

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**NÖROFİBROMATOZİS TİP 1(NF1) KAYNAKLI MEZENKİMAL STROMAL
HÜCRELERİN DETAYLI KARAKTERİZASYONU**

İrem AKAR

**Kök Hücre Programı
DOKTORA TEZİ**

ANKARA

2022

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**NÖROFİBROMATOZİS TİP 1(NF1) KAYNAKLI MEZENKİMAL STROMAL
HÜCRELERİN DETAYLI KARAKTERİZASYONU**

İrem AKAR

**Kök Hücre Programı
DOKTORA TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Fatma Banu ANLAR**

**ANKARA
2022**

ONAY SAYFASI**HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ****Nörofibromatozis Tip 1 (Nf1) Kaynaklı Mezenkimal Stromal Hücrelerin Detaylı
Karakterizasyonu****İrem Akar****Danışman: Prof.Dr.Fatma Banu Anlar****İkinci Danışman: -**

Bu tez çalışması 12/08/2022 tarihinde jürimiz tarafından "Kök Hücre Programı" nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: *Prof. Dr. Duygu Uçkan Çetinkaya**Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Dahili Tıp Bilimleri, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı,
Pediatrik Hematoloji Bilim Dalı***Üye:** *Prof.Dr. Ayşen Günel Özcan**Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Kök Hücre Bilimleri,Anabilim Dalı***Üye:** *Prof. Dr. Kamil Can Akçalı**Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Bölümü, Biyofizik Anabilim Dalı***Üye:** *Doç.Dr. Betül Çelebi Saltık**Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Kök Hücre Bilimleri Anabilim Dalı***Üye:** *Doktor Öğr. Üyesi Parisa Sharafi**TOBB Üniversitesi Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Anabilim Dalı, Tıbbi Biyoloji Bilim Dalı*

Bu tez, Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuştur. 7 Ekim 2022

*Prof. Dr. Müge YEMİŞÇİ ÖZKAN***Enstitü Müdürü**

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan “**Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge**” kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H.Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- o Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. ⁽¹⁾
- o Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren .6. ay ertelenmiştir.⁽²⁾
- o Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir.

11/10/2022.

İrem AKAR

1“*Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge*”

- (1) *Madde 6. 1. Lisansüstü teze ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.*
- (2) *Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internetten paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.*
- (3) *Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, tezin yapıldığı kurum tarafından verilir *. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, ilgili kurum ve kuruluşun önerisi ile enstitü veya fakültenin uygun görüşü üzerine üniversite yönetim kurulu tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir. Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir*

* Tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu tarafından karar verilir.

ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Prof.Dr. Fatma Banu Anlar danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesi'ne göre yazıldığını beyan ederim.

İrem AKAR

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca bilgi ve fikirleriyle bana yol gösteren, bu süreçte desteğini esirgemeyen, bilgi ve tecrübeleri ile bana ışık tutan, değerli tez danışmanım Sayın Prof.Dr. Fatma Banu ANLAR'a teşekkürlerimi sunarım.

Doktora sürecimin başlamasında ve eğitim hayatımın dönüm noktalarında büyük katkısı olan değerli hocam Sayın Prof.Dr.Emin KANSU'ya, doktora sürecim boyunca gerek akademik, gerekse özel hayatımda desteğini hiç esirgemeyen, her daim çözümcül yaklaşımları ile bana güç katan ve hep sonsuz bir sabırla kıymetli zamanını ayıran saygıdeğer hocam Sayın Prof.Dr.Duygu Uçkan ÇETİNKAYA'ya teşekkürü bir borç bilirim. Doktora sürecine başladığım günden bu yana, eğitimime ve bakış açıma her daim katkısı olan, bilgi, tecrübe ve fikirleri ile bana ışık tutan değerli hocam Sayın Prof.Dr. Ayşen GÜNEL ÖZCAN'a, kıymetli vaktini ayırarak, hem yeterlilik, hem de tez savunma sınavımda değerli katkılarını benden esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Kamil Can AKCALI'ya, zor zamanların geçeceğine dair inancımı her daim besleyen Sayın Doç.Dr. Betül ÇELEBİ SALTIK'a, danıştığım ve yardım istediğim her an bana sabır ve samimiyetle zaman ayıran, verdiği sonsuz desteği her daim hatırlayacağım Sayın Doktor Öğretim Üyesi Parisa Sharafi'ye, doktora sürecinin hayatıma kattığı ama artık ailemden biri olarak gördüğüm Sayın Öğr.Gör. Özge Burcu ŞAHAN'a, tez çalışmasının deneyleri sırasında emeği geçen Sayın Doç.Dr.Ekim TAŞKIRAN'a, varlığı ve desteği ile hep içimi ısıtan, kıymetli katkılarını hiçbir zaman esirgemeyen, başta Sayın Dr. Öğr.Üyesi Ilgın ÇAĞNAN ÇAKKOL olmak üzere, Dr.Öğr.Üyesi Beyza GÖKÇİNAR'a, Öğr.Gör. Beren KARAOSMANOĞLU'na teşekkürlerimi sunarım. Doktora eğitim sürecimde bana çok değerli bilgiler öğreten Kök Hücre Bilimleri Anabilim Dalı'ndaki tüm hocalarıma, varlıkları, dostlukları ve destekleri ile kendimi hep yuvamdaymışım gibi hissettiren tüm can arkadaşlarıma ve Kök Hücre aileme teşekkürü borç bilirim.

Teşekkürlerin en büyüğünü hak eden, minnetimi kelimelerle ifade edemeyeceğim, geçirdiğim zorlu süreçler dahil elimi hiç bırakmayan, bana dair inançlarını hiç kaybetmeyen, hep "umut" olan, sevgi ile destek olan kıymetli annem Nedret AKAR ve babam İlker AKAR'a, desteğini her daim yanımda hissettiğim ablam Didem AKAR'a sonsuz teşekkür eder, sevgilerimi sunarım.

ÖZET

Akar, İ., Nörofibromatozis Tip 1 (NF1) Kaynaklı Mezenkimal Stromal Hücrelerin Detaylı Karakterizasyonu, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Kök Hücre Doktora Tezi, Ankara, 2022. Nörofibromatozis Tip 1 (NF1) genetik hastalıklar içinde sık rastlanan, Nörofibromin (*NF1 geni*) tümör süpresör geninde mutasyon sonucu ortaya çıkan ve otozomal dominant olarak kalıtılan bir hastalıktır. Gen ürünü olan nörofibromin'in eksikliği sinir sistemi gelişiminde aksamaya, hücre içi mitojenik sinyallerde ve beraberinde hücre proliferasyonu ve farklılaşmasında değişikliklere sebep olur. Bunun sonucunda neoplazm gelişimine yatkınlık oluşur. En sık görülen tümörler, nörofibromlar, Schwann hücrelerinden gelişen, içlerinde fibroblastlar, zengin damar yapıları ve mast hücreleri bulunduran kompleks tümörlerdir. Deri ve derialtı nörofibromlarının, ayrıca pleksiform nörofibrom adı verilen, büyüklük ve yerlerine göre belirgin görüntü ve işlev sorunlarına yol açabilen, malign karakter de kazanabilen tipleri vardır. NF1 hastalarında sık rastlanan diğer klinik bulgular arasında kemik defektleri, kanamaya yatkınlık, yara iyileşmesinde gecikme ve hematolojik maligniteye yatkınlık yer almaktadır. Bu çalışmada NF1'in klinik bulgularının ortaya çıkmasında veya seyrinde mikroçevre elemanları olarak mezenkimal kök/stromal hücrelerin(MSH)/fibroblastların katkısının araştırılması amaçlanmıştır. Stromal karakterde destek hücreleri olan MSH/Fibroblastlar çeşitli büyüme faktörleri, sitokin, kemokinler salgılayarak indirekt veya diğer hücrelerle (örn. tümör hücresi, endotel, epitel) direkt ilişkileri yoluyla hücrelerin proliferasyon, apoptosis, migrasyon gibi biyolojik davranışlarını etkilemektedirler. NF1 hastalarının MSH/Fibroblastları da taşıdıkları mutasyondan dolayı farklılaşma ve yaşam süresi bakımından normal bireylerinkilerden farklı olabilirler. Bu çalışmada NF1'de mezoderm kökenli bu hücrelerin mikroçevre ve NF1 patogenezi üzerine etkilerinin incelenmesi amacı ile hasta ve sağlıklı bireylerin dokularından elde edilen MSH/Fibroblastların ayrıntılı karakterizasyonu ile adipojenik ve osteojenik farklılaşma potansiyelleri incelenmiş, hastaların dermal, pleksiform nörofibrom dokuları ve/veya cafe au lait veya sağlıklı cilt bölgesinden MSH/Fibroblastların karakterizasyonları, yara iyileşmesindeki (scratch assay) farklılıkları ve ayrıca Schwann hücreleri ile etkileşimlerinin araştırılmasına yönelik çalışmalar yapılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Nörofibromatozis Tip 1, mezenkimal stromal kök hücre, fibroblast,nörofibrom, mikroçevre, tümör

ABSTRACT

Akar, İ., Characterisation of Mesenchymal Stromal Cells Derived from Neurofibromatosis Type 1 (NF1), Hacettepe University Graduate School of Health Sciences Stem Cell Doctor of Philosophy Thesis, Ankara, 2022. Neurofibromatosis type 1 (NF1) is an inherited autosomal dominant disease characterized by mutation in the neurofibromin (*NF1*) tumor suppressor gene. The lack of neurofibromin, the gene product, causes defects in the nervous system, affects intracellular mitogenic signaling, induces alterations in cell proliferation and differentiation leading to increased tendency in the development of neoplasm. The most common tumors are neurofibromas, the complex tumors derived from Schwann cells containing fibroblasts, rich vascular structures and mast cells. There are epidermic and subcutaneous neurofibromas and besides there are plexiform neurofibromas which can develop into malignant tumors and -according to their localization- lead to functional problems. Other clinical findings in NF1 include bone defects, bleeding diathesis, delayed wound healing and susceptibility to leukemia. This study was designed to investigate the contribution of mesenchymal stem/stromal cells (MSC)/Fibroblasts as the microenvironmental elements, to the occurrence or progression of the clinical symptoms of NF1. Mesenchymal Stem Cells/Fibroblasts which are supportive cells of stromal character, affect the biological behaviour of other cells such as proliferation, apoptosis and migration through various secreted growth factors, cytokines, chemokines, by direct or indirect contact. The MSC/Fibroblasts of NF1 patients can be different from those of normal individuals in terms of differentiation and survival time due to the mutation they carry. In this study, we planned to analyze the effect of mesodermal derived cells the MSC/Fibroblast of NF1 patients on microenvironment and pathogenesis of NF1. MSC/fibroblasts were expanded from biological materials of patients and healthy donors, and characterized in detail. Their adipogenic, osteogenic differentiation potential and wound healing capacity were compared, additionally, MSC-Schwann cell interaction was investigated in co-culture. All of these studies were performed on biological materials derived from NF1 patients with dermal and plexiform neurofibromas and the characteristics of MSC/Fibroblasts derived from each patient's café au lait, healthy and neurofibrom tissues were determined.

Key Words: Neurofibromatosis type 1, mesenchymal stromal/stem cells, neurofibroma, microenvironment, tumor.

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR	xii
ŞEKİLLER	xiv
TABLolar	xvi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Nörofibromatozis Tip 1	5
2.1.1. Nörofibromatozis Tip 1 Patofizyolojisi	5
2.1.2. Nörofibromatozis Tip 1 'de Görülen Fenotipik Değişimler	9
2.1.3. NF1'de Görülen Diğer Klinik Bulgular	18
2.2. Schwann Hücreleri	21
2.3. Mezenkimal Kök/Stromal Hücreler	24
2.4. NF1 Hastalarında Tedavi Yaklaşımları	26
2.5. Amaç	27
3. GEREÇ VE YÖNTEM	28
3.1. Hasta Örneklerinin Temini	28
3.2. MSH/Fibroblast Hücrelerinin Kültürü ve Karakterizasyonu	28
3.2.1 Hücre Kültürü	28
3.2.2. MSH/Fibroblastların Yüzey Belirteçlerinin Saptanması (Akım Sitometri Çalışması)	29
3.2.3. Mezenkimal Stromal Hücrelerin/Fibroblastların Farklılaşma Analizleri	30
3.3. MSH/Fibroblastlarda yara iyileşmesinin gözlenmesi (Scratch assay):	32
3.3.1. Yara İyileşmesi Modeli Oluşturulması:	32

3.4. MSH/Fibroblastların Osteojenik Farklılaşma Kapasitelerinin Moleküler Düzeyde İncelenmesi	33
3.4.1. RNA İzolasyonu	33
3.4.2. cDNA Sentezi	34
3.4.3. Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)	35
3.5. Schwann Hücre Hattı ile Hasta MSH/Fibroblast ve Sağlıklı MSH/Fibroblast Ko-Kültürü	36
3.5.1. Hücre Kültürü	36
3.5.2. Schwann Hücre Apoptozisinin Akım Sitometri ile Tayini	37
3.5.3. Schwann Hücreleri ile Ko-kültüre alınan MSH/Fibroblastların Yüzey Belirteçlerinin İncelenmesi	38
4. BULGULAR	39
4.1. Çalışmaya Dahil Edilen Hastaların Bilgileri	39
4.2. MSH/Fibroblast Hücrelerinin Karakterizasyonu	39
4.2.1. Hücre Kültürü	39
4.2.2. MSH/Fibroblastların Yüzey Belirteçlerinin Saptanması (Akım Sitometri Çalışması)	41
4.2.3. Mezenkimal Stromal Hücrelerin Farklılaşma Analizleri	44
4.3. MSH/Fibroblastlarda Yara İyileşmesinin Gözlenmesi (Scratch assay):	49
4.3.1. Sağlıklı Bireye Ait Doku MSH'lerinde Yapılan Yara İyileşmesi	49
4.3.1. NF1'li Hastalara Ait Doku MSH'lerinde Yapılan Yara İyileşmesi	51
4.4. MSH/Fibroblastların lerin Osteojenik Farklılaşma Kapasitelerinin (NF1 Defektlerini Yansıtacak Şekilde) Gerçek Zamanlı PZR ile Analizi	59
4.4.1. Osteopontin (SPP) İfadesnini Gerçek Zamanlı PZR Yöntemi İle Araştırılması	59
4.5. Schwann Hücre Hattı ile Hasta -MSH ve Sağlıklı MSH Ko-Kültürü	63
4.5.1. Hücre Kültürü	63
4.5.2. Schwann Hücre Apoptozisinin Akım Sitometri ile Tayini	65
4.5.3. Schwann Hücrelerinin MSH/Fibroblastların Yüzey Belirteçleri Üzerine Etkisi	67

5. TARTIŞMA	70
5.1. MSH/Fibroblast Hücrelerinin Karakterizasyonu	70
5.2. MSH/Fibroblastlarda yara iyileşmesinin gözlenmesi (Scratch assay):	71
5.3. MSH/Fibroblast Hücrelerinin Osteojenik Farklılaşma sürecinde Sergiledikleri Osteopontin İfadenmesi	71
5.4. Schwann Hücre Hattı ile Hasta - MSH ve Sağlıklı MSH İlişkisinin Değerlendirmesi	72
6. SONUÇLAR	75
7. KAYNAKLAR	76
8. EKLER	
EK 1. Etik Kurul Onayı	
EK 2. Orjinallik Ekran Çıktısı	
EK 3. Dijital Makbuz	
9. ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER ve KISALTMALAR

ADAP	<i>Adhesion- and Degranulation-promoting Adapter Protein</i>
APC	<i>Allophycocyanin</i>
cDNA	<i>Complementary Deoxyribonucleic Acid</i>
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
COLA1A	Kolajen 1
Cp	<i>Crossing point</i>
Ct	<i>Threshold cycle</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMEM-LG	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium-Low Glucose</i>
DMSO	<i>Dimethyl sulfoxide</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
dNF	Dermal Nörofibrom
EMT	Epitelyal Mezenkimal transfer
ERK	<i>Extracellular-signal-regulated kinase</i>
Ets	<i>Erythroblast Transformation Specific</i>
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>
FGF2	<i>Fibroblast Growth Factor 2</i>
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
FSC	<i>Forward side scatter</i>
GAP	<i>GTPAz Aktivated Protein</i>
HIF1α	<i>Hypoxia-inducible factor 1-alpha</i>
iPSC	<i>Induced pluripotent stem cells</i>
Ki	Kemik İliği
KML	Kronik Myeloid Lösemi
mTOR	<i>mammalian Target of Rapamycin</i>
MAPK	<i>The mitogen-activated protein kinase</i>
Mb	MegaBaz
MKH	Mezenkimal Kök Hücre

MNH	Mononükleer Hücre
MPNST	Malign Periferik Sinir Kılıf Tümörü
MSH	Mezenkimal Stromal Hücre
NAHR	<i>Nonallelic homologous recombination</i>
NF1	Nörofibromatozis Tip 1
<i>NF1</i>	<i>Neurofibromin gene</i>
Oct 6	<i>Octamer transcription factor 6</i>
OPN	<i>Osteopontin</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PDGF	<i>Platelet Derived Growth Factor</i>
PE	<i>phycoerythrin</i>
PerCp	<i>Peridinin chlorophyll a protein</i>
PI	<i>Propidium İodite</i>
pNF	Pleksiform Nörofibrom
P/S	<i>Penicillin and streptomycin</i>
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog</i>
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RAS	Renal arter stenozu
RAE	<i>Ras activated enhancer</i>
RNA	<i>Reoxyribonucleic Acid</i>
SOX10	<i>SRY-box transcription factor 10</i>
SSC	<i>Side Scatter</i>
SUZ12	<i>polycomb repressive complex 2 subunit</i>
TAZ	<i>Transcriptional co-activator with PDZ-binding motif</i>
TGFβ	<i>Transforming Growth Factor beta</i>
TP53	<i>Tumor protein p53</i>
VDR	<i>Vitamin D receptor</i>
YAP	<i>Yes-associated protein</i>
Wnt1	<i>Wingless and Int-1</i>
α-SMA	<i>Alpha-Smooth Muscle Actin</i>

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. NF1'de görülen nörofibrom oluşumuna katkısı olan yolaklar özetlenmiştir. Kesikli ok ile gösterilen yolaklar nörofibrom oluşum mekanizmasında üstlendikleri roller açısından henüz tam olarak aydınlatılmış değildir. Jiang ve ekibi'nin 2021 yılına ait derlemesinden uyarlanmıştır.	8
2.2. NF1 geninde meydana gelen mutasyonların, Nörofibromatozis Tip 1'de görülen sorunlar ile ilişkisi.	21
2.3. Periferik sinir üzerinde Schwann hücrelerinin yerleşimi görülmektedir.	22
4.1. NF1'li hastanın normal derisinin (NF-Normal deri) ekildikten 1 hafta sonraki görüntüsü	40
4.2. NF1'li bireyin nörofibrom (a) ve CLS içeren (b) dokusundan elde edilen fibroblast benzeri hücre görüntüleri (Örneklerin ikisi de Pasaj 0 aşamasındadır).	40
4.3. Dermal nörofibromlu hastanın (H1) NF normal derisinden geliştirilen MSH/Fibroblastların immünohistokimyasal boyanması.	42
4.4. Dermal nörofibromlu hastanın (H1) CLS dokusundan geliştirilen MSH/Fibroblastların immünohistokimyasal boyanması.	42
4.5. Dermal nörofibromlu hastanın (H1) Nörofibrom dokusundan geliştirilen MSH/Fibroblastların immünohistokimyasal boyanması.	42
4.6. Hastaların farklı bölgelerinden elde edilen MSH'lerin yüzey belirteç yüzdeleri	43
4.7. Hastaların gerek normal deri, gerekse CLS ve nörofibrom içeren dokuları karakterize edildiğinde, hepsinin stromal belirteçler için pozitif (>%20) ve hematopoetik belirteçler için ise negatif (<%20) ifadenme gösterdiği saptandı.	43
4.8. Sağlıklı bireyden elde edilen MSH'lerin adiposit farklılaşması (Oil Red-O boyası).	44
4.9. Sağlıklı bireyden elde edilen MSH'lerin osteojenik farklılaşması (Alizarin Red S boyası).	45
4.10. Sağlıklı kontrolden elde edilen MSH'lerden geliştirilen yara iyileşmesi modelinde 0,3,6,12,24. saatlerdeki ölçümler.	50
4.11. Sağlıklı kontrol MSH'lerinden geliştirilen yara iyileşmesi modelinin 0, 3, 6, 12, 24. saatlerdeki Motilite indeksi.	51
4.12. Dermal NF1 hastalarından (n=7) alınan örnekler kullanıldı ve Normal doku, CLS, Nörofibrom dokusu olmak üzere üç grup birbirleri arasında karşılaştırıldı. Kruskal Wallis Testi sonucu örnekler arasında MI değeri bakımından fark saptanmadı.	56

- 4.13.** Plexiform NF1'li hastaların (n=6) Nörofibrom, CLS örnekleri üzerinden analiz yapılan istatistiksel analiz sonuçları. Tek bir CLS dokusu olması nedeniyle Mann-Whitney u testi kullanıldı. 57
- 4.14.** Pleksiform nörofibromu olan 6 numaralı hastadan geliştirilen yara iyileşmesi modelinde 24. satte ölçülen plexiform NF hücrelerinin MI değerleri, CLS hücrelerinden anlamlı olarak farklıydı (P<0.05). MI, istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. 58
- 4.15.** Dermal ve pleksifom NF1'li hastaların tüm dokuları (normal/CLS/NF dokusu) üzerinden analiz yapıldı. Kruskal wallis testi kullanıldı. 59
- 4.16.** Sağlıklı kontrol, NF1 hastalarına ait normal deri, CLS dokusu ve NF dokularının osteojenik indüksiyon öncesi ve sonrası Osteopontin (SPP) ifadelenmeleri karşılaştırıldı. p<0,05 60
- 4.17.** Sağlıklı kontrol ve hastalardan elde edilen tüm MSH/Fibroblastların osteojenik indüksiyon öncesi ve sonrası Osteopontin ifadelenmeleri 61
- 4.18.** Dermal Nörofibrom dokusu ve pleksiform nörofibrom dokusundan elde edilen MSH/Fibroblastların osteojenik farklılaşma sonrası Osteopontin ifadeleri. 62
- 4.19.** Poli L Lysin ve Laminin kaplı transwell kültür kabında Schwann hücrelerinin ko kültür sırasındaki görüntüsü 63
- 4.20.** Schwann hücresi ile ko kültür edilen MSH'lerin eş zamanlı görüntüsü 63
- 4.21.** Dokulardan elde edilen MSH'lerin Schwann Hücrelerin ölümü üzerine etkisi. Akım sitometri görüntüsüdür. 66
- 4.22.** Sağlıklı kontrol MSH ile Schwann hücre hattı ko-kültürü sonrası MSH yüzey belirteçleri 66
- 4.23.** Pleksiform nörofibromlu hastanın CLS dokusundan elde edilen MSH'ler ile Schwann hücre hattı ko-kültürü sonrası MSH yüzey belirteçleri 67
- 4.24.** Dermal nörofibromu olan hastanın CLS dokusundan elde edilen MSH'ler ile Schwann hücre hattı ko-kültürü sonrası MSH yüzey belirteçleri 68
- 4.25.** Dermal nörofibromu olan hastanın normal dokusundan elde edilen MSH'ler ile Schwann hücre hattı ko-kültürü sonrası MSH yüzey belirteçleri 67
- 4.26.** Sağlıklı birey, dermal nörofibromu olan bireylerin NF Normal deri ve CLS, pleksiform nörofibromu olan bireyin CLS içeren dokularından elde edilen MSH'ların Schwann Hücre hattı ile yapılan ko-kültür sonrası, MSH'lerin yüzey belirteç değişimleri. 68

TABLolar

Tablo		Sayfa
3.1.	Karakterizasyon için Akım sitometride kullanılan Stromal ve Hematopoetik belirteçler	30
3.2.	Apoptozis için kullanılan Akım Sitometri boya larının emisyon-eksitasyon de ğerleri	38
4.1.	Çalışmaya dahil edilen tüm hastaların listesi ve bulguları	39
4.2.	NF1 tanısı alan bireylerin farklı dokularından elde edilen MSH'lerin stromal ve hematopoetik yüzey belirteçleri. Akım sitometri d atasıdır.	41
4.3.	Dermal ve Pleksiform olmak üzere çalışmaya dahil edilen hastaların (n=13) Nörofibrom, CLS dokusu ve Normal Derisinden elde edilen MSH/Fibroblastların adipojenik ve osteojenik hücre farklılaşma görüntüleri.	46
4.4.	NF1 hastalarından 0 ve 24. saatlerde elde edilen yara iyileşmesi görüntüleri	52

1. GİRİŞ

Bu tez çalışmasında farklı dokulardaki mezemkimal stromal hücrelerin (MSH) biyolojik ve fonksiyonel özelliklerinde Nörofibromatozis Tip 1 geni (*NF1*) kaybı sonucu meydana gelen değişimlerin hastalık patogenezi katkılarının araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda, hastalardaki dermal, subdermal ve pleksiform nörofibromlar ve/veya sütlü kahve lekeleri (Cafe au lait spots - CLS) ve/veya normal dokulardan geliştirilen MSH'lerin detaylı karakterizasyonu ve bu hücrelerin sağlıklı bireylerden elde edilen MSH'ler ile karşılaştırılması yapılmıştır. Karakterizasyon için, NF1 tanısı almış hastalarda, nörofibrom doku MSH, CLS dokusu MSH ve NF normal deri içeren dokulardan MSH elde edilmiş olup, elde edilen MSH'lerin morfolojik/fenotipik özelliklerinin yanı sıra, osteojenik ve adipojenik farklılaşma kapasiteleri, osteojenik farklılaşmadaki gen profilleri ve yara iyileşme sürecindeki farklılıkları (scratch assay) incelenmiştir. Karşılaştırmalar, nörofibromatozis hastalarının farklı doku bölgelerinden elde edilen MSH'lerin yanı sıra sağlıklı bireylerden elde edilen normal doku kaynaklı hücreler arasında da yapılmıştır. Bu çalışmada ayrıca, ko-kültür deneylerinde MSH ile nörofibromların yaklaşık %40-80'ini oluşturan Schwann hücresi arasındaki etkileşim de incelenmiş, Schwann hücreleri ile hasta nörofibrom ve sağlıklı bireylerden elde edilen stromal hücrelerde yüzey belirteçlerinde meydana gelebilecek değişimler ve apoptozis üzerine etkileri araştırılmıştır.

Nörofibromatozis tip 1 (NF1) sinir sistemini etkileyen, toplumda, 2500'de 1 frekansı ile sık görülen tek gen hastalığıdır (1, 2). RAS sinyalizasyonunun negatif düzenleyicisi olan nörofibromin geninin (*NF1*) mutasyonu sonucu ortaya çıkar (3). Gen ürünü nörofibromin proteini, normalde Ras proteininin aktivitesini baskılar ve hücre siklusunu kontrol eder. NF1 hastalarındaki mutasyon sonucu nörofibromin aktivitesinde azalma olduğunda, RAS ile temas gerçekleşmez, baskılanamaz ve hücre döngüsü kontrol edilemeyerek tümör oluşumunda artış meydana gelir (4, 5). NF1 hastalarında en yaygın görülen tipik tümörler hastalığa da adını veren nörofibromlardır (6). Bunlar, benign Schwann hücre tümörleri olup nöral ve fibröz dokuları içerirler. Nörofibromlar ciltte (dermal/kutanöz nörofibrom) veya daha

derinde nöral pleksuslar yakınında (pleksiform nörofibrom) bulunurlar (7, 8). Nörofibromların yapısında fibroblastlar, perinöral hücreler ve mast hücreleri bulunmakla birlikte ana bileşenini her iki alleli de mutant olan (*NF1*^{-/-}) Schwann hücreleri oluşturur (9).

NF1 hastalarında tümör dışında deri, sinir sistemi gibi ektodermal ve damar, kemik gibi mezodermal dokuları ilgilendiren bulgular vardır (10). Yara iyileşmesinde yetersizlik, kanamaya yatkınlık bu hastalığın klinik bulgularının ortaya çıkmasında veya seyrinde mezoderm kökenli destek dokularının rolünü düşündürmektedir. Stromal karakterde destek hücreleri olan MSH'ler çeşitli büyüme faktörleri, sitokin, kemokinler salgılayarak veya direkt ilişkileri yoluyla diğer hücrelerin proliferasyon, apoptosis, migrasyon gibi biyolojik davranışlarını etkilemektedirler (11). MSH'ler hasarlı bölgeye göç etme, onarma-destek görevi gördükleri ve immunomodülatör özellik taşıdıkları için rejeneratif potansiyele sahiptirler (12). Hastalardan elde edilen cilt dokuları aynı zamanda, bağ dokunun büyük bir kısmını meydana getiren fibroblast da içermektedir. Fibroblastlar, MSH'ler ile ortak birçok özelliğe sahiptir, hatta literatürde MSH'lerin bir alternatifi olarak değerlendirildikleri çalışmalar mevcuttur (11, 13). Tez çalışmasında da hastalardan elde edilen dokular MSH gelişimi için özel olarak kullanılan besi ortamı içinde alınarak kültür edilmişlerdir. Alınan doku parçasında ilk başta farklı hücre tipleri olmasına rağmen, deneylerin gerçekleştiği 3. pasaja kadar yapılan kültür sürecinde, ortamda fibroblastoid karakterde (fibroblast ve öncülleri olan MSH) hücre kalmaktadır. Bu nedenle, bu tez çalışmasında, hasta ve sağlıklı bireylerin dokularından elde edilen hücreler MSH/Fibroblast tanımlaması altında yer almaktadır.

Bu kapsamda tez çalışmasında;

- NF1 hastalarının CLS bulunan deri, normal deri, dermal nörofibrom ve pleksiform nörofibrom dokularından elde edilen MSH/Fibroblast'ların akım sitometrik yöntemle yüzey belirteçlerinin ve in vitro osteojenik ve adipojenik farklılaşma potansiyellerinin incelenmesi,
- NF1 hastalarının farklı dokularından elde edilen MSH/Fibroblast'ların, birbirleriyle ve sağlıklı bireylerden elde edilen MSH'lerle morfolojik ve

fonksiyonel karşılaştırması, akım sitometrik yöntemle yüzey belirteçlerinin ve in vitro osteojenik ve adipojenik farklılaşma potansiyellerinin incelenmesi,

- Nörofibromlardan (dermal/pleksiform) elde edilen MSH/Fibroblast'ların birbirleriyle ve sağlıklı bireyden elde edilen MSH'lerle osteojenik farklılaşma sırasında gözlenebilecek değişimler açısından, in vitro farklılaşma uyarılmasını takiben 10. gününde Osteopontin gen ifadenmesi yönünden karşılaştırılmaları,
- NF1 hastalarının iki farklı nörofibrom tipi olan dermal ve pleksiform dokularından, CLS, normal ve nörofibrom (dermal/pleksiform) içeren dokularından geliştirilen MSH/Fibroblastların in vitro ortamda oluşturulan yara modelinde yara iyileşmesi yönünden incelenmesi ve dokular arasında, NF1 ile sağlıklı birey MSH'leri arasında karşılaştırma yapılması,
- Schwann hücreleri ile aynı ortamı paylaşan hasta ve sağlıklı birey dokularından elde edilen MSH'lerin interaksiyonunun, bunların her iki hücre tipi üzerine etkilerinin incelenmesi amacıyla Schwann hücre hattı ile MSH/Fibroblast ko-kültürü oluşturulması, Schwann hücrelerinde akım sitometri ile Annexin V/PI boyaması yapılarak apoptozis yönünden incelenmesi, MSH/Fibroblast'ların yüzey belirteçlerinin olası değişiminin incelenmesi amaçlanmıştır.

Tez kapsamında incelenen MSH/Fibroblast'lar çalışmanın başlangıcında Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulunca incelenmiş, gerekli izin alınmış olarak (Karar No: GO 13/202-21) NF1 tanısı almış 13 hastadan doku temin edilmiştir. Sağlıklı kontrol olarak sünnet derisi kullanılmıştır.

NF1 tanısı almış bireylerin, CLS, nörofibrom (dermal/pleksiform) ve normal dokularından elde edilen ve pasajlanarak homojenize edilen MSH'ler akım sitometrik yöntem ile karakterize edilmiştir. Karakterizasyon sırasında, MSH'ler adipojenik, osteojenik farklılaşma ve yüzey belirteçleri açısından, bölgeler arası ve söz konusu bölgeler ile de sağlıklı bireylerden elde edilen stromal hücreler arasında bir fark olup olmadığı incelenmiştir. Takiben, osteojenik farklılaşma yapılan doku

kaynaklı stromal hücrelerden RNA eldesi yapılmış ve Osteopontin gen ifadenmesi açısından fark olup olmadığı polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile incelenmiştir.

Ayrıca, nörofibrom (dermal/pleksiform) ve hastalardan elde edilen farklı doku bölgelerinin yara iyileşmesi sürecindeki davranış farklılıkları incelenmiştir. Çalışmanın bu kısmında tüm örneklerden ve sağlıklı kontrolden geliştirilen, MSH kültüründe yara modelinin kapanma hızı ölçülmüştür. Ölçümler faz kontrast mikroskobu altında ve belirli zaman aralıklarında fotoğraf çekilerek gerçekleştirilmiştir. Ölçümler imageJ prgramı kullanılarak gerçekleştirilmiş ve sonrasında motilite indeksi hesaplanmıştır.

Schwann hücre-MSH ko-kültür deneylerinde ise, Schwann hücreleri, hastaların farklı doku bölgelerinden elde edilen MSH/Fibroblast ile aynı besi yeri ve ortamı paylaşabilecekleri şekilde kültüre alınmıştır. Schwann hücre hattı, taban kısmında, mezenkimal stromal hücreler de süzgeç hattında olacak şekilde kültüre edilen hücreler, kültür sonunda yapıştıkları yüzeyden kaldırılarak yüzey belirteç ve apoptoz yönünden test edilmişlerdir. Bu çalışma için akım sitometrik yöntem kullanılmıştır.

Özetle, bu tez çalışmasında, NF1'in, mezodermal dokuları tutması veya klinik bulguların (nörofibrom, kemik deformiteleri, yara iyileşmesinde yetersizlik, kanamaya yatkınlık, malignite eğilimi, CLS gibi) gelişimi ve seyirinde mezodermal komponentin önemli rolünün olmasından yola çıkılarak birçok dokunun stromal elemanlarından olan MSH'ler detaylı incelenmiştir. Dermal veya pleksiform alt tiplerinden birini ifade eden hastalarda normal, CLS ve nörofibrom olmak üzere farklı dokulardan elde edilen stromal hücrelerin detaylı karakterizasyonu yapılmış, gerek dokuların birbirleri arasında gerekse dermal ve pleksiform nörofibromlar arasındaki davranışsal farklılıklar araştırılmıştır. Literatürde daha önce hastaların normal dokusu karakterize edilen ve nörofibrom dokuları ile karşılaştırma yapılan benzer bir çalışmanın olmaması nedeniyle bu çalışmanın NF1 hastalığının mekanizmalarının aydınlatılmasına katkı sağlayabilir ve genotip-fenotip korelasyonunun belirlenmesine yardımcı olabilir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Nörofibromatozis Tip 1

Nörofibromatozis tip 1 (NF1), ilk kez 1793 yılında Tilesius tarafından kayıtlara geçirilmiş ve 1882 senesinde de Alman patolog Friedrich Daniel von Recklinghausen tarafından tanımlanmıştır. Elli yıl sonra, göz hastalıkları uzmanı olan Lisch, NF1'in klinik tanısında önemli bir kriter olan iris nodülleri varlığını göstermiştir (14). En yaygın genetik hastalıklarından biri olup 2500-5000 kişide bir rastlanır. Otozomal dominant olarak kalıtılmasına rağmen, olguların %50'si spontan mutasyon sonucu gelişmektedir (15). Bu bulgu, hastalığın görülme sıklığının zaman içinde artış gösterdiğine işaret etmektedir (16). İnsanda 17.kromozomda yerleşik olan Nörofibromin (*NF1*) geni, tümör baskılayıcı görevi görür ve p21-RAS sinyalizasyonunu kontrol eden GTPaz aktive edici protein (GAP) kodlar (17, 18). Gen ürünü olan nörofibromin'in kaybı ya da disfonksiyonu, sinir sisteminin gelişiminde aksamaya, hücre içi mitojenik sinyallerde ve beraberinde hücre proliferasyonu ve farklılaşmasında değişikliklere sebep olur (19). Bu şekilde oluşan nörofibromlar NF1'in major bulgularındandır. NF1 hastalarının çoğunda tümör oluşum mekanizmaları benzer olmakla beraber tümörlerin klinik spektrumu, gelişim esnasında nöral krest orijinli hücrelerde NF1'de görülen heterozigosite kaybının zamanlamasına ve bölgesel farklılığına (loss of heterozygosity) bağlı olarak değişkenlik gösterir (20-22). Nörofibromların tipik özelliği nöronal ve fibröz doku içerimleridir. Esas olarak Schwann hücrelerinden gelişen, içlerinde fibroblastlar, zengin damar yapıları ve mast hücreleri bulunduran kompleks tümörlerdir. Nörofibromlar ciltte dermal/kütanöz nörofibrom, CLS lekeleri veya pleksiform nörofibromlar ve Lisch nodülleri (iris hamartomları) ile karakterizedir (23).

2.1.1. Nörofibromatozis Tip 1 Patofizyolojisi

Nörofibrom gelişimindeki sebepleri içsel ve dışsal olarak ikiye ayırmak mümkündür (9). İçsel sebeplere bakıldığında, 17. kromozom üzerinde yer alan *NF1* geninde meydana gelen fonksiyon kaybı ile sonuçlanan mutasyonlar ve dermal ile

pleksiform nörofibrom arasındaki epigenetik farklılıklar gözümüze çarpmaktadır. MPNST gelişimi için, *NF1* gen inaktivasyonunun yanı sıra, TP53, PTEN, CDKN2A ve PRC2 tümör baskılayıcı genlerinin inaktivasyonu veya büyümeyi destekleyen EGFR veya PDGFR genlerinin aktivasyonundan söz edilmektedir (3, 16, 24). Son yıllarda üzerinde çok durulan indüklenmiş pluripotent kök hücre (iPSC) çalışmaları da içsel faktörlere ışık tutmaktadır. Örnek verilecek olursa, *NF1*^{-/-} hiPSC (human iPSC) hücrelerinin, *NF1*^{+/-} veya *NF1*^{+/+} hiPS hücrelerinden daha fazla RAS aktivitesine sahip olduğu ve SOX10, HOXB7 gibi nörofibrom belirteçleri ifade eden *NF1*^{-/-} hiPSC Schwann hücre öncülleri fare siyatik sinirine aktarıldığında ise pleksiform nörofibromlar meydana getirdiği saptanmıştır (9, 25).

Dışsal faktörler ise nörofibromun çevresindeki destek hücreler ve tümör mikroçevresinin yapısal bileşenleridir. Hem pleksiform, hem de dermal nörofibromlar, Schwann hücreleri haricinde, periferik sinirler, mast hücreleri, makrofajlar, fibroblastlar, kolajen ve endotel hücreleri ile çevrilidirler (26). Kolajen, nörofibromların yaklaşık %70'lik bölümünü oluşturduğu için mikroçevrenin en önemli bileşeni olarak kabul edilmektedir (27). Kolajen ipliklerinin oluşturduğu morfolojik görüntü, histopatolojik incelemede önemli bir tanı kriteridir. Brosseau ve ekibinin yapmış olduğu çalışma nörofibrom kaynaklı fibroblastların, kolajen ailesinin 28 alt tipinden özellikle tip 1, 3, 6 ve 15'i içerdiğini göstermiştir (28).

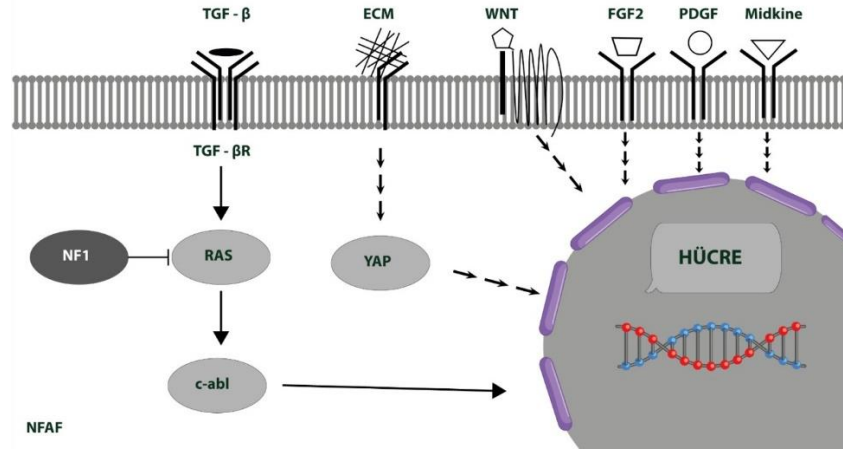
Çeşitli dokularda ifade edilen ve gelişimlerinde rol oynayan *NF1* geninde meydana gelen mutasyonlar sonucu kemik mezenkimal kök/stromal hücrelerin (MSH) farklılaşma süreci de etkilenmektedir. Otofajide büyük rol oynadığı bilinen mTOR sinyal yolağının *NF1* genindeki mutasyonlara bağlı olarak değişim gösterdiği ve böylece de nörofibromatozis tip 1'de kemik anomalilerine yol açtığı saptanmıştır (18, 29).

NF1 geni, 17q11.2de yer alan 350kb'lık bir gendir. Protein ürünü olan Nörofibromin, 320-kDa, 2818 aminoasitten meydana gelir ve Ras-GTPaz aktive edici proteinlerin bir grubu ile fonksiyonel homoloji gösterir. RAS yolağı mitojenik sinyalleri çekirdeğe iletir, nörofibromin ise bu yolda negatif düzenleyici olarak görev yaparak MEK/ERK ve PI3K'nın da dahil olduğu birçok mitojenik sinyali kontrol

eder. Bu işte *NF1*'in RasGAP (GTPase activating protein) ile ilişkili bölgesi görev alır ve Ras'ın GTP'ye bağlı aktif formundan GDP'ye bağlı inaktif forma dönüşmesini hızlandırır (22, 30). GTP-bağlı RAS da PI3K yolağını uyararak hücre proliferasyonu, sağkalımı ve hücre büyümesini uyarır. *NF1*, normal hücrede RAS aktivitesini dengeler, ancak nörofibromin kaybı, RAS'ın inaktif hale geçmesini engellediği için mitojenik sinyallerde ve beraberinde hücre proliferasyonu ve farklılaşmasında artışa sebep olur. *NF1* mutasyonlarının çoğu fonksiyon kaybı mutasyonlarıdır. *NF1*'de *NF1* geni ve sınırdaki diğer genleri kapsayan büyük delesyonlar ve translokasyonlar ile birlikte, yanlış anlam ve anlam kaybı meydana getiren mutasyonlar, çerçeve kayması ve uç uca eklenen mutasyonlar, insersiyon, delesyonlar görülmektedir. Bundan dolayı da *NF1* geni, tümör baskılayıcılar içerisinde yer almaktadır. *NF1* tümörlerinde nörofibromin kaybı sonucu RAS ve devamındaki MAPK/ERK sinyal yolları aktiftir. *NF1* geni, RAS'dan başka cAMP yolağı üzerinden de hücre proliferasyonunda rol oynar (16, 18, 30, 31).

Nörofibromlar, Schwann hücre tümörleri olarak bilinmekle beraber başlatan hücre tipi ve zamanlaması hakkında bilgiler yetersizdir (22, 32). Normal nöral hücrelerde Schwann hücreleri aksonlarla sıkı birliktelik göstermektedirler. Nörofibrom gelişiminde erken aşamasında Schwann hücresi-aksonal kontakt kaybında semaforin 4'ün rolü olduğu gösterilmiştir (33). Son zamanlarda, dermal ve pleksiform nörofibromların Schwann hücre gelişiminde ortak kökeni paylaştığı ve buradan yola çıkarak, kök/öncü hücrelerin rolüne değinilmekle birlikte kök hücredeki *NF1* inaktivasyonunun gelişim sırasında tümör oluşumu ile ilişkili olduğu ileri sürülmektedir (22, 34). Cram ve ekibinin yapmış olduğu bir çalışmada, nörofibromlar ve nörofibrom kaynaklı Schwann hücre öncülleri ile, olgun Schwann hücrelerinde, bir G protein coupled reseptör olan (GPCR) P2ry14 saptanmış ve bu genin delesyonunun düşük cAMP sinyalizasyonunu önlediği, fare deneylerinde ise hastalığın kliniğinde düzelleme sağladığı gösterilmiştir (35-37). Bu çalışma bir pürinerjik reseptör olan P2ry14'nin, cAMP sinyal yolağı üzerinden Schwann hücre yenilenmesi, proliferasyonu ve nörofibromin oluşumundaki önemine işaret etmektedir (35, 36, 38). Son yıllarda adından sıkça söz edilen, uyarılmış pluripotent

kök hücre (iPSC) teknolojisi ile pleksiform nörofibrom dokularından pluripotent hücre elde edilmiş, sonrasında ise elde edilen hücrelerin nöral krest ve Schwann hücrelerine farklılaştırılması sağlanmıştır. Söz konusu yöntemle hastalık modellenmesi, NF1 ile ilgili çalışmalar açısından önemli gelişme olmuştur (25).



Şekil 2.1. NF1’de görülen nörofibrom oluşumuna katkısı olan yollar özetlenmiştir. Kesikli ok ile gösterilen yollar nörofibrom oluşum mekanizmasında üstlendikleri roller açısından henüz tam olarak aydınlatılmış değildir. Jiang ve ekibi’nin 2021 yılına ait derlemesinden uyarlanmıştır (18).

Yapılan çalışmalar nörofibrom mikroçevresi ve sinir hasarı ile oluşan mikroçevrenin ortak özellikleri paylaştığını göstermiştir. Sinir hasarında gözlenen fibrotik cevapların moleküler düzenlenmesi nörofibromdakilere de ipucu sağlamaktadır. TGF- β yolağı, Wnt ve YAP/TAZ yolları hep birlikte organ fibrozisinde görev almaktadırlar (39).

Wehner ve ekibi, zebra balığında meydana getirdikleri omurilik hasarı sonrasında yenilenen aksonlara komşu olan fibroblast benzeri hücrelerde Wnt/ β -catenin yolağının aktive olduğunu göstermiştir (40). Wnt yolağının NF1’deki rolünü inceleyen çalışmalarda, pleksiform nörofibromlarda dermal nörofibromlara göre, 9 Wnt geninden 8’inin ifadesinde artış, 1 ‘inin ifadesinde ise azalma görülmesi ile belirgin şekilde düzensizliğe uğradığı, 20 Wnt geninin de MPNST biyopsileri ve hücre serilerinde ifadelenmesinde artış gözlemlendiği belirtilmiştir (41).

2.1.2. Nörofibromatozis Tip 1 'de Görülen Fenotipik Değişimler

Nörofibromin RAS ve MAPK sinyalizasyonlarının negatif düzenleyicisidir (42, 43). Gelişim sırasında *NF1*'in diğer lokusunda heterozigosite kaybı oluşması sonucu hem zamanlama, hem de bölgeye göre farklılık gösteren tümörler ve etkilenen hücre tipine göre farklı klinik bulgular gelişir (22).

Sütlü Kahve Lekeleri (Cafe au lait spots CLS)

Melanositlerdeki *NF1* geninin her iki alelde kaybı sonucu oluşan hiperpigmente (sütlü kahve renginde) değişimdir (44). *NF1*'li yenidoğanlarda %2,7 ve çocuklarda da yaşa göre değişmekle birlikte %90-100 arasındadır (45). CLS lekeleri *NF1*'in erken tanı kriterleri arasında yer almaktadır. Genel toplumun %10'nun vücudunda bir veya iki adet CLS lekesi oluşabileceği bilinmektedir. Vücudunda 3-5 adet CLS lekesi oluşan çocuklar, *NF1*'in diğer bulguları olmasa bile nörofibromatozis kliniğinde izlenmelidir (46). Yetişkinlerde fizik muayene ile hastalığa kolayca tanı konulabilirken çocuklarda CLS lekeleri uzunca bir süre hastalığın tek bulgusu olarak kalabilir. Beşten fazla CLS lekesinin görülmesi ve beraberinde çillenmenin olması *NF1* tanı kriterleri arasında en sık ve erken rastlanan bulgulardır.

Birkaç çalışmada, görünen herhangi bir nörofibrom olmadan sadece CLS lekesi ve çillenmenin olduğu *NF1* vakaları üzerinde durulmuş, 26 *NF1* hastası ile yapılan bir çalışmada, kodon 992'de (p.Met992del) meydana gelen üç baz çiftlik, tek amino asit içeren delesyonun çok hafif CLS lekelenmesine sebep olduğu, diğer bulguların ise hiç görülmediği bildirilmiştir (43, 47). Bu tip bir mutasyonun görülme sıklığı %0.9 olarak saptanmıştır. *NF1* geninin ekson 17 bölgesinde meydana gelen 3 baz çiftlik çerçeve delesyonu, kodon 991 veya 992'de bulunan iki komşu metioninin kaybı ile sonuçlanır, ki bu da nörofibrominin korunmuş bölgesinin ifadenmesini etkiler (48).

Lisch Nodülleri

Benign karakter gösteren tümörler (hamartomlar) olup, irisin yüzeyinde konumlanırlar (49). 84 NF1 hastasının incelendiği bir genetik çalışmada, çerçeve kayması mutasyonu görülen vakalarda Lisch nodüllerine rastlanma sıklığının daha fazla olduğu ortaya konmuştur (50). Ayrıca, Lisch nodüllerinin varlığının NF1'li bireylerde görülen koroidal anomaliler ile bağlantılı olabileceği de düşünülmektedir (51).

Nörofibromlar

NF1 hastalarında en tipik klinik bulgu periferik sinir sisteminde çocukluk çağı veya erişkin dönemde gelişen ve farklı özellikte olabilen tümöral oluşumlardır (18). Bunlar, kütanöz (dermal) nörofibrom, pleksiform nörofibrom, daha seyrek olarak da malign periferik sinir kılıfı tümörleridir (20).

Nörofibromlar NF1'in en sık rastlanan bulgusu olup Schwann benzeri hücreler, fibroblastlar, yoğun kolajen matriks, mast hücreleri, makrofajlar, sinirler ve diğer hücre tiplerini içeren benign tümörlerdir (52).

Nörofibromların ana bileşenlerinden biri olan fibroblastlar, bağ dokunun büyük çoğunluğunu meydana getirdiği gibi aynı zamanda hemen hemen tüm organlarda bulunmaktadır (11). Fibroblastlar kolajen gibi hücre dışı matriks üretiminde rol alırlar, bu özelliklerinden ötürü de doku devamlılığının sağlanması ve onarımına büyük katkıları vardır. Fibroblastlar birçok dokudan elde edilebildikleri gibi, kaynak aldıkları dokuya göre de gen ifadenmeleri ve ürettikleri hücre dışı matriks değişkenlik göstermektedir (53). Farklılaşmalarını tamamlamış olgun hücre olarak değerlendiriliyor olsalar da, fibroblastların uygun besi ortamı içerisinde adiposit, kondroblast ve osteoblasta farklılaşabildikleri gösterilmiştir (54). Bu özelliklerinden ötürü de yara iyileşmesi ile ilgili klinik çalışmalarda sıkça kullanılmaktadır. Friendstein, yüzeye yapışabilme ve klon oluşturma özelliklerinden ötürü fibroblastları, stromal hücrelere benzetmiştir (11). Literatüre bakıldığında, fibroblastların MSH'lerin bir alternatifi olduğu düşünülebilir, bu

noktadan hareketle bu tez çalışmasında hasta ve sağlıklı bireylerin dokularından elde edilen MSH'ler için MSH/Fibroblast tanımlaması kullanılmaktadır.

Dermal Nörofibromlar: Kutanöz nörofibromlar olarak da adlandırılan dermal nörofibromlar, genellikle dermis tabakasının içinden gelişirler ve bazan sayıları binleri bulabilen küçük tümörler meydana getirirler (2). Ciltte içerisinde periferik sinir sisteminden orijin alan, kenarları düzenli, kapsüllü olmayan ve hiçbir zaman malignleşmeyen nodüler yapılardır. Le ve ekibi, dermiste konumlanan öncül hücre popülasyonunu tanımlamıştır (16). *NF1* kaybı ile dermal nörofibromları meydana getiren bu hücrelere, cilt kaynaklı öncüler adını vermiştir (21). Erişkin *NF1* olgularının %99'unda dermal nörofibromlara rastlanır (55). Dermal nörofibromlar genellikle geç ergenlik veya erken yirmili yaşlarda, nadiren erken çocukluk döneminde gelişir, deride birbirinden ayrı lezyonlar halinde büyürler (41, 56). Nörofibromların sayısı bireyler ve aileler arasında değişkenlik gösterebilir (41, 57). Yaş ilerledikçe sayıları artar, 10-1000'leri bulabilir. Nörofibromlarda farklı hücre tipleri bulunur: Schwann hücreleri, endonöral fibroblastlar ve infiltre eden immün sistem hücreleri, sinir aksonlarıyla birlikte kolajenden zengin yoğun hücre dışı matriks içerisindedir. Dermal nörofibromlar, Schwann hücrelerinde *NF1* tümör supressör genin iki alelinin de inaktivasyonu sonucu oluşur; diğer selüler komponentler *NF(+/-)* olup bunların *NF(-/-)* Schwann hücreleri ile interaksiyonunun nörofibrom oluşumunu uyardığı bildirilmiştir (58).

Bilindiği üzere, nörofibromların bir başka önemli bileşeni de fibroblastlardır. Bu özelliklerinden ötürü, *NF1*'de görülen nörofibromlardaki fibroblastlara özgü işaretleyicilerin arayışına girilmiş, bu fibroblast popülasyonunun heterojen olduğu bulgusu ile karşılaşmıştır. Örneğin nörofibromlardaki fibroblastlar, organ fibrozisinde görev alan aktif miyofibroblastların belirteci olan, "alpha smooth muscle actin"i (α SMA) ifade etmezler (28, 59). Daha çok normal deri fibroblastlarına benzerlik gösterirler (28). Normal deri fibroblastları ise, gelişim esnasında, papiller dermal ve hipodermal olmak üzere 2 seriden köken almaktadırlar. Papiller dermal fibroblastik seri saçların uzamasını düzenler, diğer dermal fibroblastlar da çoğunlukla hücre dışı matriksin sentezlenmesinden sorumludur (60). Dermal

fibroblastların karakterizasyonunun nörofibromlardaki fibroblastların kökeni ve dermal/pleksiform nörofibromlar arasındaki farklara ışık tutabileceği düşünülebilir (18).

Nörofibromatozis Tip 1 hastalarında p.Met992del, p.Arg1809 yer değiştirmesi ve p.Arg1038Gly mutasyonlarının varlığı orta düzeyde bir fenotip sergilenmesine neden olur, bu tip hastalarda dermal nörofibroma rastlanmaz. Buna karşılık, NF1 tanısı almış vakaların %5-10'luk kısmında görülen, *NF1* geni üzerinde ve 17q11.2 komşuluğundaki bölgelerde meydana gelen mikrodelesyonlar ise daha şiddetli bir tabloya neden olurlar (2, 61, 62). 2017 yılında Kehrer-Sawatzki ve ekibinin yapmış olduğu derlemede NF1'de görülen ve büyük bir genom bölgesini içine alan delesyonlar, *NF1* geninin yanı sıra, genin komşuluğunda görülen mikrodelesyonları da içine alacak şekilde tanımlanmıştır (61). Delesyonlar, atipik de dahil olmak üzere, tip 1, tip2 ve tip 3 olarak, delesyonun büyüklüğü ve kırılma noktalarının yer aldığı bölgenin konumuna bağlı olarak isimlendirilmektedir (63, 64). En sık görülen tip 1 *NF1* delesyonlarının, 1.4 Mb'lık bir gen bölgesini içine aldığı ve 14 adet protein kodlayan gen bölgesi ile 4 adet mikroRNA genini içermekte olduğu rapor edilmiştir. Çoğu tip 1 *NF1* delesyonu maternal mayozis sırasında kromozomlar arası allelik olmayan homolog rekombinasyon (NAHR) sonucu meydana gelmektedir (65, 66).

NF1 gen delesyonlarının yaklaşık %10'u tip 2 delesyonlardır. Tip 2 *NF1* delesyonları da sıklıkla post zigotik kökenli olup, mitotik NAHR ile ilişkilidirler (67, 68). Bu özelliklerinden ötürü delesyon görülmeyen normal hücrelerdeki somatik mozaizm açıklanabilmektedir (68-70).

Tip 3 *NF1* delesyonlarına ise çok ender rastlanmakta olup, 1.0 Mb'lık bir genom alanını içine almaktadır. Hastaların yaklaşık %1-4'ünde gözlenen Tip3 *NF1* delesyonlar, 9 adet protein kodlayan gen içermektedirler (61, 71, 72). Adından da anlaşılacağı üzere, atipik *NF1* delesyonları kapsadıkları bölge ve içerdikleri genler açısından oldukça heterojen olup, belirli bir kırılma bölgesi içermemektedirler (52). *NF1* delesyonlarının %8-10'unun atipik olduğu rapor edilmiştir (73, 74). Germ hattı mutasyonları olarak sınıflandırılabilirliği gibi, post zigotik kökenli de

olabilmektedirler (75, 76). Atipik *NF1* delesyonları sadece etkiledikleri gen bölgesinin genişliği açısından heterojen olmayıp, aynı zamanda altta yatan mutasyonel mekanizmalar açısından da oldukça karmaşıktırlar (76). Geniş bir alanı içine alan *NF1* delesyonlarının alelik olmayan homolog rekombinasyon aracılığıyla gerçekleştiği, Bengesser ve ekibinin 2010 yılında yayınladıkları makalede de ele alınmıştır (71). Bu çalışmada 20 tip1 *NF1* delesyonu görülen germ hattı incelendiğinde, kırılma bölgelerinin komşuluğunu da kapsayan gen değişimlerinin alelik olmayan homolog rekombinasyon aracılığıyla gerçekleştiği rapor edilmiştir (61, 71). Bu bulgulara ek olarak, tip2 *NF1* delesyonu olan 32 örneğin 31'inde gen değişimi saptanmış olup, mayotik tipteki tip 1 *NF1* delesyonunun aksine, tip 2 *NF1* delesyonunun çoğunlukla post-zigotik kökenli olduğu gözlenmiştir (61). Dermal nörofibromlar, *NF1*'de en sık rastlanan ortak bulgu olmalarına rağmen bu fenotipe özgü temel genetik değişim henüz aydınlığa kavuşturulmuş değildir. Dermal nörofibromlar malign değişime uğramazlar, ancak kozmetik sorunlara, geçici ağrı ve kaşınmaya neden olabilir ve eksize edilmeyi gerektirebilirler (77). Mutasyonların tanımlanması, genotip-fenotip korelasyonunun aydınlatılması tümör oluşumunu, tümör tiplerindeki değişkenliği, yoğunluk, boyut ve büyüme hızlarındaki farklılıkları açıklamaya yarayabilir (2).

Pleksiform nörofibromlar: *NF1* hastalarının %20-50'sinde görülmektedirler. Genellikle dermal nörofibromlardan daha büyük olup, onların aksine önemli morbiditeye neden olurlar; belirgin görüntü ve -yerlerine göre- işlev sorunlarına yol açabilir, malign tümörlere de dönüşebilirler. Periferik sinirler boyunca büyür, çevredeki yumuşak dokuyu infiltre ederler ve daha nadir olarak o bölgede kemik hipertrofisi gözlenebilir (57). Pleksiform nörofibromlar konjenitaldirler. Gelişim esnasında nöral krest hücreleri periferik sinirler boyunca göç ederler, bu esnada hücrelerin bir alt grubu Schwann hücre dizisine farklılaşır ve pleksiform nörofibromlar genellikle embriyonik Schwann hücre serisinden köken alırlar (41, 78). Erken çocukluk ve hamilelik dönemleri hariç, yavaş büyüme gösterirler (79). Buldukları bölgeye göre deformasyon, komşu organlarda sıkışma, ağrı ve fonksiyonel hasar oluşturabilirler (80, 81). *CDKN2A/ARF* ve *CDKN2B* tümör

baskılayıcı genlerin ifadenmesini etkilemesinden ötürü, ANRIL modifikasyonunun pleksiform nörofibromların sayısı ile ilişkili olduğu düşünülmüştür (82). Söz konusu ifadenme hücre döngüsünü etkilemekte ve pleksiformlarda apoptozisi baskılamaktadır (82-85). Li ve ekibinin yaptığı bir çalışmada da *Runx1*'in rolü üzerinde durulmaktadır (2). Çalışma, *Runx1*'in tümör baskılayıcı gen ve aynı zamanda da *NF1*'de nörofibrom oluşumunun başlatılmasında baskın onkogen olması dolayısıyla bir paradoks ortaya koymaktadır. Fare modellerinde *Runx1*'deki bu ifade artışının Schwann hücre öncüllerinde ve nörofibromlarda meydana geldiği, *Runx1*'in ifadenmesi inhibe edildiğinde nörofibromların sayılarında azalma meydana geldiği saptanmıştır. *RNF43* gibi diğer genlerin veya *Wnt/β-katenin* gibi moleküler yolların da pleksiform nörofibromların tümörenezinde rol oynadıkları düşünülmektedir (86-88).

Dermal ve pleksiform nörofibromların arasındaki bu farklılıklar, öncül hücrenin tipi ile olduğu kadar, aynı zamanda da somatik mutasyonların zamanlaması ile ilişkilidir. Pleksiform nörofibromların %10 kadarı malign forma, malign periferik sinir kılıfı tümörlerine (MPNST), dönüşebilmektedirler. MPNST'ler konvansiyonel terapilere dirençli olabildiklerinden ötürü kötü prognoz taşırlar (bkz 2.1.4) (9, 10).

Malignansi oluşumunda RAS yolağının tümör baskılayıcı mekanizmasının bozulması, *PTEN*, *TP53*, *CDKN2A* inaktivasyonu ya da platelet-kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) veya epidermal büyüme faktör reseptörü amplifikasyonu gibi ek bozukluklar rol oynar (3, 16, 24).

Son yıllardaki klinik gelişmeler dermal nörofibrom ile pleksiform nörofibromların yerleşim yerleri ve oluşumlarındaki zamanlamaları hakkında farklı hücresel kökenleri desteklemektedir (22). Zhu ve ekibinin fareler üzerinde yapmış olduğu çalışmada Schwann hücre serisinde *NF1* geninin Cre/LoxP delesyonunun pleksiform nörofibrom gelişimine neden olduğu gösterilmiştir (89). Ayrıca, etrafındaki destek hücrelerde görülen *NF1* heterozigositesinin de tümör gelişiminden sorumlu olabileceği Li ve ekibi tarafından gösterilmiştir (22).

Pleksiform nörofibromların gelişimi üzerinde duran birkaç araştırmacı grubu, geliştirdikleri Cre rekombinaz fare modellerinde yaptıkları deneyler sonucunda *NF1* geni ifadesi olmayan nöral krest hücrelerinin tümör oluşumu gözlenen alanlarda yer almadıklarını, bununla birlikte pNF veya MPNST gelişiminde de gerekli olmadıklarını gözlemlemişlerdir. POa-Cre knockout fare modellemesi ile Schwann hücre öncüllerindeki *NF1* kaybının pleksiform nörofibromların oluşumunda etkin rol oynadığı gözlenmiştir (22, 32, 58).

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda nöral krest kökenli bir başka populasyon olan ve "boundary cap" adı altında tanımlanan sınır kapak hücrelerinden bahsedilmektedir (90). Söz konusu hücreler, erken gelişim esnasında periferik sinirlerin giriş ve çıkış noktalarında yer almaktadırlar (91). Radomska ve ekibinin deneylerinde, Prss-56 (+) sınır kapak hücrelerinde embriyonik *NF1* aktivasyonu olan yeni bir fare modeli geliştirilerek dermal nörofibrom oluşumu gösterilmiştir. Aynı zamanda bu modelde pleksiform nörofibrom oluşumu da gözlemlenmiştir. Çalışma sonuçları bahsi geçen sınır kapak hücrelerinin, dermal ve pleksiform nörofibromlara köken oluşturabileceklerini düşündürmektedir (92).

Aynı sıralarda Chen ve ekibinin (2019) farelerde yaptıkları deneylerde de, göç edebilen nöral krest hücrelerinden köken alan HOXB7 pozitif hücrelerde *NF1* delesyonunun deride hiperpigmentasyona, ve hem dermal, hem de pleksiform nörofibromların gelişimine neden olduğu gözlenmiştir (34). Ek olarak bu çalışmalarda, tüm ekson sekanslama ile Hippo yolağının da nörofibromatozisi karakterize eden bulgularla ilintili olan MAPK sinyalizasyonunu tetikleyen ana etmenlerden olduğu ortaya konmuştur (9, 34).

Kas-iskelet sistemi bozuklukları

Nörofibromin proteini, başta nöral krest kökenli dokular ve tümörler olmak üzere birçok doku ve hücrede ifade edilmektedir. *NF1*'de çoğunlukla nörokutanöz bulgular üzerinde durulsa da, kas-iskelet sisteminin de hastalık sürecinde etkilendiği bilinmektedir (93, 94). Nörofibromin proteini, MSH ve hematopoetik sistemde de ifade olmaktadır. *NF1* geninde meydana gelen mutasyonlar, RAS sinyalinde artışa

neden olmakla birlikte, kemik yapım ve onarımında bozukluğa neden olur (93). Nörofibromin, osteoprogenitör hücrelerde, kondrositlerde, osteoblastlarda ve osteoklastlarda ifade edilir.

Kemik lezyonları, NF1'in neredeyse %50'sinde görülmektedir, skolyoz, osteoporoz, kafatası kemiklerinde ve tibia gibi uzun kemiklerde displaziler, pseudoartrozlar sık rastlanan bulgulardır (95, 96). Nörofibromin etkinliğindeki azalma kemik yenilenme sürecinde, kalsiyum homeostazında, kemik mineralizasyonunda bozukluklara sebep olabilir. Çok sayıda (n=365) NF1 hasta örneği ile yapılan bir çalışmada tüm gen delesyonları ve çerçeve kayması mutasyonlarının, skolyoz ve sfenoid kemik displazileri dahil olmak üzere çeşitli iskelet anomalileri ile ilişkili olduğu sonucuna varılmıştır (97). Bu bulguların TGF- β , RAS/ERK, JNK ve mTORC1 sinyal yollarının hiperaktivasyonu ile bağlantılı olduğu düşünülmektedir (98-101). Ayrıca, vitamin D ve reseptörü VDR'nin her ikisinin de kalsiyum miktarı ve kemik yoğunluğu ile ilintili olduğu, NF1 hastalarında tümör oluşma oranındaki artış ile serumda azalma gösterdiklerine dair veriler mevcuttur (94, 102). Bu veriler NF1'de görülen ortopedik bozuklukların tedavisi ile ilgili olumlu gelişmelere ışık tutabilir.

Son yıllarda gerek insan, gerekse hayvan modelleri üzerinde yapılan araştırmalar, NF1'de gözlenen iskelet problemlerinin altında yatan moleküler temeli aydınlatmaya yöneliktir (102). Nörofibromin kaybının kemik fonksiyonu üzerine etkisi insan çalışmalarında henüz tam olarak aydınlatılmamış olup konu hakkındaki güncel bilgiler hayvan modellerine dayanmaktadır. NF1, konjenital psödoartroz dahil, birçok iskelet anomalisi ile karakterize bir hastalıktır (103, 104). Özellikle tibial psödoartroz ve sfenoid kanat displazisi gözlenir. Tibia başta olmak üzere uzun kemiklerde görülen eğilmeler, psödoartrozlar, distrofik ve distrofik olmayan skolyoz, osteopeni, kırılmalara eğilim, göğüs duvarı anomalileri sayılabilir (95, 104, 105). NF1'de görülen kas-iskelet sistemi tutulumundaki bu çeşitliliğin, çoklu organ sisteminde artış gösteren RAS sinyalinden etkilenen hücre tipinin çok olmasından ileri geldiği düşünülmektedir (98). NF1 tanısı almış çocuk vakaların %2-3'ünde gözlenen kemik defektlerinin, hasarlı osteoblast fonksiyonu ve artmış osteoklast

aktivitesi ile ilişkili olduğu gözlenmiştir (106). Ayrıca osteogenik farklılaşma bozukluğunun MSH kaynaklı olduğu da gösterilmiştir. Wang ve ekibi tarafından gerçekleştirilen çalışmada, her iki allelde de *NF1* geni eksik olan farelerle yapılan, çalışmada meydana gelen kemik anomalilerinin mezenkimal seri ile ilişkili olduğu ve *NF1* geninin süreçteki rolü üzerinde durulmuştur (98).

Kanamaya Yatkınlık, Yara İyileşmesinde Gecikme

NF1 hastalarında sık görülen kemik defektlerinin yanı sıra hastalarda kanamaya yatkınlık, yara iyileşmesinde gecikme de yer almaktadır. Bu klinik bulgularda MSH'lerin doğrudan veya kemik, endotel, fibröz doku üzerine etkileri ile dolaylı şekilde rol aldığı düşünülebilir. Stromal karakterde destek hücreleri olan MSH'ler çeşitli büyüme faktörleri, sitokin, kemokinler salgılayarak veya diğer hücrelerle (örn. tümör hücresi, endotel, epitel) direkt ilişkileri yoluyla hücrelerin biyolojik davranışlarını (proliferasyon, apoptosis, migrasyon) etkiler (107).

NF1 hastalarında özellikle ameliyat sonrası iyileşmelerde, fibrozis sık rastlanan sorunlar arasındadır. Fibrozisi hedef alan etkin terapilerin geliştirilmesi için nörofibromlardaki fibroblastların patogenezinin altında yatan moleküler mekanizmaların aydınlatılmasına ihtiyaç vardır. TGF- β sinyal yolağı, *NF1* de dahil olmak üzere birçok patolojik oluşumdaki fibrozisin ana düzenleyicisi konumundadır. *NF1* hastalarında artan fibrozis ile birlikte, TGF- β plazma düzeyinin de arttığı gözlenmiştir (108). TGF- β ile birlikte c-abl tirozin kinazın aktivasyonuna bağlı olarak nörofibromlardaki fibroblastlarda fibrotik cevap artar (109). Buna ek olarak *NF1* geni ifade etmeyen neoplastik Schwann hücrelerinde FGF2, PDGF ve Midkine'nin aşırı salgılandığı, bu salgılanan faktörlerin de nörofibromlardaki fibroblastların patolojik fonksiyonlarını düzenledikleri düşünülmektedir (18, 110) (bkz. Şekil 2.1)

Mezodermal kökenli dokuları tutan bozukluklardan yola çıkılarak, bu çalışmada *NF1*'de MSH/Fibroblastların karakterizasyonu, etkilerinin belirlenmesi ve sağlıklı kontrol MSH/fibroblast ile karşılaştırılması amaçlanmıştır.

2.1.3. NF1'de Görülen Diğer Klinik Bulgular

Wang Wei ve ekibinin 2021 yılındaki yayınından uyarlanan şekilde (1) (bkz. Şekil2.2) de özetlendiği gibi Nörofibromatozis Tip 1 birçok farklı klinik bulgu ile birlikte seyreden bir hastalıktır. Örneğin, çocukluk çağında kemiklerde aşırı büyüme görülebilir. Bu, *NF1*'in 17q11.2 gen bölgesinde mikrodelesyon ile ilişkili, az rastlanan bir durumdur (111). Mikrodelesyonu olan çocuklarda boy ve vücut ağırlığı mikrodelesyonu olmayanlara göre daha fazladır. Bunun yanı sıra, REP135'in dahil olduğu NF1-REPa ve REPb bölgelerinin mikrodelesyonları, uzun boy, makrosefali gibi sonuçlara yol açmaktadır (112, 113).

NF1 hastalarında ayrıca, kardiyovasküler sorunlara da rastlanmaktadır. Buna neden olarak, kalp gelişimini etkilemesinden ötürü ADAP geni aday gösterilmektedir (114). Özellikle *NF1* geninde mikrodelesyon görülen vakalarda gen içi mutasyon taşıyan hastalara oranla daha sık kardiyovasküler sorunlarla karşılaşmaktadır. Bu noktanın aydınlatılması amaçlı Venturin ve ekibinin yapmış olduğu çalışmada, ADAP2, SUZ12 ve UTP6 olmak üzere üç aday gen üzerinde durulmuştur. Söz konusu çalışma, ifadenme profilini aydınlatmak amaçlı fare embriyoları ve fonksiyonel özelliklerin aydınlatılması için de zebra balığı üzerinde yapılmıştır. Üç aday gen için fare embriyoları üzerinde yapılan in-situ deneyler ADAP2 geninin kardiyak gelişimdeki rolünü ortaya koyarken, aynı gen için zebra balığında da fonksiyon kaybı deneyleri gerçekleştirilmiştir. Fare embriyolarındaki ADAP2 geninin zebra balığındaki karşılığı olan adap'nin fonksiyon gösterememesi sonucunda ise, kapakcıkta hasar meydana geldiği tespit edilmiştir. Deneyden elde edilen sonuçlar, ADAP'nin kalp gelişimindeki rolüne dikkat çektiği gibi *NF1* mikrodelesyonu olan hastalarda görülen kardiyovasküler sıkıntılarının temel nedeni olabileceğini de düşündürmektedir (114).

NF1 hastalarında kardiyak anomaliler, dismorfizm veya öğrenme güçlüğü görüldüğünde *NF1* geninde meydana gelmiş olası mikrodelesyonlar üzerinde durulmalıdır.

Öğrenme Güçlüğü ve Diğer Bilişsel Sorunlar

Öğrenme güçlüğü NF1'de en sık görülen bilişsel sorundur. NF1 tanısı almış çocukların yaklaşık %50-75'inde özellikle matematik ve okuma dersleri olmak üzere akademik başarıyı etkileyecek düzeyde öğrenme güçlüğü görülür (115, 116). Dikkat eksikliği, hiperaktivite, zihinsel yetersizliği ve motor beceri azlığı diğer bilişsel sorunlar arasında yer almaktadır (117).

Malign Periferik Sinir Kılıf Tümörü

Nörofibromatozis 1, tümör eğilimi gösteren bir hastalık olarak sınıflandırılır. NF1 hastalarının hayatları süresince MPNST geliştirme riski %8-13 oranındadır (118). Bu malign neoplazmların çoğu da pleksiform nörofibrom kökenlidir. Pleksiform nörofibromlar önce atipik özellik kazanırlar ki bu aşama pre-malign dönem olarak düşünülebilir, daha sonra MPNST özelliği kazanırlar (119). Tüm MPNST'lerin yarısı izole olarak ortaya çıkarken, yarısı da NF1 tanısı almış bireylerde oluşur. Pleksiform nörofibromdan MPNST dönüşümü için *NF1* geninin kaybı gerekli olmakla birlikte yeterli değildir. *NF1* geninin her iki alelinde de inaktivasyon meydana gelmiş olduğu gözlenmekle birlikte, ek genetik lezyonların da malignite gelişiminde gerekli olduğu saptanmıştır (41). Örneğin, *NF1* geninin 844-848 kodonlarında meydana gelen yanlış anlamlı mutasyonlar, erken yaşlarda pleksiform nörofibrom oluşumunu hızlandırmakta, MPNST oluşum riskini de arttırmaktadır (120). Bunun yanı sıra, *NF1* geninin her iki alelde de inaktive olduğu durumda, TP53/p53 gen inaktivasyonu, CDKN2A/p16 gen delesyonu ve PTEN kaybının da atipik nörofibromun MPNST'ye dönüşmesine katkı yapabileceği bilinmektedir (121-123).

Optik Glioma

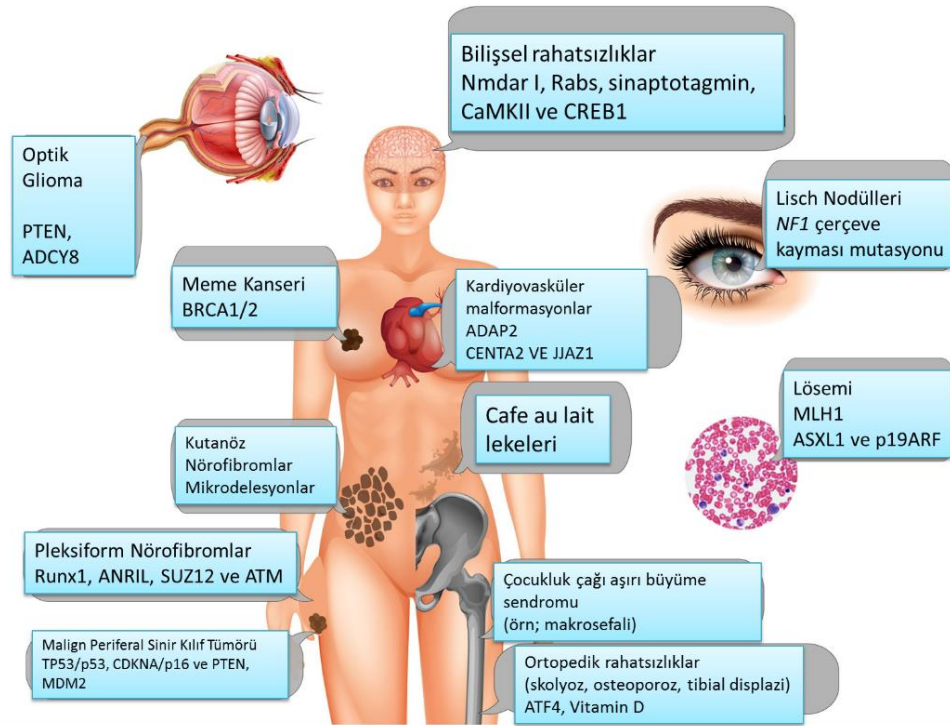
Optik yolak gliomaları, NF1 tanısı almış küçük çocukların %15-20'sinde görülmektedir (124). Özellikle 7 yaşın altındaki çocuklarda bu lezyon, optik yolağı ve görmede azalma, bir ölçüde kaybı ile sonuçlanabilir (125). *NF1* geninin 13.eksonunda meydana gelen anlamsız mutasyonunun optik sinir kalınlaşmasına yol

açabildiği gösterilmiştir (126, 127). Buna ek olarak *NF1* geninin 5' ucunda oluşan mutasyonların da optik glioma gelişiminde rol oynadıkları bilinmektedir (128).

NF1'de beyinde de glial tümörler gelişebilmekte, çeşitli nörolojik bulgulara yol açabilmektedir. Nörofibromların cerrahi olarak çıkarılması işlev ve görünüm açısından iyilik sağlayabilmekte, ancak *NF1* hastalarında tekrarlayan cerrahi işlemler gerekebilmektedir (129).

Nörofibromatozis Tip 1'e Eşlik Eden Diğer Malign Hastalıklar

Nörofibromatozis Tip 1'in, nörofibroma ve gliomaların yanı sıra, meme kanseri ve lösemi gibi malignitelerle de ilişkisi olabileceği düşünülmektedir. Lösemi insidansı normal popülasyona göre fazladır. Kronik Myeloid Lösemi (KML) %6,7, meme kanseri %2,3 olmak üzere *NF1* tanısı almış bireylerin %4'ünde kanser gelişimi rapor edilmiştir (130). Sağlıklı kadınlara oranla, *NF1* tanısı almış kadınların meme kanserine yakalanma riskleri iki kat daha fazladır (131) Bu risk 50 yaş üstü kadınlarda 5 katına kadar çıkmaktadır (132-134). Bunların yanı sıra, gastrointestinal stromal tümörler de Nörofibromatozis tip 1'e eşlik eden diğer kanser tipleri arasındadır (135-137). *NF1*'de görülen tüm sorunlar Şekil 2.2' de gösterilmiştir.



Şekil 2.2. *NF1* geninde meydana gelen mutasyonların, Nörofibromatozis Tip 1’de görülen sorunlar ile ilişkisi (Wang Wei ve ekb. 2021, *Frontiers in Neurology* yayınından uyarlanmıştır) (2).

2.2. Schwann Hücreleri

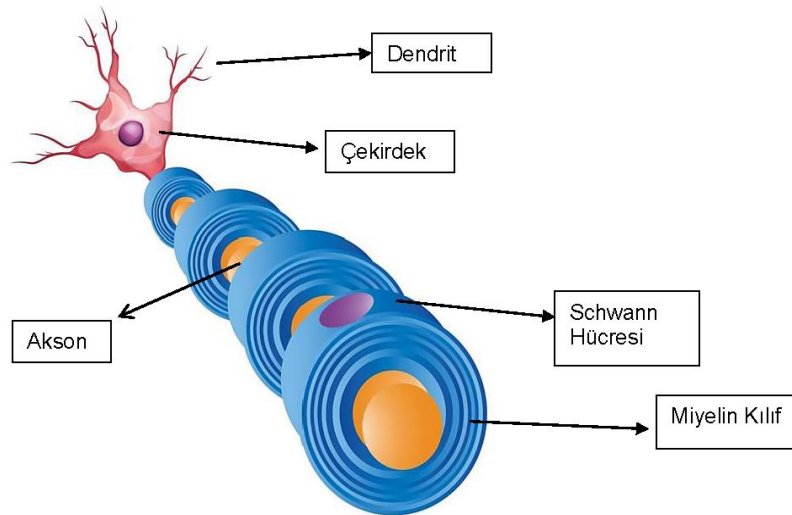
Nörofibrom dokularında Schwann hücrelerinin anormal proliferasyonunun gösterilmesiyle bu hücrelerin *NF1* başlatıcı rolünün üzerinde durulmaya başlanmış ve *NF1* heterozigot olan fare hücrelerinde diğer allelin kaybı sonucu pleksiform nörofibrom oluşturulmasıyla Schwann hücrelerin bu hastalığındaki önemi ortaya çıkmıştır (138, 139). Schwann hücreleri periferik sinir sisteminin glial hücreleridir (140). Santral sinir sistemindeki oligodendrositlerin analogu sayılırlar. Nöronları desteklemenin yanında uydu hücreler, burunda yer alan koku organındaki kılıf hücreler, bağırsak kökenli glia ve duyu sinirleri etrafındaki gliaya destek verirler. Miyelinli veya miyelinsizdirler. Şekil 2.3’de de gösterildiği gibi, miyelinli Schwann hücreleri motor ve duyu sinir aksonlarını sarar ve miyelin kılıf oluştururlar. (bkz: Şekil 2.3)

Schwann hücreleri periferik sinir biyolojisinde çeşitli rollere sahiptir. Bunlar arasında, aksonların miyelinizasyonu, akson boyunca sinir uyarılarının iletimi,

hücresel atıkların temizlenmesi, nöron gelişimi, tamiri, nöronların beslenmesine destek sağlanması, nöronların hücre dışı matriksinin üretimi, hem sinir hem de kas dokusunun özelliklerine sahip olan sinaptik aktivitenin düzenlenmesi ve T lenfositlere antijen sunumu, yer almaktadır.

Miyelinsiz Schwann hücreleri de aksonların idamesinde önemlidir, nöron yaşamı için gereklidir. Schwann hücre gelişiminde, transkripsiyon faktörü olan Sox10, Oct-6, Schwann hücre öncüllerinin çoğalması, yaşamını sürdürmesi için de neuregulin (NRG1)'in önemi bildirilmiştir (141-143). Diğer taraftan "miyelin protein zero" (P0) Schwann hücre öncüllerinde ifade olunan bir proteindir. Miyelinizasyon sürecinde ifade olan transkripsiyon faktörü Krox-20' da periferik sinir sistemi miyelinizasyonunun başlıca düzenleyicisi olup eksikliğinde Schwann hücre-ilişkili aksonların miyelinizasyonunun bozulduğu gözlenmiştir.

Schwann hücreleri aksonları yalıtım edici özelliklerinin yanı sıra periferik sinir sisteminde akson hasar onarımında da önemli rol üstlenmektedirler. Nöron hasarına cevap olarak hızla fenotip değişimine uğramakta ve aksonun yeniden gelişimi için uygun ortam oluşturmaktadırlar. Aksonal hasarı önleyen olmalarının yanı sıra, hasar yükü fazla olan aksonları küçük parçalara bölerek direkt Schwann hücrelerinin kendisi veya makrofajlar tarafından temizlenmesini sağlayarak hücre sağ kalımına da önemli katkıda bulunmaktadır (123).



Şekil 2.3. Periferik sinir üzerinde Schwann hücrelerinin yerleşimi görülmektedir. Chen ve ekibinin 2021 yılı yayınından uyarlanmıştır (144).

Genel olarak kanser biyolojisinde kanser gelişimini başlatan hücre tipi günümüzde de hala netlik kazanmış değildir (145). Birçok farklılaşmış dokuda, dokunun devamlılığını sağlamak amaçlı kendini yenileme ve farklılaşma özelliği gösteren kök hücre bulunmaktadır. Söz konusu bu hücreler, sayıca azalma gösterebilir de varlıklarını hayat boyu sürdürmektedirler (146). Kansere neden olan mutasyonların, uzun ömürlü olduklarından ötürü kök hücrelerde biriktiği düşüncesine ek olarak, kendilerini yenilme özellikleri nedeniyle, kök hücrelerin kanser gelişimine zemin hazırladığı hipotezler arasındadır (147). Bir başka olasılık da, kanser gelişiminin çok aşamalı bir süreç olduğu yönündedir. Bu yaklaşıma göre, mutasyonlar kök hücrelerde birikim yapabilir ancak kontrolsüz çoğalma öncül hücrelerde başlamaktadır (148, 149). Şunu da belirtmek gerekir ki, bu bulgular fare modelleri kullanılarak elde edilmişlerdir. Söz konusu aşamaların insandaki biyolojik karşılığı belirsizliğini korumaktadır (150).

Kanserin biyolojik özelliklerinin belirlenmesinde köken aldığı hücre tipinin de büyük önemi olduğu bilinmektedir (150). Nörofibromatozis Tip 1'de görülen tümör hücresinin Schwann hücre serisinden geliştiği yönünde birçok kanıt gösterilmiş olsa da, tümör hücresinin Schwann hücre gelişimi sırasında tam olarak ne zaman ortaya çıktığı bilinmemektedir (9, 32, 123). Schwann hücreleri göç yeteneği olan, multipotent nöral krest kök hücrelerinden gelişmeye başlar (151). Önce immatür, sonra da matür Schwann hücrelerine farklılaşma görülür. Bu matür hücreler, aksonlar etrafında miyelin kılıf meydana getiren ve miyelin yapmayan gruplara ayrılabilirler. Bunların yanı sıra Schwann hücrelerinin multipotent potansiyellerinden ötürü melanositlere ve fibroblastlara da farklılaşabildikleri gösterilmiştir (9, 22, 32, 143, 152). *NF1* mutasyonlarının, tüm bu farklılaşmaların hangi aşamasında oluştuğu Zhu ve ekibince, Krox20-cre transgenik farelerde, embriyonik gelişimin 10.5 gününde, kranial ve spinal sinir kökerinde pleksiform nörofibrom gelişimi ile incelenmiştir (89). Ancak yine de, LOH meydana gelmesi için, ikinci mutasyonun oluşma zamanına göre nörofibrom fenotip ve davranışının değişip değişmediği araştırılmaya açık konulardır.

2.3. Mezenkimal Kök/Stromal Hücreler

Mezenkimal kök/stromal hücreler (MKH/MSH), çeşitli hücre tiplerine farklılaşabilme, hasarlı dokulara migrasyon, hücre:hücre, hücre:matriks adezyon ilişkilerini destekleme, çözünür faktörlerin salgılanması (büyüme faktörleri, sitokinler, kemokinler, hücre dışı vezikül/eksozomlar) fonksiyonları, anti-apoptotik, anjiojenik özellikleri, ayrıca hasarlı hücrelerle füzyon yapma, organel transferi (örn. mitokondri) özellikleri nedeniyle de rejenerasyonda başı çeken hücreler olarak öne çıkmaktadır (13, 54). MKH'lerin farklı mekanizmalarla immün sistemden kaçış göstermeleri de *in vivo* uygulamalar için avantaj sağlamakta, doku uyumu gereğini ortadan kaldırmaktadır (13, 153).

Kemik iliğinde, iskelet doku hücrelerine farklılaşma özelliği taşıyan stromal hücrelerin varlığı eski yıllara dayanmakta, kemik iliğinin heterotopik anatomik bölgelere verilmesi sonrası ektopik kemik ve ilik dokularının geliştiği deneylerle desteklenmektedir. Kemik iliğinde fibroblastoid ve aderan özellikteki non-hematopoetik hücrelerin, kan elemanlarının gelişimine ve fonksiyonlarına destek olduğu, ayrıca kemik, dokusuna farklılaşabilme potansiyeli taşıdığı gösterilmiş, Friedenstein ve Owen tarafından bu hücreler "osteojenik kök hücre" veya "kemik iliği stromal kök hücresi" olarak adlandırılmışlardır (154). Daha sonra, bu hücrelerin kemik dokusu yanında yağ dokusu ve kıkırdak dokusuna da farklılaşabildiği gösterilmiş, ardından Caplan tarafından "mezenkimal kök hücre" olarak adlandırılmışlardır (155).

Mezenkimal kök hücreler mezoderm kökenli olup, kendini yenileme özelliklerinin yanı sıra adiposit, osteosit, kondrosit gibi diğer hücrelere farklılaşabilme özelliklerinden ötürü multipotent farklılaşma kapasitesine sahip erişkin kök hücre gruplarından biri olarak tanımlanmaktadır (156). Kolay elde edilebilir olmaları, MKH'leri hücresele tedavi ve rejeneratif tıp alanında kullanılır kılmaktadır (157). Kemik iliği, yağ dokusu, kas, tendon, diş pulpası (158) ve endometrial polip gibi birçok erişkin dokudan izole edilebildikleri gibi, göbek kordonu, plasenta, kordon kanı (159), amniyon sıvısı (160) gibi fetal dokulardan da rahatlıkla elde edilebilirler.

MKH'lerin klonojenite potansiyelinin yüksek olmaması ve heterojen olmaları nedeniyle bu hücrelerin aslında "kök hücre" olmadığı, stromal hücre olarak adlandırılmaları gerektiği ileri sürülmüş ve 2006 yılında International Society of Cellular Therapy (ISCT) Uluslararası Hücresel Tedavi Derneği tarafından "mezenkimal stromal hücre" olarak adlandırılmışlar, minimal tanımlayıcı kriterler olarak; 1) plastik yüzeye tutunma, 2) CD90, CD44, CD73, CD29, CD105 gibi hücre yüzey belirteçlerini ifade etme, 3) CD45, CD34, CD14 hücre yüzey belirteçlerini ifade etmeme, 4) *in vitro* koşullarda osteoblast, adiposit ve kondroblastlara farklılaşma özelliklerini sergilemeleri gerektiği bildirilmiştir (161, 162). Bu kuruluşun 2019 yılında yaptığı bir bildirim ile MKH/MSH kısaltmasının uygun olduğu ifade edilmiştir. Bu tez çalışmasında mezenkimal stromal hücre (MSH) olarak isimlendirilmişlerdir.

Kullanılan stromal belirteçlerden CD29, β 1 integrin ailesine ait olup, CD44 gibi hücre adezyon moleküllerindedir. CD44; hücre dışı matriks glikozaminoglikan için hücre yüzey reseptörüdür. Thy-1 olarak da bilinen CD90 ise, çoğunlukla lökositlerde ifade olmakla birlikte, hücre hücre ve hücre matriks etkileşimlerinden sorumludur. CD73, hücre adezyonu görev almakta olup, fibronektin ve laminin gibi hücre dışı matriks bileşenleri ile birlikte hücreler arası sinyalizasyonun düzenlenmesinde rol oynamaktadır.

Mezenkimal kök hücrelerin heterojen olmaları nedeniyle farklı özelliklere sahip alt tiplerinin ayrıştırılması da ilgi çeken bir konudur. CD271 pozitif seleksiyonu yapılarak izole edilen MSH'de kültür esnasında bu belirteçte azalma gözlenmiştir. Fonksiyonu tam olarak aydınlatılmış olmasa da CD271 ifadenmesinin MSH'lerde osteojenik kapasitenin erken belirteci olduğu düşünülmektedir. Aynı zamanda immün baskılayıcı özellik taşıyan alt grup MSH'lerin tanımlanmasında da kullanılmaktadır (163-165).

Mezenkimal kök hücreler kendilerini yenileme ve farklı hücre serilerine farklılaşma özelliğine sahip olmaları, ek olarak kolay elde edilebilir olmaları nedeniyle deneysel ve klinik çalışmalar için iyi bir aday olmakla birlikte farklılaşma, mobilizasyon ve hedefe yönelik hareket edebilme mekanizmaları hala tam olarak aydınlığa kavuşturulmuş değildir (166).

Farklı hücre serilerine farklılaşma özelliğinin yanı sıra, MSH'lerin, T, B ve doğal öldürücü olarak adlandırılan NK-hücrelerinin fonksiyonları ve çoğalmalarının baskılanmasına katkı sağladıkları, yani immün düzenleyici etkileri de bilinmektedir. Bu özelliğın fizyolojik önemi tam netleşmiş değildir: altta yatan mekanizmanın, MSH'lerin stromal özellik kazanmasında yer aldığı düşünülmektedir. Tüm bu özelliklerin aydınlığa kavuşması klinik çalışmaların gelişimine katkı sağlayacaktır (166-168). Mikroçevre elemanı olarak da MSH'ler bağ dokusu kökenli olmaları ve buldukları yüzeye yapışma özellikleri nedeniyle kritik önem taşırlar.

Son 20 yılda artarak ilgi uyandıran MSH'ler, mikroçevre ve kök hücre nişlerinin anlaşılmasına çok katkı sağlamıştır. Hücre-hücre-matriks ilişkileri, salgıladıkları faktörler ile matriks yapımına katkıları, çözünür faktörler ile kök/öncül hücreler ve diğer hücrelerin biyolojik özellikleri üzerine etkileri, eksozom salınımı yoluyla da hedef hücrelere genetik materyal/organel transfer edebilmeleri ve hasarlı dokulara göç edebilme özellikleri MSH'lerin en önemli özellikleri arasındadır (12, 169).

MSH'lerin bu özellikleri, NF1 hastalarında nörofibromlar yanında, kemik defektleri, kanamaya yatkınlık, yara iyileşmesinde gecikme ve hematolojik maligniteye yatkınlık gibi bulguların ortaya çıkmasında veya seyirinde MSH'lerin katkısı olabileceğini düşündürmektedir.

2.4. NF1 Hastalarında Tedavi Yaklaşımları

Nörofibromatozis Tip 1'in tedavisinde yolak inaktivasyonunun uygulanması son yıllarda üzerinde oldukça çok çalışılan bir konu haline gelmiştir. Bu noktada YAP/TAZ yolağının yerinden de bahsetmek gerekir. YAP, Hippo yolağında yer alan ve Schwann hücrelerinin gelişim ve remiyelinizasyonunu düzenleyen anahtar bir moleküldür. Jia-Liang ve ekibinin yapmış olduğu çalışmada 17 pleksiform nörofibrom dokusu, normal sinir dokuları ile karşılaştırılmış ve pleksiform nörofibromların Schwann hücrelerinin yer aldığı bölgelerde nükleer YAP'ta anlamlı artış bildirilmiş, hücre çekirdeğinde YAP transkripsiyonundaki artışın pleksiform nörofibrom tedavisinde hedeflenebileceği düşünülmüştür (170). Buradan yola

çıkarak, son dönemlerde tedavi seçeneği olarak üzerinde önemle durulan ve NF1'de FDA onaylı tek ilaç olan selumetinib ile karşılaştırıldığında YAP inhibitörünün *NF-/-* Schwann hücreleri üzerinde daha etkili olabileceği düşünülebilir (18, 170).

Diğer taraftan, nörofibrom mikroçevresi ve sinir hasarı ile oluşan mikroçevrenin ortak özelliklerinden ve TGF- β yolağı, Wnt ve YAP/TAZ yolaklarının hep birlikte organ fibrozisinde görev aldıklarından yola çıkılarak (39) fibrosizi hedef alan çalışmalar içerisinde, idiyopatik pulmoner fibrozis tedavisinde denenmiş ve başarılı sonuçlar elde edilmiş olan pirfenidone NF1 tedavisinde de denenmiş, ancak olumlu sonuçlar elde edilememiştir (171, 172). Wnt yolağının NF1'deki rolünü inceleyen çalışmalarda ise, pleksiform nörofibromlarda dermal nörofibromlara göre, 9 Wnt geninden 8'inin ifadesinde artış, 1'inin ifadesinde ise azalma görülmesi ile belirgin şekilde düzensizliğe uğradığı, 20 Wnt geninin de MPNST biyopsileri ve hücre serilerinde ifadelenmesinde artış gözlemlendiği belirtilmiştir (41). Bu noktadan hareketle, bu tez çalışmasından elde edilen veriler ışığında, gerek pleksiform, gerekse dermal nörofibrom hücrelerinde *in vitro* olarak Wnt yolağı baskılanarak incelenmeleri planlanmaktadır. Elde edilen sonuçların tedavi protokolü gelişimine katkıda bulunabileceği düşünülmektedir.

2.5. Amaç

Bu çalışmada,

- Nörofibromatozis Tip 1 hastalarının CLS, normal ve nörofibrom içeren dokular,
- Nörofibromatozis Tip 1 hastaları ile sağlıklı kontrol,
- Pleksiform/Dermal nörofibromu olan hastalar, grupları arasında,

MSH/Fibroblast karakterizasyonu sonrası, Osteopontin gen ifadelenmesinin osteojenik farklılaşma öncesi ve sonrası olası değişimi, yara iyileşmesi yönünden meydana gelebilecek farklılıkların ve Schwann hücre hattı üzerindeki apoptotik etkilerinin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Hasta Örneklerinin Temini

Tez çalışmasında, Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulunca incelenmiş olup gerekli izin alınmış olan (Karar No: GO 13/202-21) Nörofibromatozis Tip 1 tanı kriterlerinden en az 2 tane bulunduran (173) ve cerrahi işlem gerektiren 13 hastanın dokuları kullanılmıştır.

Tanı kriterleri:

- 6 ve > café-au-lait lekesi (prepubertal>5 mm, postpubertal>15 mm)
- Koltukaltı/inguinal çillenme
- Iris Lisch nodülleri
- Nörofibromlar (en az 2 tane ya da bir pleksiform)
- Optik glioma;
- Özel kemik lezyonları (sfenoid displazi ya da uzun kemik korteks incilmesi, psödoartroz)
- 1. derece yakınardan birinin NF1 tanısı almış olması

Bu hastalarda sıklıkla cerrahi işlemler gerekmekte ve nörofibrom dokusu, cilt, kemik, tümör dokusu, gerektiğinde kemik iliği gibi doku örnekleri alınmaktadır. Bu çalışmada, çıkartılan dokuların patolojik inceleme için gerekli olan parçası alındıktan sonra geride kalan materyalden nörofibrom, CLS ve normal deri kısımlarını içeren parçalar, cerrahi işlemi gerçekleştiren plastik cerrah tarafından ayrılıp ve steril medyum içerisinde Kök Hücre Merkezi'ne ulaştırıldı. MSH kültürleri için sağlıklı kontrol kontrol olarak, aile ve hastalardan gerekli onamlar alındıktan sonra sünnet derisi kullanıldı.

3.2. MSH/Fibroblast Hücrelerinin Kültürü ve Karakterizasyonu

3.2.1 Hücre Kültürü

NF1 tanısı almış hastalarından ve sağlıklı bireyden cerrahi işlem ile alınan ve steril medyum içinde gelen yumuşak, fibroadipöz dokular ve pleskiform nörofibrom

örnekleri, ek olarak CLS içeren (CLS) doku örnekleri ve NF1'li hastanın normal dokusu, bistüri ile petri kabında küçük parçalara ayrıldıktan sonra 25 cm² ve 75 cm² 'lik kültür kaplarına ekim yapıldı. Doku parçalarının yapışması sağlandıktan sonra 25 cm² 'lik kültür flaskına (Corning, ABD) 5ml, 75 cm² 'lik kültür flaskına (Corning, ABD) da 10ml; %60 *Dulbecco's modified Eagle's medium-low glucose* (DMEM-LG; Biochrom, Berlin), %40 MCDB 201 besiyeri (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, ABD), %10 ısı ile inaktive edilmiş fetal sığır serumu (FBS-HI; Gibco, UK), 100 U/ml pensilin ve 100 µg/ml streptomisin (%1 Pen/Strep) (Biological Industries, İsrail) ve 2mM L-Glutamin (%1 L-glu; Lonza, Walkersville) içeren gelişme besi yeri (çalışmada normal gelişme medyumunu olarak isimlendirilmiştir) eklenerek, 37° C, %5 O₂ ve nemli ortamında kültüre konuldu. Bir haftanın sonunda kültür kaplarına yapışan dokuların etrafında fibroblast benzeri hücreler gözlemlendi. Bundan sonra her 3-4 günde bir besi yeri değiştirilerek kültüre devam edildi. Hücreler 30-45 gün içerisinde kültür kabının yüzeyini %70-80 kapladığı zaman %0,25 oranında hazırlanan Tripsin (Invitrogen, UK), 1 mM EDTA (UltraPure™, Invitrogen) ile yüzeyden kaldırıldı. Tripin mavisi (Biological Industries, İsrail) ile hücre sayımı yapıldı. Pasaj 0'daki hücrelerin bir kısmı %10 DMSO (AppliChem, Almanya), %10 FBS içeren DMEM-LG tabanlı dondurma medyumunda sıvı azotta dondurularak saklandı, kalan hücreler ile 3. pasaja kadar kültüre devam edildi. Sonraki pasajlarda 10x10⁴ hücre/cm² olacak şekilde 25 cm² lik kültür kaplarına ekim yapılarak hücreler çoğaltıldı. Tüm pasajlarda elde edilen hücrelerin salgıladıkları faktörlerin daha ileri bir çalışmada incelenmesi için kültür ortamındaki süpernatant 0,45µm'lik filtreden geçirilerek -80° C'de saklandı.

3.2.2. MSH/Fibroblastların Yüzey Belirteçlerinin Saptanması (Akım Sitometri Çalışması)

Akım sitometri belirli bir hızda akan hücreleri, büyüklük, granüllük ve yüzey veya içeride ifade gören antikora bağlı floresan miktarına göre tanımlayan sistemdir. Hücrelerin, süspansiyon halinde, tek tek ışık kaynağı olan lazerin önünden geçmesi sağlanır ve bu sırada hücreye bağlanmış olan floresan işaretli antikorun yaymış

olduğu ışımaya detektörlerde tespit edilir. İfade görülen antikora göre de hücrelerin karakter özellikleri belirlenir.

Yapışma özelliği gösteren hücreler subkonfluent (%70-80) olunca 0,25% tripsin/1mM EDTA ile kaldırıldı ve hücre suspansiyonları hazırlanarak floresan işaretli monoklonal antikolar ile inkubasyonu üretici firmanın talimatlarına göre yapıldı. Floresan antikor ile işaretlenmiş MSH/Fibroblastlar FACS Aria (Becton Dickinson, ABD) akım sitometri cihazı kullanılarak yüzey belirteçler açısından incelendi. İmmünofenotiplendirme için kullanılan antikolar Tablo 3.1'de detaylı olarak verilmiştir. Analizler BDFACSDiva™ (Becton Dickinson, ABD) yazılımı kullanılarak yapıldı.

Verilerin istatistiksel analizleri ise 2-way ANOVA kullanılarak yapıldı, $p < 0,05$ değeri anlamlı kabul edildi.

Tablo 3.1. Karakterizasyon için Akım sitometride kullanılan Stromal ve Hematopoetik belirteçler

Stromal Belirteç	Anti-CD44 fluorescein isothiocyanate (FITC)	BD Biosciences, ABD
	Anti-C90 phycoerythrin (PE)	BD Pharmingen, ABD
	Anti-CD29 allophycocyanin (APC)	BD Pharmingen, ABD
	Anti-CD73 PerCp	BD Pharmingen, ABD
Hematopoetik Belirteç	Anti-CD45 FITC	Becton Dickinson, ABD
	Anti-CD34 PercP	Becton Dickinson, ABD

3.2.3. Mezenkimal Stromal Hücrelerin/Fibroblastların Farklılaşma Analizleri

Adiposit Hücre Farklılaşması

Adipojenik farklılaşma için pasaj 2'de tripsin ile kaldırılmış MSH/Fibroblast hücreleri 6 kuyucuklu propilen petri kaplarına (Geriner, ABD) kuyu başına 4×10^4 hücre/cm² olacak şekilde ekildi. %90-100 konfluent olana kadar 6-kuyucuklu (Geriner, ABD) hücre kültürü plakalarında normal gelişme medyumu içerisinde çoğaltıldı. Yeterli yoğunluğa ulaştıktan sonra (%90-100) iki kuyunun büyüme ortamı adipojenik ortamı ile değiştirildi. Bir kuyu kontrol olarak normal gelişme medyumu içerisinde bırakıldı.

Adipojenik ortamı

- 10% FBS,
- 1 µM deksametazon (Invitrogen)
- 60 µM indometasin (Sigma-Aldrich)
- 500 µM isobütilmetilksantin (IBMX; Sigma-Aldrich)
- 5 µg/ml insülin (Sigma-Aldrich)
- %1 L-Glutamin (Lonza, Walkersville)
- %1 P/S (Biological Industries, İsrail) içeren DMEM-LG idi.

Ortam 3-4 günde yenilenerek 21. günde adipojenik farklılaşma için analiz yapıldı. 21. günde hücreler %10'luk formalinde fikse edildi ve adipojenik farklılaşma ile oluşan nötral lipidlere özgü Oil Red O ile boyanarak mikroskopta (Olympus CKX41; Olympus, Tokyo, Japonya) görüntülendi.

Osteoblast Hücre Farklılaşması

Pasaj 2'de tripsin edilmiş MSH/Fibroblastlar 6 kuyucuklu propilen petri kaplarına kuyu başına 2×10^4 hücre/cm² olacak şekilde ekildi. MSH/Fibroblastlar %70-80 konfluent olana kadar 6-kuyucuklu hücre kültürü plakalarında normal gelişme medyumunu kullanılarak çoğaltıldıktan sonra iki kuyunun büyüme ortamı osteojenik ortamı ile değiştirildi. Bir kuyu kontrol olması açısından normal gelişme medyumunu içerisinde bırakıldı.

Osteojenik ortamı;

- 10% FBS-HI, 100 nM deksametazon
- 10 mM β-gliserofosfat (Sigma-Aldrich)
- 0,2 mM L-askorbik asit (Sigma-Aldrich)
- %1 L-Glutamin (Lonza, Walkersville)
- %1 P/S (Biological Industries, İsrail) içeren DMEM-LG idi.

Ortam 3-4 günde yenilendi ve 21. günde osteojenik farklılaşma için analiz yapıldı. 21. günde hücreler %10'luk formalinde fikse edildikten sonra Alizarin Red S (pH 4,2; Sigma-Aldrich) ile boyanarak mikroskopta (Olympus CKX41; Olympus,

Tokyo, Japonya) kalsiyum fosfat depositleri görüntülenerek hücre dışı matriks kalsifikasyonu saptandı (174).

3.3. MSH/Fibroblastlarda yara iyileşmesinin gözlenmesi (Scratch assay):

3.3.1. Yara İyileşmesi Modeli Oluşturulması:

Gerek hasta (n=13) gerekse sağlıklı bireyden elde edilmiş olan toplam 22 doku örneğinden geliştirilen ve karakterize edilen MSH/Fibroblastlar, yara iyileşmesi modeli oluşturmak üzere, üç paralelli olacak şekilde, kuyu başına 20×10^3 hücre olacak şekilde ekildi. 6 kuyucuklu (Geriner, ABD) kültür kapları kullanıldı.

Hücreler, 6 kuyucuklu kültür kaplarına ekildikten sonra, %60 *Dulbecco's modified Eagle's medium-low glucose* (DMEM-LG; Biochrom, Berlin), %40 MCDB 201 besiyeri (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, ABD), %10 ısı ile inaktive edilmiş fetal sığır serumu (FBS-HI; Gibco, UK), 100 U/ml pensilin ve 100 µg/ml streptomisin (%1 Pen/Strep) (Biological Industries, İsrail) ve 2mM L-Glutamin (%1 L-glu; Lonza, Walkersville) içeren normal gelişme besi yeri içerisinde, 37° C, %5 CO₂ ve nemli ortamında kültüre alındı. Yüzeyi %90 kapladığı zaman, steril 200 µl pipet ucu kullanılarak tek hamlede çizgi şeklinde yarık açıldı. Besi ortamı uzaklaştırıldıktan sonra, kalkan hücreler PBS ile yıkandı, ortama taze besi yeri eklendi. Faz kontrast mikroskobu (Olympus CKX41; Olympus, Tokyo, Japonya) ile 4X ve 10X'de fotoğraf çekildi. 37° C, %5 CO₂ ve nemli ortamında kültüre devam edildi. Sağlıklı kontrolün 3. 6. 12. ve 24. ve 48. saatlerde tekrar fotoğraf çekildi, fotoğraf çekimine hasta örnekleri için 0. ve 24. saatlerde devam edildi. Deney her bir örnek için (nörofibrom dokusu MSH/Fibroblast, CLS MSH/Fibroblast ve NF Normal deri MSH/Fibroblast) üç biyolojik tekrarlı yapıldı ve her bir örnek için 4 ayrı fotoğraf çekildi. Oluşturulan yarığın kapanma alanı bir çizik üzerinde 5 ayrı noktada ölçüm yapılarak belirlendi. Her doku örneğine ait ölçümün ortalaması alınarak motilite indeksi (MI) hesaplandı (175). Sağlıklı bireyden elde edilen MSH/Fibroblastlar da aynı işleme tabi tutularak kapanma oranı hastadan elde edilen MSH/Fibroblastlar ile karşılaştırıldı. Böylece hem hasta bireylerin farklı doku bölgeleri, hem de sağlıklı bireyin doku örnekleri yara iyileşmesi yönünden incelenmiş oldu.

Yara iyileşmesi modelinde sağlıklı kontrol için, Motilite indeksi veri analizi SPSS 20 programı tek yönlü ANOVA kullanılarak yapıldı, $p < 0,05$ değeri anlamlı kabul edildi.

Hasaların verileri için ise, Motilite indeksi veri analizi, az örnek sayısından dolayı, non-parametrik test olan, Kruskal wallis testi kullanılarak yapıldı, $p < 0,05$ değeri anlamlı kabul edildi.

Pleksiform hastalarının Nörofibrom ve CLS dokularından geliştirilen MSH/Fibroblastlar ile yapılan yara iyileşmesi modelinde tek bir CLS dokusu bulunması nedeniyle istatistiksel analiz olarak mann-whitney u testi kullanıldı.

3.4. MSH/Fibroblastların Osteojenik Farklılaşma Kapasitelerinin Moleküler Düzeyde İncelenmesi

Primer Dizileri

β -aktin (ACTB) primer dizileri

ACTB forward primeri 5' - CGCAAAGACCTGTACGCCAAC - 3'

ACTB reverse primeri 5' - GAGCCGCCGATCCACACG - 3'

Osteopontin (SPP1) primer dizileri

SPP1 forward primeri: 5' – CTCCTAGGCATCACCTGT – 3'

SPP1 reverse primeri: 5' – TCTTCAGAGGACACAGCAT – 3'

3.4.1. RNA İzolasyonu

Osteojenik indüksiyonun 10. gününde (174) osteojenik medyum içeren ve içermeyen (kontrol olarak kullanıldı) 6 kuyucuklu kültür kabına 1 ml Trizol eklenerek 5 dakika oda ısısında bekletildi. Pipet ile hafifçe kazınarak toplanan hücreler yeni tüpte toplandı. 13.000 rpm'de $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 5 dakika santrifüj edildi. Üstte kalan faz yeni bir tüpe alınıp oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi. 300 μl kloroform eklenip 10 saniye vorteks ile çalkalandı ve oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi. 13.000 rpm'de $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 5 dakika santrifüj edildi ve üst faz yeni tüpe alındı. %100 etanolden 500 μl eklenip 5 kez alt üst yapıldıktan sonra en az 30 dakika -20°C 'de bekletildi. 13.000 rpm'de $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 5 dakika santrifüj edilip üstte kalan faz pelete zarar

vermeden atıldı. DEPC'li su ile hazırlanmış %75 etanolden 500 µl eklenip yıkama yapıldı. Etanolün fazlası çekildi, kalanın da uçması için en az 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi. 20 µl DEPC-H₂O eklenip 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra RNA örneklerinin konsantrasyon ve kalitesini ölçmek için NanoDrop® cihazı kullanıldı. İzole edilen RNA'lar ilerideki deneylerde tekrar kullanabilmek için -80°C'de saklandı.

3.4.2. cDNA Sentezi

İzole edilmiş RNA molekülünden cDNA elde etmek için ProtoScript II First Strand cDNA Synthesis Kit (New England Biolabs) kullanıldı. RNA'lar -80°C'den alındı ve zarar görmemesi için buz üzerinde çözülmesi beklendi. cDNA sentezi için her bir örnekten 1 µg/ml alındı.

Karışım I

RNA	1-6 µl
Random Primer Mix	2 µl
RNaz'sız dH ₂ O	8 µl'ye tamamlandı
<hr/>	
TOPLAM	8 µl

Karışım I hazırlandıktan sonra RNA örnekleri 65°C'de 5 dakika inkübe edildi ve örnekler buz üzerine alındı. Bu aşamada 5 dakikalık bekleme süresince karışım II hazırlandı.

Karışım II

ProtoScript II Reaction Mix (2X)	10 µl
ProtoScript II Enzyme Mix (10X)	2 µl
<hr/>	
TOPLAM	12 µl

Karışım II, karışım I'e eklendi ve örnekler, Amplification PCR System 9700 (Applied Biosystems) cihazında 25°C'de 5 dakika, 42°C'de 60 ve 80°C'de 5 dakika

inkübe edilerek cDNA sentezi tamamlandı. Sentez sonrası örneklere, 30 µl dH₂O eklenerek hacim 50 µl'ye çıkarıldı ve örnekler -20°C'de saklandı.

3.4.3. Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Kantitatif gerçek zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) bir nükleik asit dizisinin miktarının nicel ölçümü için kullanılan bir yöntemdir. Gen ifadesi çalışmalarında hedef gen/genlerin total cDNA içerisinde hangi miktarda bulunduğu, belirli patolojik ya da deneysel koşullarda ifadenin ne yönde değiştiğini ölçmek için kullanılabilir. Bu teknikle nicel gen ifadesi analizi yapmak için her dokuda sabit düzeyde ifade olan housekeeping gen ile ilgilenilen genin ifadesi karşılaştırılarak yorum yapılır.

NF1 hastalarında mRNA ifadesi, hücrelerden izole edilen RNA'lardan sentezlenen cDNA'larda *SYBR green* (Sigma) kiti ile Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı Enstitüsü, Pediatrik Ve Perinatal Patolojileri Araştırmaları A.B.D.'nda bulunan MxPro 3005 (Agilent) cihazı kullanılarak incelendi. Normalizasyon için *Housekeeping* gen olarak, β-aktin geni kullanıldı.

Gerçek zamanlı PZR koşulları;

2X <i>SYBR Green</i> karışımı	10 µl
<i>Forward</i> primer (10 pmol/µl)	1 µl
<i>Reverse</i> primer (10 pmol/µl)	1 µl
Distile su	6 µl
cDNA	2 µl

TOPLAM 20 µl

20 µl gerçek zamanlı PZR reaksiyonu MxPro 3005 (Agilent) cihazında aşağıdaki koşullarda gerçekleştirildi:

95 °C'de 15 saniye
 58 °C'de 20 saniye
 72 °C'de 20 saniye

} 30 döngü

Çoklu gruplar arasındaki farklar $2^{-\Delta\Delta Ct}$ hesaplanarak, 2way ANOVA yöntemi kullanılarak analiz edildi. $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3.5. Schwann Hücre Hattı ile Hasta MSH/Fibroblast ve Sağlıklı MSH/Fibroblast Ko-Kültürü

3.5.1. Hücre Kültürü

Ko-kültür çalışması başlatılmadan 24 saat önce kullanılacak Transwell (Corning, ABD) (24 kuyucuklu, 0,4µm por çaplı) Poly L-lizin ve laminin ile kaplandı (176). Schwann hücrelerinin gelişme medyumunu hazırlandı (176).

Schwann Hücre Gelişme Medyumunu

- %10 FBS (Gibco), %1 L-Glutamin
- %1 Pensilin/Streptomisin
- Forsikolin (Sigma-Aldrich, ABD) idi.

Besi yeri kültür başlamadan 24 saat önce taze olarak hazırlandı.

Poly L- lizin kaplanması: Poly L- lizin, steril PBS ile 1:10 seyreltildi. 0,22 µm'lik filtreden geçirilen karışım 250µl olacak şekilde Schwann hücrelerinin ekileceği 12 kuyuya eklendi. Bir saat boyunca laminar flow'da bekletildi.

Laminin kaplanması: Laminin eklenmeden önce, Poly L- lizin kaplı Transwell kültür plağı, 3 defa steril PBS ile yıkandı. Her yıkama arasında 5'er dakika beklendi. 16µl Laminin, 4 ml steril PBS içinde çözüldü ve 250µl olacak şekilde Schwann hücrelerinin ekileceği 12 kuyuya paylaştırıldı. Kültür plağı parafilm ile kaplanarak +4 derecede bir gece bekletildi. Ertesi gün kültür başlamadan steril PBS ile yıkanarak hazır hale getirildi.

Pasaj 2'de tripsin ile kaldırılmış dermal nörofibromu olan iki hastanın CLS dokusundan ve NF normal derisinden elde edilen MSH/Fibroblast, pleksiform nörofibromu olan iki hastanın CLS dokusundan elde edilen MSH/Fibroblast ve

sağlıklı bireyin dokusundan elde edilen MSH/Fibroblastlar propilen 6 kuyulu transwell petri kaplarının süzgeç kısmına (Geriner, ABD) kuyu başına 4×10^4 hücre/cm² olacak şekilde ekildi. %90-100 konfluent olana kadar normal gelişme medyumu içerisinde çoğaltıldı. Yeterli yoğunluğa ulaştıktan sonra (%90-100) Schwann Hücreleri ile ko-kültüre başlandı.

Prof. Dr. Şükriye Ayter tarafından hibe edilen İnsan Schwann hücreleri (Sciencell Cat. No.:1700) laboratuvara kuru buz içerisinde, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji ABD'dan getirildi. Çözöldükten sonra, tripan mavisi ile boyanarak canlılık tespiti ve sayımı yapıldı. Schwann gelişme besi yeri içerisinde poli L- lizin ve laminin kaplı 24 kuyucuklu transwell (por büyüklüğü; 0,4µm) kültür plağına her kuyuda 15×10^3 hücre olacak şekilde ekimi gerçekleştirildi ve 37°C, %5 CO₂ ve nemli ortamında kültüre konuldu. Ardından ko-kültüre alınması için önceden belirlenmiş, sıvı azotta bekletilen sağlıklı ve hasta MSH/Fibroblast hücreleri çözöldü, tripan mavisi ile boyanarak canlılık tespiti ve sayımı yapıldı. Her süzgeç üzerinde 10×10^3 hücre olacak şekilde ekimi gerçekleşti. MSH'leri içeren süzgeçler Schwann hücrelerini içeren kuyuların üzerine kondu ve ko-kültür başlatıldı. Ko-kültür için Schwann hücre besi ortamı kullanıldı.

3.5.2. Schwann Hücre Apoptozisinin Akım Sitometri ile Tayini

NF1'li hastaların farklı nörofibromlarından (pleksiform ve dermal), CLS bulunan (hiperpigmente) ve bulunmayan (normal pigmentasyonlu) derilerinden, ayrıca sağlıklı bireyin dokusundan geliştirilen MSH/Fibroblastların Schwann hücre hattına etkisini incelemek amacı ile ko-kültür sonrası Schwann hücrelerinde apoptozis tayini gerçekleştirildi. 24 saat süre ile 37°C, %5 CO₂ ve nemli ortamında kültür sonrası akım sitometride (FACSAria, ABD) Annexin V-PI ikili boyaması yapılarak Schwann hücrelerinin erken ve geç apoptozu değerlendirildi. Schwann Hücreleri yüzeye yapışma özelliği gösterdiğinden ötürü 0,25% tripsin/1mM EDTA ile kaldırıldı ve tek hücre suspansiyonları hazırlandı. Annexin V ve PI (Annexin V Fluos Staining Kit, Roche, Almanya) boyaması üretici firmanın talimatlarına göre yapıldı.

Akım sitometri çalışması FACSAria (Becton Dickinson, ABD) cihazında, analizler ise BDFACSDiva™ (Becton Dickinson, ABD) yazılımı kullanılarak yapıldı.

Apoptozis için kullanılan boyaın emisyon ve eksitasyon değerleri Tablo 3.2'de verilmiştir.

Tablo 3.2. Apoptozis için kullanılan Akım Sitometri boyaının emisyon-eksitasyon değerleri

Boya	Emisyon (nm)	Eksitasyon (nm)
Annexin V	521	494
PI	617	488

3.5.3. Schwann Hücresi ile Ko-kültüre alınan MSH/Fibroblastların Yüzey Belirteçlerinin İncelenmesi

Transwell kültür plağının hücre geçişini engelleyen 0,4 µm por çaplı süzgeç kısmında Schwann hücresi ile kokültüre alınan hasta ve sağlıklı birey MSH'leri yüzeye yapışma özelliği gösterdiğinden ötürü 0,25% tripsin/1mM EDTA ile kaldırıldı ve tek hücre suspansiyonları hazırlandı. Hücresinin fluoresan işaretli monoklonal antikorlar ile inkubasyonu üretici firmanın talimatlarına göre yapıldı. İmmünofenotiplendirme için stromal belirteç olarak allophycocyanin (APC)-anti-CD29 (Becton Dickinson, ABD), phycoerythrin (PE)-anti-CD73 (BD Pharmingen, ABD), fluorescein isothiocyanate (FITC)-anti-CD44 (BD Pharmingen, ABD), hematopoetik hücre belirteci olarak FITC-anti-CD45 (Becton Dickinson; BD Pharmingen), Akım sitometri çalışması FACSAria (Becton Dickinson, ABD) cihazında, analizler ise BDFACSDiva™ (Becton Dickinson, ABD) yazılımı kullanılarak yapıldı.

4. BULGULAR

4.1. Çalışmaya Dahil Edilen Hastaların Bilgileri

NF1 tanı kriterlerinden en az iki özelliği barındıran, cerrahi işlem planlanmış ve rızası alınmış olan 7 dermal, 6 pleksiform olmak üzere toplam 13 hastaya ait, 24 farklı doku bölgesinden mezenkimal stromal hücre/Fibroblastlar geliştirildi ve 3. pasaj'a kadar kültüre devam edildi. 24 farklı MSH/Fibroblastların karakterizasyonları, gerek yüzey belirteçleri, gerekse farklılaşma analizleri incelenerek yapıldı.

Tablo 4.1. Çalışmaya dahil edilen tüm hastaların listesi ve bulguları

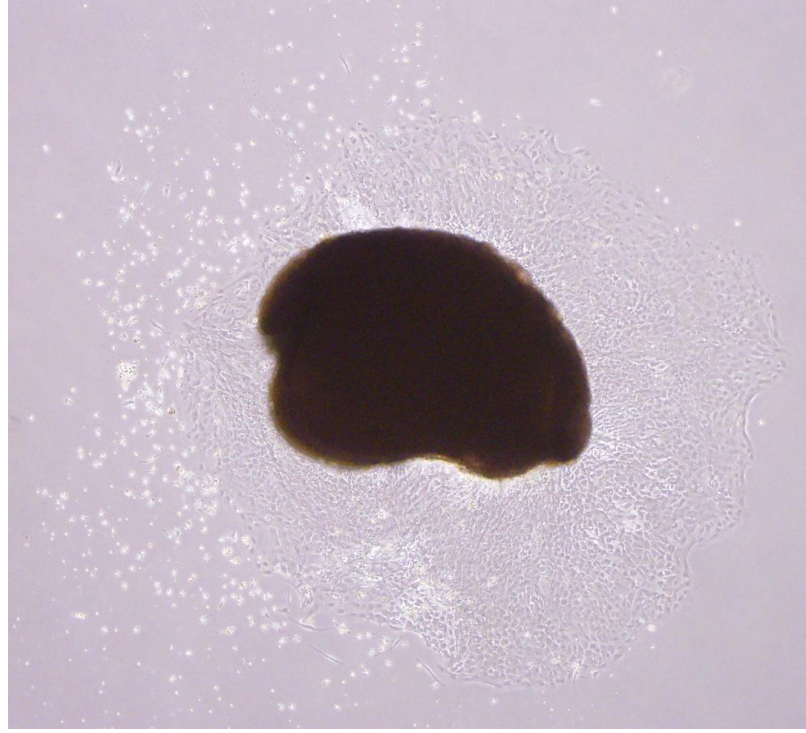
Hasta No	Cinsiyet	Nörofibrom Dokusu	CLS	Normal Doku	Hastaların Patolojik Tanısı
H1	K	+	+	+	Dermal
H2	K	+	+	+	Dermal
H3	K	+	-	+	Dermal
H4	E	+	+	+	Dermal
H5	K	+	+	+	Dermal
H6	K	+	+	-	Pleksiform
H7	E	-	+	+	Dermal
H8	E	-	-	+	Pleksiform
H9	E	+	-	-	Pleksiform
H10	E	+	-	-	Pleksiform
H11	K	+	-	-	Pleksiform
H12	K	+	-	-	Dermal
H13	E	+	-	-	Pleksiform

4.2. MSH/Fibroblast Hücrelerinin Karakterizasyonu

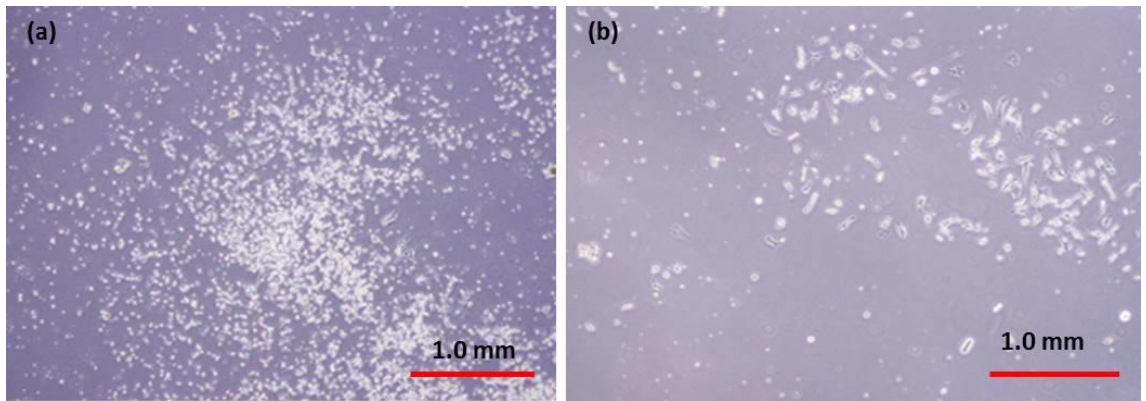
4.2.1. Hücre Kültürü

Cerrahi işlem ile alınan ve steril medyum içinde gelen yumuşak, fibroadipöz dokular ve pleksiform nörofibrom örnekleri, ek olarak CLS içeren doku örnekleri ve NF Normal deriler bistüri ile kesilerek hücre kültür kaplarına ekildi ve bir hafta sonra dokuların etrafından fibroblast benzeri hücrelerin çoğaldığı gözlemlendi (Şekil 4.1). Elde edilen dokuların hepsinden fibroblast benzeri hücre elde edildi (Şekil 4.2). Hastaların hücrelerinden elde edilmiş pasaj 0'daki hücreler, pasaj 2 aşamasına getirildi. Pasajlar

arasında fazla miktarda elde edilen hücreler sıvı azotta donduruldu. Her pasaj sonrası hücrelerin salgıladıkları faktörler ilerdeki bir çalışmada incelenmek üzere 0,45'lik filtreden süzülerek eppendorf tüplerde -80 derecede saklandı.



Şekil 4.1. NF1'li hastanın normal derisinin (NF-Normal deri) ekildikten 1 hafta sonraki görüntüsü (4X objektif görüntüsü).



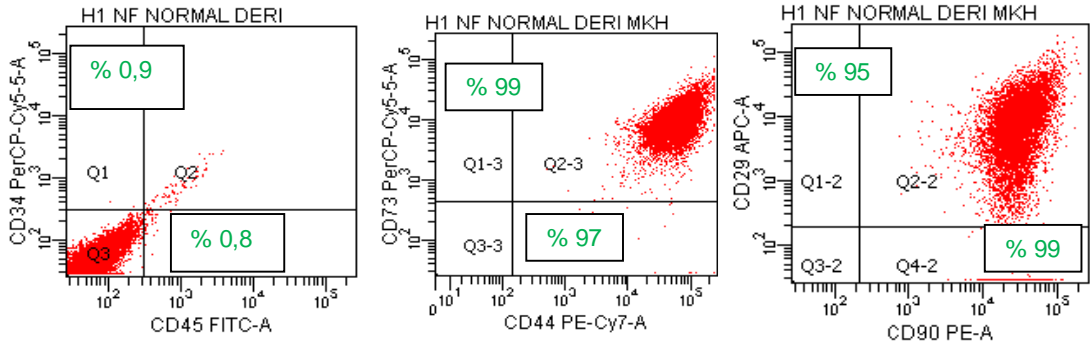
Şekil 4.2. NF1'li bireyin nörofibrom (a) ve CLS içeren (b) dokusundan elde edilen fibroblast benzeri hücre görüntüleri (Örneklerin ikisi de Pasaj 0 aşamasındadır) (4X objektif görüntüsü).

4.2.2. MSH/Fibroblastların Yüzey Belirteçlerinin Saptanması (Akım Sitometri Çalışması)

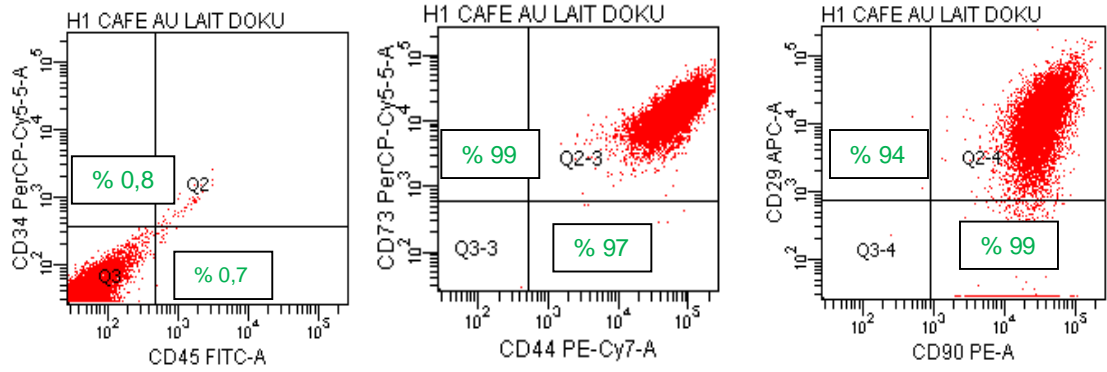
NF1 hastalarından ve sağlıklı bireylerden elde edilen tüm doku örneklerinden geliştirilen MSH hücrelerin immünfenotiplendirilmesi başarı ile yapıldı. Toplam 21 farklı MSH immünfenotiplendirilmesi sonucu stromal belirteçler olan CD44, CD90, CD73, CD29 ifadeleri pozitif olarak saptanırken (>%20), hematopoetik belirteçler olan CD45, CD34 ifadelenmeleri negatif (<%20) olarak belirlendi (Şekil 4.3-4-7). İstatiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı. ($p < 0.05$)

Tablo 4.2. NF1 tanısı alan bireylerin farklı dokularından elde edilen MSH'lerin stromal ve hematopoetik yüzey belirteçleri. Akım sitometri datasıdır.

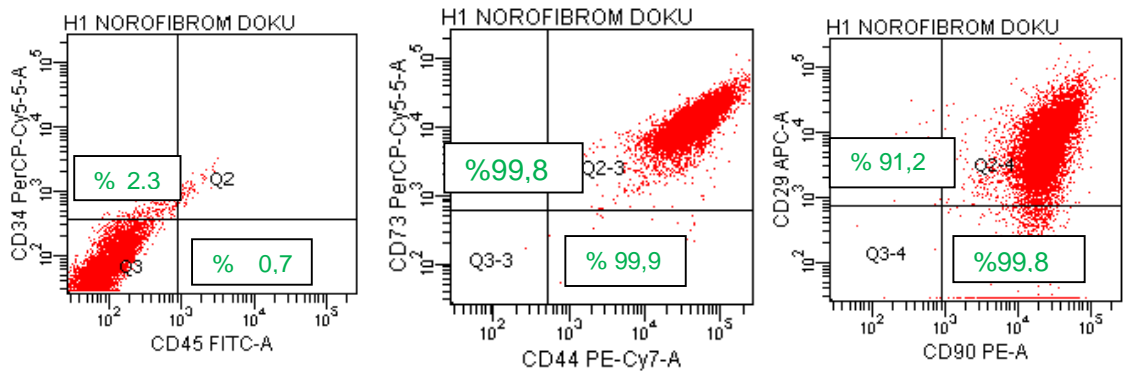
Hasta No	%CD 29	%CD 44	%CD73	%CD90	%CD34	%CD45
H1 NF Normal Deri MSH	92,5	100	100	100	0,7	1,2
H1 CLS dokusu MSH	93,4	99,9	99,9	92,6	0,4	0,6
H1 Nörofibrom dokusu MSH	91,2	99,9	99,8	99,8	2,3	0,7
H2 NF Normal Deri MSH	96,9	100	99,4	99,4	0,3	0,1
H2 CLS dokusu MSH	98,8	100	98,4	98	1,5	1,9
H2 Nörofibrom dokusu MSH	98	99,9	99,8	99,9	0,1	0,1
H3 NF Normal Deri MSH	92,5	100	99,9	98,8	0	0
H3 CLS dokusu MSH	97,7	99,9	99,5	99,6	0,1	0
H3 Nörofibrom dokusu MSH	96,5	99,9	99,5	99,9	0,3	0,2
H4 NF Normal Deri MSH	97,8	99,9	98,2	100	0	2,4
H4 CLS dokusu MSH	35	100	99,5	100	0,1	0
H4 Nörofibrom dokusu MSH	89,6	99,9	98,6	99,9	0,4	0,6
H5 NF Normal Deri MSH	98,8	99,6	97	98	1	0,3
H5 CLS dokusu MSH	97,7	100	100	100	0	0
H5 Nörofibrom dokusu MSH	95,4	100	99,9	100	0,1	0,1
H6 CLS dokusu MSH	93,1	66,9	94,2	100	0,1	0
H6 Nörofibrom dokusu MSH	98,1	82,6	99	98,7	0	0,3
H7 NF Normal Deri MSH	96,7	-	99,1	99,3	21,3	0,1
H7 CLS dokusu MSH	96,1	-	97,1	98,9	0,1	0
H8 Nörofibrom Dokusu	96	90	97,2	98,9	0,1	0
H9 Nörofibrom Dokusu	85	99,9	98,6	99,9	0,4	0,3
H10 Nörofibrom Dokusu	92,5	100	99,5	98,8	0,3	0
H11 Nörofibrom Dokusu	98,6	82,6	97	98	0,5	0,3
H12 Nörofibrom Dokusu	98,1	93	99	98	0	0
H13 Nörofibrom Dokusu	97	85	99	99	0,4	0



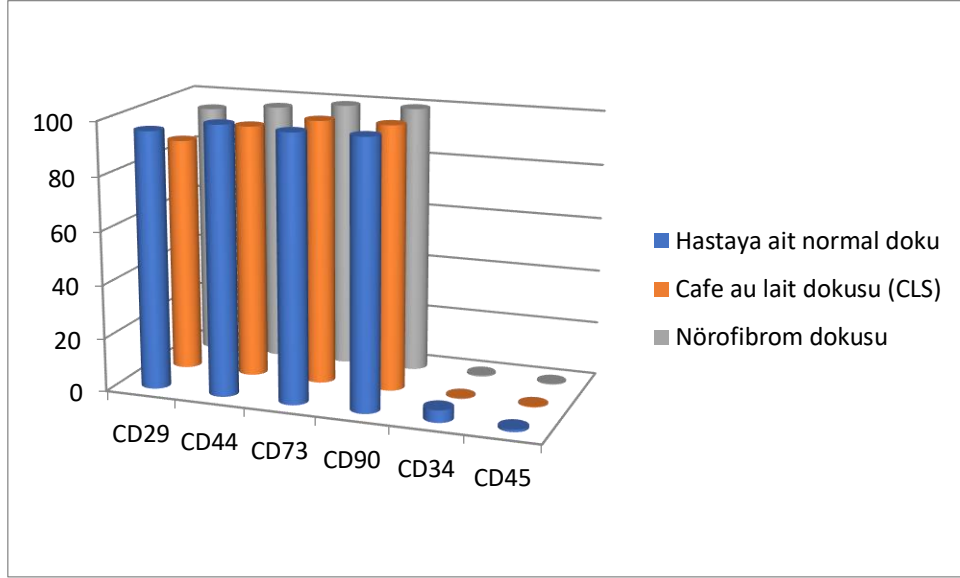
Şekil 4.3. Dermal nörofibromlu hastanın (H1) NF normal derisinden geliştirilen MSH/Fibroblastların immünofenotiplendirilmesi.



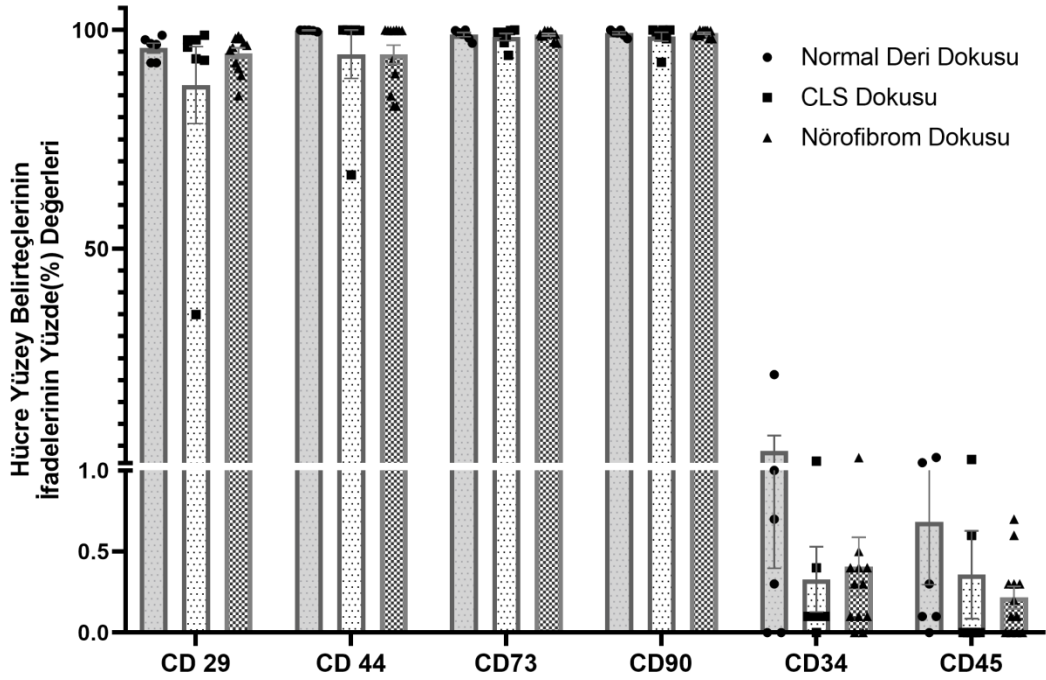
Şekil 4.4. Dermal nörofibromlu hastanın (H1) CLS dokusundan geliştirilen MSH/Fibroblastların immünofenotiplendirilmesi.



Şekil 4.5. Dermal nörofibromlu hastanın (H1) Nörofibrom dokusundan geliştirilen MSH/Fibroblastların immünofenotiplendirilmesi.



Şekil 4.6. Hastaların farklı bölgelerinden elde edilen MSH'lerin yüzey belirteç yüzdeleri

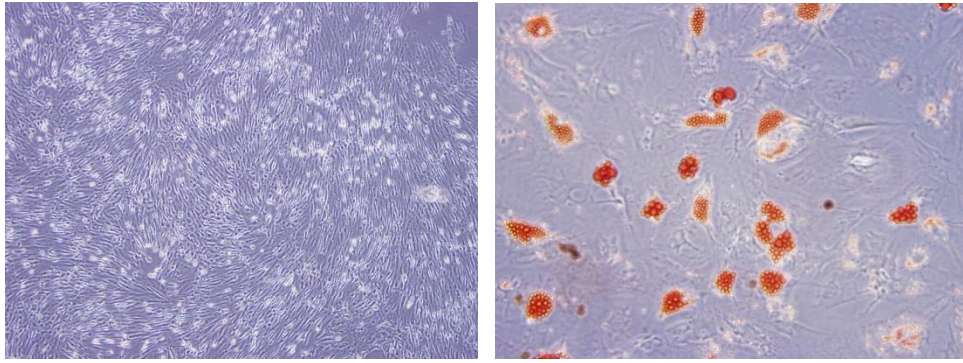


Şekil 4.7. Hastaların gerek normal deri, gerekse CLS ve nörofibrom içeren dokuları karakterize edildiğinde, hepsinin stromal belirteçler için pozitif (>%20) ve hematopoetik belirteçler için ise negatif (<%20) ifadenme gösterdiği saptandı (Şekil 4.7). $p < 0,05$

4.2.3. Mezenkimal Stromal Hücrelerin Farklılaşma Analizleri

Adiposit Hücre Farklılaşması

Nörofibromatozis Tip 1 tanısı alan bireylerin farklı (NF Normal deri, CLS ve nörofibrom dokusu) dokularından ve sağlıklı bireylerden elde edilen MSH/Fibroblastlar (n=24) 21 gün boyunca adipojenik farklılaşma besi yeri ile indüklendi ve adipojenik farklılaşmaları gerçekleştirildi.

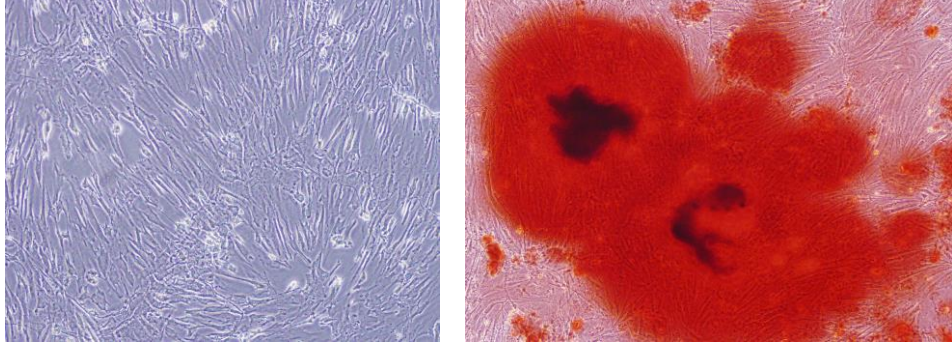


Besi yeri ile indüklenmemiş (kontrol)4X Adipojenik farklılaşma besi yeri ile indüklenmiş 20X

Şekil 4.8. Sağlıklı bireyden elde edilen MSH'lerin adiposit farklılaşması (Oil Red-O boyası).

Osteoblast Hücre Farklılaşması

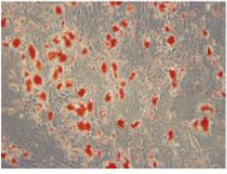
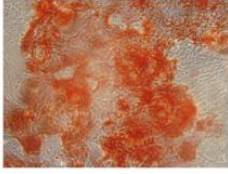
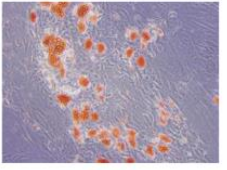
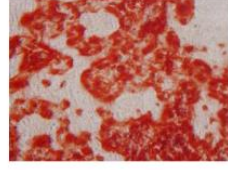
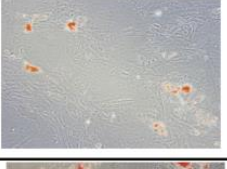
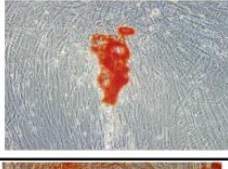
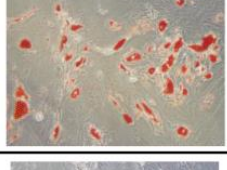
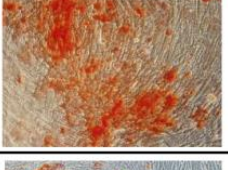
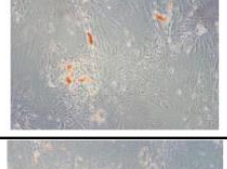
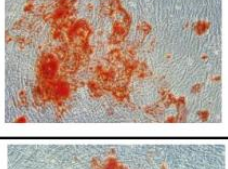
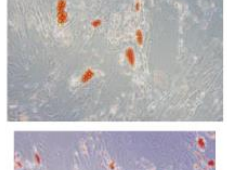
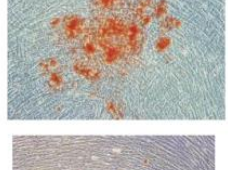
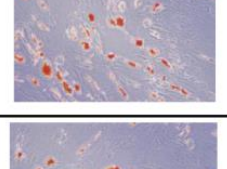
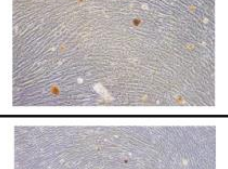
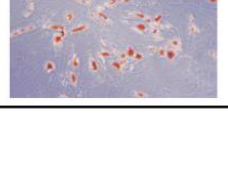

Nörofibromatozis 1 tanısı alan bireylerin farklı (NF Normal deri, CLS dokusu ve nörofibrom dokusu) dokularından ve sağlıklı bireylerden elde edilen MSH/Fibroblastlar (n=24) 21 gün boyunca osteojenik farklılaşma besi yeri ile indüklendi ve osteojenik farklılaşmaları gerçekleştirildi.

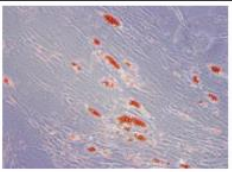
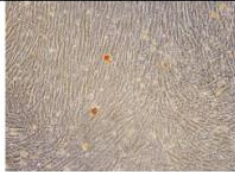
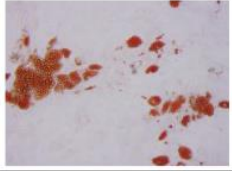
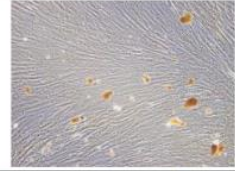
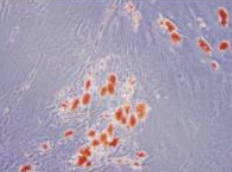

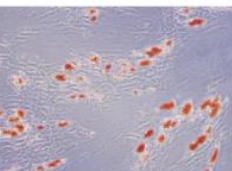

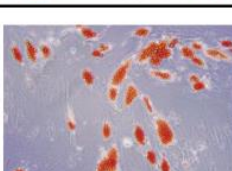

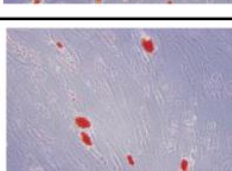
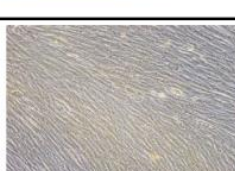
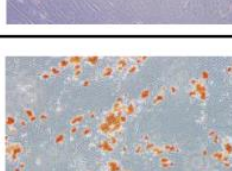
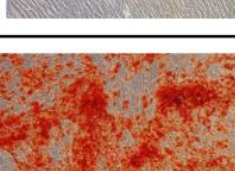
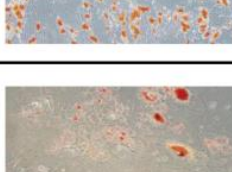
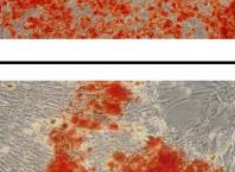


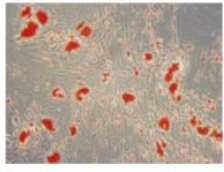
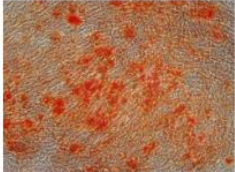
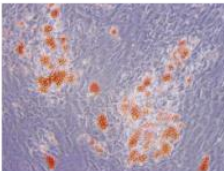
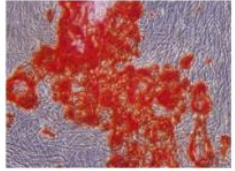
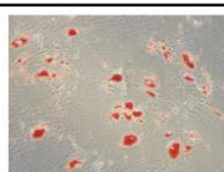
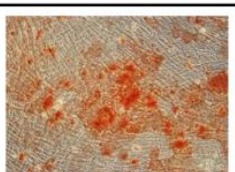
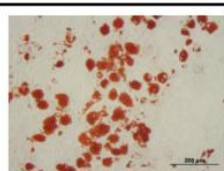
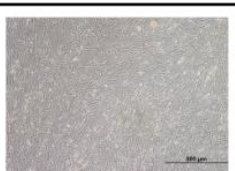
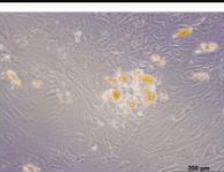

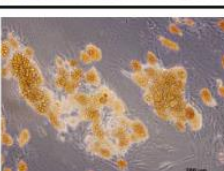
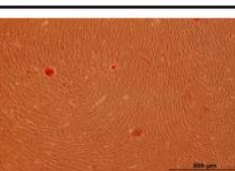
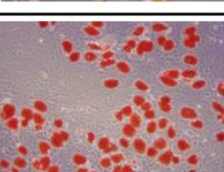

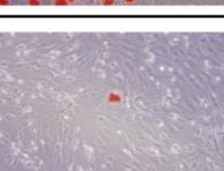
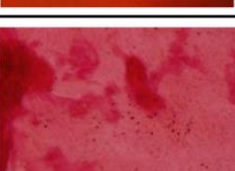
Besi yeri ile indüklenmemiş (kontrol)10X Osteojenik farklılaşma besi yeri ile indüklenmiş 4X

Şekil 4.9. Sağlıklı bireyden elde edilen MSH'lerin osteojenik farklılaşması (Alizarin Red S boyası).

Tablo 4.3. Dermal ve Pleksiform olmak üzere çalışmaya dahil edilen hastaların (n=13) Nörofibrom, CLS dokusu ve Normal Derisinden elde edilen MSH/Fibroblastların adipojenik ve osteojenik hücre farklılaşma görüntüleri.

0	DOKU TÜRÜ	FLOW	Adipojenik FARKLILAŞMA	Osteojenik FARKLILAŞMA
H1	Normal	CD29: 92,5 CD44: 100 CD73: 100 CD90: 100 CD34: 0,7 CD45: 1,2		
	CLS	CD29: 93,4 CD44: 99,9 CD73: 99,9 CD90: 92,6 CD34: 0,4 CD45: 0,6		
	dNF	CD29: 91,2 CD44: 99,9 CD73: 99,8 CD90: 99,8 CD34: 2,3 CD45: 0,7		
H2	Normal	CD29: 96,9 CD44: 100 CD73: 99,4 CD90: 99,4 CD34: 0,3 CD45: 0,1		
	CLS	CD29: 98,8 CD44: 100 CD73: 98,8 CD90: 98 CD34: 1,5 CD45: 1,9		
H3	dNF	CD29: 98 CD44: 99,9 CD73: 99,8 CD90: 99,9 CD34: 0,1 CD45: 0,1		
	Normal	CD29: 92,5 CD44: 100 CD73: 99,9 CD90: 98,8 CD34: 0 CD45: 0		
	dNF	CD29: 96,5 CD44: 99,9 CD73: 99,5 CD90: 99,9 CD34: 0,3 CD45: 0,2		

H4	Normal	CD29: 97,8 CD44: 99,9 CD73: 98,2 CD90: 100 CD34: 0 CD45: 2,4		
	CLS	CD29: 35 CD44: 100 CD73: 99,5 CD90: 100 CD34: 0,1		
	pNF	CD29: 89,6 CD44: 99,9 CD73: 98,6 CD90: 99,9 CD34: 0,4 CD45: 0,6		
H5	Normal	CD29: 98,8 CD44: 99,6 CD73: 97 CD90: 98 CD34: 1 CD45: 0,3		
	CLS	CD29: 97,7 CD44: 100 CD73: 100 CD90: 100 CD34: 0 CD45: 0		
	dNF	CD29: 95,4 CD44: 100 CD73: 99,9 CD90: 100 CD34: 0,1 CD45: 0,1		
H6	CLS	CD29: 93,1 CD44: 66,9 CD73: 94,2 CD90: 100 CD34: 0,1 CD45: 0		
	pNF	CD29: 98,1 CD44: 82,6 CD73: 99 CD90: 98,7 CD34: 0		

H7	Normal	CD29: 96,7 CD44: - CD73: 99,1 CD90: 99,3 CD34: 21,3 CD45: 0,1		
	CLS	CD29: 96,1 CD44: - CD73: 97,1 CD90: 98,9 CD34: 0,1 CD45: 0		
H8	Normal	CD29: 96 CD44: 90 CD73: 97,2 CD90: 98,9 CD34: 0,1 CD45: 0		
H9	pNF	CD29: 85 CD44: 99,9 CD73: 98,6 CD90: 99,9 CD34: 0,4 CD45: 0,3		
H10	pNF	CD29: 92,5 CD44: 100 CD73: 99,5 CD90: 98,8 CD34: 0,3 CD45: 0		
H11	pNF	CD29: 98,6 CD44: 82,6 CD73: 97 CD90: 98 CD34: 0,5 CD45: 0,3		
H12	dNF	CD29: 98,1 CD44: 93 CD73: 99 CD90: 98 CD34: 0 CD45: 0		
H13	pNF	CD29: 97 CD44: 85 CD73: 99 CD90: 99 CD34: 0,4 CD45: 0		

Çalışmaya dahil edilen tüm örneklerden 21. günde boyama gerçekleştirildi ve görüntü alındı. Oil Red-O boyası ile boyandığı zaman hem sağlıklı MSH'de (Şekil 4.8), hem de hastalardan elde edilen Nörofibrom, CLS ve NF Normal deri MSH'lerinde

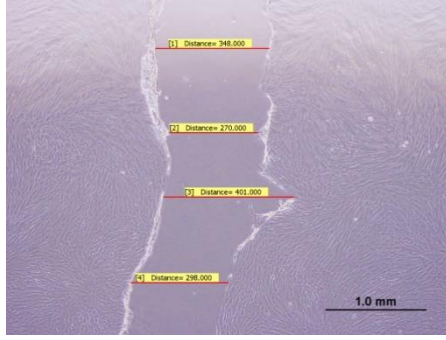
nötral lipid oluşumu, Alizarin Red S boyası ile boyandığı zaman hem sağlıklı MSH'de (Şekil 4.9), hem de hastalardan elde edilen nörofibrom, CLS ve normal deri MSH'lerinde kalsiyum depozitleri gözlemlendi. (Tablo 4.3).

4.3. MSH/Fibroblastlarda Yara İyileşmesinin Gözlenmesi (Scratch assay):

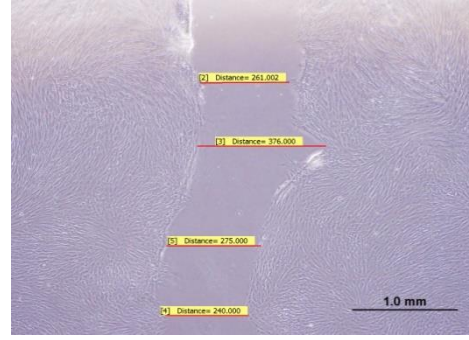
Gerek hasta gerekse sağlıklı bireylerden elde edilmiş olan 13 hasta bir de sağlıklı kontrol örneği olmak üzere toplamda 22 farklı MSH örneği, konfluent hale getirilmiş olup (%90), örneklerin hepsine yara iyileşmesi modeli uygulandı. Hasta örneklerinin birbiri ile ve sağlıklı bireyin MSH'leri ile karşılaştırıldığı yara iyileşmesi modelinde motilite indeksi ile değerlendirme yapıldı. Motilite indeksi kültür kabındaki hücreler üzerine pipet ucu ile yapılan çizginin kapanma hızı (W) bir dokuya ait üç farklı alanda beşer ölçüm yapılarak ($MI = 1 - W_t/W_0$) hesaplandı (175). Her bir doku için üç biyolojik tekrarlı deney yapıldı ve mikroskopta 4X ve 10X objektif kullanılarak görüntü alındı. Bu çalışmaya 13 hasta dahil edildi ancak iki hastaya ait (H4-Normal deri ve H5-CLS ve Normal deri) MSH/Fibroblastlarında mikoplazma kontaminasyonu geliştiği için kültüre son verildi ve örnek sayısı n=22'ye düşmüş oldu.

4.3.1. Sağlıklı Bireye Ait Doku MSH'lerinde Yapılan Yara İyileşmesi

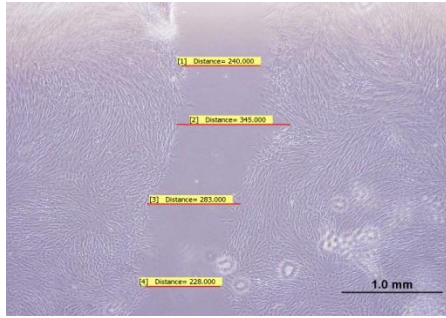
Sağlıklı bireye ait doku MSH'lerinde yapılan yara iyileşmesinde 0, 3, 6, 12, 24. saatlerde yapılan ölçümlerde 24. saatteki kapanmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlemlendi (Şekil 4.10, 4.11)



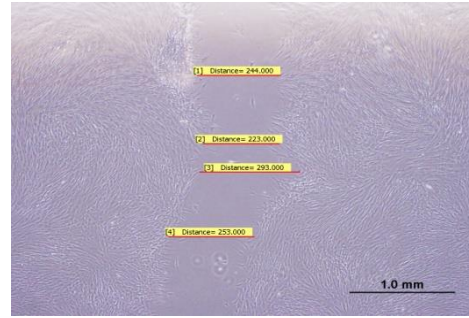
0.saat



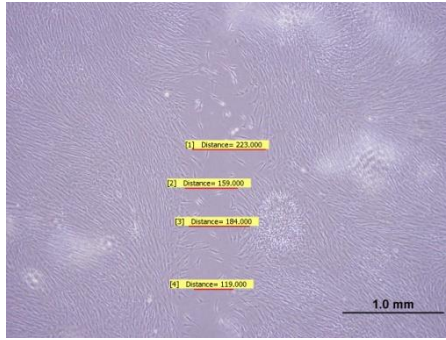
3.saat



6.saat

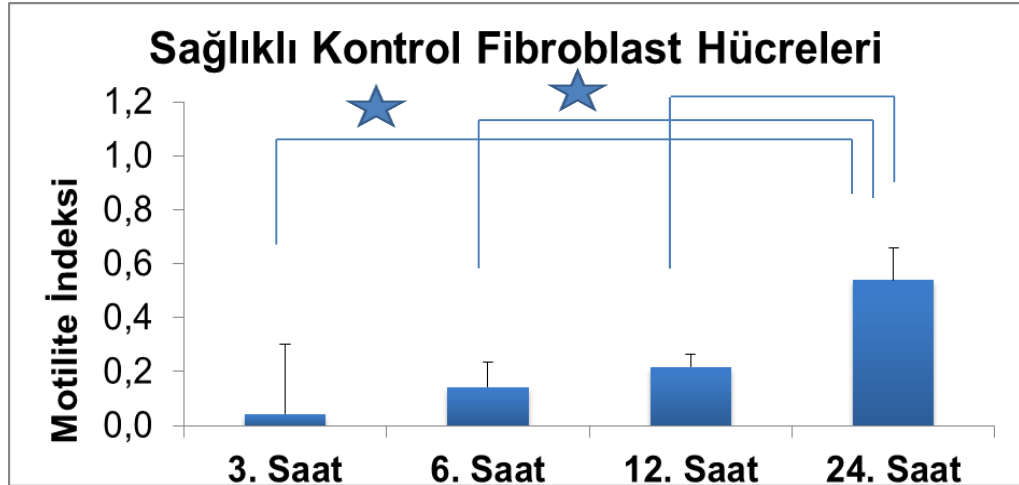


12.saat



24.saat

Şekil 4.10. Sağlıklı kontrolden elde edilen MSH'lerden geliştirilen yara iyileşmesi modelinde 0,3,6,12,24. saatlerdeki ölçümler.



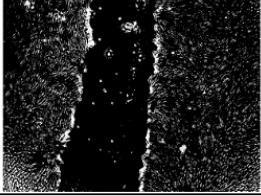
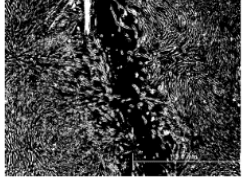
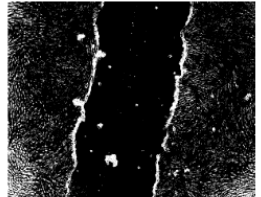
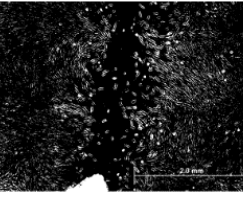


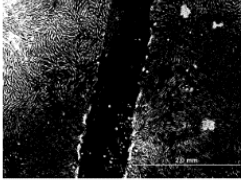
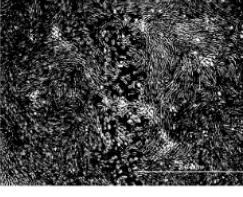
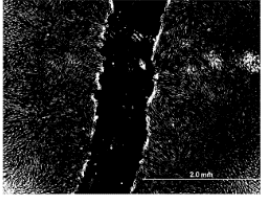
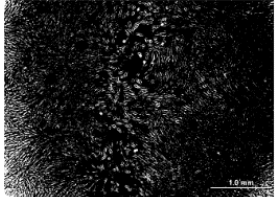
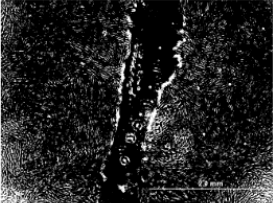
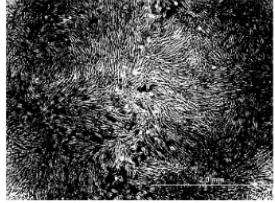
Şekil 4.11. Sağlıklı kontrol MSH'lerinden geliştirilen yara iyileşmesi modelinin 0, 3, 6, 12, 24. saatlerdeki Motilite indeksi.

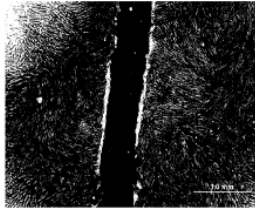
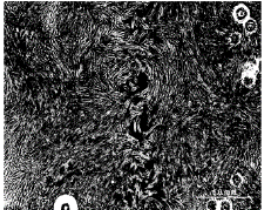

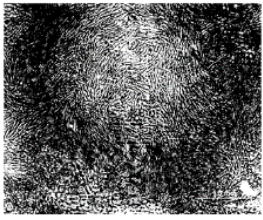
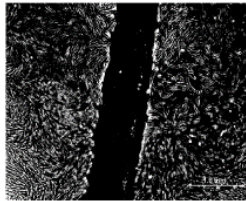
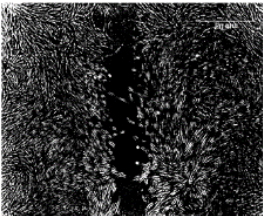
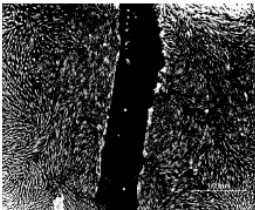
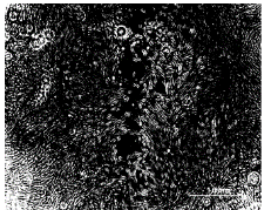
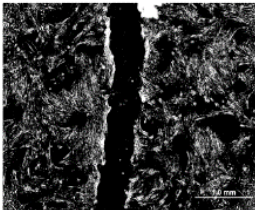
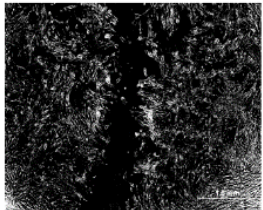

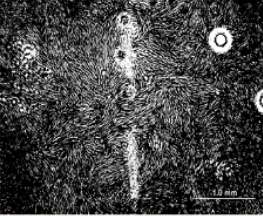
İstatistiksel analiz, SPSS 20 programı tek yönlü ANOVA kullanılarak yapıldı, Anlamli kapanmanın 24. saatte gerçekleştiği gözlemlendi. (*= istatistiksel olarak anlamlı olduğunu ifade etmektedir $p < 0,05$ değeri anlamlı kabul edildi.)

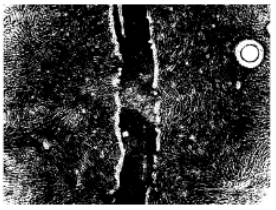
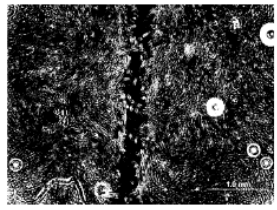
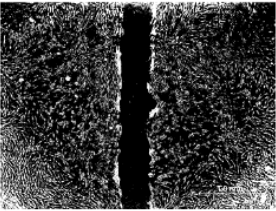
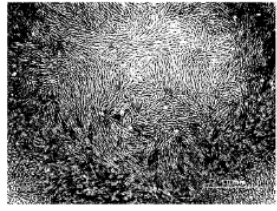
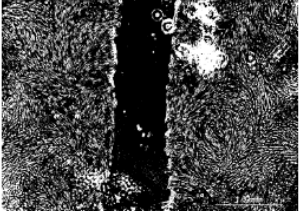
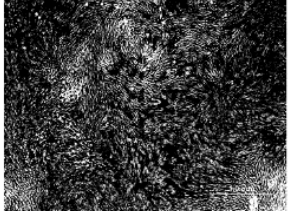
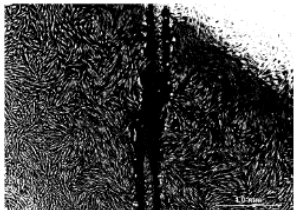
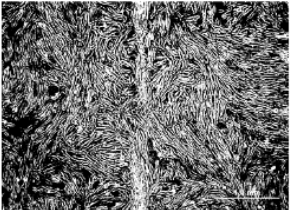
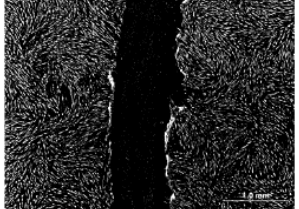
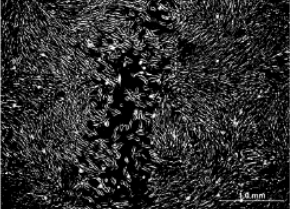
4.3.1. NF1'li Hastalara Ait Doku MSH'lerinde Yapılan Yara İyileşmesi

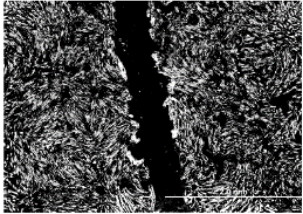
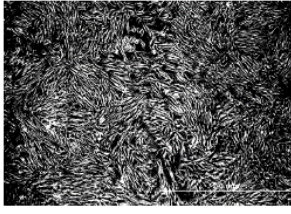
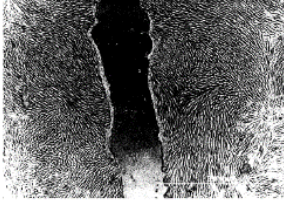
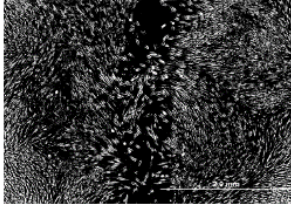
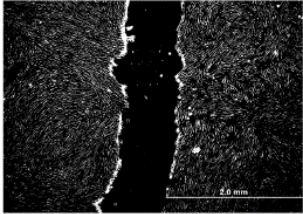
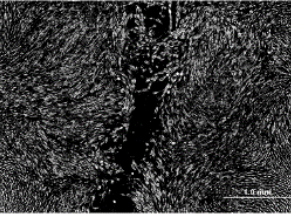
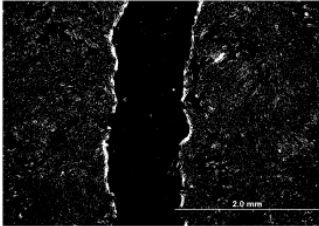
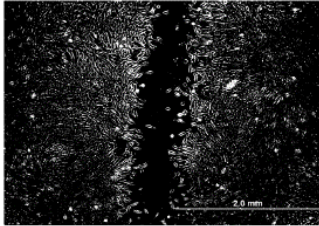
NF1 tanısı almış 13 hastanın Nörofibrom (dermal/pleksiform), CLS ve normal derilerinden geliştirilen MSH/Fibroblast hücrelerinde yapılan yara iyileşmesi ölçümlerinin, sağlıklı kontrolden alınan Motilite indeksine göre 24. saatte yapılması kararlaştırıldı. Motilite indeksi kültür kabındaki hücreler üzerine pipet ucu ile yapılan çizginin kapanma hızı (W) bir dokuya ait üç farklı alanda beşer ölçüm yapılarak ($MI = 1 - W_t/W_0$) hesaplandı (175). Her bir doku için üç biyolojik tekrarlı deney yapıldı ve mikroskopta 4X ve 10X objektif kullanılarak görüntü alındı. Kapanma ölçümleri için ImageJ programı kullanıldı. İstatistiksel analiz Kruskal wallis testi kullanıldı. Tüm NF1 hastalarından elde edilen yara iyileşmesi görüntüleri 0 ve 24. saat olarak, Tablo 4.4'de detaylı olarak gösterilmiştir.

Tablo 4.4. NF1 hastalarından 0 ve 24. saatlerde elde edilen yara iyileşmesi görüntüleri

Hasta No	Doku Tipi	0.saat	24.saat
H1	Normal Doku		
	CLS		
	Nörofibrom Doku (Dermal)		
H2	Normal Doku		
	CLS		
	Nörofibrom Doku (Dermal)		

H3	Normal Doku		
	Nörofibrom Dokusu (Dermal)		
H4	CLS		
	Nörofibrom Dokusu (Pleksiform)		
H5	Nörofibrom Dokusu (Dermal)		
H6	CLS		

	Nörofibrom Dokusu (Pleksiform)		
H7	Normal Doku		
	CLS		
H8	Normal Doku		
H9	Nörofibrom Dokusu (Pleksiform)		

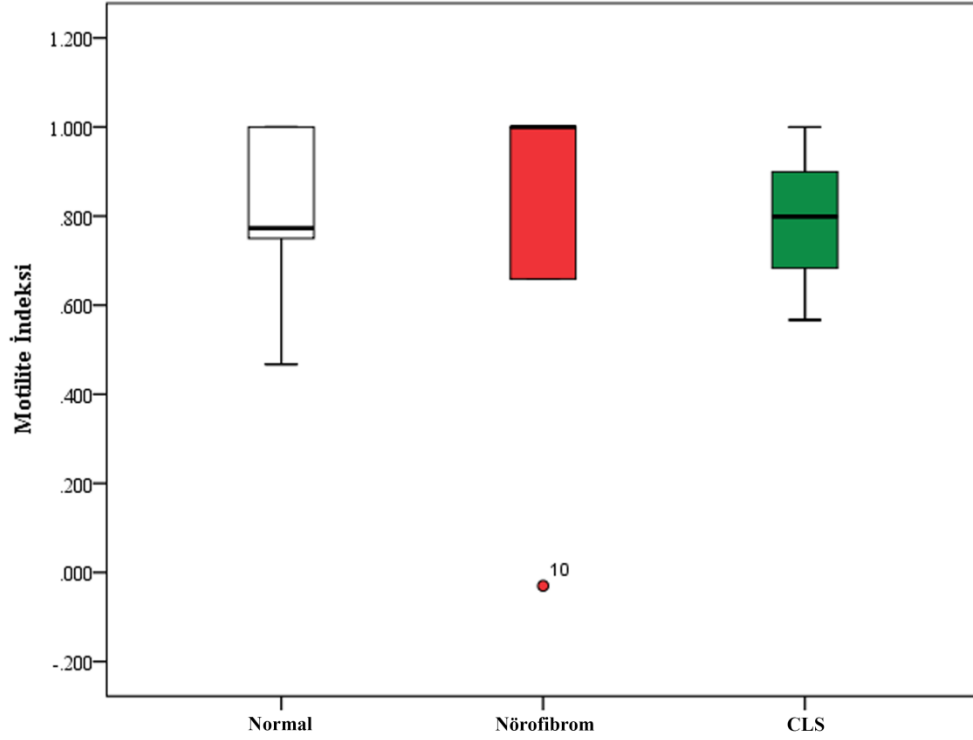
H10	Nörofibrom Dokusu (Pleksiform)		
H11	Nörofibrom Dokusu (Pleksiform)		
H12	Nörofibrom Dokusu (Dermal)		
H13	Nörofibrom Dokusu (Pleksiform)		

Test Statistics^{a,b}

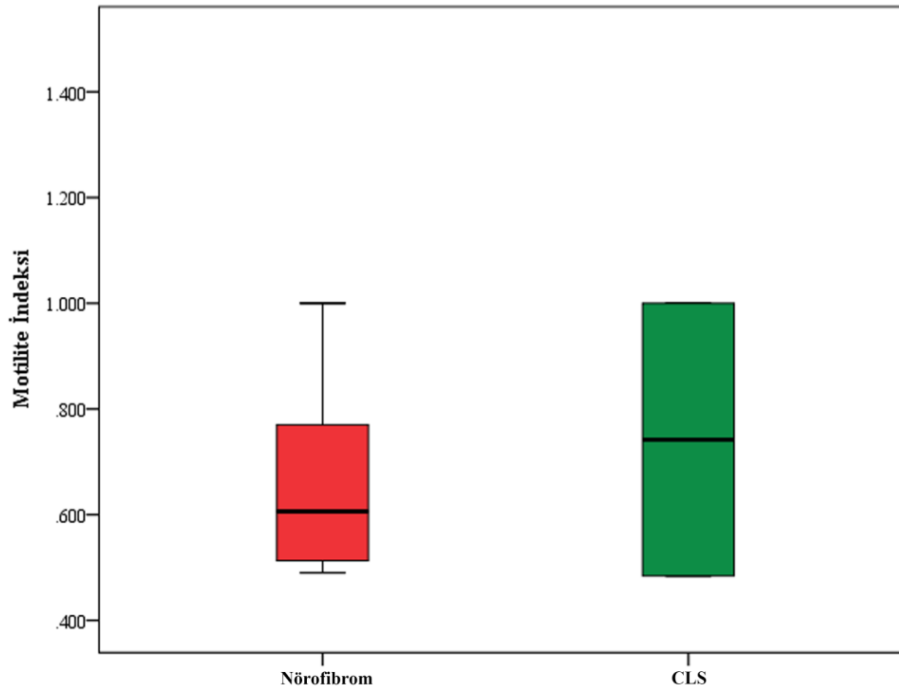
	MI
Chi-Square	,053
df	2
Asymp. Sig.	,974 Not significant

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Gruplama



Şekil 4.12. Dermal NF1 hastalarından (n=7) alınan örnekler kullanıldı ve Normal doku, CLS, Nörofibrom dokusu olmak üzere üç grup birbirleri arasında karşılaştırıldı. Kruskal Wallis Testi sonucu örnekler arasında MI değeri bakımından fark saptanmadı ($p=0.974$).



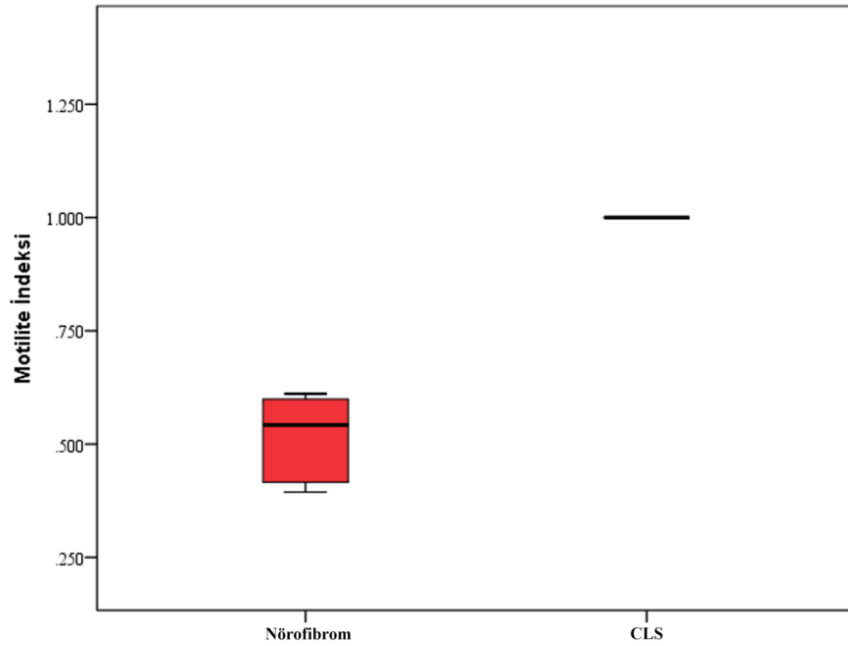
Test Statistics^a

	MI
Mann-Whitney U	5,500
Wilcoxon W	8,500
Z	-,168
Asymp. Sig. (2-tailed)	,867
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.857 ^b

Not Significant

Şekil 4.13. Plexiform NF1'li hastaların (n=6) Nörofibrom, CLS örnekleri üzerinden analiz yapılan istatistiksel analiz sonuçları. Tek bir CLS dokusu olması nedeniyle Mann-Whitney u testi kullanıldı.

Test sonucunda tüm plexiform NF1 hasta örnekleri değerlendirmeye alındığında Nörofibrom ve CLS dokularından alınan hücrelerin MI potansiyeli bakımından farklı olmadığı sonucuna varıldı (p=0.867).

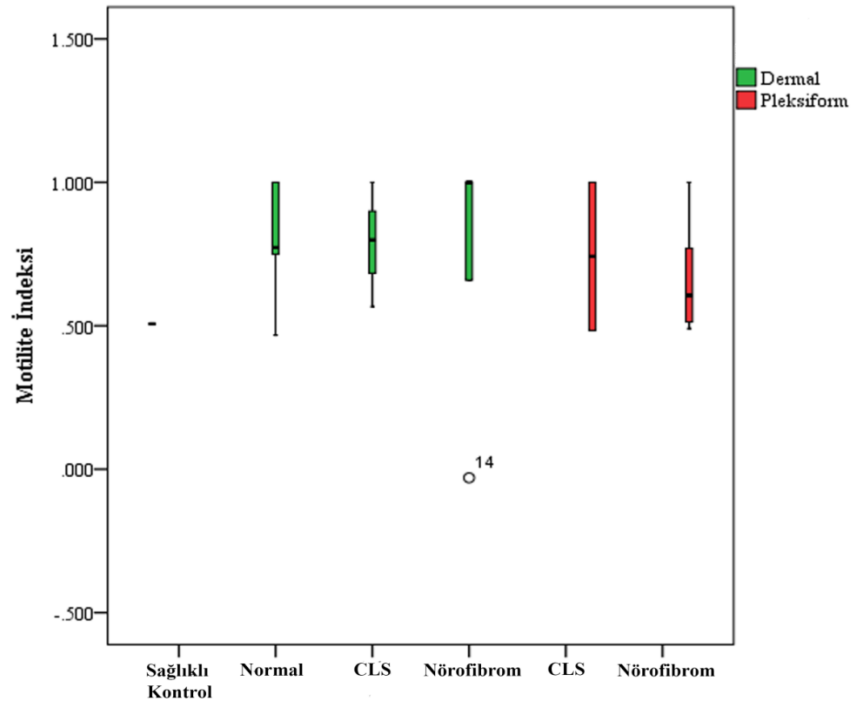


Test Statistics^a

	MI
Mann-Whitney U	0,000
Wilcoxon W	15,000
Z	-2,785
Asymp. Sig. (2-tailed)	,005 SIGNIFICANT
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.008 ^b

Şekil 4.14. Pleksiform nörofibromu olan 6 numaralı hastadan geliştirilen yara iyileşmesi modelinde 24. saatte ölçülen plexiform NF hücrelerinin MI değerleri, CLS hücrelerinden anlamlı olarak farklıydı ($P < 0.05$). MI, istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. ($p < 0,05$)

Pleksiform hastalarının tüm dokularından elde edilen veriler ışığında CLS dokusunun ait olduğu H6 NF1'li hastanın tek başına CLS ve Nörofibrom dokusundan elde edilen yara iyileşmesi sonuçları karşılaştırıldı. İstatistiksel analiz için, non-parametrik analiz yöntemi seçildi olan Mann-Whitney testi uygulandı. H6 numaralı hasta için 24. saatte ölçülen MI değerleri bakımından plexiform NF hücreleri ile CLS hücreleri arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlemlendi ($p < 0,05$).

Test Statistics^{a,b}

	MI
Chi-Square	1,371
df	4
Asymp. Sig.	,849 Not significant

a. Kruskal Wallis Test

Şekil 4.15. Dermal ve pleksiform NF1'li hastaların tüm dokuları (normal/CLS/NF dokusu) üzerinden analiz yapıldı. Kruskal wallis testi kullanıldı.

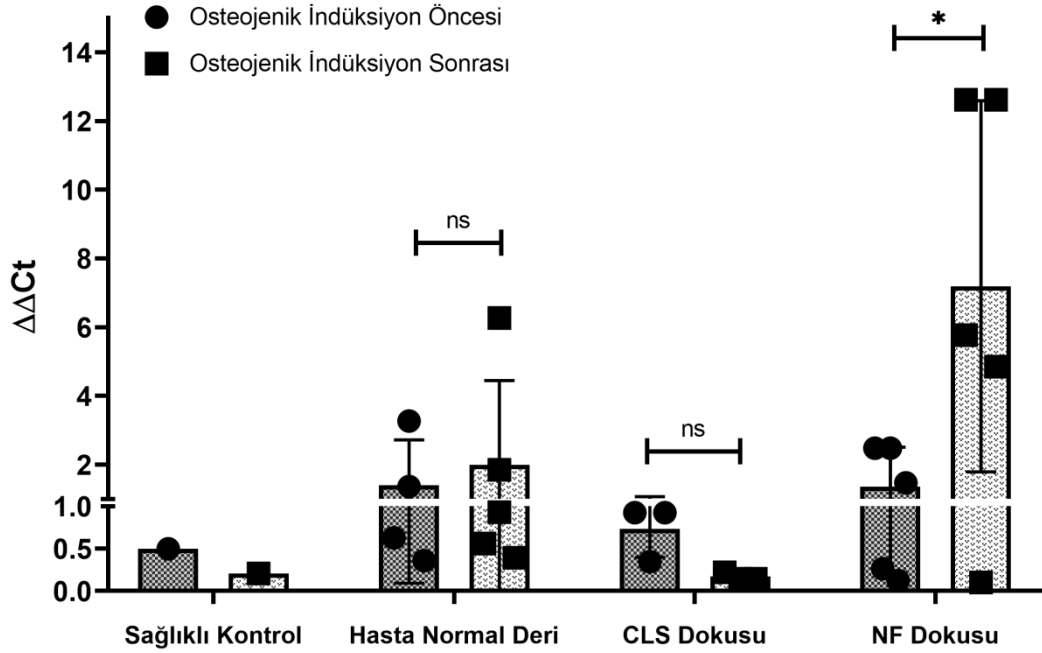
Asymp sig değeri 0.849 çıktığı için analize alınan 5 grup arasında MI değeri bakımından anlamlı bir fark olmadığı sonucuna varıldı.

4.4. MSH/Fibroblastların İlerin Osteojenik Farklılaşma Kapasitelerinin (NF1 Defektlerini Yansıtacak Şekilde) Gerçek Zamanlı PZR ile Analizi

4.4.1. Osteopontin (SPP) İfadesini Gerçek Zamanlı PZR Yöntemi İle Araştırılması

Kemik farklılaşması belirteçlerinden olan osteopontin (SPP) ifadesi gerçek zamanlı PZR yöntemi ile araştırıldı. Veri analizinde housekeeping gen olarak ACTB (beta-actin) geni kullanıldı, göreceli mRNA ifade analizi delta delta Ct metodu ile

hesaplandı. Farklılaşmamış hücrelerden elde edilen total RNA örnekleri, osteojenik farklılaşmanın 10. gününde yapılan RNA örnekleri ile karşılaştırıldı (174).



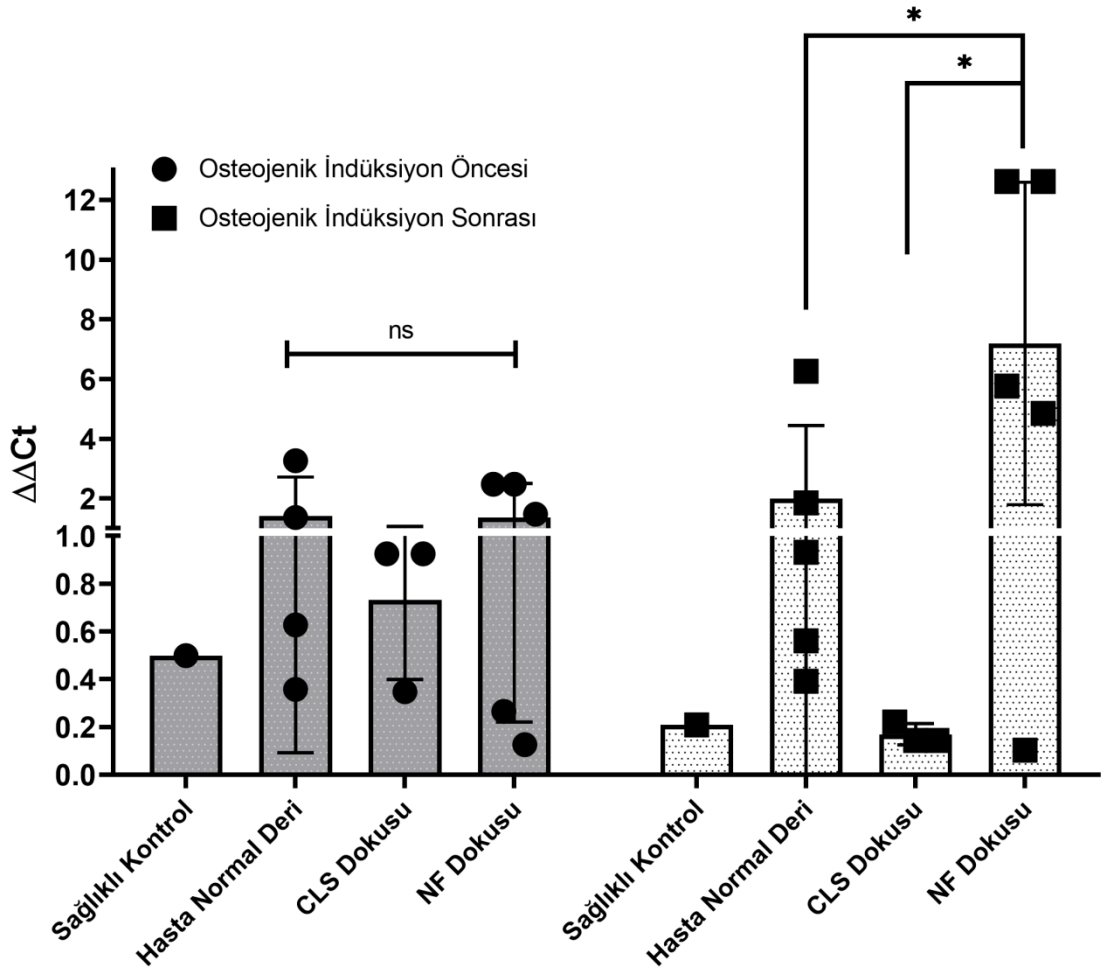
Şekil 4.16. Sağlıklı kontrol, NF1 hastalarına ait normal deri, CLS dokusu ve NF dokularının osteojenik indüksiyon öncesi ve sonrası Osteopontin (SPP) ifadenmeleri karşılaştırıldı. (ns=anlamli değil *=istatikel olarak anlamli p<0,05)

Kat artışı $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metodu kullanılarak hesaplanmıştır. $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metodunda, normalize edilen referans gen ifadenme değeri; $\Delta\Delta Ct=0$, $2^0=1$ olarak kabul edilir.

Hedef genler, hasta normal dokusuna göre normalize edildi. Hastalara ait NF dokularından elde edilen MSH/Fibroblastların osteojenik indüksiyon öncesi ve sonrası Osteopontin ifadenmesi arasındaki fark istatikel olarak anlamli bulundu. (p=0,0162)

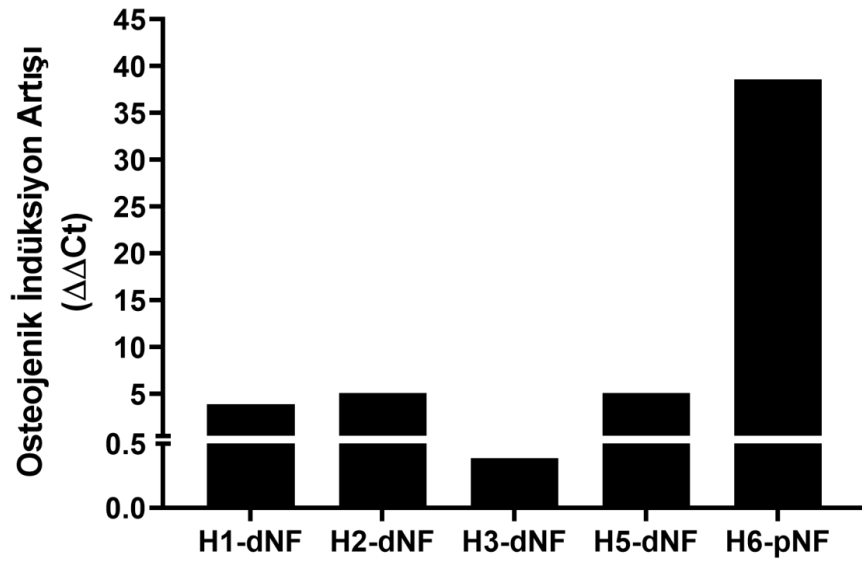
$$\Delta Ct = Ct_{\text{Hedeflenen gen}} - Ct_{\text{Referans Gen (\beta-actin)}}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{Hedeflenen dokular}} - \Delta Ct_{\text{Hasta Normal Deri}}$$



Şekil 4.17. Sağlıklı kontrol ve hastalardan elde edilen tüm MSH/Fibroblastların osteojenik indüksiyon öncesi ve sonrası Osteopontin ifadelermeleri (ns=anlamli değil *=istatikel olarak anlamli $p < 0,05$)

Osteojenik indüksiyon öncesi gruplar arasında anlamli fark gözlenmezken, osteojenik indüksiyon sonrası hastaların normal derilerinden geliştirilen MSH/Fibroblastların Osteopontin ifadeleri ile NF dokusu MSH/Fibroblastları arasında ($p=0,0411$) ve CLS Dokusu MSH/Fibroblastlar ile NF dokusu MSH/Fibroblastları arasında anlamli fark olduğu ($p=0,0144$) gözlendi.

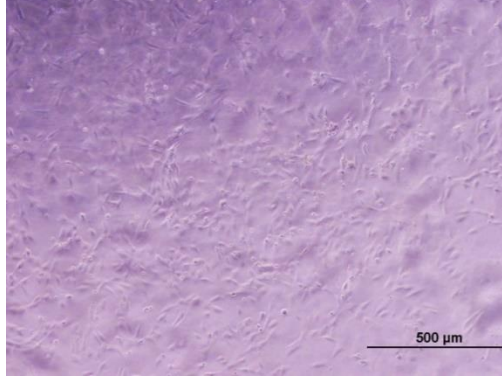


Şekil 4.18. Dermal Nörofibrom dokusu ve pleksiform nörofibrom dokusundan elde edilen MSH/Fibroblastların osteojenik farklılaşma sonrası Osteopontin ifadeleri.

4 adet dermal, 1 adet pleksiform NF dokusunun osteojenik indüksiyon öncesi ve sonrası Osteopontin ifadenmesi hasta normal dokusuna göre normalize edildi. Her hasta için öncesi ve sonrası kat artışı hesaplandı. Meydana gelen fark, NF dokuları arasında karşılaştırıldığında, pNF'deki Osteojenik indüksiyon sonrası Osteopontin ifadenmesindeki kat artışı açıkça görülmektedir. Örnek sayısı az olduğundan istatistiksel analiz yapılamamıştır.

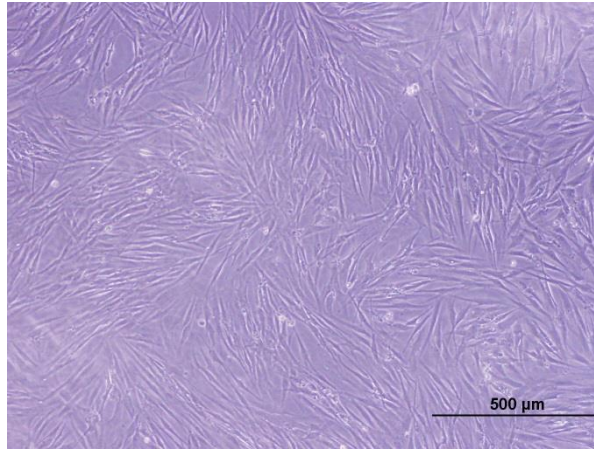
4.5: Schwann Hücre Hattı ile Hasta -MSH ve Sağlıklı MSH Ko-Kültürü

4.5.1. Hücre Kültürü



Şekil 4.19. Poli L Lysin ve Laminin kaplı transwell kültür kabında Schwann hücrelerinin ko kültür sırasındaki görüntüsü (10X)

Ko-kültür için kuru buzda getirilen insan Schwann Hücreleri çözülüp, tripan mavisi ile canlılık ve sayımı gerçekleştirildikten sonra Poli L Lysin ve Laminin kaplı transwell kültür kabında ekildi. 24 saat sonra hücrelerin plastik yüzeye yapıştığı gözlemlendi (Şekil 4.19) ve ko-kültür aşamasına geçildi.

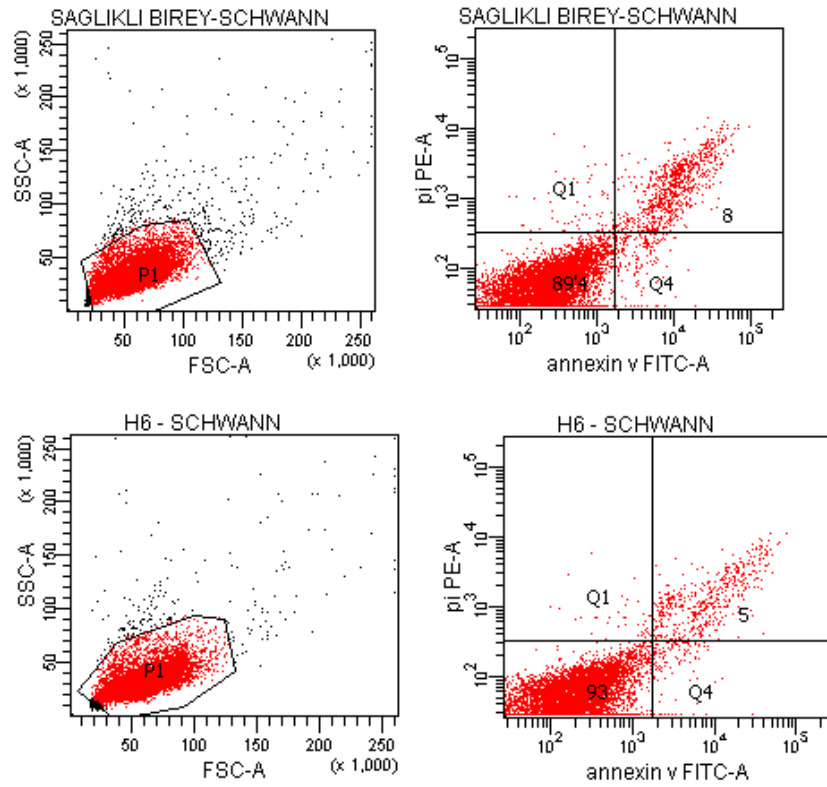


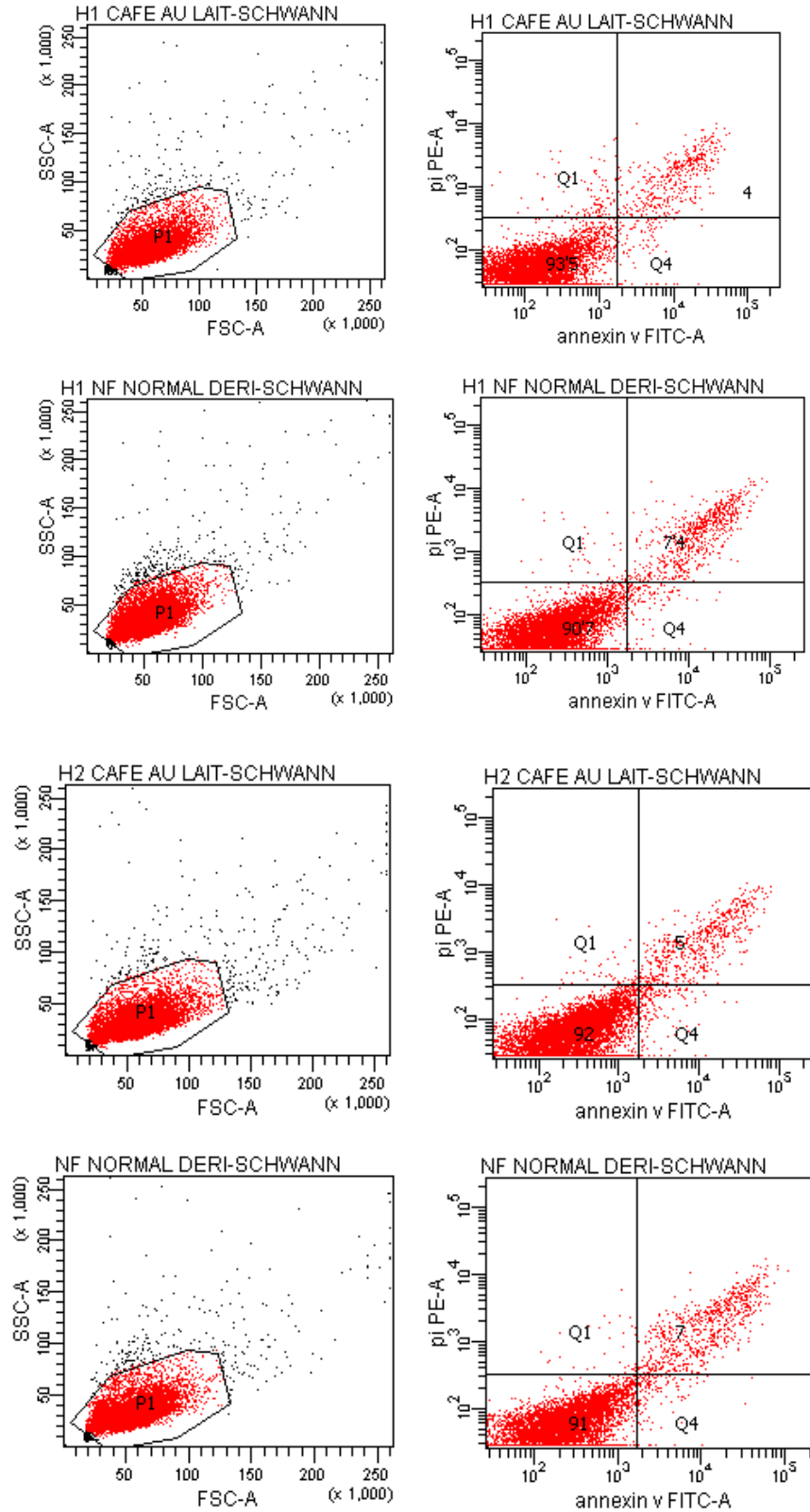
Şekil 4.20. Schwann hücresi ile ko kültür edilen MSH'lerin eş zamanlı görüntüsü (10X)

(süzgeç üzerinde görüntü net olmadığı için ko-kültür yapılmayan başka kuyudan eş zamanlı olarak alınmıştır.)

Ko-kültür çalışması için dermal nörofibromu olan iki hastanın CLS dokusundan ve NF normal derisinden elde edilen MSH/Fibroblast, pleksiform nörofibromu olan iki hastanın CLS dokusundan elde edilen MSH/Fibroblast ve sağlıklı bireyin dokusundan elde edilen MSH/Fibroblastlar kullanıldı. Hücrelerin ko-kültür sırasında morfolojik özelliklerini korudukları ve MSH'lerin plastik yüzeye yapışma özelliklerini sürdürdükleri gözlemlendi.

4.5.2. Schwann Hücre Apoptozisinin Akım Sitometri ile Tayini

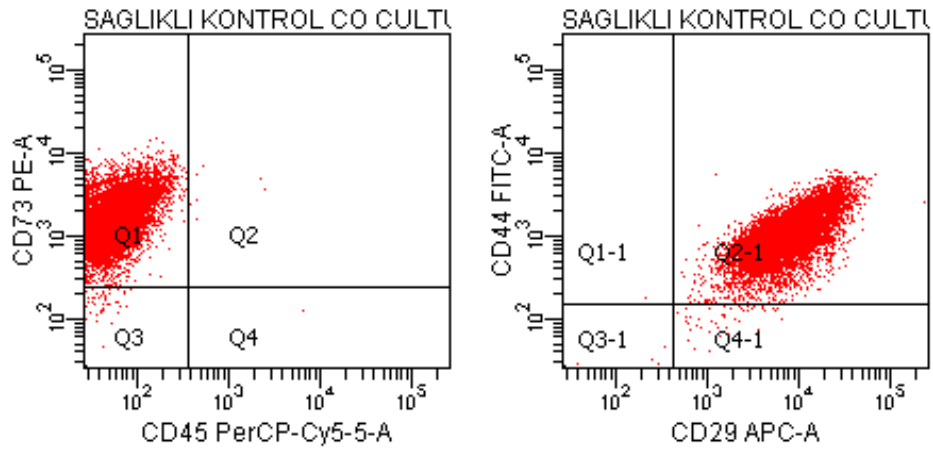




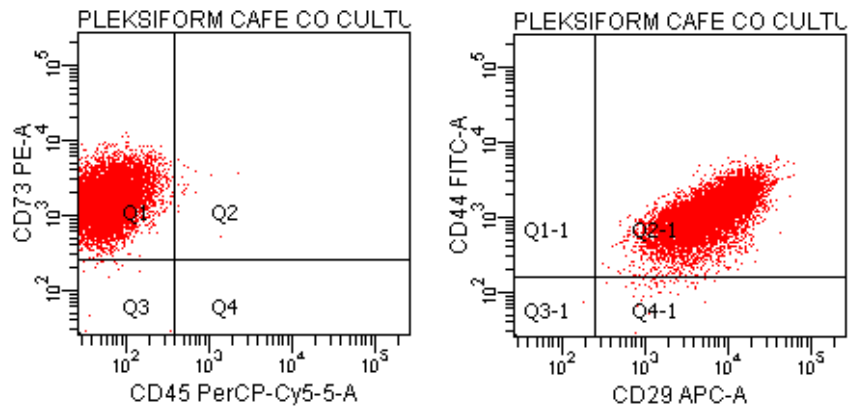
Şekil 4.21. Dokulardan elde edilen MSH'lerin Schwann Hücrelerin ölümü üzerine etkisi. Akım sitometri görüntüsüdür.

Dermal ve pleksiform nörofibromu olan bireylerin NF Normal deri ve CLS içeren dokularından elde edilen MSH'lerin Schwann Hücre hattı ile yapılan ko kültür sonrası, Sağlıklı birey MSH'lerin Schwann hücrelerinin ölümü üzerinde benzer etkisi olduğu tespit edildi. (Şekil4.21)

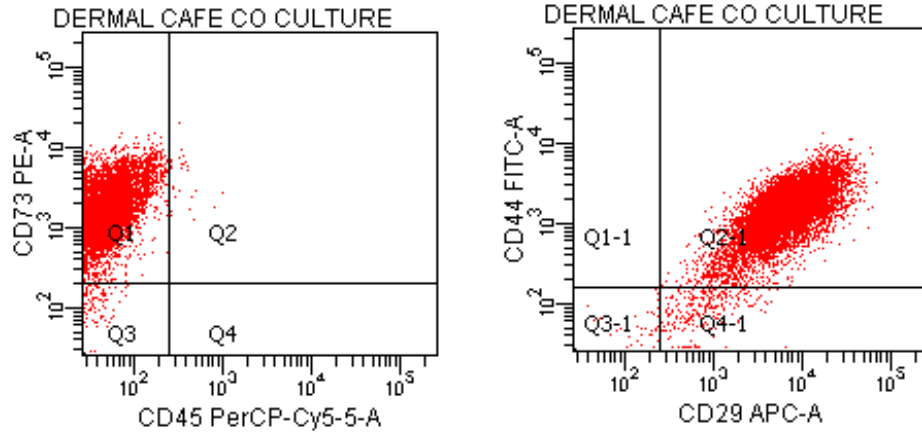
4.5.3. Schwann Hücrelerinin MSH/Fibroblastların Yüzey Belirteçleri Üzerine Etkisi



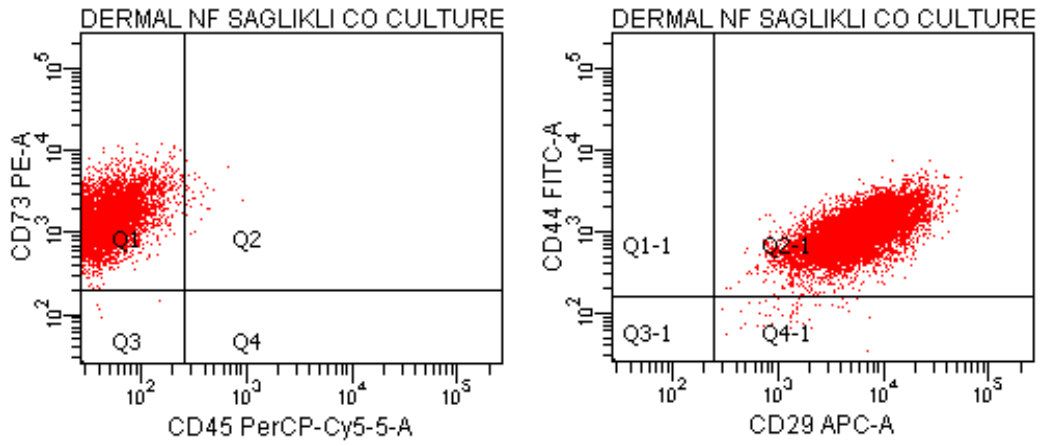
Şekil 4.22. Sağlıklı kontrol MSH ile Schwann hücre hattı ko-kültürü sonrası MSH yüzey belirteçleri



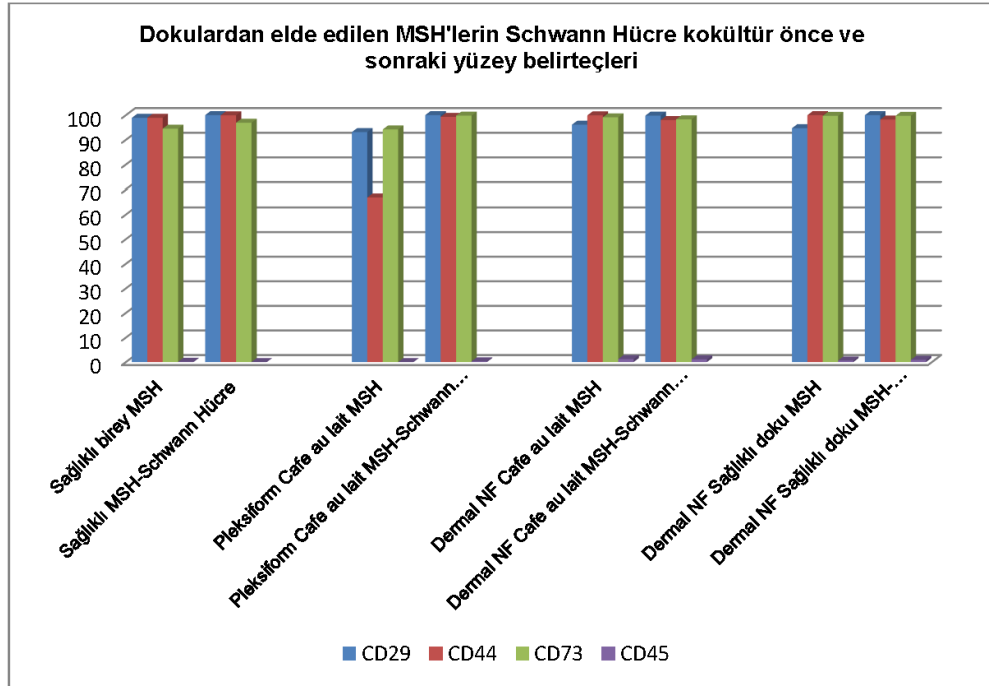
Şekil 4.23. Pleksiform nörofibromlu hastanın CLS dokusundan elde edilen MSH'ler ile Schwann hücre hattı ko-kültürü sonrası MSH yüzey belirteçleri



Şekil 4.24. Dermal nörofibromu olan hastanın CLS dokusundan elde edilen MSH'ler ile Schwann hücre hattı ko-kültürü sonrası MSH yüzey belirteçleri



Şekil 4.25. Dermal nörofibromu olan hastanın normal dokusundan elde edilen MSH'ler ile Schwann hücre hattı ko-kültürü sonrası MSH yüzey belirteçleri



Şekil 4.26. Sağlıklı birey, dermal nörofibromu olan bireylerin NF Normal deri ve CLS, pleksiform nörofibromu olan bireyin CLS içeren dokularından elde edilen MSH'lerin Schwann Hücre hattı ile yapılan ko-kültür sonrası, MSH'lerin yüzey belirteç değişimleri.

Her gruba ait örnek sayısı n=1 olduğu için istatistiksel analiz yapılamadı.

Sağlıklı bireyin dokusu, dermal nörofibromu olan bireylerin Normal deri, CLS dokuları ve pleksiform nörofibromu olan bireyin CLS içeren dokusundan elde edilen MSH'lerin Schwann Hücre hattı ile yapılan kokültürü sonrası, MSH'lerin yüzey belirteçleri üzerinde, pleksiform CLS MSH'lerinde gözlenen CD44 artışı hariç belirgin bir fark tespit edilmedi. (Şekil 4.26)

5. TARTIŞMA

Stromal karakterde destek hücreleri olan MSH'ler çeşitli büyüme faktörleri, sitokin, kemokinler salgılayarak veya diğer hücrelerle (örn. tümör hücresi, endotel, epitel) direkt ilişkileri yoluyla hücrelerin biyolojik davranışlarını (proliferasyon, apoptosis, migrasyon) etkiler (107). NF1 hastalarındaki bulgular mezenkimal, epitelyal, nöral, gibi birçok dokuyu tutmaktadır. Bu klinik bulgularda MSH'ler doğrudan veya diğer hücreler üzerine etkileri yoluyla dolaylı şekilde rol alabilir.

Nörofibromatozis Tip 1'de nörofibromlar önemli morbiditeye sebep olsa da çoğunlukla benign karakterdedir, ancak pleksiform nörofibromlar malign dönüşüme uğrayabilmektedir. Yapılan çalışmaların çoğunda söz konusu dönüşümde altta yatan mekanizmaları çözmek ve oluşan nörofibromların karakteristik özelliklerini tanımlamak üzerinedir. Ek olarak, pleksiform ve dermal nörofibromların davranışlarındaki farklılık nedeniyle, bu iki tip tümörün oluşumu arasındaki ayrımı yapmak da önem taşımaktadır. Söz konusu çalışmaların amaçları nörofibrom patogenezi ortaya koymak ve aynı zamanda NF1'li hastalar için yeni terapiler geliştirilmesine de olanak sağlamaktır (9). Bu noktadan yola çıkılarak bu tez çalışmasında NF1'li hasta dokularından elde edilen MSH/Fibroblast özelliklerinin sağlıklı insan MSH'leri ile karşılaştırılması amaçlandı.

Çalışmada temel olarak, NF1 hastalarında görülen pleksiform ve dermal Nörofibromların oluşum sürecinin altında yatan mekanizmayı aydınlatmak ve genotip fenotip ilişkisini kurmak amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda, hastaların Nörofibrom dokularının yanı sıra, CLS ve normal dokularından da geliştirilen MSH/Fibroblastlar kullanıldı. Detaylı karakterizasyonları gerçekleştirilen MSH/Fibroblastlar ayrıca yara iyileşmeleri yönünden ve osteojenik gen ifadelermeleri yönünden de karşılaştırıldı.

5.1. MSH/Fibroblast Hücrelerinin Karakterizasyonu

Bu tez çalışmasında karakterizasyon aşamasının ilk basamağı olarak akım sitometri çalışması sonucunda hücrelerin yüzeyinde ifade olan stromal belirteçlerin %20'nin üzerinde, hematopoetik belirteçlerin ise %20 değerinin altında olması

beklenmekteydi. NF1'li hastaların, Nörofibrom, CLS ve normal dokularından geliştirilen ve 3. pasaja getirilen MSH/Fibroblastların hepsi stromal belirteçler (CD44, CD90, CD73, CD29) açısından pozitif ve hematopoetik belirteçler (CD34, CD45) açısından da negatif ifadelenme gösterdiler.

Karakterizasyonun ikinci basamağında ise adipojenik ve osteojenik farklılaşma işlemleri gerçekleştirildi (bkz. Tablo 4.3). Gerek hasta gerekse sağlıklı kontrolden geliştirilen ve farklı dokulara ait MSH/Fibroblastların hepsinin adipojenik ve osteojenik farklılaşmaya gittiği gözlemlendi. Bu iki çalışmanın sonuçları birlikte değerlendirildiğinde, tez kapsamında elde edilmesi amaçlanan stromal hücrelerin NF1'li hasta ve sağlıklı kontrolden elde edilebildiği sonucuna varıldı.

5.2. MSH/Fibroblastlarda yara iyileşmesinin gözlenmesi (Scratch assay):

Fibroblastlar yara iyileşmesinde görev alan en önemli mezenkimal hücrelerdir (153, 177). Hem "üretim", hem de "mekanik" görevleri vardır. Geçici matriksin yerini alacak olan kollajen kökenli matriksin üretiminden sorumludurlar. Mekanik görevleri ise kontraktıl özellikleri yoluyla yara birleşmesini sağlamaktır (153). *NF1* geninin dermal yara iyileşmesi ve skar formasyonu üzerindeki rolü insan ve hayvan çalışmalarında değerlendirilmiştir. *NF1* knockout farelerle yapılan deneylerde, fibroblastlar tarafından gerçekleştirilen yara iyileşmesinin anormal olduğu gözlenmiştir (178). Çalışmamızda ise, 13 hasta ve sağlıklı bireyden elde edilmiş olan 22 farklı MSH örneği, konfluent hale getirilmiş olup (%90), örneklerin hepsine yara iyileşmesi modeli uygulandı. (bkz. Tablo 4.4.) Örneklerin sadece nörofibrom dokularından alınmayıp, CLS ve sağlıklı bölgelerini de içermesi çalışmamızın önemli bir özelliğidir. Hasta örneklerinin birbiri ile ve sağlıklı bireyin MSH'leri ile karşılaştırıldığı yara iyileşmesi modelinde motilite indeksi (MI) ile değerlendirme yapıldı. Dermal nörofibromlu NF1 hastasının CLS ve nörofibrom içeren MSH/Fibroblastlarının, sağlıklı bölgeye göre daha hızlı kapanma gözlemlendi ancak istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı. (bkz. Şekil 4.12) Pleksiform nörofibromu olan 1 hastada ise (H6), CLS dokusundan elde edilen MSH/Fibroblastlarının yarı kapatma hızı Nörofibrom MSH/Fibroblastlara göre

istatistiksel olarak anlamlı olduğu sonucuna varıldı (bkz. Şekil 4.14). Bu da pleksiform nörofibromu olan CLS dokusunun daha hızlı proliferasyona sahip olduğunu düşündürebilir. Bu veri tek hasta üzerinden alındığı ve literatürde de daha önce bu konuyla ilgili bir çalışmaya rastlanmadığı için sayı artırılarak bu sonucun desteklenmesi gerekmektedir. Ayrıca ileri bir çalışma ile proliferasyonda yer alan yollar açısından da değerlendirilmesi önerilebilir. Tüm pleksiform hastalarından elde edilen Mİ verileri incelendiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi (bkz. Şekil 4.13). Sağlıklı birey ile tüm NF1'li hastalar kıyaslandığında ise, nörofibrom kaynaklı MSH/Fibroblast'larının 24.saatte genel olarak kapanma sağladığı, CLS ve normal doku kaynaklı MSH/Fibroblastların ise sağlıklı bireyin verilerine daha yakın olduğu gözlemlendi. Ancak istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmedi (bkz. Şekil 4.15) Bunun nedeninin ise hasta ve özellikle sağlıklı kontrolün sayısının az olması olduğu düşünülebilir. Nörofibrom dokularından elde edilen MSH/Fibroblast'ların daha hızlı proliferere oldukları Almeida ve ekibi tarafından da gözlenmiştir (179).

5.3. MSH/Fibroblast Hücrelerinin Osteojenik Farklılaşma sürecinde Sergiledikleri Osteopontin İfadelemesi

Osteopontin(OPN) bilindiği üzere gelişim ve sağ kalıma ek olarak ilaç direnci gibi hücresel işlevleri etkileyen çok fonksiyonlu bir sitokindir (180). Bu özelliklerinden ötürü ifadenmesindeki değişiklikler çeşitli kanser tipleri başta olmak üzere hastalıkların patogeneğinde önemli rol oynamakta, tümör mikroçevresindeki rolü de hesaba katıldığında tanı ve prognozda belirteç olarak yer almasını sağlamaktadır. Çoğu karsinomlarda metastatik davranışı da etkilediği düşünülmektedir. Wnt/ β -katenin, Hedgeog, NF κ B ve östrojen gibi onkojenik sinyal yollarının düzenlenmesindeki hataların da osteopontin ifadenmesinin aktivasyonuna yol açabileceği bildirilmiştir (180, 181). Ras – aktive edici enhancer gibi (RAE) birkaç *cis*-düzenleyici elementin de OPN promotörü üzerinde tanımlanmış olması, OPN'nin fibroblast ve epitel hücrelerdeki önemli rolünü destekler niteliktedir (182). Ayrıca Wnt sinyalinin Osteopontin üzerindeki kritik rolü de birçok çalışmada gösterilmiştir (183, 184). OPN promotörünün Ets 1, Ets 2 gibi Ets

transkripsiyon faktörleri tarafından β -katenin ve Lep1'e cevap verebilme kapasitesini arttırdığı rapor edilmiştir (185). NF κ B ve Hedgeog yolaklarının transkripsiyon faktörü olan Gli1'in de OPN'nin düzenlenmesinde rol aldığı saptanmıştır (186, 187). Bu bilgilerin yanı sıra, OPN'in, sadece hipoksiye yanıt veren bir gen olmadığı, aynı zamanda normoksik koşullarda da HIF1 α ifadenmesini arttırdığı kaydedilmiştir (188, 189).

Tez kapsamında NF1 hastalarının dokulardan elde edilen MSH/fibroblast hücrelerinde osteojenik farklılaşma öncesi ve sonrası osteopontin ifadeleri de analiz edilmiş ve istatistiksel olarak anlamlı artış nörofibrom dokularından geliştirilen MSH/Fibroblastlarda gözlenmiştir (bkz.Şekil 4.16). *NF1* mutasyonu sonucu meydana gelen farklılaşmamış osteoblastların birikimi ile artmış olduğu var sayılan osteopontin ifadesi, kemik oluşumu açısından değerlendirildiğinde NF1 hastalarında görülen iskelet bulgularını açıklayabilir (190). Özellikle CLS lekelerinden elde edilen hücrelerin farklılaşma sonrasında daha düşük seviyede osteopontin ifade etmesi bu fikri desteklemektedir. Buna karşılık, nörofibrom dokularından elde edilen hücrelerde farklılaşma sürecinin 10. gününde osteopontin ifadesi artmıştır.(bkz. Şekil 4.17) Bu farklılık *NF1* geni mutasyonu sonucu RAS yolağında meydana gelen aktivite artışı ile açıklanabilir (182, 191-193). Farklı hastaların osteopontin ifadesi ayrı ayrı incelendiğinde ise pleksiform nörofibrom dokusundan kültüre edilen hücrelerin, diğer bireylere oranla 40 katın üzerinde osteopontin ifade ettiği saptanmış (bkz. Şekil 4.18), bu verinin pleksiform nörofibromda *NF1* mutasyonu bakımından "loss of heterozygosity" ve RAS yolağının aşırı aktivasyonuna bağlı olabileceği düşünülmüştür (192). OPN'nin RAS yolağı ile ilişkisi göz önüne alındığında daha sonraki çalışmalarda bu bulgunun hasta sayısı artırılarak ve Wnt yolağı baskılanarak incelenmesi öngörülebilir.

5.4. Schwann Hücre Hattı ile Hasta - MSH ve Sağlıklı MSH İlişkisinin Değerlendirmesi

NF1'in genetik doğasına baktığımızda nörofibromların NF1 geninin her iki allelinin de mutant olduğu Schwann hücrelerinden evrildiği, bununla beraber tümör

mikroçevresinin ise NF1 geninin heterozigot mutant bir ortamdan gelişim gösterdiği söylenebilmektedir. Tümör mikroçevresinde görülen bu heterozigozisitenin ise nörofibrom tümörgenezinde önemli olduğu da bilinmektedir (18, 20, 26, 89). Nörofibrom tümörgenezinde, Schwann hücreleri ve fibroblastlar arasındaki ilişkiden de söz etmek gerekmektedir. İki hücre arasında direkt temasın olduğu durumlarda Ephrin-B/EphB2 yolları üzerinden Schwann hücre ve nörofibrom kaynaklı fibroblastlarda sinyalizasyonu başlar (18, 194). Buna karşılık şu ana kadar yapılan çalışmalarda hücreler arası ilişkinin indirekt olduğu, yani hücre-hücre teması olmaksızın sadece aynı ortamın paylaşıldığı durumlar daha iyi karakterize edilmiş olup, immün hücreleri ve hücre dışı matriks bileşenlerini kapsamaktadır. NF1-/- Schwann hücrelerinin SCF ve CSF1 gibi kemokin-sitokinler salgılayarak, mast hücreleri ve makrofajlardan TGF- β salınmasını sağladıkları ve böylelikle de nörofibromların aktivitesini düzenledikleri bilinmektedir (18, 109). Bu tez çalışmasında Schwann hücresi ile NF1 ve sağlıklı bireylerden elde edilen MSH/fibroblastlar ko-kültür edilmiş, sonuçlar apoptoz ve hücre yüzey belirteçleri yönünden incelenmiştir. Ko-kültür sonrası Schwann hücrelerinde apoptoz açısından bir fark gözlenmediği gibi, kültüre alınan MSH/Fibroblastların yüzey belirteçlerinde de herhangi bir değişim olmamıştır. Bu bulgu, Giuliani'nin 2013 yılındaki, Schwann hücre içerikli tümörler olan nörofibromlarda tümör mikroçevresinden çok, doğrudan NF1 mutasyonunun etkisini incelediği yayını destekler niteliktedir (163).

MSH/Fibroblastların yüzey belirteçlerindeki değişim ele alındığında, CD44 belirtecinin ifadenmesinin, pleksiform CLS MSH'larında Schwann hücre ile yapılan ko-kültür sonrası artış göstermesi EMT geçişimi düşündürse de örnek sayısı artırılarak tekrarlanması gereken bir bulgudur.

6. SONUÇLAR

Elde edilen bilgiler ışığında;

- Transkriptom analizleri ile bulguların desteklenmesi ve mekanizmaların aydınlatılması,
- NF1 hastalarına ait mezenkimal stromal hücrelerin diğer RASopati grubu hastalıklar ve farklı iskelet malformasyonları taşıyan hastaların MSH'leri ile transkriptom düzeyinde kıyaslanması,
- Kemik bulgusu olan ve olmayan NF1 hastalarında osteopontin sentezi, osteojenik farklılaşma parametrelerinin ölçülmesi ve kültür ortamının fiziksel ve kimyasal koşulları ile ilişkisinin incelenmesi, böylece biyomateryal kullanımına ışık tutulması,
- Yara iyileşmesini etkileyen fiziksel koşulların ve özellikle keloid oluşumuna yatkın olan NF1 ve diğer bireyler için biyomateryallerin bu modelde denenmesi düşünülebilir.
- Farklı dokulardan elde edilen MSH/fibroblast'ların farklılaşma potansiyelleri morfolojik olarak incelendiğinde ise NF1'de sağlıklı kontrollere göre hem adipojenik hem de osteojenik farklılaşmanın azaldığı gözlemlendi (Tablo 4.3). İstatistik testleri uygulamak için sağlıklı kontrol bireylerin sayısının artırılması gerekmektedir. Benzer veriler osteojenik farklılaşma için Almeida ve ekibinin NF1 tanısı alan hastanın dental pulpasından elde edilen MSH'lerdeki çalışmasında da gözlenmiştir (179).
- Kemik farklılaşması sürecinde yapılan gen ifade analizleri de NF1 hastalığının patogenezi aydınlatmak açısından oldukça önemli görünmektedir. Özellikle NF1 hastalarına ait MSH'lerin diğer RASopati grubu hastalıklar ve farklı iskelet malformasyonları ile transkriptom düzeyinde kıyaslanması hem NF1, hem de benzer klinik tablolar gösteren bu diğer hastalıkların moleküler patogenezi aydınlatmak açısından faydalı olacaktır.

7. KAYNAKLAR

1. Wilson BN, John AM, Handler MZ, Schwartz RA. Neurofibromatosis type 1: New developments in genetics and treatment. *J Am Acad Dermatol.* 2021;84(6):1667-76.
2. Wang W, Wei CJ, Cui XW, Li YH, Gu YH, Gu B, et al. Impacts of NF1 Gene Mutations and Genetic Modifiers in Neurofibromatosis Type 1. *Front Neurol.* 2021;12:704639.
3. Laycock-van Spyk S, Thomas N, Cooper DN, Upadhyaya M. Neurofibromatosis type 1-associated tumours: their somatic mutational spectrum and pathogenesis. *Hum Genomics.* 2011;5(6):623-90.
4. Ballester R, Marchuk D, Boguski M, Saulino A, Letcher R, Wigler M, et al. The NF1 locus encodes a protein functionally related to mammalian GAP and yeast IRA proteins. *Cell.* 1990;63(4):851-9.
5. Spurlock G, Bennett E, Chuzhanova N, Thomas N, Jim HP, Side L, et al. SPRED1 mutations (Legius syndrome): another clinically useful genotype for dissecting the neurofibromatosis type 1 phenotype. *J Med Genet.* 2009;46(7):431-7.
6. Upadhyaya M, Han S, Consoli C, Majounie E, Horan M, Thomas NS, et al. Characterization of the somatic mutational spectrum of the neurofibromatosis type 1 (NF1) gene in neurofibromatosis patients with benign and malignant tumors. *Hum Mutat.* 2004;23(2):134-46.
7. Jouhilahti EM, Peltonen S, Heape AM, Peltonen J. The pathoetiology of neurofibromatosis 1. *Am J Pathol.* 2011;178(5):1932-9.
8. Upadhyaya M, Kluwe L, Spurlock G, Monem B, Majounie E, Mantripragada K, et al. Germline and somatic NF1 gene mutation spectrum in NF1-associated malignant peripheral nerve sheath tumors (MPNSTs). *Hum Mutat.* 2008;29(1):74-82.
9. Bui A, Jiang C, McKay RM, Klesse LJ, Le LQ. Insights into the Pathogenesis of NF1-Associated Neoplasms. *JID Innov.* 2021;1(3).
10. Riccardi VM. von Recklinghausen Disease: 130 Years. Upadhyaya M, Cooper D, editors. *Neurofibromatosis Type 1: Molecular and Cellular Biology.* Berlin: Springer; 2012.
11. Ugurlu B, Karaoz E. Comparison of similar cells: Mesenchymal stromal cells and fibroblasts. *Acta Histochem.* 2020;122(8):151634.
12. Fitzsimmons REB, Mazurek MS, Soos A, Simmons CA. Mesenchymal Stromal/Stem Cells in Regenerative Medicine and Tissue Engineering. *Stem Cells Int.* 2018;2018:8031718.
13. Buechler MB, Turley SJ. A short field guide to fibroblast function in immunity. *Semin Immunol.* 2018;35:48-58.

14. Antonio JR, Goloni-Bertollo EM, Tridico LA. Neurofibromatosis: chronological history and current issues. *An Bras Dermatol*. 2013;88(3):329-43.
15. Ferner RE, Gutmann DH. International consensus statement on malignant peripheral nerve sheath tumors in neurofibromatosis. *Cancer Res*. 2002;62(5):1573-7.
16. Le LQ, Parada LF. Tumor microenvironment and neurofibromatosis type 1: connecting the GAPs. *Oncogene*. 2007;26(32):4609-16.
17. Rutkowski JL, Wu K, Gutmann DH, Boyer PJ, Legius E. Genetic and cellular defects contributing to benign tumor formation in neurofibromatosis type 1. *Hum Mol Genet*. 2000;9(7):1059-66.
18. Jiang C, McKay RM, Le LQ. Tumorigenesis in neurofibromatosis type 1: role of the microenvironment. *Oncogene*. 2021;40(39):5781-7.
19. Viskochil D. Genetics of neurofibromatosis 1 and the NF1 gene. *J Child Neurol*. 2002;17(8):562-70; discussion 71-2, 646-51.
20. Brosseau JP, Pichard DC, Legius EH, Wolkenstein P, Lavker RM, Blakeley JO, et al. The biology of cutaneous neurofibromas: Consensus recommendations for setting research priorities. *Neurology*. 2018;91(2 Suppl 1):S14-S20.
21. Le LQ, Shipman T, Burns DK, Parada LF. Cell of origin and microenvironment contribution for NF1-associated dermal neurofibromas. *Cell Stem Cell*. 2009;4(5):453-63.
22. Li S, Chen Z, Le LQ. New insights into the neurofibroma tumor cells of origin. *Neurooncol Adv*. 2020;2(Suppl 1):i13-i22.
23. Boyd KP, Korf BR, Theos A. Neurofibromatosis type 1. *J Am Acad Dermatol*. 2009;61(1):1-14; quiz 5-6.
24. Pemov A, Li H, Presley W, Wallace MR, Miller DT. Genetics of human malignant peripheral nerve sheath tumors. *Neurooncol Adv*. 2020;2(Suppl 1):i50-i61.
25. Mo J, Anastasaki C, Chen Z, Shipman T, Papke J, Yin K, et al. Humanized neurofibroma model from induced pluripotent stem cells delineates tumor pathogenesis and developmental origins. *J Clin Invest*. 2021;131(1).
26. Staser K, Yang FC, Clapp DW. Mast cells and the neurofibroma microenvironment. *Blood*. 2010;116(2):157-64.
27. Peltonen J, Penttinen R, Larjava H, Aho HJ. Collagens in neurofibromas and neurofibroma cell cultures. *Ann N Y Acad Sci*. 1986;486:260-70.
28. Brosseau JP, Sathe AA, Wang Y, Nguyen T, Glass DA, 2nd, Xing C, et al. Human cutaneous neurofibroma matrisome revealed by single-cell RNA sequencing. *Acta Neuropathol Commun*. 2021;9(1):11.

29. Li Y, Zhu M, Lin X, Li J, Yuan Z, Liu Y, et al. Autophagy is involved in neurofibromatosis type 1 gene-modulated osteogenic differentiation in human bone mesenchymal stem cells. *Exp Ther Med*. 2021;22(5):1262.
30. Oguzkan S, Terzi YK, Cinbis M, Anlar B, Aysun S, Ayter S. Molecular genetic analyses in neurofibromatosis type 1 patients with tumors. *Cancer Genet Cytogenet*. 2006;165(2):167-71.
31. Parkin B, Ouillette P, Wang Y, Liu Y, Wright W, Roulston D, et al. NF1 inactivation in adult acute myelogenous leukemia. *Clin Cancer Res*. 2010;16(16):4135-47.
32. Zheng H, Chang L, Patel N, Yang J, Lowe L, Burns DK, et al. Induction of abnormal proliferation by nonmyelinating schwann cells triggers neurofibroma formation. *Cancer Cell*. 2008;13(2):117-28.
33. Parrinello S, Noon LA, Harrisingh MC, Wingfield Digby P, Rosenberg LH, Cremona CA, et al. NF1 loss disrupts Schwann cell-axonal interactions: a novel role for semaphorin 4F. *Genes Dev*. 2008;22(23):3335-48.
34. Chen Z, Mo J, Brosseau JP, Shipman T, Wang Y, Liao CP, et al. Spatiotemporal Loss of NF1 in Schwann Cell Lineage Leads to Different Types of Cutaneous Neurofibroma Susceptible to Modification by the Hippo Pathway. *Cancer Discov*. 2019;9(1):114-29.
35. Patrilli Cram J, Wu J, Coover RA, Rizvi TA, Chaney KE, Ravindran R, et al. P2RY14 cAMP signaling regulates Schwann cell precursor self-renewal, proliferation, and nerve tumor initiation in a mouse model of neurofibromatosis. *Elife*. 2022;11.
36. Conroy S, Kindon N, Kellam B, Stocks MJ. Drug-like Antagonists of P2Y Receptors-From Lead Identification to Drug Development. *J Med Chem*. 2016;59(22):9981-10005.
37. Patrilli-Cram J, Coover RA, Jankowski MP, Ratner N. Purinergic signaling in peripheral nervous system glial cells. *Glia*. 2021;69(8):1837-51.
38. Cho J, Yusuf R, Kook S, Attar E, Lee D, Park B, et al. Purinergic P2Y(1)(4) receptor modulates stress-induced hematopoietic stem/progenitor cell senescence. *J Clin Invest*. 2014;124(7):3159-71.
39. Piersma B, Bank RA, Boersema M. Signaling in Fibrosis: TGF-beta, WNT, and YAP/TAZ Converge. *Front Med (Lausanne)*. 2015;2:59.
40. Wehner D, Tsarouchas TM, Michael A, Haase C, Weidinger G, Reimer MM, et al. Wnt signaling controls pro-regenerative Collagen XII in functional spinal cord regeneration in zebrafish. *Nat Commun*. 2017;8(1):126.
41. Luscan A, Shackelford G, Masliah-Planchon J, Laurendeau I, Ortonne N, Varin J, et al. The activation of the WNT signaling pathway is a Hallmark in neurofibromatosis type 1 tumorigenesis. *Clin Cancer Res*. 2014;20(2):358-71.

42. Viskochil D, Buchberg AM, Xu G, Cawthon RM, Stevens J, Wolff RK, et al. Deletions and a translocation interrupt a cloned gene at the neurofibromatosis type 1 locus. *Cell*. 1990;62(1):187-92.
43. Upadhyaya M, Huson SM, Davies M, Thomas N, Chuzhanova N, Giovannini S, et al. An absence of cutaneous neurofibromas associated with a 3-bp inframe deletion in exon 17 of the NF1 gene (c.2970-2972 delAAT): evidence of a clinically significant NF1 genotype-phenotype correlation. *Am J Hum Genet*. 2007;80(1):140-51.
44. De Schepper S, Maertens O, Callens T, Naeyaert JM, Lambert J, Messiaen L. Somatic mutation analysis in NF1 cafe au lait spots reveals two NF1 hits in the melanocytes. *J Invest Dermatol*. 2008;128(4):1050-3.
45. Corsello G, Antona V, Serra G, Zara F, Giambrone C, Lagalla L, et al. Clinical and molecular characterization of 112 single-center patients with Neurofibromatosis type 1. *Ital J Pediatr*. 2018;44(1):45.
46. Ruggieri M, Huson SM. The clinical and diagnostic implications of mosaicism in the neurofibromatoses. *Neurology*. 2001;56(11):1433-43.
47. Koczkowska M, Callens T, Gomes A, Sharp A, Chen Y, Hicks AD, et al. Expanding the clinical phenotype of individuals with a 3-bp in-frame deletion of the NF1 gene (c.2970_2972del): an update of genotype-phenotype correlation. *Genet Med*. 2019;21(4):867-76.
48. Ben-Shachar S, Dubov T, Toledano-Alhadeef H, Mashiah J, Sprecher E, Constantini S, et al. Predicting neurofibromatosis type 1 risk among children with isolated cafe-au-lait macules. *J Am Acad Dermatol*. 2017;76(6):1077-83 e3.
49. Boley S, Sloan JL, Pemov A, Stewart DR. A quantitative assessment of the burden and distribution of Lisch nodules in adults with neurofibromatosis type 1. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2009;50(11):5035-43.
50. Stella A, Lastella P, Loconte DC, Bukvic N, Varvara D, Patruno M, et al. Accurate Classification of NF1 Gene Variants in 84 Italian Patients with Neurofibromatosis Type 1. *Genes (Basel)*. 2018;9(4).
51. Makino S, Tampo H, Arai Y, Obata H. Correlations between choroidal abnormalities, Lisch nodules, and age in patients with neurofibromatosis type 1. *Clin Ophthalmol*. 2014;8:165-8.
52. Le LQ, Liu C, Shipman T, Chen Z, Suter U, Parada LF. Susceptible stages in Schwann cells for NF1-associated plexiform neurofibroma development. *Cancer Res*. 2011;71(13):4686-95.
53. Fries KM, Blieden T, Looney RJ, Sempowski GD, Silvera MR, Willis RA, et al. Evidence of fibroblast heterogeneity and the role of fibroblast subpopulations in fibrosis. *Clin Immunol Immunopathol*. 1994;72(3):283-92.

54. Blasi A, Martino C, Balducci L, Saldarelli M, Soleti A, Navone SE, et al. Dermal fibroblasts display similar phenotypic and differentiation capacity to fat-derived mesenchymal stem cells, but differ in anti-inflammatory and angiogenic potential. *Vasc Cell*. 2011;3(1):5.
55. Ly KI, Blakeley JO. The Diagnosis and Management of Neurofibromatosis Type 1. *Med Clin North Am*. 2019;103(6):1035-54.
56. Korf BR. Diagnostic outcome in children with multiple cafe au lait spots. *Pediatrics*. 1992;90(6):924-7.
57. Korf BR. Plexiform neurofibromas. *Am J Med Genet*. 1999;89(1):31-7.
58. Joseph NM, Mosher JT, Buchstaller J, Snider P, McKeever PE, Lim M, et al. The loss of Nf1 transiently promotes self-renewal but not tumorigenesis by neural crest stem cells. *Cancer Cell*. 2008;13(2):129-40.
59. Dundr P, Povysil C, Tvrdik D. Actin expression in neural crest cell-derived tumors including schwannomas, malignant peripheral nerve sheath tumors, neurofibromas and melanocytic tumors. *Pathol Int*. 2009;59(2):86-90.
60. Driskell RR, Lichtenberger BM, Hoste E, Kretzschmar K, Simons BD, Charalambous M, et al. Distinct fibroblast lineages determine dermal architecture in skin development and repair. *Nature*. 2013;504(7479):277-81.
61. Kehrer-Sawatzki H, Mautner VF, Cooper DN. Emerging genotype-phenotype relationships in patients with large NF1 deletions. *Hum Genet*. 2017;136(4):349-76.
62. Bengesser K, Vogt J, Mussotter T, Mautner VF, Messiaen L, Cooper DN, et al. Analysis of crossover breakpoints yields new insights into the nature of the gene conversion events associated with large NF1 deletions mediated by nonallelic homologous recombination. *Hum Mutat*. 2014;35(2):215-26.
63. Jenne DE, Tinschert S, Reimann H, Lasinger W, Thiel G, Hameister H, et al. Molecular characterization and gene content of breakpoint boundaries in patients with neurofibromatosis type 1 with 17q11.2 microdeletions. *Am J Hum Genet*. 2001;69(3):516-27.
64. Messiaen L, Vogt J, Bengesser K, Fu C, Mikhail F, Serra E, et al. Mosaic type-1 NF1 microdeletions as a cause of both generalized and segmental neurofibromatosis type-1 (NF1). *Hum Mutat*. 2011;32(2):213-9.
65. Steinmann K, Kluwe L, Cooper DN, Brems H, De Raedt T, Legius E, et al. Copy number variations in the NF1 gene region are infrequent and do not predispose to recurrent type-1 deletions. *Eur J Hum Genet*. 2008;16(5):572-80.
66. Kehrer-Sawatzki H, Schmid E, Funsterer C, Kluwe L, Mautner VF. Absence of cutaneous neurofibromas in an NF1 patient with an atypical deletion partially overlapping the common 1.4 Mb microdeleted region. *Am J Med Genet A*. 2008;146A(6):691-9.

67. Kehrer-Sawatzki H, Kluwe L, Sandig C, Kohn M, Wimmer K, Krammer U, et al. High frequency of mosaicism among patients with neurofibromatosis type 1 (NF1) with microdeletions caused by somatic recombination of the JAZ1 gene. *Am J Hum Genet.* 2004;75(3):410-23.
68. Kehrer-Sawatzki H, Vogt J, Mussotter T, Kluwe L, Cooper DN, Mautner VF. Dissecting the clinical phenotype associated with mosaic type-2 NF1 microdeletions. *Neurogenetics.* 2012;13(3):229-36.
69. Steinmann K, Cooper DN, Kluwe L, Chuzhanova NA, Senger C, Serra E, et al. Type 2 NF1 deletions are highly unusual by virtue of the absence of nonallelic homologous recombination hotspots and an apparent preference for female mitotic recombination. *Am J Hum Genet.* 2007;81(6):1201-20.
70. Roehl AC, Mussotter T, Cooper DN, Kluwe L, Wimmer K, Hogel J, et al. Tissue-specific differences in the proportion of mosaic large NF1 deletions are suggestive of a selective growth advantage of hematopoietic del(+/-) stem cells. *Hum Mutat.* 2012;33(3):541-50.
71. Bengesser K, Cooper DN, Steinmann K, Kluwe L, Chuzhanova NA, Wimmer K, et al. A novel third type of recurrent NF1 microdeletion mediated by nonallelic homologous recombination between LRRC37B-containing low-copy repeats in 17q11.2. *Hum Mutat.* 2010;31(6):742-51.
72. Zickler AM, Hampp S, Messiaen L, Bengesser K, Mussotter T, Roehl AC, et al. Characterization of the nonallelic homologous recombination hotspot PRS3 associated with type-3 NF1 deletions. *Hum Mutat.* 2012;33(2):372-83.
73. Venturin M, Gervasini C, Orzan F, Bentivegna A, Corrado L, Colapietro P, et al. Evidence for non-homologous end joining and non-allelic homologous recombination in atypical NF1 microdeletions. *Hum Genet.* 2004;115(1):69-80.
74. Pasmant E, Sabbagh A, Spurlock G, Laurendeau I, Grillo E, Hamel MJ, et al. NF1 microdeletions in neurofibromatosis type 1: from genotype to phenotype. *Hum Mutat.* 2010;31(6):E1506-18.
75. Taylor Tavares AL, Willatt L, Armstrong R, Simonic I, Park SM. Mosaic deletion of the NF1 gene in a patient with cognitive disability and dysmorphic features but without diagnostic features of NF1. *Am J Med Genet A.* 2013;161A(5):1185-8.
76. Vogt J, Bengesser K, Claes KB, Wimmer K, Mautner VF, van Minkelen R, et al. SVA retrotransposon insertion-associated deletion represents a novel mutational mechanism underlying large genomic copy number changes with non-recurrent breakpoints. *Genome Biol.* 2014;15(6):R80.
77. Ferner RE, Huson SM, Thomas N, Moss C, Willshaw H, Evans DG, et al. Guidelines for the diagnosis and management of individuals with neurofibromatosis 1. *J Med Genet.* 2007;44(2):81-8.

78. Gross AM, Singh G, Akshintala S, Baldwin A, Dombi E, Ukwuani S, et al. Association of plexiform neurofibroma volume changes and development of clinical morbidities in neurofibromatosis 1. *Neuro Oncol.* 2018;20(12):1643-51.
79. Dombi E, Solomon J, Gillespie AJ, Fox E, Balis FM, Patronas N, et al. NF1 plexiform neurofibroma growth rate by volumetric MRI: relationship to age and body weight. *Neurology.* 2007;68(9):643-7.
80. Prada CE, Rangwala FA, Martin LJ, Lovell AM, Saal HM, Schorry EK, et al. Pediatric plexiform neurofibromas: impact on morbidity and mortality in neurofibromatosis type 1. *J Pediatr.* 2012;160(3):461-7.
81. Nguyen R, Kluwe L, Fuensterer C, Kentsch M, Friedrich RE, Mautner VF. Plexiform neurofibromas in children with neurofibromatosis type 1: frequency and associated clinical deficits. *J Pediatr.* 2011;159(4):652-5 e2.
82. Mussotter T, Kluwe L, Hogel J, Nguyen R, Cooper DN, Mautner VF, et al. Non-coding RNA ANRIL and the number of plexiform neurofibromas in patients with NF1 microdeletions. *BMC Med Genet.* 2012;13:98.
83. Eyvani H, Moghaddaskho F, Kabuli M, Zekri A, Momeny M, Tavakkoly-Bazzaz J, et al. Arsenic trioxide induces cell cycle arrest and alters DNA methylation patterns of cell cycle regulatory genes in colorectal cancer cells. *Life Sci.* 2016;167:67-77.
84. Chen J, Huang X, Tao C, Xiao T, Li X, Zeng Q, et al. Artemether Attenuates the Progression of Non-small Cell Lung Cancer by Inducing Apoptosis, Cell Cycle Arrest and Promoting Cellular Senescence. *Biol Pharm Bull.* 2019;42(10):1720-5.
85. Meng L, Hu H, Zhi H, Liu Y, Shi F, Zhang L, et al. OCT4B regulates p53 and p16 pathway genes to prevent apoptosis of breast cancer cells. *Oncol Lett.* 2018;16(1):522-8.
86. Bakker AC, La Rosa S, Sherman LS, Knight P, Lee H, Pancza P, et al. Neurofibromatosis as a gateway to better treatment for a variety of malignancies. *Prog Neurobiol.* 2017;152:149-65.
87. Yang F, Xu S, Liu R, Shi T, Li X, Li X, et al. The investigation for potential modifier genes in patients with neurofibromatosis type 1 based on next-generation sequencing. *Onco Targets Ther.* 2018;11:919-32.
88. Wu J, Keng VW, Patmore DM, Kendall JJ, Patel AV, Jousma E, et al. Insertional Mutagenesis Identifies a STAT3/Arid1b/beta-catenin Pathway Driving Neurofibroma Initiation. *Cell Rep.* 2016;14(8):1979-90.
89. Zhu Y, Ghosh P, Charnay P, Burns DK, Parada LF. Neurofibromas in NF1: Schwann cell origin and role of tumor environment. *Science.* 2002;296(5569):920-2.

90. Maro GS, Vermeren M, Voiculescu O, Melton L, Cohen J, Charnay P, et al. Neural crest boundary cap cells constitute a source of neuronal and glial cells of the PNS. *Nat Neurosci*. 2004;7(9):930-8.
91. Gresset A, Coulpier F, Gerschenfeld G, Jourdon A, Matesic G, Richard L, et al. Boundary Caps Give Rise to Neurogenic Stem Cells and Terminal Glia in the Skin. *Stem Cell Reports*. 2015;5(2):278-90.
92. Radomska KJ, Topilko P. Boundary cap cells in development and disease. *Curr Opin Neurobiol*. 2017;47:209-15.
93. Armstrong L, Jett K, Birch P, Kendler DL, McKay H, Tsang E, et al. The generalized bone phenotype in children with neurofibromatosis 1: a sibling matched case-control study. *Am J Med Genet A*. 2013;161A(7):1654-61.
94. Kluwe L, Hagel C, Friedrich RE, Schnabel C, Schon G, Mautner V. Vitamin D receptor expression and serum 25(OH)D concentration inversely associates with burden of neurofibromas. *Eur J Cancer Prev*. 2019;28(3):220-4.
95. Elefteriou F, Kolanczyk M, Schindeler A, Viskochil DH, Hock JM, Schorry EK, et al. Skeletal abnormalities in neurofibromatosis type 1: approaches to therapeutic options. *Am J Med Genet A*. 2009;149A(10):2327-38.
96. Kossler N, Stricker S, Rodelsperger C, Robinson PN, Kim J, Dietrich C, et al. Neurofibromin (Nf1) is required for skeletal muscle development. *Hum Mol Genet*. 2011;20(14):2697-709.
97. Scala M, Schiavetti I, Madia F, Chelleri C, Piccolo G, Accogli A, et al. Genotype-Phenotype Correlations in Neurofibromatosis Type 1: A Single-Center Cohort Study. *Cancers (Basel)*. 2021;13(8).
98. Wang W, Nyman JS, Ono K, Stevenson DA, Yang X, Elefteriou F. Mice lacking Nf1 in osteochondroprogenitor cells display skeletal dysplasia similar to patients with neurofibromatosis type I. *Hum Mol Genet*. 2011;20(20):3910-24.
99. Rhodes SD, Wu X, He Y, Chen S, Yang H, Staser KW, et al. Hyperactive transforming growth factor-beta1 signaling potentiates skeletal defects in a neurofibromatosis type 1 mouse model. *J Bone Miner Res*. 2013;28(12):2476-89.
100. Sullivan K, El-Hoss J, Little DG, Schindeler A. JNK inhibitors increase osteogenesis in Nf1-deficient cells. *Bone*. 2011;49(6):1311-6.
101. Li Y, Li J, Zhou Q, Liu Y, Chen W, Xu H. mTORC1 signaling is essential for neurofibromatosis type I gene modulated osteogenic differentiation of BMSCs. *J Cell Biochem*. 2019;120(3):2886-96.
102. Lammert M, Friedman JM, Roth HJ, Friedrich RE, Kluwe L, Atkins D, et al. Vitamin D deficiency associated with number of neurofibromas in neurofibromatosis 1. *J Med Genet*. 2006;43(10):810-3.

103. Plotkin SR, Bredella MA, Cai W, Kassarian A, Harris GJ, Esparza S, et al. Quantitative assessment of whole-body tumor burden in adult patients with neurofibromatosis. *PLoS One*. 2012;7(4):e35711.
104. Friedman JM, Birch PH. Type 1 neurofibromatosis: a descriptive analysis of the disorder in 1,728 patients. *Am J Med Genet*. 1997;70(2):138-43.
105. North K. Neurofibromatosis type 1. *Am J Med Genet*. 2000;97(2):119-27.
106. Ostrov DA, Magis AT, Wronski TJ, Chan EK, Toro EJ, Donatelli RE, et al. Identification of enoxacin as an inhibitor of osteoclast formation and bone resorption by structure-based virtual screening. *J Med Chem*. 2009;52(16):5144-51.
107. Liu ZJ, Zhuge Y, Velazquez OC. Trafficking and differentiation of mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem*. 2009;106(6):984-91.
108. Kadono T, Soma Y, Takehara K, Nakagawa H, Ishibashi Y, Kikuchi K. The growth regulation of neurofibroma cells in neurofibromatosis type-1: increased responses to PDGF-BB and TGF-beta 1. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994;198(3):827-34.
109. Yang FC, Chen S, Clegg T, Li X, Morgan T, Estwick SA, et al. Nf1+/- mast cells induce neurofibroma like phenotypes through secreted TGF-beta signaling. *Hum Mol Genet*. 2006;15(16):2421-37.
110. Mashour GA, Ratner N, Khan GA, Wang HL, Martuza RL, Kurtz A. The angiogenic factor midkine is aberrantly expressed in NF1-deficient Schwann cells and is a mitogen for neurofibroma-derived cells. *Oncogene*. 2001;20(1):97-105.
111. Spiegel M, Oexle K, Horn D, Windt E, Buske A, Albrecht B, et al. Childhood overgrowth in patients with common NF1 microdeletions. *Eur J Hum Genet*. 2005;13(7):883-8.
112. Ning X, Farschtschi S, Jones A, Kehrer-Sawatzki H, Mautner VF, Friedman JM. Growth in neurofibromatosis 1 microdeletion patients. *Clin Genet*. 2016;89(3):351-4.
113. Brussa Reis L, Turchetto-Zolet AC, Fonini M, Ashton-Prolla P, Rosset C. The Role of Co-Deleted Genes in Neurofibromatosis Type 1 Microdeletions: An Evolutive Approach. *Genes (Basel)*. 2019;10(11).
114. Venturin M, Carra S, Gaudenzi G, Brunelli S, Gallo GR, Moncini S, et al. ADAP2 in heart development: a candidate gene for the occurrence of cardiovascular malformations in NF1 microdeletion syndrome. *J Med Genet*. 2014;51(7):436-43.
115. Krab LC, Aarsen FK, de Goede-Bolder A, Catsman-Berrevoets CE, Arts WF, Moll HA, et al. Impact of neurofibromatosis type 1 on school performance. *J Child Neurol*. 2008;23(9):1002-10.

116. Chaix Y, Lauwers-Cances V, Faure-Marie N, Gentil C, Lelong S, Schweitzer E, et al. Deficit in phonological processes: a characteristic of the neuropsychological profile of children with NF1. *Child Neuropsychol.* 2018;24(4):558-74.
117. Acosta MT, Bearden CE, Castellanos FX, Cutting L, Elgersma Y, Gioia G, et al. The Learning Disabilities Network (LeaDNet): using neurofibromatosis type 1 (NF1) as a paradigm for translational research. *Am J Med Genet A.* 2012;158A(9):2225-32.
118. Evans DG, Baser ME, McGaughan J, Sharif S, Howard E, Moran A. Malignant peripheral nerve sheath tumours in neurofibromatosis 1. *J Med Genet.* 2002;39(5):311-4.
119. Carrio M, Gel B, Terribas E, Zucchiatti AC, Moline T, Rosas I, et al. Analysis of intratumor heterogeneity in Neurofibromatosis type 1 plexiform neurofibromas and neurofibromas with atypical features: Correlating histological and genomic findings. *Hum Mutat.* 2018;39(8):1112-25.
120. Koczkowska M, Chen Y, Callens T, Gomes A, Sharp A, Johnson S, et al. Genotype-Phenotype Correlation in NF1: Evidence for a More Severe Phenotype Associated with Missense Mutations Affecting NF1 Codons 844-848. *Am J Hum Genet.* 2018;102(1):69-87.
121. Tajima S, Koda K. A neurogenic tumor containing a low-grade malignant peripheral nerve sheath tumor (MPNST) component with loss of p16 expression and homozygous deletion of CDKN2A/p16: a case report showing progression from a neurofibroma to a high-grade MPNST. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015;8(5):5113-20.
122. Keng VW, Rahrman EP, Watson AL, Tschida BR, Moertel CL, Jessen WJ, et al. PTEN and NF1 inactivation in Schwann cells produces a severe phenotype in the peripheral nervous system that promotes the development and malignant progression of peripheral nerve sheath tumors. *Cancer Res.* 2012;72(13):3405-13.
123. Cichowski K, Shih TS, Schmitt E, Santiago S, Reilly K, McLaughlin ME, et al. Mouse models of tumor development in neurofibromatosis type 1. *Science.* 1999;286(5447):2172-6.
124. Listernick R, Charrow J, Greenwald M, Mets M. Natural history of optic pathway tumors in children with neurofibromatosis type 1: a longitudinal study. *J Pediatr.* 1994;125(1):63-6.
125. Campen CJ, Gutmann DH. Optic Pathway Gliomas in Neurofibromatosis Type 1. *J Child Neurol.* 2018;33(1):73-81.
126. Kocova M, Kochova E, Sukarova-Angelovska E. Optic glioma and precocious puberty in a girl with neurofibromatosis type 1 carrying an R681X mutation of NF1: case report and review of the literature. *BMC Endocr Disord.* 2015;15:82.

127. Toonen JA, Anastasaki C, Smithson LJ, Gianino SM, Li K, Kesterson RA, et al. NF1 germline mutation differentially dictates optic glioma formation and growth in neurofibromatosis-1. *Hum Mol Genet.* 2016;25(9):1703-13.
128. Bolcekova A, Nemethova M, Zatkova A, Hlinkova K, Pozgayova S, Hlavata A, et al. Clustering of mutations in the 5' tertile of the NF1 gene in Slovakia patients with optic pathway glioma. *Neoplasma.* 2013;60(6):655-65.
129. Robertson KA, Nalepa G, Yang FC, Bowers DC, Ho CY, Hutchins GD, et al. Imatinib mesylate for plexiform neurofibromas in patients with neurofibromatosis type 1: a phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2012;13(12):1218-24.
130. Seminog OO, Goldacre MJ. Risk of benign tumours of nervous system, and of malignant neoplasms, in people with neurofibromatosis: population-based record-linkage study. *Br J Cancer.* 2013;108(1):193-8.
131. Uusitalo E, Kallionpaa RA, Kurki S, Rantanen M, Pitkaniemi J, Kronqvist P, et al. Breast cancer in neurofibromatosis type 1: overrepresentation of unfavourable prognostic factors. *Br J Cancer.* 2017;116(2):211-7.
132. Suarez-Kelly LP, Yu L, Kline D, Schneider EB, Agnese DM, Carson WE. Increased breast cancer risk in women with neurofibromatosis type 1: a meta-analysis and systematic review of the literature. *Hered Cancer Clin Pract.* 2019;17:12.
133. Evans DGR, Kallionpaa RA, Clementi M, Trevisson E, Mautner VF, Howell SJ, et al. Breast cancer in neurofibromatosis 1: survival and risk of contralateral breast cancer in a five country cohort study. *Genet Med.* 2020;22(2):398-406.
134. Yap YS, Munusamy P, Lim C, Chan CHT, Prawira A, Loke SY, et al. Breast cancer in women with neurofibromatosis type 1 (NF1): a comprehensive case series with molecular insights into its aggressive phenotype. *Breast Cancer Res Treat.* 2018;171(3):719-35.
135. Geldon L, Masjkur JR, Richter S, Darr R, Lahera M, Aust D, et al. Next-generation panel sequencing identifies NF1 germline mutations in three patients with pheochromocytoma but no clinical diagnosis of neurofibromatosis type 1. *Eur J Endocrinol.* 2018;178(2):K1-K9.
136. Vlenterie M, Flucke U, Hofbauer LC, Timmers HJ, Gastmeier J, Aust DE, et al. Pheochromocytoma and gastrointestinal stromal tumors in patients with neurofibromatosis type I. *Am J Med.* 2013;126(2):174-80.
137. Rodriguez FJ, Vizcaino MA, Blakeley J, Heaphy CM. Frequent alternative lengthening of telomeres and ATRX loss in adult NF1-associated diffuse and high-grade astrocytomas. *Acta Neuropathol.* 2016;132(5):761-3.
138. Serra E, Puig S, Otero D, Gaona A, Kruyer H, Ars E, et al. Confirmation of a double-hit model for the NF1 gene in benign neurofibromas. *Am J Hum Genet.* 1997;61(3):512-9.

139. Serra E, Ars E, Ravella A, Sanchez A, Puig S, Rosenbaum T, et al. Somatic NF1 mutational spectrum in benign neurofibromas: mRNA splice defects are common among point mutations. *Hum Genet.* 2001;108(5):416-29.
140. Mirsky R, Woodhoo A, Parkinson DB, Arthur-Farraj P, Bhaskaran A, Jessen KR. Novel signals controlling embryonic Schwann cell development, myelination and dedifferentiation. *J Peripher Nerv Syst.* 2008;13(2):122-35.
141. El Soury M, Fornasari BE, Morano M, Grazio E, Ronchi G, Incarnato D, et al. Soluble Neuregulin1 Down-Regulates Myelination Genes in Schwann Cells. *Front Mol Neurosci.* 2018;11:157.
142. Jessen KR, Brennan A, Morgan L, Mirsky R, Kent A, Hashimoto Y, et al. The Schwann cell precursor and its fate: a study of cell death and differentiation during gliogenesis in rat embryonic nerves. *Neuron.* 1994;12(3):509-27.
143. Jessen KR, Mirsky R. Schwann Cell Precursors; Multipotent Glial Cells in Embryonic Nerves. *Front Mol Neurosci.* 2019;12:69.
144. Chen CZ, Neumann B, Forster S, Franklin RJM. Schwann cell remyelination of the central nervous system: why does it happen and what are the benefits? *Open Biol.* 2021;11(1):200352.
145. Visvader JE. Cells of origin in cancer. *Nature.* 2011;469(7330):314-22.
146. Knudson AG. Antioncogenes and human cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90(23):10914-21.
147. Clevers H. The cancer stem cell: premises, promises and challenges. *Nat Med.* 2011;17(3):313-9.
148. Yang ZJ, Ellis T, Markant SL, Read TA, Kessler JD, Bourbonoulas M, et al. Medulloblastoma can be initiated by deletion of Patched in lineage-restricted progenitors or stem cells. *Cancer Cell.* 2008;14(2):135-45.
149. Pardal R, Clarke MF, Morrison SJ. Applying the principles of stem-cell biology to cancer. *Nat Rev Cancer.* 2003;3(12):895-902.
150. Magee JA, Piskounova E, Morrison SJ. Cancer stem cells: impact, heterogeneity, and uncertainty. *Cancer Cell.* 2012;21(3):283-96.
151. Liao CP, Pradhan S, Chen Z, Patel AJ, Booker RC, Le LQ. The role of nerve microenvironment for neurofibroma development. *Oncotarget.* 2016;7(38):61500-8.
152. Adameyko I, Lallemand F, Aquino JB, Pereira JA, Topilko P, Muller T, et al. Schwann cell precursors from nerve innervation are a cellular origin of melanocytes in skin. *Cell.* 2009;139(2):366-79.
153. Ichim TE, O'Heeron P, Kesari S. Fibroblasts as a practical alternative to mesenchymal stem cells. *J Transl Med.* 2018;16(1):212.
154. Friedenstein AJ, Piatetzky S, II, Petrakova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol.* 1966;16(3):381-90.

155. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res.* 1991;9(5):641-50.
156. Soundararajan M, Kannan S. Fibroblasts and mesenchymal stem cells: Two sides of the same coin? *J Cell Physiol.* 2018;233(12):9099-109.
157. Galipeau J, Sensebe L. Mesenchymal Stromal Cells: Clinical Challenges and Therapeutic Opportunities. *Cell Stem Cell.* 2018;22(6):824-33.
158. Jo YY, Lee HJ, Kook SY, Chung HW, Park JY, Chung JH, et al. Isolation and characterization of postnatal stem cells from human dental tissues. *Tissue Eng.* 2007;13(4):767-73.
159. Secco M, Zucconi E, Vieira NM, Fogaca LL, Cerqueira A, Carvalho MD, et al. Multipotent stem cells from umbilical cord: cord is richer than blood! *Stem Cells.* 2008;26(1):146-50.
160. Hauser PV, De Fazio R, Bruno S, Sdei S, Grange C, Bussolati B, et al. Stem cells derived from human amniotic fluid contribute to acute kidney injury recovery. *Am J Pathol.* 2010;177(4):2011-21.
161. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006;8(4):315-7.
162. Denu RA, Nemcek S, Bloom DD, Goodrich AD, Kim J, Mosher DF, et al. Fibroblasts and Mesenchymal Stromal/Stem Cells Are Phenotypically Indistinguishable. *Acta Haematol.* 2016;136(2):85-97.
163. Giuliani N, Lisignoli G, Magnani M, Racano C, Bolzoni M, Dalla Palma B, et al. New insights into osteogenic and chondrogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells and their potential clinical applications for bone regeneration in pediatric orthopaedics. *Stem Cells Int.* 2013;2013:312501.
164. Boxall SA, Jones E. Markers for characterization of bone marrow multipotential stromal cells. *Stem Cells Int.* 2012;2012:975871.
165. Rasini V, Dominici M, Kluba T, Siegel G, Lusenti G, Northoff H, et al. Mesenchymal stromal/stem cells markers in the human bone marrow. *Cytotherapy.* 2013;15(3):292-306.
166. Ding DC, Shyu WC, Lin SZ. Mesenchymal stem cells. *Cell Transplant.* 2011;20(1):5-14.
167. Keyser KA, Beagles KE, Kiem HP. Comparison of mesenchymal stem cells from different tissues to suppress T-cell activation. *Cell Transplant.* 2007;16(5):555-62.
168. Li N, Hua J. Interactions between mesenchymal stem cells and the immune system. *Cell Mol Life Sci.* 2017;74(13):2345-60.

169. Song N, Scholtemeijer M, Shah K. Mesenchymal Stem Cell Immunomodulation: Mechanisms and Therapeutic Potential. *Trends Pharmacol Sci.* 2020;41(9):653-64.
170. Liu JL, You YH, Tian ZW, Xiao M, Zheng JW, Wang YA, et al. Increased nuclear translation of YAP might act as a potential therapeutic target for NF1-related plexiform neurofibroma. *Int J Med Sci.* 2021;18(9):2008-16.
171. Widemann BC, Babovic-Vuksanovic D, Dombi E, Wolters PL, Goldman S, Martin S, et al. Phase II trial of pirfenidone in children and young adults with neurofibromatosis type 1 and progressive plexiform neurofibromas. *Pediatr Blood Cancer.* 2014;61(9):1598-602.
172. Babovic-Vuksanovic D, Ballman K, Michels V, McGrann P, Lindor N, King B, et al. Phase II trial of pirfenidone in adults with neurofibromatosis type 1. *Neurology.* 2006;67(10):1860-2.
173. Neurofibromatosis. Conference statement. National Institutes of Health Consensus Development Conference. *Arch Neurol.* 1988;45(5):575-8.
174. Castren E, Sillat T, Oja S, Noro A, Laitinen A, Konttinen YT, et al. Osteogenic differentiation of mesenchymal stromal cells in two-dimensional and three-dimensional cultures without animal serum. *Stem Cell Res Ther.* 2015;6:167.
175. Fraser SP, Salvador V, Manning EA, Mizal J, Altun S, Raza M, et al. Contribution of functional voltage-gated Na⁺ channel expression to cell behaviors involved in the metastatic cascade in rat prostate cancer: I. Lateral motility. *J Cell Physiol.* 2003;195(3):479-87.
176. Streuli CH, Schmidhauser C, Bailey N, Yurchenco P, Skubitz AP, Roskelley C, et al. Laminin mediates tissue-specific gene expression in mammary epithelia. *J Cell Biol.* 1995;129(3):591-603.
177. Ho S, Marcal H, Foster LJ. Towards scarless wound healing: a comparison of protein expression between human, adult and foetal fibroblasts. *Biomed Res Int.* 2014;2014:676493.
178. Atit RP, Crowe MJ, Greenhalgh DG, Wenstrup RJ, Ratner N. The Nf1 tumor suppressor regulates mouse skin wound healing, fibroblast proliferation, and collagen deposited by fibroblasts. *J Invest Dermatol.* 1999;112(6):835-42.
179. Almeida PN, Souza GT, de Souza CM, de Zanette RS, Maranduba CP, Rettore JV, et al. Proposing the use of dental pulp stem cells as a suitable biological model of neurofibromatosis type 1. *Childs Nerv Syst.* 2015;31(1):7-13.
180. Shevde LA, Samant RS. Role of osteopontin in the pathophysiology of cancer. *Matrix Biol.* 2014;37:131-41.
181. Minai-Tehrani A, Chang SH, Park SB, Cho MH. The Oglycosylation mutant osteopontin alters lung cancer cell growth and migration in vitro and in vivo. *Int J Mol Med.* 2013;32(5):1137-49.

182. Denhardt DT, Mistretta D, Chambers AF, Krishna S, Porter JF, Raghuram S, et al. Transcriptional regulation of osteopontin and the metastatic phenotype: evidence for a Ras-activated enhancer in the human OPN promoter. *Clin Exp Metastasis*. 2003;20(1):77-84.
183. Ravindranath A, Yuen HF, Chan KK, Grills C, Fennell DA, Lappin TR, et al. Wnt-beta-catenin-Tcf-4 signalling-modulated invasiveness is dependent on osteopontin expression in breast cancer. *Br J Cancer*. 2011;105(4):542-51.
184. Mitra A, Menezes ME, Pannell LK, Mulekar MS, Honkanen RE, Shevde LA, et al. DNAJB6 chaperones PP2A mediated dephosphorylation of GSK3beta to downregulate beta-catenin transcription target, osteopontin. *Oncogene*. 2012;31(41):4472-83.
185. El-Tanani M, Platt-Higgins A, Rudland PS, Campbell FC. Ets gene PEA3 cooperates with beta-catenin-Lef-1 and c-Jun in regulation of osteopontin transcription. *J Biol Chem*. 2004;279(20):20794-806.
186. Samant RS, Clark DW, Fillmore RA, Cicek M, Metge BJ, Chandramouli KH, et al. Breast cancer metastasis suppressor 1 (BRMS1) inhibits osteopontin transcription by abrogating NF-kappaB activation. *Mol Cancer*. 2007;6:6.
187. Das S, Harris LG, Metge BJ, Liu S, Riker AI, Samant RS, et al. The hedgehog pathway transcription factor GLI1 promotes malignant behavior of cancer cells by up-regulating osteopontin. *J Biol Chem*. 2009;284(34):22888-97.
188. Kale S, Raja R, Thorat D, Soundararajan G, Patil TV, Kundu GC. Osteopontin signaling upregulates cyclooxygenase-2 expression in tumor-associated macrophages leading to enhanced angiogenesis and melanoma growth via alpha9beta1 integrin. *Oncogene*. 2014;33(18):2295-306.
189. Raja R, Kale S, Thorat D, Soundararajan G, Lohite K, Mane A, et al. Hypoxia-driven osteopontin contributes to breast tumor growth through modulation of HIF1alpha-mediated VEGF-dependent angiogenesis. *Oncogene*. 2014;33(16):2053-64.
190. Kolanczyk M, Kossler N, Kuhnisch J, Lavitas L, Stricker S, Wilkening U, et al. Multiple roles for neurofibromin in skeletal development and growth. *Hum Mol Genet*. 2007;16(8):874-86.
191. Yoon S, Seger R. The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth Factors*. 2006;24(1):21-44.
192. Sherman LS, Atit R, Rosenbaum T, Cox AD, Ratner N. Single cell Ras-GTP analysis reveals altered Ras activity in a subpopulation of neurofibroma Schwann cells but not fibroblasts. *J Biol Chem*. 2000;275(39):30740-5.
193. Gutmann DH, Ferner RE, Listernick RH, Korf BR, Wolters PL, Johnson KJ. Neurofibromatosis type 1. *Nat Rev Dis Primers*. 2017;3:17004.
194. Fricker FR, Bennett DL. The role of neuregulin-1 in the response to nerve injury. *Future Neurol*. 2011;6(6):809-22.

8. EKLER

EK 1. Etik Kurul Onayı



HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSEL OLMAYAN
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

06100 Sıhhiye-Ankara
Telefon: 0 (312) 305 1082 - Faks: 0 (312) 330 0580
E-posta: goetik@hacettepe.edu.tr

02 Ağustos 2013

Sayı: 16969557 - 846

ARAŞTIRMA PROJESİ DEĞERLENDİRME RAPORU

Toplantı Tarihi : 24.07.2013 ÇARŞAMBA
Toplantı No : 2013/14
Proje No : GO 13/ 202 (Değerlendirme Tarihi 24.07.2013)
Karar No : GO 13/ 202 - 21

Üniversitemiz Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Pediatrik Hematoloji Ünitesi öğretim üyelerinden Prof.Dr.Mualla ÇETİN'in sorumlu araştırmacı olduğu Prof.Dr.Şükriye AYTER, Prof.Dr.Duygu Uçkan ÇETİNKAYA, Prof.Dr.Banu ANLAR, Prof.Dr.Petek KORKUSUZ, Doç.Dr.Barış KUŞKONMAZ, Doç.Dr.İbrahim VARGEL, Yrd.Doç.Dr.Tarık ÇAVUŞOĞLU, Dr.Ünsal DEMİR ve Uzm.Bio.İrem Akar SOYCAN ile birlikte çalışacakları GO 13/202 kayıt numaralı ve "*Nörofibromatozis (NF) Hastalarında Kemik İliği ve Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Özelliklerinin Belirlenmesi*" başlıklı proje önerisi Kurulumuzda değerlendirilmiş olup, etik açıdan uygun bulunmuştur.

1. Prof. Dr. Nurten Akarsu	(Başkan)	9	Prof. Dr. Melahat Görduysus	(Üye)
2. Prof. Dr. Nüket Örnek Buken	(Üye)	10	Prof. Dr. Cansın Şaçkesen	(Üye)
3. Prof. Dr. M. Yıldırım Sara	(Üye)	11	Doç. Dr. R. Köksal Özgül	(Üye)
4. Prof. Dr. Sevda E. Müftüoğlu	(Üye)	12	Doç. Dr. Ayşe Lale Doğan	(Üye)
5. Prof. Dr. Cenk Sökmensüer	(Üye)	13	Doç. Dr. S. Kutay Demirkan	(Üye)
6. Prof. Dr. Volga Bayrakçı Tuna	(Üye)	14	Prof. Dr. Leyla Dinç	(Üye)
7. Prof. Dr. Songül Vaizoğlu	(Üye)	15	Yrd. Doç. Dr. H. Hüsvrev Turnagöl	(Üye)
8. Prof. Dr. Yılmaz Selim Erdal	(Üye)	16	Av. Meltem Onurlu	(Üye)

EK 2. Orjinallik Ekran Çıktısı

NÖROFİBROMATOZİS TİP 1(NF1) KAYNAKLI MEZENKİMAL
STROMAL HÜCRELERİN DETAYLI KARAKTERİZASYONU

ORJİNALLİK RAPORU

7	7	2	1
%	%	%	%
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	%2
2	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	%2
3	diyabetkongresi.org İnternet Kaynağı	<%1
4	openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<%1
5	VNUA Yayın	<%1
6	www.tard.gen.tr İnternet Kaynağı	<%1
7	Submitted to Chester College of Higher Education Öğrenci Ödevi	<%1
8	tur.acousticbiotech.com İnternet Kaynağı	<%1
	repozitorij.svkst.unist.hr	

EK 3. Dijital Makbuz

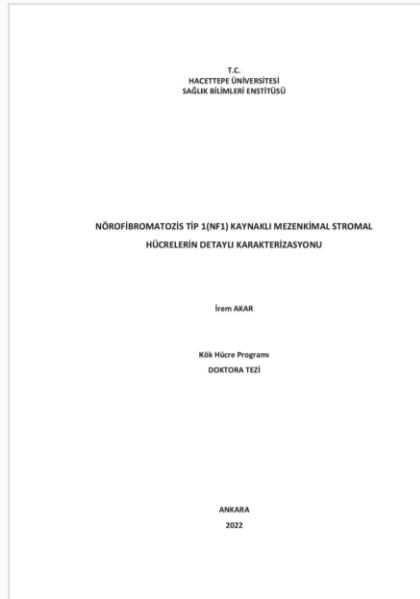


Dijital Makbuz

Bu makbuz ödevinizin Turnitin'e ulaştığını bildirmektedir. Gönderiminize dair bilgiler şöyledir:

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen: İrem Akar
Ödev başlığı: NÖROFİBROMATOZİS TİP 1(NF1) KAYNAKLI MEZENKİMAL STR...
Gönderi Başlığı: NÖROFİBROMATOZİS TİP 1(NF1) KAYNAKLI MEZENKİMAL STR...
Dosya adı: T.docx
Dosya boyutu: 18.51M
Sayfa sayısı: 76
Kelime sayısı: 12,678
Karakter sayısı: 89,351
Gönderim Tarihi: 10-Eki-2022 12:44ÖS (UTC+0300)
Gönderim Numarası: 1921485883



9. ÖZGEÇMİŞ