve Tablo 4.7**). Diğer 80 gende anlamlı sonuçlar elde edilmemiştir.

Tablo 4.6. SB-Normal deri/ NF grupları arasında PCR sonuçlarının karşılaştırılması sonrasında istatistiksel anlamlı fark çıkan genlerin tablosu

Gene Symbol	Fold Regulation	RT2 Catalog
CTSG	172,8428	PPH01358A
FGA	166,9551	PPH02623E
IFNG	5,9932	PPH00380C
IL2	19,3373	PPH00172C

Tablo 4.7. SB- Normal deri ile NF-Normal deri grupları arasında PCR sonuçlarının karşılaştırılması sonrasında istatistiksel anlamlı fark çıkan genlerin tablosu

Gene Symbol	Fold Regulation	RT2 Catalog
CTSG	94895,3795	PPH01358A
FGA	124350,2793	PPH02623E
IFNG	12625,4765	PPH00380C
IL2	48781,6259	PPH00172C

5. TARTIŞMA

5.1. Scratch Assay

NF-I 17. kromozomun uzun kolunda yerleşik NF-I geninin mutasyonu ile ilişkilidir [35, 144]. NF-I'in derideki görünümü nörofibromlar, café au lait pigmentleri ve aksiler çillenmedir [145, 146]. NF-I ile ilişkili diğer bulgular, kemik displazileri ve malign periferik sinir kılıfı tümörleri/lösemi gibi malignitelere yatkınlıktır. NF-I geni, bir tümör supresör olarak kabul edilmektedir. Çünkü, NF-I hastalarının malign tümörlerinde heterozigot kaybı [147, 148] veya genin homozigotik inaktivasyonu [149, 150] görülebilir. Ayrıca, NF-I proteini ve/veya mRNA'sının düzeyleri bazı proliferatif hastalıklarda değişkenlik göstermektedir [151-155].

İnsan derisindeki epidermal keratinositler ve dermal fibroblastların NF-I genini eksprese edebildiği gösterilmiştir [9, 153, 156, 157]. Keratinositlerde NF-I gen ekspresyonu bazal tabakada en yüksektir ve keratinositler farklılaşarak epidermin üst tabakalarına doğru hareket ettikçe NF-I gen ekspresyon düzeyinde azalma olur [153, 157]. NF-I geninin keratinositlerdeki hücre-hücre adezyon formasyonunda ve sitoskeletal yeniden düzenlemede önemli rol oynayabileceği ileri sürülmüştür [158]. NF-I geninin fare epidermisinde kimyasal karsinogenezin baskılayıcılarından biri olduğu gösterilmiştir. NF-I geni için heterozigot olan farelerde karsinogen uygulamasından sonra anormal pigmentasyon ve artmış papilloma formasyonu gözlenir [159].

NF-I geni dermal yara iyileşmesi ve skar formasyonu açısından insan ve hayvan çalışılmalarında değerlendirilmiştir. NF-I gen ekspresyonu, yara iyileşmesi sırasında etkin olan PDGF veya TGF- β gibi çeşitli büyüme faktörlerine maruz bırakılan kültüre fibroblastlarda ve skar dokusu fibroblastlarında artmaktadır [9]. NF-I geni için heterozigot olan farelerde deneysel punch biyopsi sonrasındaki derin yara iyileşmesi değerlendirilmiş ve iyileşme sürecinde defektler olduğu gösterilmiştir. Özgül olarak, NF-I susturulmuş farelerde fibroblast hiperplazisi ve artmış kollajen birikimi saptanmıştır. NF-I heterozigot fibroblastların, *in vitro* ortamda çeşitli

büyüme faktörlerine anormal düzeyde proliferasyon yanıtı gösterdiği bulunmuştur [11].

NF-I tümör supresör geni epidermal yara iyileşmesinde rol oynamaktadır. NF-I gen ekspresyonu epidermal yara iyileşmesi sırasında artmaktadır. Bir çalışmada, epidermal yara iyileşmesi sürecinin NF-I hastalarında normal düzeylerde devam ettiği ileri sürülmüştür [160]. NF-I olgularında keloid veya hipertrofik skar gelişimi gözlenmemektedir [10].

Keloidler, malign potansiyeli olmayan, benign dermal fibroproliferatif tümörlerdir [119, 121]. Keloidler, normal bir epidermal tabakaya sahiptir. Fakat normal skar dokusuna göre mezenkimal densitenin arttığı gözlenir [121, 161].

Keloid ve hipertrofik skar lezyonları, özellikle kollajen olmak üzere ekstrasellüler matriks bileşenlerinin anormal birikimi ile karakterizedir. Bu lezyonlarda, nodül biçiminde aşırı kollajen depolanması ve aşırı mikro damar yapıları gözlenmektedir. Bu damarların büyük bölümü, yüksek miktarlardaki endotel hücreleri nedeniyle kısmen veya tamamen tıkalıdır [162]. Tip I kollajen sentezinin keloid dokusunda ve hipertrofik skarlarda arttığı gösterilmiştir [163].

Çalışmamızda "Scratch assay" değerlendirmesinde üç grubun yakınlaşma yüzdeleri arasında anlamlı düzeyde fark saptanmamıştır. Sonuç olarak bulgularımız literatürde önerilen NF-I olgularında keloid veya hipertrofik skar gelişiminin gözlenmemesi bulgusunu destekler niteliktedir.

5.2. İmmunohistokimyasal analiz

Normal fibroblastlarla karşılaştırıldığında keloid ve/veya hipertrofik skardaki fibroblastların, TGF- β [164], PDGF [165], PDGFR [166], konnetif doku büyüme faktörü (CTGF) [167] ve VEGF [168] ve FGF [23] gibi biyolojik araçları yüksek düzeyde eksprese ettiği bilinmektedir. PDGFR, anjiyogenez ile ilişkili bir faktördür [23].

PDGF serum ve trombositlerde bulunan, bağ dokusu hücreleri için mitojenik ve kemotaktik olan majör bir büyüme faktörüdür [166, 169-171]. PDGF

keratinositler, fibroblastlar ve endotel hücrelerinin gelişimi ve farklılaşması üzerine önemli etkileri olan bir faktördür. Bu büyüme faktörü, aynı zamanda, kollajenaz üretimini, fibronektin ve hiyaluronik asit gibi ekstrasellüler matriks bileşenlerinin sentezini ve fibrozisi indüklemektedir [166, 172-175]. PDGF patolojik skar/keloid oluşumunda önemli bir role sahiptir [12, 13]. Normal fibroblastlarla karşılaştırıldığında keloid lezyonundaki fibroblastların PDGF'ye yanıtının artmış olduğu gözlenmiştir. Bunun nedeni, keloid fibroblastlarında düzeyi normal fibroblastlara göre artan PDGF- α reseptörüdür. Ayrıca, keloid fibroblastlarının üç PDGF izoformuna migratuar yanıtlarının da normal fibroblastlardan daha yüksek düzeyde olduğu gösterilmiştir [166].

PDGF'nin büyük bölümü trombositlerin α -granüllerinde depolanmaktadır [169]. Serumla karşılaştırıldığında, trombositten fakir plazmadaki PDGF yoğunluğu çok belirgin biçimde azalmıştır [176]. Bir çalışmada, NF'deki fibroblast benzeri hücrelerin proliferasyonunun, içindeki PDGF düzeyi düşük olan plateletten fakir plazma ile indüklendiği, serumla böyle bir etkinin oluşmadığı gözlenmiştir [177]. Sonuçlarımız NF dokusu, NF hastalarının normal derileri ve sağlıklı bireylerin deri örneklerindeki PDGFR ekspresyon düzeyleri arasında anlamlı fark olmadığını gösterdi. O zaman NF dokusunda keloid ve hipertrofik skar oluşmaması, NF hücrelerinde PDGFR ekspresyonunun sağlıklı deriden farklı olmamasına bağlanabilir.

Keloid lezyonunda asitte çözünen kollajen düzeyinin yüksek olduğu bilinmektedir [178]. Kültüre edilmiş keloid fibroblastlarında, kollajen üretiminin arttığı [14] ve keloid lezyonunda tip I prokollajen üretiminin yüksek düzeyde olduğu [15] ve bu durumun tip I prokollajen üretebilen fibroblastların aktivasyonu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir [179]. Normal yara iyileşmesinde katabolik ve anabolik aktivite arasında bir denge vardır. Keloid fibroblast kültüründe kollajen üretimi ve yıkımının değerlendirildiği bir çalışmada keloid dokusunda belli bir zaman noktasındaki tip I kollajen miktarının belirleyicisinin hem transkripsiyonel düzeyde artan üretim hem de yıkım süreçlerindeki yavaşlama olduğu bildirilmiştir [180]. Diğer bir çalışmada, keloid skarlarda normal skarlara göre hem protein hem de endoplazmik retikulum düzeylerinin arttığı saptanmıştır. Artan sentez kapasitesinin, keloid skarlarda aşırı

miktarlarda olan ekstrasellüler matrikse katkısı olduğu düşünülebilir [181]. Literatürde, sadece bir çalışmada keloid lezyonundan izole edilen fibroblastların tip I kollajen sentezinin normal miktarlarda olduğu bulunmuştur [182]. Bizim çalışmamızın sonuçları NF dokusu, NF hastalarının normal derileri ve sağlıklı bireylerin deri örneklerindeki tip I kollajen sentezinin farklı olmadığını gösterdi. Bu bulgumuz, NF dokusunda anormal fibroblast aktivitesinin göstergesi olabilecek keloid ve hipertrofik skar oluşmaması ile paralellik göstermektedir.

PDGF geninin (PDGFA) ekspresyonunun keloid dokusunda yüksek olduğu bilinmektedir [17]. Çalışmamızda, NF-I lezyonu ve NF-I olgularının sağlam deri fibroblastlarında PDGFA ekspresyonunda sağlıklı bireylerin deri fibroblastlarına göre yüksek olduğunu bulduk. Ancak, bu yükseklik istatistiksel anlamlılık düzeyine ulaşmıyordu.

FGF'ler, büyüme ve diferansiasyon süreçlerine katılan geniş bir gen ailesinin ürünlerini kapsamaktadır. FGF'nin çeşitli doku ve organların gelişmesi, metabolizması ve tamiri gibi süreçlerde önemli rol oynadığı gösterilmiştir. İnsan FGF ailesinin 22 üyesi vardır. İnsan FGF-1, bu süper ailenin en çok çalışılan ve en iyi biçimde karakterize edilmiş üyesidir. FGF-1 çeşitli biyolojik işlevlere sahiptir ve morfogenezin, doku tamirinin, anjiyogenezin ve yara iyileşmesinin çeşitli karmaşık aşamaları ile ilişkilidir [183, 184].

FGF-1, özellikle ekstrasellüler matriks olmak üzere çeşitli doku kompartmanlarında bulunmaktadır. Rekombinant DNA teknolojisi ile FGF üretilmektedir [185-188]. Çeşitli çalışmalarda, doğrudan hayvanlara veya insan yara bölgesine uygulanan FGF-1'in yara iyileşmesi ve doku rejenerasyonu üzerine etkileri değerlendirilmiştir [189, 190]. FGF-1, diğer FGF'lere göre düşük stabiliteye sahiptir ve proteazlar tarafından daha kolay yıkılmaktadır [183, 184].

FGF'nin keloid fibroblastlarda kollajen ekspresyonunu azalttığı gösterilmiştir [16]. FGF, insan düz kas hücresindeki kollajen ve kollajenaz aktivitesinin düzenlenmesini pretranslasyonel düzeyde gerçekleştirmektedir. FGF, tip I kollajen

gen ekspresyonu ve biyosentezini inhibe ederken kollajenaz gen ekspresyonunu arttırmaktadır [191].

NF hücreleri ile normal fibroblast hücreleri üzerine FGF etkisinin değerlendirildiği bir çalışmada, FGF'nin kültüre edilen normal fibroblastların önemli sayıda koloni oluşmasına neden olduğu, NF hücrelerinde ise böyle bir etkisinin olmadığı gözlenmiştir [192].

Çalışma sonuçlarımıza göre NF dokusu, NF hastalarının normal derileri ve sağlıklı bireylerin deri örneklerindeki FGF ekspresyon düzeyleri arasında anlamlı fark yoktu. Bu sonuç, NF dokusunda keloid ve hipertrofik skar oluşmaması durumunun açıklanmasına yardımcı olmaktadır.

FGF anjiyogenez ile ilişkili bir faktördür [23]. FGF; hücre proliferasyonu ve göçünü ve endotel hücrelerinin kan damarı yapılarına dönüştüren fiziksel organizasyon sürecini indüklemektedir [24]. Biz, NF dokusu, NF hastalarının normal derileri ve sağlıklı bireylerin deri örneklerindeki FGF ekspresyon düzeyleri arasında anlamlı fark bulmadık. Bu sonuç, NF dokusunda anjiyogenez sürecinin normal sınırlarda devam ettiğinin göstergesi olabilir.

VEGF anjiyogeneizde etkin bir faktördür [25]. Bizim sonuçlarımız, NF dokusu, NF hastalarının normal derileri ve sağlıklı bireylerin deri örneklerindeki VEGF ekspresyon düzeyleri arasında anlamlı fark olmadığını gösterdi. Bu, anjiyogenezle ilişkili FGF geni ile ilgili sonuçlarımızla paralellik göstermektedir.

Bir çalışmada, anormal skar kökenli fibroblastlarda tip I kollajen alfa-1 (COL1A1) ve alfa-2 (COL1A2) düzeylerinin normal derideki fibroblastlardan yüksek olduğu, matriks metalloproteinaz (MMP)-1 düzeylerinin normal deriden daha düşük olduğu saptanmıştır [18]. Nörofibroma dokusunda tip III kollajen miktarının yüksek olduğuna dair kanıtlar vardır [193]. Çalışmamızın sonuçları, NF tümör dokusundaki fibroblastlarda COL1A1 ve COL1A2 ekspresyonunun normal deriden yüksek ve MMP-1 düzeylerinin normal deriden daha düşük olduğunu; ancak bu farkların anlamlı olmadığını gösterdi. Bu durum, NF-I'de anormal fibroblastik

aktivitede artış olabileceğini ancak, bu aktivite artışının keloid veya hipertrofik skar dokusu oluşumuna neden olabilecek düzeylere ulaşmadığını düşündürmektedir. Literatürde çalışmamızın sonuçlarına paralel sonuçları olan, nörofibroma fibroblastlarında kollajen üretim miktarının normal sınırlarda olduğunu gösteren bir çalışma da vardır [8].

5.3. PCR gen analizi

Literatürde, NF-I'de tümör dokusunda interferon- γ geninin (IFNG) araştırıldığı bir çalışma ile karşılaşmamıştır. NF-I tanısı konan bir olguda, hastanın lenfositlerindeki interferon- γ ekspresyonunun normal sınırlarda olduğu belirlenmiştir [194]. IFN- γ , fibrotik bozukluklar için bir terapötik ajan olarak düşünülmektedir. IFN- γ , keloid oluşumu sırasında TGF- β tarafından indüklenen tip I kollajen üretimini inhibe edememektedir [19]. Ayrıca, keloid olgularının periferal kanında IFN- γ üretiminin belirgin biçimde baskılandığı bildirilmiştir [195]. Hipertrofik skar dokularının değerlendirildiği bir çalışmada, IFN- γ boyanmasının kontrollerden farklı olmadığı bulunmuştur [196]. Sonuçlarımıza göre, NF lezyonu ve NF olgularının sağlam deri fibroblastlarında IFN- γ ekspresyonu sağlıklı bireylerin deri fibroblastlarından daha yüksekti. Bu durum, NF-I olgularında dermofibrotik durumların ortaya çıkmamasını açıklayabilir.

TGF- β , keloid oluşumu sırasında tip I kollajen üretimini indüklemektedir [19]. Biz, NF-I lezyonu ve NF-I olgularının sağlam deri fibroblastlarında TGF- β ekspresyonunda sağlıklı bireylerin deri fibroblastlarına göre artış saptadık. Ancak, bu artış istatistiksel olarak anlamlı düzeyde değildi.

Literatürde, NF-I'de IL-2 geninin (IL2) değerlendirildiği çalışmaya rastlanmamıştır. Keloid olgularının periferal kanında IL-2 üretiminin kontrollerden farklı olmadığı bulunmuştur [195]. Hipertrofik skar veya keloid olgularında da, sistemik bir yanıt olarak IL-2 ve IL-6 düzeylerinin arttığına dair kanıtlar vardır [20, 21]. Biz, NF lezyonu ve NF olgularının sağlam deri fibroblastlarındaki IL-2 ve IL-6 ekspresyonunun sağlıklı bireylerin deri fibroblastlarına göre yüksek olduğunu bulduk.

Literatürde, NF-I'deki tümör dokusunda katepsin G geninin (CTSG) ve bu genin NF-1'deki kanama artışı ile ilişkisinin değerlendirildiği bir çalışma ile karşılaşmamıştır. Katepsin G'nin platelet trombus oluşumunu bozarak gerçekleştirdiği antitrombotik bir etkisi vardır [26]. Biz, NF-I lezyonu ve NF-I olgularının sağlam deri fibroblastlarında CTSG ekspresyonunda sağlıklı bireylerin deri fibroblastlarına göre artış saptadık. Bu bulgumuz, NF-1 olgularındaki kanama artışının CTSG geninin de dahil olduğu bir süreç ile aktive olduğunu düşündürmektedir.

Literatürde, NF-I'de tümör dokusunda fibrinojen alfa zincir geninin (FGA) ve bu genin NF-1'deki kanama ile ilişkisinin araştırıldığı bir çalışma ile karşılaşmamıştır. Fibrinojen alfa zincir geni (FGA), hepatositlerde fibrinojen ekspresyonu ile ilişkilidir [27]. Bir çalışmada, FGA delesyonunun afibrinojenemi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir [28]. Sonuçlarımız, NF lezyonu ve NF olgularının sağlam deri fibroblastlarında FGA ekspresyonunun sağlıklı bireylerin deri fibroblastlarından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha yüksek olduğunu gösterdi. Bu sonuç, NF-1'de, fibrinojen üretimi ile ilişkili FGA geninin ekspresyonunun yüksek olmasının kanama üzerine olumlu etkilerinin olmadığını akla getirmektedir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

- "Scratch assay" sonuçlarımız, üç grubun 5., 15. ve 30. saatteki yaklaşma yüzdelерinin farklı olmadığını gösterdi.
- İmmünohistokimyasal değerlendirme sonuçları;
Üç grubun; PDGFR, FGF ve tip I kollajen boyanmalarının benzer olduğunu gösterdi.
- PCR sonuçlarına göre;
 - NF-I lezyonu ve NF-I olgularının sağlam deri fibroblastlarında antitrombotik etkisi olduğu bilenen katepsin G geninin (CTSG) ve fibrinojen üretimini artıran fibrinojen alfa zincir geninin (FGA) ekspresyonu sağlıklı bireylerin deri fibroblastlarına göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksekti.
 - İnterferon- γ geninin (IFNG) ve IL-2 geninin (IL2) ekspresyonu sağlıklı bireylerin deri fibroblastlarına göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksekti.
 - NF tümör dokusundaki fibroblastlarda COL1A1 ve COL1A2 ekspresyonunun normal deriden yüksek ve MMP-1 düzeylerinin normal deriden daha düşük olduğunu; ancak bu farkların anlamlı olmadığını gösterdi.
 - Üç grubun VEGF ekspresyonları arasında anlamlı fark yoktu.

Sonuçlarımız, NF-I'de anormal fibroblastik aktivitede artış olabileceğini ancak, bu aktivite artışının keloid veya hipertrofik skar dokusu gibi skar dokusu anormalliklerine neden olabilecek düzeylere ulaşmadığını düşündürmektedir. Ayrıca, NF-1'de kanamaya yatkınlığı artıran süreçlerin patolojik anjiyogenez ve trombotik aktivitedeki bozulmalarla ilişkili olabileceğini düşündürmüştür.

Çalışmamızın küçük boyutlu bir örnekleme sahip olması nedeniyle sonuçlarımızın dikkatli yorumlanması önemlidir. Ancak çalışmamızın, daha sonraki çalışmalarda öncelikli olarak değerlendirilmesi gereken parametrelere katkı sağladığı söylenebilir.

7. KAYNAKLAR

1. Cecen, E., Ince, D., Uysal, K.M., Ozer, E., Cetingoz, R., Ozguven, A.A., Cakmakci, H., Sarialioglu, F., and Olgun, N., Soft tissue sarcomas and central nervous system tumors in children with neurofibromatosis type 1. *Childs Nerv Syst*, 2011. 27(11): p. 1885-93.
2. Ars, E., Kruyer, H., Gaona, A., Casquero, P., Rosell, J., Volpini, V., Serra, E., Lazaro, C., and Estivill, X., A clinical variant of neurofibromatosis type 1: familial spinal neurofibromatosis with a frameshift mutation in the NF-I gene. *Am J Hum Genet*, 1998. 62(4): p. 834-41.
3. Messiaen, L., Vogt, J., Bengesser, K., Fu, C., Mikhail, F., Serra, E., Garcia-Linares, C., Cooper, D.N., Lazaro, C., and Kehrer-Sawatzki, H., Mosaic type-1 NF-I microdeletions as a cause of both generalized and segmental neurofibromatosis type-1 (NF-I). *Hum Mutat*, 2011. 32(2): p. 213-9.
4. Jentoft, M., Giannini, C., Cen, L., Scheithauer, B.W., Hoesley, B., Sarkaria, J.N., Abell-Aleff, P.C., Rodriguez, E.F., Li, Y., and Rodriguez, F.J., Phenotypic variations in NF-I-associated low grade astrocytomas: possible role for increased mTOR activation in a subset. *Int J Clin Exp Pathol*, 2010. 4(1): p. 43-57.
5. Kaufmann, D., Muller, R., Bartelt, B., Wolf, M., Kunzi-Rapp, K., Hanemann, C.O., Fahsold, R., Hein, C., Vogel, W., and Assum, G., Spinal neurofibromatosis without cafe-au-lait macules in two families with null mutations of the NF-I gene. *Am J Hum Genet*, 2001. 69(6): p. 1395-400.
6. Uitto, J., Matsuoka, L.Y., Chu, M.L., Pihlajaniemi, T., and Prockop, D.J., Connective tissue biochemistry of neurofibromas. *Ann N Y Acad Sci*, 1986. 486: p. 271-86.
7. Peltonen, J., Marttala, T., Vihersaari, T., Renvall, S., and Penttinen, R., Collagen synthesis in cells cultured from v. Recklinghausen's neurofibromatosis. *Acta Neuropathol*, 1981. 55(3): p. 183-7.
8. Sasaki, T., Arai, K., and Nagai, Y., Growth and collagen synthesis of cultured neurofibroma fibroblasts. *J Dermatol*, 1992. 19(10): p. 598-601.
9. Yla-Outinen, H., Aaltonen, V., Bjorkstrand, A.S., Hirvonen, O., Lakkakorpi, J., Vaha-Kreula, M., Laato, M., and Peltonen, J., Upregulation of tumor suppressor protein neurofibromin in normal human wound healing and in

- vitro evidence for platelet derived growth factor (PDGF) and transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) elicited increase in neurofibromin mRNA steady-state levels in dermal fibroblasts. *J Invest Dermatol*, 1998. 110(3): p. 232-7.
10. Ademiluyi, S.A., Sowemimo, G.O., and Oyeneyin, J.O., Surgical experience in the management of multiple neurofibromatosis in Nigerians. *West Afr J Med*, 1989. 8(1): p. 59-65.
 11. Atit, R.P., Crowe, M.J., Greenhalgh, D.G., Wenstrup, R.J., and Ratner, N., The NF-I tumor suppressor regulates mouse skin wound healing, fibroblast proliferation, and collagen deposited by fibroblasts. *J Invest Dermatol*, 1999. 112(6): p. 835-42.
 12. Hunasgi, S., Koneru, A., Vanishree, M., and Shamala, R., Keloid: A case report and review of pathophysiology and differences between keloid and hypertrophic scars. *J Oral Maxillofac Pathol*, 2013. 17(1): p. 116-20.
 13. Mofikoya, B.O., Adeyemo, W.L., and Ugburo, A.O., An overview of biological basis of pathologic scarring. *Niger Postgrad Med J*, 2012. 19(1): p. 40-5.
 14. Fujiwara, M., Muragaki, Y., and Ooshima, A., Keloid-derived fibroblasts show increased secretion of factors involved in collagen turnover and depend on matrix metalloproteinase for migration. *Br J Dermatol*, 2005. 153(2): p. 295-300.
 15. Uitto, J., Perejda, A.J., Abergel, R.P., Chu, M.L., and Ramirez, F., Altered steady-state ratio of type I/III procollagen mRNAs correlates with selectively increased type I procollagen biosynthesis in cultured keloid fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1985. 82(17): p. 5935-9.
 16. Tan, E.M., Rouda, S., Greenbaum, S.S., Moore, J.H., Jr., Fox, J.W.t., and Sollberg, S., Acidic and basic fibroblast growth factors down-regulate collagen gene expression in keloid fibroblasts. *Am J Pathol*, 1993. 142(2): p. 463-70.
 17. Xiaoxue, W., Xi, C., and Zhibo, X., Effects of botulinum toxin type A on expression of genes in keloid fibroblasts. *Aesthet Surg J*, 2014. 34(1): p. 154-9.

18. McFarland, K.L., Glaser, K., Hahn, J.M., Boyce, S.T., and Supp, D.M., Culture medium and cell density impact gene expression in normal skin and abnormal scar-derived fibroblasts. *J Burn Care Res*, 2011. 32(4): p. 498-508.
19. Hasegawa, T., Nakao, A., Sumiyoshi, K., Tsuboi, R., and Ogawa, H., IFN-gamma fails to antagonize fibrotic effect of TGF-beta on keloid-derived dermal fibroblasts. *J Dermatol Sci*, 2003. 32(1): p. 19-24.
20. Armour, A., Scott, P.G., and Tredget, E.E., Cellular and molecular pathology of HTS: basis for treatment. *Wound Repair Regen*, 2007. 15 Suppl 1: p. S6-17.
21. Ghazizadeh, M., Tosa, M., Shimizu, H., Hyakusoku, H., and Kawanami, O., Functional implications of the IL-6 signaling pathway in keloid pathogenesis. *J Invest Dermatol*, 2007. 127(1): p. 98-105.
22. Konno, E. and Kishi, K., Use of the LigaSure vessel sealing system in neurofibroma excision to control postoperative bleeding. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*, 2012. 65(6): p. 814-7.
23. Jiang, D.Y., Fu, X.B., Chen, W., and Sun, T.Z., [Relationship of overexpression of angiogenesis factors and their receptors with invasive growth of keloid]. *Zhonghua Zheng Xing Wai Ke Za Zhi*, 2004. 20(2): p. 128-31.
24. Caron, A., Michelet, S., Sordello, S., Ivanov, M.A., Delaere, P., Branellec, D., Schwartz, B., and Emmanuel, F., Human FGF-1 gene transfer promotes the formation of collateral vessels and arterioles in ischemic muscles of hypercholesterolemic hamsters. *J Gene Med*, 2004. 6(9): p. 1033-45.
25. Fantozzi, A., Gruber, D.C., Pisarsky, L., Heck, C., Kunita, A., Yilmaz, M., Meyer-Schaller, N., Cornille, K., Hopfer, U., Bentires-Alj, M., and Christofori, G., VEGF-mediated angiogenesis links EMT-induced cancer stemness to tumor initiation. *Cancer Res*, 2014. 74(5): p. 1566-75.
26. Faraday, N., Schunke, K., Saleem, S., Fu, J., Wang, B., Zhang, J., Morrell, C., and Dore, S., Cathepsin G-dependent modulation of platelet thrombus formation in vivo by blood neutrophils. *PLoS One*, 2013. 8(8): p. e71447.
27. Fish, R.J. and Neerman-Arbez, M., Fibrinogen gene regulation. *Thromb Haemost*, 2012. 108(3): p. 419-26.

28. Stroka, D., Keogh, A., Vu, D., Fort, A., Stoffel, M.H., Kuhni-Boghenbor, K., Furer, C., Banz, V., Demarmels Biasiutti, F., Lammle, B., Candinas, D., and Neerman-Arbez, M., In vitro rescue of FGA deletion by lentiviral transduction of an afibrinogenemic patient's hepatocytes. *J Thromb Haemost*, 2014. 12(11): p. 1874-9.
29. Zanca, A., Antique illustrations of neurofibromatosis. *Int J Dermatol*, 1980. 19(1): p. 55-8.
30. von Recklinghausen, F.D. U"ber die Multiplen Fibrome der Haut und Ihre Beziehung zu den Multiplen Neuromen. 1882, Berlin: Hirschwald, A.
31. National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement, in Neurofibromatosis, A. Neurol, Editor. 1988: Chicago. p. 575-8.
32. Viskochil, D., Buchberg, A.M., Xu, G., Cawthon, R.M., Stevens, J., Wolff, R.K., Culver, M., Carey, J.C., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., and et al., Deletions and a translocation interrupt a cloned gene at the neurofibromatosis type 1 locus. *Cell*, 1990. 62(1): p. 187-92.
33. Wallace, M.R., Marchuk, D.A., Andersen, L.B., Letcher, R., Odeh, H.M., Saulino, A.M., Fountain, J.W., Brereton, A., Nicholson, J., Mitchell, A.L., and et al., Type 1 neurofibromatosis gene: identification of a large transcript disrupted in three NF-I patients. *Science*, 1990. 249(4965): p. 181-6.
34. Xu, G.F., O'Connell, P., Viskochil, D., Cawthon, R., Robertson, M., Culver, M., Dunn, D., Stevens, J., Gesteland, R., White, R., and et al., The neurofibromatosis type 1 gene encodes a protein related to GAP. *Cell*, 1990. 62(3): p. 599-608.
35. Gutmann, D.H., Wood, D.L., and Collins, F.S., Identification of the neurofibromatosis type 1 gene product. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991. 88(21): p. 9658-62.
36. Daston, M.M., Scrable, H., Nordlund, M., Sturbaum, A.K., Nissen, L.M., and Ratner, N., The protein product of the neurofibromatosis type 1 gene is expressed at highest abundance in neurons, Schwann cells, and oligodendrocytes. *Neuron*, 1992. 8(3): p. 415-28.
37. Huson, S.M., Compston, D.A., and Harper, P.S., A genetic study of von Recklinghausen neurofibromatosis in south east Wales. II. Guidelines for genetic counselling. *J Med Genet*, 1989. 26(11): p. 712-21.

38. Ruggieri, M. and Huson, S.M., The clinical and diagnostic implications of mosaicism in the neurofibromatoses. *Neurology*, 2001. 56(11): p. 1433-43.
39. Huson, S.M., Harper, P.S., and Compston, D.A., Von Recklinghausen neurofibromatosis. A clinical and population study in south-east Wales. *Brain*, 1988. 111 (Pt 6): p. 1355-81.
40. Korf, B.R., Diagnostic outcome in children with multiple cafe au lait spots. *Pediatrics*, 1992. 90(6): p. 924-7.
41. Ferner, R.E., Huson, S.M., Thomas, N., Moss, C., Willshaw, H., Evans, D.G., Upadhyaya, M., Towers, R., Gleeson, M., Steiger, C., and Kirby, A., Guidelines for the diagnosis and management of individuals with neurofibromatosis 1. *J Med Genet*, 2007. 44(2): p. 81-8.
42. DiPaolo, D.P., Zimmerman, R.A., Rorke, L.B., Zackai, E.H., Bilaniuk, L.T., and Yachnis, A.T., Neurofibromatosis type 1: pathologic substrate of high-signal-intensity foci in the brain. *Radiology*, 1995. 195(3): p. 721-4.
43. Bognanno, J.R., Edwards, M.K., Lee, T.A., Dunn, D.W., Roos, K.L., and Klatte, E.C., Cranial imaging in neurofibromatosis. *Am J Radiol*, 1988. 151: p. 381-388.
44. Ferner, R.E., Chaudhuri, R., Bingham, J., Cox, T., and Hughes, R.A., MRI in neurofibromatosis 1. The nature and evolution of increased intensity T2 weighted lesions and their relationship to intellectual impairment. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 1993. 56(5): p. 492-5.
45. North, K., Joy, P., Yuille, D., Cocks, N., Mobbs, E., Hutchins, P., McHugh, K., and deSilva, M., Specific learning disability in children with neurofibromatosis type 1: significance of MRI abnormalities. *Neurology*, 1997. 44: p. 878-83.
46. DeBella, K., Poskitt, K., Szudek, J., and Friedman, J.M., Use of "unidentified bright objects" on MRI for diagnosis of neurofibromatosis 1 in children. *Neurology*, 2000. 54(8): p. 1646-51.
47. Korf, B.R. and Huson, S.M., The Phakamatoses, in *Principles and Practice of Medical Genetics*, D. Rimoin, et al., Editors. 2006, Churchill Livingstone: Edinburgh. p. 2817-50.
48. Bandipalliam, P., Syndrome of early onset colon cancers, hematologic malignancies & features of neurofibromatosis in HNPCC families with

- homozygous mismatch repair gene mutations. *Fam Cancer*, 2005. 4(4): p. 323-33.
49. De Luca, A., Bottillo, I., Sarkozy, A., Carta, C., Neri, C., Bellacchio, E., Schirinzi, A., Conti, E., Zampino, G., Battaglia, A., Majore, S., Rinaldi, M.M., Carella, M., Marino, B., Pizzuti, A., Digilio, M.C., Tartaglia, M., and Dallapiccola, B., NF-I gene mutations represent the major molecular event underlying neurofibromatosis-Noonan syndrome. *Am J Hum Genet*, 2005. 77(6): p. 1092-101.
 50. Evans, D.G., Moran, A., King, A., Saeed, S., Gurusinghe, N., and Ramsden, R., Incidence of vestibular schwannoma and neurofibromatosis 2 in the North West of England over a 10-year period: higher incidence than previously thought. *Otol Neurotol*, 2005. 26(1): p. 93-7.
 51. Trofatter, J.A., MacCollin, M.M., Rutter, J.L., Murrell, J.R., Duyao, M.P., Parry, D.M., Eldridge, R., Kley, N., Menon, A.G., Pulaski, K., and et al., A novel moesin-, ezrin-, radixin-like gene is a candidate for the neurofibromatosis 2 tumor suppressor. *Cell*, 1993. 75(4): p. 826.
 52. Evans, D.G., Huson, S.M., Donnai, D., Neary, W., Blair, V., Newton, V., and Harris, R., A clinical study of type 2 neurofibromatosis. *Q J Med*, 1992. 84(304): p. 603-18.
 53. MacCollin, M., Chiocca, E.A., Evans, D.G., Friedman, J.M., Horvitz, R., Jaramillo, D., Lev, M., Mautner, V.F., Niimura, M., Plotkin, S.R., Sang, C.N., Stemmer-Rachamimov, A., and Roach, E.S., Diagnostic criteria for schwannomatosis. *Neurology*, 2005. 64(11): p. 1838-45.
 54. Cambiaghi, S., Restano, L., and Caputo, R., Juvenile xanthogranuloma associated with neurofibromatosis 1: 14 patients without evidence of hematologic malignancies. *Pediatr Dermatol*, 2004. 21(2): p. 97-101.
 55. Korf, B.R., Plexiform neurofibromas. *Am J Med Genet*, 1999. 89(1): p. 31-7.
 56. Packer, R.J., Gutmann, D.H., Rubenstein, A., Viskochil, D., Zimmerman, R.A., Vezina, G., Small, J., and Korf, B., Plexiform neurofibromas in NF-I: toward biologic-based therapy. *Neurology*, 2002. 58(10): p. 1461-70.
 57. Evans, D.G., Baser, M.E., McGaughan, J., Sharif, S., Howard, E., and Moran, A., Malignant peripheral nerve sheath tumours in neurofibromatosis 1. *J Med Genet*, 2002. 39(5): p. 311-4.

58. Ferner, R.E. and Gutmann, D.H., International consensus statement on malignant peripheral nerve sheath tumors in neurofibromatosis. *Cancer Res*, 2002. 62(5): p. 1573-7.
59. Sharif, S., Ferner, R., Birch, J.M., Gillespie, J.E., Gattamaneni, H.R., Baser, M.E., and Evans, D.G., Second primary tumors in neurofibromatosis 1 patients treated for optic glioma: substantial risks after radiotherapy. *J Clin Oncol*, 2006. 24(16): p. 2570-5.
60. De Raedt, T., Brems, H., Wolkenstein, P., Vidaud, D., Pilotti, S., Perrone, F., Mautner, V., Frahm, S., Sciot, R., and Legius, E., Elevated risk for MPNST in NF-I microdeletion patients. *Am J Hum Genet*, 2003. 72(5): p. 1288-92.
61. Khosrotehrani, K., Bastuji-Garin, S., Riccardi, V.M., Birch, P., Friedman, J.M., and Wolkenstein, P., Subcutaneous neurofibromas are associated with mortality in neurofibromatosis 1: a cohort study of 703 patients. *Am J Med Genet A*, 2005. 132A(1): p. 49-53.
62. Ferner, R.E., Hughes, R.A., Hall, S.M., Upadhyaya, M., and Johnson, M.R., Neurofibromatous neuropathy in neurofibromatosis 1 (NF-I). *J Med Genet*, 2004. 41(11): p. 837-41.
63. Ferner, R.E., Lucas, J.D., O'Doherty, M.J., Hughes, R.A., Smith, M.A., Cronin, B.F., and Bingham, J., Evaluation of (18)fluorodeoxyglucose positron emission tomography ((18)FDG PET) in the detection of malignant peripheral nerve sheath tumours arising from within plexiform neurofibromas in neurofibromatosis 1. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2000. 68(3): p. 353-7.
64. De, S., L., Sciot, R., and Legius, E., Multifocal glomus tumours of the fingers in two patients with neurofibromatosis type 1. *J Med Genet*, 2002. 39: p. e45.
65. Creange, A., Zeller, J., Rostaing-Rigattieri, S., Brugieres, P., Degos, J.D., Revuz, J., and Wolkenstein, P., Neurological complications of neurofibromatosis type 1 in adulthood. *Brain*, 1999. 122 (Pt 3): p. 473-81.
66. Vivarelli, R., Grosso, S., Calabrese, F., Farnetani, M., Di Bartolo, R., Morgese, G., and Balestri, P., Epilepsy in neurofibromatosis 1. *J Child Neurol*, 2003. 18(5): p. 338-42.
67. Friedman, J.M., Arbiser, J., Epstein, J.A., Gutmann, D.H., Huot, S.J., Lin, A.E., McManus, B., and Korf, B.R., Cardiovascular disease in

- neurofibromatosis 1: a report of the NF-I Cardiovascular Task Force. *Genet Med*, 2003. 4: p. 105-111.
68. Ferner, R.E., Hughes, R.A., and Weinman, J., Intellectual impairment in neurofibromatosis 1. *J Neurol Sci*, 1996. 138(1-2): p. 125-33.
 69. Ferner, R.E., Hughes, R.A., and Johnson, M.R., Neurofibromatosis 1 and multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 1995. 58(5): p. 582-5.
 70. North, K.N., Riccardi, V., Samango-Sprouse, C., Ferner, R., Moore, B., Legius, E., Ratner, N., and Denckla, M.B., Cognitive function and academic performance in neurofibromatosis. 1: consensus statement from the NF-I Cognitive Disorders Task Force. *Neurology*, 1997. 48(4): p. 1121-7.
 71. Ozonoff, S., Cognitive impairment in neurofibromatosis type 1. *Am J Med Genet*, 1999. 89(1): p. 45-52.
 72. Hyman, S.L., Shores, A., and North, K.N., The nature and frequency of cognitive deficits in children with neurofibromatosis type 1. *Neurology*, 2005. 65(7): p. 1037-44.
 73. Johnson, H., Wiggs, L., Stores, G., and Huson, S.M., Psychological disturbance and sleep disorders in children with neurofibromatosis type 1. *Dev Med Child Neurol*, 2005. 47(4): p. 237-42.
 74. Mautner, V.F., Kluwe, L., Thakker, S.D., and Lark, R.A., Treatment of ADHD in neurofibromatosis type 1. *Dev Med Child Neurol*, 2002. 44(3): p. 164-70.
 75. Li, W., Cui, Y., Kushner, S.A., Brown, R.A., Jentsch, J.D., Frankland, P.W., Cannon, T.D., and Silva, A.J., The HMG-CoA reductase inhibitor lovastatin reverses the learning and attention deficits in a mouse model of neurofibromatosis type 1. *Curr Biol*, 2005. 15(21): p. 1961-7.
 76. Pollack, I.F. and Mulvihill, J.J., Special issues in the management of gliomas in children with neurofibromatosis 1. *J Neurooncol*, 1996. 28(2-3): p. 257-68.
 77. Listernick, R., Louis, D.N., Packer, R.J., and Gutmann, D.H., Optic pathway gliomas in children with neurofibromatosis 1: consensus statement from the NF-I Optic Pathway Glioma Task Force. *Ann Neurol*, 1997. 41(2): p. 143-9.
 78. Listernick, R., Ferner, R.E., Piersall, L., Sharif, S., Gutmann, D.H., and Charrow, J., Late-onset optic pathway tumors in children with neurofibromatosis 1. *Neurology*, 2004. 63(10): p. 1944-6.

79. Bajenaru, M.L., Garbow, J.R., Perry, A., Hernandez, M.R., and Gutmann, D.H., Natural history of neurofibromatosis 1-associated optic nerve glioma in mice. *Ann Neurol*, 2005. 57(1): p. 119-27.
80. Packer, R.J., Ater, J., Allen, J., Phillips, P., Geyer, R., Nicholson, H.S., Jakacki, R., Kurczynski, E., Needle, M., Finlay, J., Reaman, G., and Boyett, J.M., Carboplatin and vincristine chemotherapy for children with newly diagnosed progressive low-grade gliomas. *J Neurosurg*, 1997. 86(5): p. 747-54.
81. Dasgupta, B., Yi, Y., Chen, D.Y., Weber, J.D., and Gutmann, D.H., Proteomic analysis reveals hyperactivation of the mammalian target of rapamycin pathway in neurofibromatosis 1-associated human and mouse brain tumors. *Cancer Res*, 2005. 65(7): p. 2755-60.
82. Lammert, M., Kappler, M., Mautner, V.F., Lammert, K., Storkel, S., Friedman, J.M., and Atkins, D., Decreased bone mineral density in patients with neurofibromatosis 1. *Osteoporos Int*, 2005. 16(9): p. 1161-6.
83. Crawford, A.H., Jr. and Bagamery, N., Osseous manifestations of neurofibromatosis in childhood. *J Pediatr Orthop*, 1986. 6(1): p. 72-88.
84. Booth, C., Preston, R., Clark, G., and Reidy, J., Management of renal vascular disease in neurofibromatosis type 1 and the role of percutaneous transluminal angioplasty. *Nephrol Dial Transplant*, 2002. 17(7): p. 1235-40.
85. Bausch, B., Borozdin, W., and Neumann, H.P., Clinical and genetic characteristics of patients with neurofibromatosis type 1 and pheochromocytoma. *N Engl J Med*, 2006. 354(25): p. 2729-31.
86. Hough, D.R., Chan, A., and Davidson, H., Von Recklinghausen's disease associated with gastrointestinal carcinoid tumors. *Cancer*, 1983. 51(12): p. 2206-8.
87. Miettinen, M., Fetsch, J.F., Sobin, L.H., and Lasota, J., Gastrointestinal stromal tumors in patients with neurofibromatosis 1: a clinicopathologic and molecular genetic study of 45 cases. *Am J Surg Pathol*, 2006. 30(1): p. 90-6.
88. Wolkenstein, P., Zeller, J., Revuz, J., Ecosse, E., and Leplege, A., Quality-of-life impairment in neurofibromatosis type 1: a cross-sectional study of 128 cases. *Arch Dermatol*, 2001. 137(11): p. 1421-5.

89. McLaughlin, M.E. and Jacks, T., Progesterone receptor expression in neurofibromas. *Cancer Res*, 2003. 63(4): p. 752-5.
90. Lammert, M., Mautner, V.F., and Kluwe, L., Do hormonal contraceptives stimulate growth of neurofibromas? A survey on 59 NF-I patients. *BMC Cancer*, 2005. 5: p. 16.
91. Segal, D., Holcberg, G., Sapir, O., Sheiner, E., Mazor, M., and Katz, M., Neurofibromatosis in pregnancy. Maternal and perinatal outcome. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 1999. 84(1): p. 59-61.
92. Dugoff, L. and Sujansky, E., Neurofibromatosis type 1 and pregnancy. *Am J Med Genet*, 1996. 66(1): p. 7-10.
93. Griffiths, S., Sharp, R., Foote, T.N., Bertin, I., Wanous, M., Reader, S., Colas, I., and Moore, G., Molecular characterization of Ph1 as a major chromosome pairing locus in polyploid wheat. *Nature*, 2006. 439(7077): p. 749-52.
94. Messiaen, L.M., Callens, T., Mortier, G., Beysen, D., Vandenbroucke, I., Van Roy, N., Speleman, F., and Paepe, A.D., Exhaustive mutation analysis of the NF-I gene allows identification of 95% of mutations and reveals a high frequency of unusual splicing defects. *Hum Mutat*, 2000. 15(6): p. 541-55.
95. Verlinsky, Y., Rechitsky, S., Verlinsky, O., Chistokhina, A., Sharapova, T., Masciangelo, C., Levy, M., Kaplan, B., Lederer, K., and Kuliev, A., Preimplantation diagnosis for neurofibromatosis. *Reprod Biomed Online*, 2002. 4(3): p. 218-22.
96. Gurtner, G., Woundhealing, in *Normal and abnormal; Grabb and Smith's Plastic Surgery*. 2007, Lippincott-Raven: Philadelphia. p. 15-22
97. Baum, C.L. and Arpey, C.J., Normal cutaneous wound healing: clinical correlation with cellular and molecular events. *Dermatol Surg*, 2005. 31(6): p. 674-86; discussion 686.
98. Broughton, G., 2nd, Janis, J.E., and Attinger, C.E., Wound healing: an overview. *Plast Reconstr Surg*, 2006. 117(7 Suppl): p. 1e-S-32e-S.
99. Singer, A.J. and Clark, R.A., Cutaneous wound healing. *N Engl J Med*, 1999. 341(10): p. 738-46.
100. Lawrence, W.T., Physiology of the acute wound. *Clin Plast Surg*, 1998. 25(3): p. 321-40.

101. Werner, S. and Grose, R., Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev*, 2003. 83(3): p. 835-70.
102. Kohyama, T., Ertl, R.F., Valenti, V., Spurzem, J., Kawamoto, M., Nakamura, Y., Veys, T., Allegra, L., Romberger, D., and Rennard, S.I., Prostaglandin E(2) inhibits fibroblast chemotaxis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2001. 281(5): p. L1257-63.
103. Jie, L., Juan, C., and Robert, K., Pathophysiology of acute wound healing. *Clinics in Dermatology*, 2007. 25: p. 9-18.
104. Nagase, H. and Woessner, J.F., Jr., Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem*, 1999. 274(31): p. 21491-4.
105. Raza, S.L. and Cornelius, L.A., Matrix metalloproteinases: pro- and anti-angiogenic activities. *J Investig Dermatol Symp Proc*, 2000. 5(1): p. 47-54.
106. Neely, A.N., Clendening, C.E., Gardner, J., Greenhalgh, D.G., and Warden, G.D., Gelatinase activity in keloids and hypertrophic scars. *Wound Repair Regen*, 1999. 7(3): p. 166-71.
107. Oriente, A., Fedarko, N.S., Pacocha, S.E., Huang, S.K., Lichtenstein, L.M., and Essayan, D.M., Interleukin-13 modulates collagen homeostasis in human skin and keloid fibroblasts. *J Pharmacol Exp Ther*, 2000. 292(3): p. 988-94.
108. Uchida, G., Yoshimura, K., Kitano, Y., Okazaki, M., and Harii, K., Tretinoin reverses upregulation of matrix metalloproteinase-13 in human keloid-derived fibroblasts. *Exp Dermatol*, 2003. 12 Suppl 2: p. 35-42.
109. Fisher, C., Gilbertson-Beadling, S., Powers, E.A., Petzold, G., Poorman, R., and Mitchell, M.A., Interstitial collagenase is required for angiogenesis in vitro. *Dev Biol*, 1994. 162(2): p. 499-510.
110. Simpson, D.M. and Ross, R., The neutrophilic leukocyte in wound repair: a study with antineutrophil serum, J.C. Invest, Editor. 1972. p. 2009-23.
111. Buck, M., Houglum, K., and Chojkier, M., Tumor necrosis factor-alpha inhibits collagen alpha1(I) gene expression and wound healing in a murine model of cachexia. *Am J Pathol*, 1996. 149(1): p. 195-204.
112. Monaco, J.L. and Lawrence, W.T., Acute wound healing an overview. *Clin Plast Surg*, 2003. 30(1): p. 1-12.

113. Soo, C., Differential expression of matrix metalloproteinases and their tissue-derived inhibitors in cutaneous wound repair--a correction. *Plast Reconstr Surg*, 2000. 106(1): p. 236-7.
114. David, T. and Robles, D., Berg., Abnormal wound healing: keloids. *Clinics in Dermatology* 2007. 25: p. 26-32.
115. Tuan, T.L. and Nichter, L.S., The molecular basis of keloid and hypertrophic scar formation. *Mol Med Today*, 1998. 4(1): p. 19-24.
116. Wendling, J., Marchand, A., Mauviel, A., and Verrecchia, F., 5-fluorouracil blocks transforming growth factor-beta-induced alpha 2 type I collagen gene (COL1A2) expression in human fibroblasts via c-Jun NH2-terminal kinase/activator protein-1 activation. *Mol Pharmacol*, 2003. 64(3): p. 707-13.
117. English, R.S. and Shenefelt, P.D., Keloids and hypertrophic scars. *Dermatol Surg*, 1999. 25(8): p. 631-8.
118. Szulgit, G., Rudolph, R., Wandel, A., Tenenhaus, M., Panos, R., and Gardner, H., Alterations in fibroblast alpha1beta1 integrin collagen receptor expression in keloids and hypertrophic scars. *J Invest Dermatol*, 2002. 118(3): p. 409-15.
119. Bayat, A., Bock, O., Mrowietz, U., Ollier, W.E., and Ferguson, M.W., Genetic susceptibility to keloid disease and hypertrophic scarring: transforming growth factor beta1 common polymorphisms and plasma levels. *Plast Reconstr Surg*, 2003. 111(2): p. 535-43; discussion 544-6.
120. Sandy, S., Urioste., Kenneth, A., Arndt., and Jeffrey, S., Dover., Keloids and hypertrophic scars: review and treatment strategies. *Medicine and Surgery. Seminars in Cutaneous* 1999. 18(2): p. 159-171.
121. Atiyeh, B.S., Costagliola, M., and Hayek, S.N., Keloid or hypertrophic scar: the controversy: review of the literature. *Ann Plast Surg*, 2005. 54(6): p. 676-80.
122. Nakaoka, H., Miyauchi, S., and Miki, Y., Proliferating activity of dermal fibroblasts in keloids and hypertrophic scars. *Acta Derm Venereol*, 1995. 75(2): p. 102-4.
123. Bronson, R.E., Argenta, J.G., and Bertolami, C.N., Interleukin-1-induced changes in extracellular glycosaminoglycan composition of cutaneous scar-derived fibroblasts in culture. *Coll Relat Res*, 1988. 8(3): p. 199-208.

124. Ladin, D.A., Hou, Z., Patel, D., McPhail, M., Olson, J.C., Saed, G.M., and Fivenson, D.P., p53 and apoptosis alterations in keloids and keloid fibroblasts. *Wound Repair Regen*, 1998. 6(1): p. 28-37.
125. Tuan, T.L., Zhu, J.Y., Sun, B., Nichter, L.S., Nimni, M.E., and Laug, W.E., Elevated levels of plasminogen activator inhibitor-1 may account for the altered fibrinolysis by keloid fibroblasts. *J Invest Dermatol*, 1996. 106(5): p. 1007-11.
126. Gira, A.K., Brown, L.F., Washington, C.V., Cohen, C., and Arbiser, J.L., Keloids demonstrate high-level epidermal expression of vascular endothelial growth factor. *J Am Acad Dermatol*, 2004. 50(6): p. 850-3.
127. Al-Attar, A., Mess, S., Thomassen, J.M., Kauffman, C.L., and Davison, S.P., Keloid pathogenesis and treatment. *Plast Reconstr Surg*, 2006. 117(1): p. 286-300.
128. Manuskiatti, W. and Fitzpatrick, R.E., Treatment response of keloidal and hypertrophic sternotomy scars: comparison among intralesional corticosteroid, 5-fluorouracil, and 585-nm flashlamp-pumped pulsed-dye laser treatments. *Arch Dermatol*, 2002. 138(9): p. 1149-55.
129. Carroll, L.A., Hanasono, M.M., Mikulec, A.A., Kita, M., and Koch, R.J., Triamcinolone stimulates bFGF production and inhibits TGF-beta1 production by human dermal fibroblasts. *Dermatol Surg*, 2002. 28(8): p. 704-9.
130. Zurada, J.M., Kriegel, D., and Davis, I.C., Topical treatments for hypertrophic scars. *J Am Acad Dermatol*, 2006. 55(6): p. 1024-31.
131. Shengkang, L., Messod, B., and Wassimi, R., Abnormal Balance between Proliferation and Apoptotic Cell Death in Fibroblasts Derived from Keloid Lesions. *Plast recon surg*, 2001. 107(1): p. 87-96.
132. Ragoowansi, R., Cornes, P.G., Moss, A.L., and Glees, J.P., Treatment of keloids by surgical excision and immediate postoperative single-fraction radiotherapy. *Plast Reconstr Surg*, 2003. 111(6): p. 1853-9.
133. Ogawa, R., Mitsuhashi, K., Hyakusoku, H., and Miyashita, T., Postoperative electron-beam irradiation therapy for keloids and hypertrophic scars: retrospective study of 147 cases followed for more than 18 months. *Plast Reconstr Surg*, 2003. 111(2): p. 547-53; discussion 554-5.

134. Botwood, N., Lewanski, C., and Lowdell, C., The risks of treating keloids with radiotherapy. *Br J Radiol*, 1999. 72(864): p. 1222-4.
135. Dinh, Q., Veness, M., and Richards, S., Role of adjuvant radiotherapy in recurrent earlobe keloids. *Australas J Dermatol*, 2004. 45(3): p. 162-6.
136. Zouboulis, C.C., Rosenberger, A.D., Forster, T., Beller, G., Kratzsch, M., and Felsenberg, D., Modification of a device and its application for intralesional cryosurgery of old recalcitrant keloids. *Arch Dermatol*, 2004. 140(10): p. 1293-4.
137. Berman, B. and Flores, F., Recurrence rates of excised keloids treated with postoperative triamcinolone acetonide injections or interferon alfa-2b injections. *J Am Acad Dermatol*, 1997. 37(5 Pt 1): p. 755-7.
138. Conejo-Mir, J.S., Corbi, R., and Linares, M., Carbon dioxide laser ablation associated with interferon alfa-2b injections reduces the recurrence of keloids. *J Am Acad Dermatol*, 1998. 39(6): p. 1039-40.
139. Berman, B. and Villa, A., Imiquimod 5% cream for keloid management. *Dermatol Surg*, 2003. 29(10): p. 1050-1.
140. Jacob, S.E., Berman, B., Nassiri, M., and Vincek, V., Topical application of imiquimod 5% cream to keloids alters expression genes associated with apoptosis. *Br J Dermatol*, 2003. 149 Suppl 66: p. 62-5.
141. Prado, A., Andrades, P., Benitez, S., and Umana, M., Scar management after breast surgery: preliminary results of a prospective, randomized, and double-blind clinical study with aldara cream 5% (imiquimod). *Plast Reconstr Surg*, 2005. 115(3): p. 966-72.
142. WMA, Declaration Of Helsinki: Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects, in 59th WMA General Assembly, W.M. Association, Editor. October 2008: Seoul.
143. T.C. Sağlık Bakanlığı İlaç ve Eczacılık Genel Müdürlüğü, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu. 1995, T.C. Sağlık Bakanlığı: Ankara.
144. Marchuk, D.A., Saulino, A.M., Tavakkol, R., Swaroop, M., Wallace, M.R., Andersen, L.B., Mitchell, A.L., Gutmann, D.H., Boguski, M., and Collins, F.S., cDNA cloning of the type 1 neurofibromatosis gene: complete sequence of the NF-I gene product. *Genomics*, 1991. 11(4): p. 931-40.

145. Riccardi, V.M., Von Recklinghausen neurofibromatosis. *N Engl J Med*, 1981. 305(27): p. 1617-27.
146. Gutmann, D.H., Aylsworth, A., Carey, J.C., Korf, B., Marks, J., Pyeritz, R.E., Rubenstein, A., and Viskochil, D., The diagnostic evaluation and multidisciplinary management of neurofibromatosis 1 and neurofibromatosis 2. *JAMA*, 1997. 278(1): p. 51-7.
147. Legius, E., Marchuk, D.A., Collins, F.S., and Glover, T.W., Somatic deletion of the neurofibromatosis type 1 gene in a neurofibrosarcoma supports a tumour suppressor gene hypothesis. *Nat Genet*, 1993. 3(2): p. 122-6.
148. Metheny, L.J., Cappione, A.J., and Skuse, G.R., Genetic and epigenetic mechanisms in the pathogenesis of neurofibromatosis type I. *J Neuropathol Exp Neurol*, 1995. 54(6): p. 753-60.
149. Li, Y., Bollag, G., Clark, R., Stevens, J., Conroy, L., Fults, D., Ward, K., Friedman, E., Samowitz, W., Robertson, M., and et al., Somatic mutations in the neurofibromatosis 1 gene in human tumors. *Cell*, 1992. 69(2): p. 275-81.
150. Johnson, M.R., Look, A.T., DeClue, J.E., Valentine, M.B., and Lowy, D.R., Inactivation of the NF-I gene in human melanoma and neuroblastoma cell lines without impaired regulation of GTP.Ras. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. 90(12): p. 5539-43.
151. Gutmann, D.H., Geist, R.T., Rose, K., Wallin, G., and Moley, J.F., Loss of neurofibromatosis type I (NF-I) gene expression in pheochromocytomas from patients without NF-I. *Genes Chromosomes Cancer*, 1995. 13(2): p. 104-9.
152. Aaltonen, V., Bostrom, P.J., Soderstrom, K.O., Hirvonen, O., Tuukkanen, J., Nurmi, M., Laato, M., and Peltonen, J., Urinary bladder transitional cell carcinogenesis is associated with down-regulation of NF-I tumor suppressor gene in vivo and in vitro. *Am J Pathol*, 1999. 154(3): p. 755-65.
153. Hermonen, J., Hirvonen, O., Yla-Outinen, H., Lakkakorpi, J., Bjorkstrand, A.S., Laurikainen, L., Kallioinen, M., Oikarinen, A., Peltonen, S., and Peltonen, J., Neurofibromin: expression by normal human keratinocytes in vivo and in vitro and in epidermal malignancies. *Lab Invest*, 1995. 73(2): p. 221-8.

154. Peltonen, J., Karvonen, S.L., Yla-Outinen, H., Hirvonen, O., and Karvonen, J., Lesional psoriatic epidermis displays reduced neurofibromin immunoreactivity. *J Invest Dermatol*, 1995. 105(5): p. 664-7.
155. Gutmann, D.H., Loehr, A., Zhang, Y., Kim, J., Henkemeyer, M., and Cashen, A., Haploinsufficiency for the neurofibromatosis 1 (NF-I) tumor suppressor results in increased astrocyte proliferation. *Oncogene*, 1999. 18(31): p. 4450-9.
156. Malhotra, R. and Ratner, N., Localization of neurofibromin to keratinocytes and melanocytes in developing rat and human skin. *J Invest Dermatol*, 1994. 102(5): p. 812-8.
157. Koivunen, J., Kuorilehto, T., Kaisto, T., Peltonen, S., and Peltonen, J., Ultrastructural localization of NF-I tumor suppressor protein in human skin. *Arch Dermatol Res*, 2002. 293(12): p. 646-9.
158. Koivunen, J., Yla-Outinen, H., Korkiamaki, T., Karvonen, S.L., Poyhonen, M., Laato, M., Karvonen, J., Peltonen, S., and Peltonen, J., New function for NF-I tumor suppressor. *J Invest Dermatol*, 2000. 114(3): p. 473-9.
159. Atit, R.P., Mitchell, K., Nguyen, L., Warshawsky, D., and Ratner, N., The neurofibromatosis type 1 (NF-I) tumor suppressor is a modifier of carcinogen-induced pigmentation and papilloma formation in C57BL/6 mice. *J Invest Dermatol*, 2000. 114(6): p. 1093-100.
160. Koivunen, J., Karvonen, S.L., Yla-Outinen, H., Aaltonen, V., Oikarinen, A., and Peltonen, J., NF-I tumor suppressor in epidermal wound healing with special focus on wound healing in patients with type 1 neurofibromatosis. *Arch Dermatol Res*, 2005. 296(12): p. 547-54.
161. Amadeu, T., Braune, A., Mandarim-de-Lacerda, C., Porto, L.C., Desmouliere, A., and Costa, A., Vascularization pattern in hypertrophic scars and keloids: a stereological analysis. *Pathol Res Pract*, 2003. 199(7): p. 469-73.
162. Akaishi, S., Ogawa, R., and Hyakusoku, H., Keloid and hypertrophic scar: neurogenic inflammation hypotheses. *Med Hypotheses*, 2008. 71(1): p. 32-8.
163. Friedman, D.W., Boyd, C.D., Mackenzie, J.W., Norton, P., Olson, R.M., and Deak, S.B., Regulation of collagen gene expression in keloids and hypertrophic scars. *J Surg Res*, 1993. 55(2): p. 214-22.

164. Xia, W., Longaker, M.T., and Yang, G.P., P38 MAP kinase mediates transforming growth factor-beta2 transcription in human keloid fibroblasts. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2006. 290(3): p. R501-8.
165. Niessen, F.B., Andriessen, M.P., Schalkwijk, J., Visser, L., and Timens, W., Keratinocyte-derived growth factors play a role in the formation of hypertrophic scars. *J Pathol*, 2001. 194(2): p. 207-16.
166. Haisa, M., Okochi, H., and Grotendorst, G.R., Elevated levels of PDGF alpha receptors in keloid fibroblasts contribute to an enhanced response to PDGF. *J Invest Dermatol*, 1994. 103(4): p. 560-3.
167. Xia, W., Kong, W., Wang, Z., Phan, T.T., Lim, I.J., Longaker, M.T., and Yang, G.P., Increased CCN2 transcription in keloid fibroblasts requires cooperativity between AP-1 and SMAD binding sites. *Ann Surg*, 2007. 246(5): p. 886-95.
168. Marneros, A.G. and Krieg, T., Keloids--clinical diagnosis, pathogenesis, and treatment options. *J Dtsch Dermatol Ges*, 2004. 2(11): p. 905-13.
169. Ross, R., Glomset, J., Kariya, B., and Harker, L., A platelet-dependent serum factor that stimulates the proliferation of arterial smooth muscle cells in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1974. 71(4): p. 1207-10.
170. Kohler, N. and Lipton, A., Platelets as a source of fibroblast growth-promoting activity. *Exp Cell Res*, 1974. 87(2): p. 297-301.
171. Grotendorst, G.R., Seppa, H.E., Kleinman, H.K., and Martin, G.R., Attachment of smooth muscle cells to collagen and their migration toward platelet-derived growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1981. 78(6): p. 3669-72.
172. Bauer, E.A., Cooper, T.W., Huang, J.S., Altman, J., and Deuel, T.F., Stimulation of in vitro human skin collagenase expression by platelet-derived growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1985. 82(12): p. 4132-6.
173. Blatti, S.P., Foster, D.N., Ranganathan, G., Moses, H.L., and Getz, M.J., Induction of fibronectin gene transcription and mRNA is a primary response to growth-factor stimulation of AKR-2B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1988. 85(4): p. 1119-23.

174. Heldin, P., Laurent, T.C., and Heldin, C.H., Effect of growth factors on hyaluronan synthesis in cultured human fibroblasts. *Biochem J*, 1989. 258(3): p. 919-22.
175. Heldin, C.-H. and Westermark, B., Role of platelet-derived growth factor in vivo, in *The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair*, R.F.A. Clark, Editor. 1996, Plenum Press. p. 249-264.
176. Antoniades, H.N. and Scher, C.D., Radioimmunoassay of a human serum growth factor for Balb/c-3T3 cells: derivation from platelets. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1977. 74(5): p. 1973-7.
177. Nogita, T., Takehara, K., Moro, A., Otsuka, F., and Ishibashi, Y., Effect of platelet-poor plasma from patients with neurofibromatosis on the growth of cultured neurofibroma-derived fibroblast-like cells. *Clin Exp Dermatol*, 1992. 17(1): p. 27-30.
178. Meenakshi, J.V., Ramakrishnan, K.M., and Babu, M., Keloids and hypertrophic scars: a review. *Indian J Plast Surg*, 2005. 38: p. 175-179.
179. Lee, K.S., Song, J.Y., and Suh, M.H., Collagen mRNA expression detected by in situ hybridization in keloid tissue. *J Dermatol Sci*, 1991. 2(4): p. 316-23.
180. Abergel, R.P., Pizzurro, D., Meeker, C.A., Lask, G., Matsuoka, L.Y., Minor, R.R., Chu, M.L., and Uitto, J., Biochemical composition of the connective tissue in keloids and analysis of collagen metabolism in keloid fibroblast cultures. *J Invest Dermatol*, 1985. 84(5): p. 384-90.
181. Meenakshi, J., Jayaraman, V., Ramakrishnan, K.M., and Babu, M., Ultrastructural differentiation of abnormal scars. *Ann Burns Fire Disasters*, 2005. 18(2): p. 83-8.
182. Ala-Kokko, L., Rintala, A., and Savolainen, E.R., Collagen gene expression in keloids: analysis of collagen metabolism and type I, III, IV, and V procollagen mRNAs in keloid tissue and keloid fibroblast cultures. *J Invest Dermatol*, 1987. 89(3): p. 238-44.
183. Yun, Y.R., Won, J.E., Jeon, E., Lee, S., Kang, W., Jo, H., Jang, J.H., Shin, U.S., and Kim, H.W., Fibroblast growth factors: biology, function, and application for tissue regeneration. *J Tissue Eng*, 2010. 2010: p. 218142.

184. Zakrzewska, M., Marcinkowska, E., and Wiedlocha, A., FGF-1: from biology through engineering to potential medical applications. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 2008. 45(1): p. 91-135.
185. Zazo, M., Lozano, R.M., Ortega, S., Varela, J., Diaz-Orejas, R., Ramirez, J.M., and Gimenez-Gallego, G., High-level synthesis in *Escherichia coli* of shortened and full-length human acidic fibroblast growth factor and purification in a form stable in aqueous solutions. *Gene*, 1992. 113(2): p. 231-8.
186. Fantoni, A., Bill, R.M., Gustafsson, L., and Hedfalk, K., Improved yields of full-length functional human FGF1 can be achieved using the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif*, 2007. 52(1): p. 31-9.
187. Zhou, Y., Ren, L., Zhu, J., Yan, S., Wang, H., Song, N., Li, L., Ouyang, H., and Pang, D., Construction of a recombinant human FGF1 expression vector for mammary gland-specific expression in human breast cancer cells. *Mol Cell Biochem*, 2011. 354(1-2): p. 39-46.
188. Liu, J., Ma, P., Sun, Y., Yang, M., Yang, L., Li, Y., Wu, Y., Zhu, X., and Wang, X., Expression of human acidic fibroblast growth factor in *Nicotiana benthamiana* with a potato-virus-X-based binary vector. *Biotechnol Appl Biochem*, 2007. 48(Pt 3): p. 143-7.
189. Pandit, A.S., Wilson, D.J., and Feldman, D.S., Fibrin scaffold as an effective vehicle for the delivery of acidic fibroblast growth factor (FGF-1). *J Biomater Appl*, 2000. 14(3): p. 229-42.
190. Tan, Y., Xiao, J., Huang, Z., Xiao, Y., Lin, S., Jin, L., Feng, W., Cai, L., and Li, X., Comparison of the therapeutic effects recombinant human acidic and basic fibroblast growth factors in wound healing in diabetic patients. *J Health Science*, 2008. 54: p. 432-440.
191. Kennedy, S.H., Qin, H., Lin, L., and Tan, E.M., Basic fibroblast growth factor regulates type I collagen and collagenase gene expression in human smooth muscle cells. *Am J Pathol*, 1995. 146(3): p. 764-71.
192. Hayashi, S., Kubota, Y., Shimada, S., and Hori, Y., Characterization of cultured neurofibroma cells derived from von Recklinghausen's disease. *Clin Exp Dermatol*, 1990. 15(3): p. 217-21.

193. Konomi, H., Arima, M., Tanaka, H., Hayashi, T., and Ikeda, S., Increased deposition of types III and V collagen in neurofibroma tissue from patients with von Recklinghausen disease. *Brain Dev*, 1989. 11(6): p. 378-83.
194. Luangwedchakarn, V., Jirapongsaranuruk, O., NiemeLa, J.E., Thepthai, C., Chokephaibulkit, K., Sukpanichnant, S., Pacharn, P., Visitsunthorn, N., Vichyanond, P., Piboonpocanun, S., and Fleisher, T.A., A novel mutation of the IL12RB1 gene in a child with nocardiosis, recurrent salmonellosis and neurofibromatosis type I: first case report from Thailand. *Asian Pac J Allergy Immunol*, 2009. 27(2-3): p. 161-5.
195. McCauley, R.L., Chopra, V., Li, Y.Y., Herndon, D.N., and Robson, M.C., Altered cytokine production in black patients with keloids. *J Clin Immunol*, 1992. 12(4): p. 300-8.
196. Niessen, F.B., Schalkwijk, J., Vos, H., and Timens, W., Hypertrophic scar formation is associated with an increased number of epidermal Langerhans cells. *J Pathol*, 2004. 202(1): p. 121-9.

PCR Array Catalog #:	PAHS-121Z
-----------------------------	------------------

Position	Unigene	Refseq	Symbol	Description	Gname
1	Hs.500483	NM_001613	ACTA2	Actin, alpha 2, smooth muscle, aorta	AAT6/ACTSA/MYMY5
2	Hs.118127	NM_005159	ACTC1	Actin, alpha, cardiac muscle 1	ACTC/ASD5/CMD1R/CMH11/LVNC4
3	Hs.369675	NM_001146	ANGPT1	Angiopoietin 1	AGP1/AGPT/ANG1
4	Hs.303649	NM_002982	CCL2	Chemokine (C-C motif) ligand 2	GDCE-2/HC11/HSMCR30/MCAF/MCP-1/MCP1/SCYA2/SMC-CF
5	Hs.251526	NM_006273	CCL7	Chemokine (C-C motif) ligand 7	FIC/MARC/MCP-3/MCP3/NC28/SCYA6/SCYA7
6	Hs.592244	NM_000074	CD40LG	CD40 ligand	CD154/CD40L/HIGM1/IGM/IMD3/T-BAM/TNF5F5/TRAP/gp39/hCD40L
7	Hs.461086	NM_004360	CDH1	Cadherin 1, type 1, E-cadherin (epithelial)	Arc-1/CD324/CDHE/ECAD/LCAM/UVO
8	Hs.409662	NM_021110	COL14A1	Collagen, type XIV, alpha 1	UND
9	Hs.681002	NM_000088	COL1A1	Collagen, type I, alpha 1	OI4
10	Hs.489142	NM_000089	COL1A2	Collagen, type I, alpha 2	OI4
11	Hs.443625	NM_000090	COL3A1	Collagen, type III, alpha 1	EDS4A
12	Hs.17441	NM_001845	COL4A1	Collagen, type IV, alpha 1	HANAC/ICH/POREN1/arresten
13	Hs.570065	NM_000091	COL4A3	Collagen, type IV, alpha 3 (Goodpasture antigen)	-
14	Hs.210283	NM_000093	COL5A1	Collagen, type V, alpha 1	-
15	Hs.445827	NM_000393	COL5A2	Collagen, type V, alpha 2	-
16	Hs.235368	NM_015719	COL5A3	Collagen, type V, alpha 3	-
17	Hs.1349	NM_000758	CSF2	Colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage)	GMCSF
18	Hs.2233	NM_000759	CSF3	Colony stimulating factor 3 (granulocyte)	C17orf33/CSF3OS/GCSF
19	Hs.410037	NM_001901	CTGF	Connective tissue growth factor	CCN2/HCS24/IGFBP8/NOV2
20	Hs.476018	NM_001904	CTNNA1	Catenin (cadherin-associated protein), beta 1, 88kDa	CTNNA1/MRD19/armadillo
21	Hs.421724	NM_001911	CTSG	Cathepsin G	CATG/CG
22	Hs.632466	NM_000396	CTSK	Cathepsin K	CTS02/CTSO/CTSO1/CTSO2/PKND/PYCD

Position	Unigene	Refseq	Symbol	Description	Gname
23	Hs.610096	NM_001333	CTSV	Cathepsin L2	CATL2/CTSL2/CTSU
24	Hs.708652	NM_001511	CXCL1	Chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (melanoma growth stimulating activity, alpha)	FSP/GRO1/GROa/MGSA/MGSA-a/NAP-3/SCYB1
25	Hs.632592	NM_005409	CXCL11	Chemokine (C-X-C motif) ligand 11	H174/I-TAC/IP-9/IP9/SCYB11/SCYB9B/b-R1
26	Hs.75765	NM_002089	CXCL2	Chemokine (C-X-C motif) ligand 2	CINC-2a/GRO2/GROb/MGSA-b/MIP-2a/MIP2/MIP2A/SCYB2
27	Hs.89714	NM_002994	CXCL5	Chemokine (C-X-C motif) ligand 5	ENA-78/SCYB5
28	Hs.419815	NM_001963	EGF	Epidermal growth factor	HOMG4/URG
29	Hs.605083	NM_005228	EGFR	Epidermal growth factor receptor	ERBB/ERBB1/HER1/PIG61/mENA
30	Hs.335513	NM_000129	F13A1	Coagulation factor XIII, A1 polypeptide	F13A
31	Hs.62192	NM_001993	F3	Coagulation factor III (thromboplastin, tissue factor)	CD142/TF/TFA
32	Hs.351593	NM_000508	FGA	Fibrinogen alpha chain	Fib2
33	Hs.664499	NM_004465	FGF10	Fibroblast growth factor 10	-
34	Hs.284244	NM_002006	FGF2	Fibroblast growth factor 2 (basic)	BFGF/FGF-2/FGFB/HBGF-2
35	Hs.567268	NM_002009	FGF7	Fibroblast growth factor 7	HBGF-7/KGF
36	Hs.592942	NM_001945	HBEGF	Heparin-binding EGF-like growth factor	DTR/DTS/DTSF/HEGFL
37	Hs.396530	NM_000601	HGF	Hepatocyte growth factor (hepapoietin A; scatter factor)	DFNB39/F-TCF/HGFB/HPTA/SF
38	Hs.856	NM_000619	IFNG	Interferon, gamma	IFG/IFI
39	Hs.160562	NM_000618	IGF1	Insulin-like growth factor 1 (somatomedin C)	IGF-I/IGF1A/IGFI
40	Hs.193717	NM_000572	IL10	Interleukin 10	CSIF/GVHDS/IL-10/IL10A/TGIF
41	Hs.126256	NM_000576	IL1B	Interleukin 1, beta	IL-1/IL1-BETA/IL1F2
42	Hs.89679	NM_000586	IL2	Interleukin 2	IL-2/TCGF/lymphokine
43	Hs.73917	NM_000589	IL4	Interleukin 4	BCGF-1/BCGF1/BSF-1/BSF1/IL-4
44	Hs.654458	NM_000600	IL6	Interleukin 6 (interferon, beta)	BSF2/HGF/HSF/IFNB2/IL-6

Position	Unigene	Refseq	Symbol	Description	Gname
				2)	
45	Hs.706627	NM_002184	IL6ST	Interleukin 6 signal transducer (gp130, oncostatin M receptor)	CD130/CDW130/GP130/IL-6RB
46	Hs.644352	NM_181501	ITGA1	Integrin, alpha 1	CD49a/VLA1
47	Hs.482077	NM_002203	ITGA2	Integrin, alpha 2 (CD49B, alpha 2 subunit of VLA-2 receptor)	BR/CD49B/GPIa/HPA-5/VLA-2/VLAA2
48	Hs.265829	NM_002204	ITGA3	Integrin, alpha 3 (antigen CD49C, alpha 3 subunit of VLA-3 receptor)	CD49C/GAP-B3/GAPB3/ILNEB/MSK18/VCA-2/VL3A/VLA3a
49	Hs.440955	NM_000885	ITGA4	Integrin, alpha 4 (antigen CD49D, alpha 4 subunit of VLA-4 receptor)	CD49D/IA4
50	Hs.505654	NM_002205	ITGA5	Integrin, alpha 5 (fibronectin receptor, alpha polypeptide)	CD49e/FNRA/VLA5A
51	Hs.133397	NM_000210	ITGA6	Integrin, alpha 6	CD49f/ITGA6B/VLA-6
52	Hs.436873	NM_002210	ITGAV	Integrin, alpha V (vitronectin receptor, alpha polypeptide, antigen CD51)	CD51/MSK8/VNRA/VTNR
53	Hs.643813	NM_002211	ITGB1	Integrin, beta 1 (fibronectin receptor, beta polypeptide, antigen CD29 includes MDF2, MSK12)	CD29/FNRB/GPIIA/MDF2/MSK12/VLA-BETA/VLAB
54	Hs.218040	NM_000212	ITGB3	Integrin, beta 3 (platelet glycoprotein IIIa, antigen CD61)	BDPLT16/BDPLT2/CD61/GP3A/GPIIIa/GT
55	Hs.536663	NM_002213	ITGB5	Integrin, beta 5	-
56	Hs.470399	NM_000888	ITGB6	Integrin, beta 6	-
57	Hs.431850	NM_002745	MAPK1	Mitogen-activated protein kinase 1	ERK/ERK2/ERT1/MAPK2/P42MAPK/PRKM1/PRKM2/p38/p40/p41/p41mapk
58	Hs.861	NM_002746	MAPK3	Mitogen-activated protein kinase 3	ERK-1/ERK1/ERT2/HS44KDAP/HUMKER1A/P44ERK1/P44MAPK/PRKM3/p44-ERK1/p44-MAPK
59	Hs.407995	NM_002415	MIF	Macrophage migration inhibitory factor (glycosylation-	GIF/GLIF/MMIF

Position	Unigene	Refseq	Symbol	Description	Gname
				inhibiting factor)	
60	Hs.83169	NM_002421	MMP1	Matrix metalloproteinase 1 (interstitial collagenase)	CLG/CLGN
61	Hs.513617	NM_004530	MMP2	Matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A, 72kDa gelatinase, 72kDa type IV collagenase)	CLG4/CLG4A/MMP-II/MONA/TBE-1
62	Hs.2256	NM_002423	MMP7	Matrix metalloproteinase 7 (matrilysin, uterine)	MMP-7/MPSL1/PUMP-1
63	Hs.297413	NM_004994	MMP9	Matrix metalloproteinase 9 (gelatinase B, 92kDa gelatinase, 92kDa type IV collagenase)	CLG4B/GELB/MANDP2/MMP-9
64	Hs.535898	NM_002607	PDGFA	Platelet-derived growth factor alpha polypeptide	PDGF-A/PDGF1
65	Hs.491582	NM_000930	PLAT	Plasminogen activator, tissue	T-PA/TPA
66	Hs.77274	NM_002658	PLAU	Plasminogen activator, urokinase	ATF/BDPLT5/QPD/UPA/URK/u-PA
67	Hs.466871	NM_002659	PLAUR	Plasminogen activator, urokinase receptor	CD87/U-PAR/UPAR/URKR
68	Hs.143436	NM_000301	PLG	Plasminogen	-
69	Hs.500466	NM_000314	PTEN	Phosphatase and tensin homolog	10q23del/BZS/CWS1/DEC/GLM2/MHAM/MMAC1/PTEN1/TEP1
70	Hs.196384	NM_000963	PTGS2	Prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)	COX-2/COX2/GRIPGHS/PGG/HS/PGHS-2/PHS-2/hCox-2
71	Hs.413812	NM_006908	RAC1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (rho family, small GTP binding protein Rac1)	Rac-1/TC-25/p21-Rac1
72	Hs.247077	NM_001664	RHOA	Ras homolog gene family, member A	ARH12/ARHA/RHO12/RHOH12
73	Hs.713079	NM_000602	SERPINE1	Serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 1	PAI/PAI-1/PAI1/PLANH1

Position	Unigene	Refseq	Symbol	Description	Gname
74	Hs.463059	NM_003150	STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3 (acute-phase response factor)	APRF/HIES
75	Hs.410977	NM_003186	TAGLN	Transgelin	SM22/SMCC/TAGLN1/WS3-10
76	Hs.628298	NM_003236	TGFA	Transforming growth factor, alpha	TFGA
77	Hs.645227	NM_000660	TGFB1	Transforming growth factor, beta 1	CED/DPD1/LAP/TGFB/TGFbeta
78	Hs.735919	NM_003243	TGFB3	Transforming growth factor, beta receptor III	BGCAN/betaglycan
79	Hs.522632	NM_003254	TIMP1	TIMP metalloproteinase inhibitor 1	CLGI/EPA/EPO/HCI/TIMP
80	Hs.241570	NM_000594	TNF	Tumor necrosis factor	DIF/TNF-alpha/TNFA/TNFSF2
81	Hs.73793	NM_003376	VEGFA	Vascular endothelial growth factor A	MVCD1/VEGF/VPF
82	Hs.2257	NM_000638	VTN	Vitronectin	V75/VN/VNT
83	Hs.492974	NM_003882	WISP1	WNT1 inducible signaling pathway protein 1	CCN4/WISP1c/WISP1i/WISP1tc
84	Hs.643085	NM_003392	WNT5A	Wingless-type MMTV integration site family, member 5A	hWNT5A
85	Hs.520640	NM_001101	ACTB	Actin, beta	BRWS1/PS1TP5BP1
86	Hs.534255	NM_004048	B2M	Beta-2-microglobulin	-
87	Hs.544577	NM_002046	GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	G3PD/GAPD
88	Hs.412707	NM_000194	HPRT1	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1	HGPRT/HPRT
89	Hs.546285	NM_001002	RPLP0	Ribosomal protein, large, P0	L10E/LP0/P0/PRLP0/RPP0
90	N/A	SA_00105	HGDC	Human Genomic DNA Contamination	HIGX1A
91	N/A	SA_00104	RTC	Reverse Transcription Control	RTC
92	N/A	SA_00104	RTC	Reverse Transcription Control	RTC
93	N/A	SA_00104	RTC	Reverse Transcription Control	RTC
94	N/A	SA_00103	PPC	Positive PCR Control	PPC

Position	Unigene	Refseq	Symbol	Description	Gname
95	N/A	SA_00103	PPC	Positive PCR Control	PPC
96	N/A	SA_00103	PPC	Positive PCR Control	PPC