

T.C
ONDOKUZMAYIS ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

ESANSİYEL TROMBOSİTOZ VE PRİMER
MİYELOFİBROZİS HASTALARINDA KALRETİKULİN
MUTASYONLARININ SIKLIĞI VE PROGNOSTİK
ÖNEMİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

UZMANLIK TEZİ
Dr. Huri Sema AYMELEK

SAMSUN

2017

T.C
ONDOKUZMAYIS ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

ESANSİYEL TROMBOSİTOZ VE PRİMER
MİYELOFİBROZİS HASTALARINDA KALRETİKULİN
MUTASYONLARININ SIKLIĞI VE PROGNOSTİK
ÖNEMİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

UZMANLIK TEZİ

Dr. Huri Sema AYMELEK

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. M. Gönül OĞUR

SAMSUN

2017

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve tecrübesiyle eğitimime katkıda bulunan, hayatıma yeni bir bakış açısı katan, desteğini en zor koşullarda bile her zaman yanımda hissettiğim saygıdeğer hocam Prof. Dr. Gönül Oğur'a, asistanlık dönemim boyunca her zaman yanımda olan ve uzun saatlerimi paylaştığım kıdemlilerim Dr. Ümmet Abur ve Dr. Engin Altundağ başta olmak üzere Dr. Hatice Mutlu Albayrak, Dr. Ömer Salih Akar Dr. Çağrı Doğan ve Dr.Yelda Yalçın'a, tez sürecinde destekleriyle yanımda olan Dr. Aslıhan Sanrı, Çağrı Gümüşkaptan ve Semanur Fazla'ya, manevi desteği ile her zaman yanımda olan Prof. Dr. Erkin Oğur'a ve yıllardır birlikte çalıştığım bölümümüzün tüm çalışanlarına teşekkür ederim.

Bugünlere gelmemde büyük emeği olan ve bütün kararlarımın arkasında duran anne ve babama, her zaman yanımda olan sevgili eşim ve biricik kızıma sonsuz teşekkür ederim.

Dr. Huri Sema AYMELEK

ÖZET

Esansiyel Trombositoz ve Primer Miyelofibrozis Hastalarında Kalretikulin Mutasyonlarının Sıklığı ve Prognostik Öneminin Değerlendirilmesi

Esansiyel Trombositoz ve Primer Miyelofibrozis BCR/ABL1 füzyon geninin negatif olduğu klasik miyeloproliferatif neoplazi grubu hastalıklar arasındadır. Trombotik olaylar, değişen derecelerde kemik iliği yetmezliği ve akut miyeloid lösemiye dönüşüm bu hastalıkların seyri esnasında görülebilecek ciddi komplikasyonlardır. MPN'lerin tanısı ve prognozunun tayininde moleküler genetik ve sitogenetik belirteçler büyük önem taşımaktadır. JAK2 geninden sonra, son yıllarda tanımlanmış olan kalretikulin (CALR) gen mutasyonları, BCR/ABL1 negatif miyeloproliferatif neoplazilerde en sık görülen ikinci genetik belirteçtir.

Bu çalışmada JAK2 V617F ve MPL gen mutasyonu olmayan esansiyel trombositoz ve primer miyelofibrozis hastalarında CALR mutasyonlarının sıklığı, dağılımı, klinik ve hematolojik parametrelerle olan ilişkisinin belirlenmesi amaçlandı.

Çalışmamızda 98'i ET (%76) ve 31'i PMF (%24) olmak üzere 129 hasta incelendi. 98 ET hastasının %89.8'inde mutasyon (JAK2 V617F, CALR ve MPL) gözlendi. 51'inde (%52) JAK2 V617F mutasyonu, 28'inde (%28.6) CALR mutasyonu, 9'unda (%9.1) MPL mutasyonu vardı. JAK2 ve MPL mutasyonu olmayan 38 hastanın 28'inde (%73.6) CALR mutasyonu vardı. 10 hastada (%10.2) ise üç mutasyonda saptanmadı. 31 PMF hastasının 16'sında (%51.6) JAK2 V617F mutasyonu, 7'sinde (%22.6) CALR mutasyonu ve 2'sinde (%6.5) MPL olmak üzere %80.7'sinde mutasyon vardı. JAK2 ve MPL olmayanların %53.8'inde CALR mutasyonu vardı. 6 hastada (%19.4) ise her üç mutasyonda saptanmadı.

Çalışmamızda JAK2 V617F, MPL ve CALR mutasyonları, ET ve PMF hastalarının yaklaşık %90'ında gösterilebilmiştir. MPN patogenezinde yer alan mutasyonların ve etkiledikleri kritik sinyal yollarının anlaşılması, bu hastalıkların tanı ve tedavi sürecinde önemli adımların atılabileceğini düşündürmektedir. Bugün için Ülkemizden bu konuda yapılmış en kapsamlı çalışma niteliğinde olan çalışmamızdan elde edilecek verilerin sözü edilen lökomogenezi içeren sistematikde etkin olacak yeni bilgiler yansıtacağı inancını taşıyoruz.

ABSTRACT

Mutation Frequency, Clinical and Prognostic Impact of Calreticulin Gene in Patients with Essential Thrombocythosis and Primary Myelofibrosis

Essential thrombocythosis (ET) and primary myelofibrosis (PMF) are classical myeloproliferative neoplasia (MPN) disorders which by molecular and chromosomal assays, BCR/ABL1 fusion gene is negative. Thrombotic events, varying degree of bone marrow failure and transformation to acute myeloid complications which can be seen in the course of the diseases. Genetic markers are important in the diagnosis and prognosis of MPN. Molecular studies first revealed the discovery of JAK2 gene in MPN and recently, calreticulin (CALR) gene has been identified. Currently CALR mutation is second most commonly used genetic marker in BCR/ABL1 negative MPN.

In this study, the aim was to identify the frequency and allelic distribution of CALR gene mutations in JAK2 V617F and MPL mutations negative ET and PMF patients and to determine their correlation with the clinical and hematological parameters.

A total 129 patients, 98 (76%) of whom major whom were diagnosed as ET and 31 (24%) of whom were diagnosed as PMF were included in our study. Mutations relevant to JAK2 V617F, CALR and MPL genes was detected in 89,8% of 98 ET patients, and of these, 51(52%) patients had JAK2 V617F, 28 (28,6%) had CALR and 9 (9,1%) had MPL mutations. 38 patients were negative for JAK2 and MPL mutations, 28 of 38 (73,6%) had CALR mutation. In 10 (10,2%) patients none of the above mentioned three PMF patients and of them 16 (51,6%) had JAK2 V617F, 7 (22,6%) had CALR and 2 (6,5%) had MPL mutations. 53,8% of the patients who were negative for JAK2 and MPL mutations had CALR mutation. In 6 (19,4 %) patients none of these three mutations were detected.

In our study, JAK2 V617F, MPL and CALR mutations, all together were detected approximately 90% of the ET and PMF patients. Identification of mutations which take part in the pathogenesis of MPN and understanding the critical signal pathways affected are the major clues for the diagnosis, and treatment/management of MPN. We assume that as a relatively extensive research our study would be one of those contributing to the management of MPNs significantly.

KISALTMALAR

aCML	: Atipik KML
AML	: Akut Miyeloid Lösemi
ASXL1	: Additional Sex Combs Like 1
CALR	: Kalretikulin
CMML	: Kronik Miyelomonositik Lösemi
EEK	: Endojen Eritroid Koloni
EPO	: Eritropoetin
EpoR	: Eritropoetin Reseptörü
ET	: Esansiyel Trombositoz
GMCSF	: Granülosit Makrofaj Koloni Stimüle Edici Faktör
Hb	: Hemoglobin
HDAC	: Histon Deasetilaz
HU	: Hidroksiüre
IDH1/2	: İzositrat Dehidrojenaz 1/2
IFN-α	: İnterferon-alfa
IGF1	: İnsülin benzeri büyüme faktörü 1
IL3	: İnterlökin 3
JAK	: Janus Kinaz
JAK2	: Janus Kinaz 2
JH	: Janus Homology
JMML	: Juvenil Miyelomonositik Lösemi
Kİ	: Kemik İliği
KML	: Kronik Miyeloid Lösemi
LDH	: Laktat Dehidrojenaz
LNK	: Lenfosit-spesifik adaptör protein
MDS	: Miyelodisplastik Sendrom
MPH	: Miyeloproliferatif Hastalıklar
MPL	: Trombopoetin Reseptör Gen
MPN	: Miyeloproliferatif Neoplazi
NADP	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
Ph	: Philadelphia kromozomu
Plt	: Platelet

PMF	: Primer Miyelofibrozis
PV	: Polisitemia Vera
RARS-T	: Refractory Anemia with Ring Sideroblasts and Thrombocytosis
REAL	: Avrupa-Amerika Lenfoid Neoplazmları Sınıflaması
SCF	: Kök Hücre Faktörü
SM	: Splenomegali
STAT	: Transkripsiyon sinyal aracı molekülü ve aktivatörü
TPO	: Trombopoetin
VWH	: Von-Willebrand Hastalığı
WHO	: World Health Organization



TABLolar

- Tablo 1.** WHO 2016 MPN Sınıflandırması
- Tablo 2.** WHO 2016 PV Tanı Kriterleri
- Tablo 3.** WHO 2008 ve 2016 PV Kriterlerinin Karşılaştırılması
- Tablo 4.** WHO 2016 ET Tanı Kriterleri
- Tablo 5.** WHO 2008 ve 2016 ET Kriterlerinin Karşılaştırılması
- Tablo 6.** ET Hastalarında Risk Grupları
- Tablo 7.** WHO 2016 Pre PMF Tanı Kriterleri
- Tablo 8.** WHO 2016 Açık PMF Tanı Kriterleri
- Tablo 9.** WHO 2008 ve 2016 Pre PMF Kriterlerinin Karşılaştırılması
- Tablo 10.** WHO 2008 ve 2016 Açık PMF Kriterlerinin Karşılaştırılması
- Tablo 11.** Post PV/ Post ET Miyelofibrozis Tanı Kriterleri
- Tablo 12.** Primer Miyelofibrozis IPSS risk skorlaması
- Tablo 13.** Primer Miyelofibrozis DIPSS risk skorlaması
- Tablo 14.** Primer Miyelofibrozis DIPSS-plus risk skorlaması
- Tablo 15.** MPN’de Görülen Mutasyonlar ve Etki Mekanizmaları
- Tablo 16.** ET Hastalarındaki Klinik ve Hematolojik Veriler
- Tablo 17.** Kemik İliği ET ve Post-ET MF İle Uyumlu Hastaların Klinik ve Hematolojik Yönden Karşılaştırılması
- Tablo 18.** PMF Hastalarındaki Klinik ve Hematolojik Veriler
- Tablo 19.** ET ve PMF Hastalarının Klinik ve Laboratuvar Bulguları
- Tablo 20.** ET ve PMF de Mutasyonların Dağılımı
- Tablo 21.** ET’da CALR Mutasyonu Olan ve Olmayan Grubun Karşılaştırılması
- Tablo 22.** ET’da Mutasyonlar Arasında Klinik ve Hematolojik Verilerin Karşılaştırılması
- Tablo 23.** ET’da CALR tip 1 ve tip 2 ve JAK2 V617F mutasyonunun Karşılaştırılması
- Tablo 24.** PMF’de CALR Mutasyonu Olan ve Olmayan Grubun Karşılaştırılması
- Tablo 25.** PMF’de Mutasyonlar Arasında Klinik ve Hematolojik Verilerin Karşılaştırılması
- Tablo 26.** ET Hastalarında JAK2 Allel Yüğü Yüksek ve Düşük Olanlarla JAK2 Mutasyon olmayan Hastaların Karşılaştırılması
- Tablo 27.** PMF Hastalarında JAK2 Allel Yüğü Yüksek ve Düşük Olanlarla JAK2 Mutasyonu olmayan Hastaların Karşılaştırılması

ŞEKİLLER

Şekil 1. JAK Proteinlerinin Yapısı

Şekil 2. JAK-STAT Sinyal Yolağı

Şekil 3. JAK2 V617F Mutasyon Bölgesi

Şekil 4. Kalretikulin Proteininin Yapısı ve Fonksiyonu

Şekil 5. Hasta Seçim Algoritmi

Şekil 6. JAK2 V617F Mutasyon Tespiti (Allel Spesifik PCR)

Şekil 7. CALR Mutasyonlarının ARMS-PCR ile saptanması

Şekil 8. ET ve PMF Hastalarının Dağılımı

Şekil 9. ET ve PMF hastalarının cinsiyete göre dağılımı

Şekil 10. ET ve PMF hastalarının yaş aralıklarına göre dağılımı

Şekil 11. Hasta Populasyonundaki Mutasyonların Dağılımı

Şekil 12. Hasta Populasyonundaki CALR Mutasyonlarının Dağılımı

Şekil 13. Hasta Populasyonundaki MPL Mutasyonlarının Dağılımı

Şekil 14. ET Hastalarında Mutasyonların Dağılımı

Şekil 15. ET Hastalarındaki Mutasyonların Alt Gruplarının Dağılımı

Şekil 16. Post-ET MF'de Mutasyonların Dağılımı

Şekil 17. PMF Hastalarındaki Mutasyonların Dağılımı

Şekil 18. PMF Hastalarındaki Mutasyonların Alt Gruplarının Dağılımı

Şekil 19: ET hastalarında JAK2 V671F, CALR, MPL mutasyonu olan ve her üç mutasyonu taşımayan hastaların ortalama sağkalımı ilişkisi

Şekil 20. PMF hastalarında JAK2 V671F, CALR, MPL mutasyonu olan ve her üç mutasyonu taşımayan hastaların ortalama sağkalım ilişkisi

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	I
ÖZET	II
ABSTRACT	III
KISALTMALAR	IV
TABLolar	V
ŞEKİLLER	VI
İÇİNDEKİLER	VII
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2.GENEL BİLGİLER	2
2.1. Miyeloproliferatif Neoplaziler	2
2.1.1. Polisitemia Vera	3
2.1.1.1. Epidemiyoloji	3
2.1.1.2. Patogenez	3
2.1.1.3. Tanı	4
2.1.1.4. Klinik	5
2.1.1.5. Laboratuvar	6
2.1.1.6. Tedavi	6
2.1.2. Esansiyel Trombositoz	8
2.1.2.1. Epidemiyoloji	8
2.1.2.2. Patogenez	9
2.1.2.3. Tanı	9
2.1.2.4. Klinik	11
2.1.2.5. Laboratuvar	12
2.1.2.6. Tedavi	12
2.1.3. Primer Miyelofibrozis	14
2.1.3.1. Epidemiyoloji	15
2.1.3.2. Patogenez	15
2.1.3.3. Tanı	16
2.1.3.4. Laboratuvar	20
2.1.3.5. Klinik	21
2.1.3.6. Tedavi	22

2.2. Miyeloproliferatif Neoplazilerde Mutasyonlar	24
2.2.1. JAK2 V617F Mutasyonu	25
2.2.2. JAK2 Ekzon 12 Mutasyonu	28
2.2.3. MPL Mutasyonu	28
2.2.4. CALR Mutasyonu	29
2.2.5. MPN'lerde Görülen Diğer Mutasyonlar	31
3. HASTALAR VE YÖNTEM	34
3.1. Hasta Seçimi	34
3.2. Yöntem	35
3.2.1. Periferik Kandan DNA İzolasyonu	35
3.2.2. JAK2 V617F Mutasyon Analizi	35
3.2.3. CALR Mutasyon Analizi	36
3.2.4. MPL Mutasyon Analizi	37
3.2.5. İstatistiksel Değerlendirme	37
4. BULGULAR	38
4.1. ET Grubu Hastalar	40
4.2. PMF Grubu Hastalar	44
4.3. ET ve PMF Grubu Hastaların Karşılaştırılması	47
4.4. ET'de Mutasyonlar	48
4.5. PMF'de Mutasyonlar	52
4.6. ET'da JAK2 Allel Yüklerinin Karşılaştırılması	56
4.7. PMF'de JAK2 Allel Yüklerinin Karşılaştırılması	57
4.8. ET ve PMF Hastalarında JAK2 Allel Yüklerinin Karşılaştırılması	58
5. TARTIŞMA	59
6. SONUÇLAR	65
7. KAYNAKLAR	68

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Miyeloproliferatif neoplaziler (MPN), hematopoetik kök hücreden köken alan, bir ya da daha fazla miyeloid serinin anormal proliferasyonu ile karakterize hematopoetik sistemin klonal bir grup hastalığıdır (1). MPN'ler BCR/ABL1 füzyon geninin pozitif ve negatif olmasına göre iki ana alt gruba ayrılır. BCR/ABL1 negatif MPN'ler başlıca polisitemia vera (PV), esansiyel trombositoz (ET) ve primer miyelofibrozis (PMF)'dir. Trombotik olaylar, değişen derecelerde kemik iliği yetmezliği ve akut miyeloid lösemiye dönüşüm bu hastalıkların seyri esnasında görülebilecek ciddi komplikasyonlardır.

MPN'lerin tanısı ve prognozunun tayininde periferik kan sayımı, LDH düzeyi, kemik iliği morfolojik ve patolojik incelemesi, dalak boyutunun değerlendirilmesi yanı sıra moleküler genetik ve sitogenetik belirteçler büyük önem taşımaktadır.

2005 yılında BCR/ABL negatif MPN'lerde JAK2 V617F mutasyonunun keşfedilmesi ile bu hastalıkların tanı ve tedavisinde büyük ilerlemeler kaydedilmiştir. Ancak ET ve PMF hastalarının üçte birinden fazlasında JAK2 V617F ya da MPL mutasyonu gösterilememiştir. 2013 yılında JAK2 V617F ve MPL mutasyonu olmayan ET ve PMF hastalarının çoğunda kalretikulin mutasyonlarının gösterilmesi MPN tanı kriterlerinin tekrar gözden geçirilmesi ihtiyacını doğurmuştur. 2016 yılında WHO tarafından düzenlenen MPN tanı kriterlerinde kalretikulin mutasyonları ET ve PMF hastalıkları için majör kriterler arasında yerini almıştır. Kalretikulin mutasyonları ET ve PMF hastalarının sadece tanısı değil prognozunun tayininde, ayrıca JAK-STAT yolağının daha iyi anlaşılması ile bu yolu hedef alan yeni tedavilerin geliştirilmesinde de büyük ilerlemelere yol açabilecektir.

Ülkemizden en geniş seri olarak bilinen bu çalışmamızda ET ve PMF hastalarında kalretikulin mutasyonlarının sıklığı, dağılımı, klinik ve hematolojik parametrelerle ilişkisini ve prognostik değerini belirlemeyi amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Miyeloproliferatif Neoplaziler

Miyeloproliferatif neoplaziler, kemik iliğinde bir veya birden fazla miyeloid serinin proliferasyonu ve matur fonksiyonel kan hücrelerinin sayısının artması ile karakterize klonal hematolojik malignitelerdir (1).

İlk defa 1951 yılında William Dameshek tarafından kronik miyeloid lösemi (KML), PV, ET, PMF ve eritrolösemi adı altındaki hastalıklar, “Miyeloproliferatif Hastalıklar (MPH)” olarak adlandırılmıştır. 1960 yılında “Philadelphia” kromozomu KML ile ilişkilendirilmiş, eritrolösemi ise varyant akut miyeloid lösemi (AML) grubuna alınıp, kalan üç hastalık (PV, ET, PMF) klasik BCR/ABL negatif MPH olarak sınıflandırılmıştır (2). 2001 yılında ise “World Health Organization” (WHO) tarafından, 1994 yılında gözden geçirilmiş olan Avrupa-Amerika Lenfoid Neoplazmaları Sınıflaması (REAL)’na dayanarak yeni bir sınıflama yapılmıştır (3). 2008 yılında yeni gelişmeler ışığında WHO tarafından bu gruptaki hastalıklar MPN olarak adlandırılmış ve yeni hastalıklar da sınıflamaya eklenmiştir (4).

Son olarak 2016 yılında MPN’lar yeni klinik, prognostik, morfolojik, immünofenotipik ve genetik bilgiler ışığında yeniden sınıflandırılmıştır (**Tablo 1**) (5).

Tablo 1. WHO 2016 MPN Sınıflandırması*

Miyeloproliferatif Neoplaziler
Kronik Miyeloid Lösemi, BCR/ABL1+
Kronik Nötrofilik Lösemi
Polisitemia Vera
Primer Miyelofibrozis
-Prefibrotik Erken Evre PMF -Açık Fibrotik Evre PMF
Esansiyel Trombositoz
Kronik Eozinofilik Lösemi, başka şekilde sınıflandırılmamış
Sınıflandırılmayan MPN
Mast Hücre Hastalığı

*(5)

BCR/ABL1 negatif klasik MPN'ler başlıca PV, ET ve PMF'dir.

2.1.1. Polisitemia Vera

Polisitemia vera, eritroid seri başta olmak üzere, miyeloid ve megakaryositik seri hücrelerinin artışı ile karakterize klonal miyeloproliferatif bir hastalıktır. Artış herhangi bir uyarana bağlı değildir ve hücreler morfolojik olarak normaldir (6). Hastalık ilk kez 1892 yılında Vaquez tarafından tanımlanmıştır. 1951 yılında William Dameshek tarafından miyeloproliferatif bozukluklardan biri olarak kabul edilmiştir (5).

2.1.1.1. Epidemiyoloji

PV yıllık insidansı 100.000'de 1 ile 2 arasında değişmektedir. Tanı anındaki yaş ortalama 60'tır. Erkeklerde kadınlardan daha sıktır, çocuklarda ise oldukça nadir görülmektedir. Etyolojide iyonize radyasyon ve benzen gibi kimyasallar suçlanmaktadır. PV tüm etnik gruplarda bildirilmekle birlikte Doğu Avrupa Yahudilerinde daha sık görülmektedir (7).

2.1.1.2. Patogenez

PV'da normal pluripotent hematopoietik hücrenin neoplastik transformasyonu sonucu değişen derecelerde klonal hematopoez meydana gelir (8). Hastalarda klonal kök hücrelerin yanısıra normal hematopoetik kök hücrelerin varlığı da sözkonusudur. Ancak KML'de olduğu gibi tanısal klonal sitogenetik belirteç (Philadelphia kromozomu) PV'da gösterilememiştir. PV'da karyotip anomalileri nadir ve nonspesifiktir. Karyotip anomalileri arasında trizomi 8, trizomi 9, 13. ve 20. kromozomların uzun kolunun delesyonu vardır (9).

Eritropoietin (EPO), eritropoezin en önemli düzenleyicisidir. PV'lı hastalarda eritroid öncü hücrelerinin kültür ortamlarında eritropoetin olmaksızın çoğalabildikleri gösterilmiştir. PV'da diğer eritropoez nedenlerinden farklı olarak serum EPO düzeyi düşüktür ve eritropoez otonomdur (8).

PV gelişiminde rol alan faktörlerle ilgili kimi hücre kültürü çalışmaları PV'da kök hücre faktörü (SCF), interlökin 3 (IL3), granülosit-makrofaj koloni stimüle edici faktör (GM-CSF), insüline benzer büyüme faktörü 1 (IGF-1) ve trombopoetine

(TPO) olan aşırı duyarlılığı ortaya koymuştur. Ayrıca IGF-1 bağlayıcı proteinin serum konsantrasyonu artmıştır ve bu protein in vitro “eritroid burst” oluşumunu stimüle eder (10). PV’da endojen eritroid koloni büyümesinin JAK2 kinaz inhibitörleri ile baskılandığı gösterilmiştir (11).

2.1.1.3. Tanı

PV tanı sistemi, PV’da özgün bir mutasyon olarak tanımlanan JAK2 mutasyonunun 2005 yılında keşfedilmesinden sonra değişmiş, 2008 yılında bir sınıflama yapılmış ve en son 2016 yılında WHO tarafından revize edilmiş tanı kriterleri yayınlanmıştır (**Tablo 2**) (5). WHO 2008 ile 2016 PV sınıflaması arasındaki farklar **Tablo 3**’te özetlenmiştir (12).

2016 WHO’ya göre tanı için üç majör kriterin tamamı veya ilk iki majör kriter ile minör kriterin varlığı gereklidir.

Tablo 2. WHO 2016 PV Tanı Kriterleri

<p>Majör Kriterler:</p> <p>1- Erkeklerde hemoglobin (Hb) >16,5 g/dl, kadında >16 g/dl olması ya da erkeklerde hematokrit (Hct) > %49, kadında >%48 olması ya da artmış kırmızı hücre kitlesi</p> <p>2- Kemik iliği (ki) biopsisinin yaşa göre hiperselüler olması ve eritrosit, granülosit ve pleomorfik, büyüklükleri farklı olgun megakaryositler ile birlikte her üç serinin miyeloproliferasyonu*</p> <p>3- JAK2 V617F ya da JAK2 exon 12 mutasyonlarından birinin varlığı</p>
<p>Minör Kriterler:</p> <p>1- Subnormal serum EPO düzeyi</p>

*sürekli mutlak eritrositozu olan, Hb değeri erkeklerde >18,5 g/dl veya kadında >16,5 g/dl olan hastalarda ek olarak hem üçüncü kriter hem de minör kriter varsa tanı için kemik iliği biyopsisi gerekli olmayabilir. Bununla birlikte miyelofibrozis vakalarında ilk tanının kemik iliği biyopsisi ile konabileceği göz önünde bulundurulmalıdır.

Tablo 3. WHO 2008 ve 2016 PV Kriterlerinin Karşılaştırılması

PV	WHO 2008	WHO 2016
Hb	A1 Erkeklerde >18.5 kadında >16.5	A1 Erkeklerde >16.5 kadında >16.0
Kırmızı hücre kitlesi	veya artmış	veya artmış
Hct	Artmış	>%49 erkeklerde, >%48 kadında
Klonal genetik belirteçlerin varlığı	A2 JAK2 V617 yada JAK2 exon 12 mutasyonu varlığı	A3 JAK2 V617 yada JAK2 exon 12 mutasyonu varlığı
Endojen eritroid koloni büyümesi	B3	-
Subnormal EPO	B2	B
Kemik iliği morfolojisi	B1 Yaşa göre hiperselüler ve üç seride miyeloproliferasyon	A2 Yaşa göre hiperselüler ve üç seride miyeloproliferasyon ile pleomorfik, olgun megakaryositler

2008 kriterlerine göre PV tanısı A1+A2 ve bir B ya da A1+ iki B kriteri, 2016 kriterlerine göre PV tanısı A1-3 ya da A1+2 ve B kriteri

2.1.1.4. Klinik

PV, çocukluktan yaşlılığa kadar herhangi bir dönemde görülebilmekle birlikte genellikle 60 yaş civarında başlar. Hastalık sinsi bir başlangıç sergiler ve semptomları genellikle nonspesifiktir. Tanı anında hastaların sadece %30'unda semptom vardır. Semptomların çoğu eritrosit kitlesindeki artış ile ilişkili hipervizkozite nedeniyledir. En sık semptomlar başağrısı, yorgunluk, kas güçsüzlüğü, kaşıntı, baş dönmesi ve gece terlemesi şeklinde sıralanabilir. Yüz, konjonktiva, müköz membranlar ve ellerde pletore önemlidir. Splenomegali, pletoreden sonra en sık görülen fizik muayene bulgusudur (13). Hastalarda banyodan sonra ortaya çıkan kaşıntı en spesifik semptomlar arasındadır (14).

PV'da en sık ve en önemli komplikasyon, hastaların yaklaşık üçte birinde görülen trombotik ataklardır (15). Trombotik olaylardan en sık görüleni serebrovasküler hadiselerdir. Bunu miyokard infarktüsü, derin ven trombozu ve pulmoner emboli takip eder (16). Gingival kanama, burun kanaması gibi küçük mukozal olayların yanısıra daha ciddi gastrointestinal sistem ve santral sinir sistemi kanamaları da görülebilmektedir

(17). Hepatik Ven Trombozu (Budd-Chiari Sendromu) PV'nın en öldürücü komplikasyonlarından (18). Budd-Chiari Sendromu PV'nın ilk klinik bulgusu olabilir. Bu nedenle hastalarda JAK2 mutasyonları bakılmalıdır (19).

PV'da trombositozla ilişkili olarak eritromelalji sendromu görülebilir. Bu sendromda hastaların el ve ayaklarında ağrı, kızarıklık ve yanma meydana gelir ve tipik olarak düşük doz aspirine yanıt verir (20).

PV hastalarının bir kısmı ileri dönemlerde miyelofibrozis ve akut miyeloid lösemiye dönüşüm riski ile karşı karşıyadır (sırasıyla %10 ve %6) (21,22).

2.1.1.5. Laboratuvar

Hemoglobin, hematokrit ve eritrosit sayısı artmıştır. Flebotomi tedavisi alan hastalarda eritrosit sayısı, hemoglobin ve hematokritten bağımsız olarak yüksek olabilir. Hastaların yaklaşık üçte ikisinde lökositoz, %50'sinde trombositoz vardır. Hemoglobin değerlerinin yükselmediği ilk evrelerde izole trombositoz nedeniyle yanlışlıkla demir eksikliği anemisi ya da esansiyel trombositoz tanısı konabilir. Kırmızı hücre kitlesi, Polisitemia Vera Çalışma Grubu tarafından tanı esnasında tüm hastalara uygulanması gereken tanı testi arasına alınmasına rağmen, ölçümünde radyoaktif izotopların kullanılması, pahalı olması ve her laboratuvarında bulunmaması nedeniyle WHO'nun 2001 ve sonrasındaki tanı kriterleri arasından çıkarılmıştır (16).

PV'lı hastaların periferik kan veya kemik iliği hücrelerinde kültür ortamında EPO olmadan eritroid koloni oluşumu gözlenir. Buna endojen eritroid koloni (EEK) oluşumu denir. Sağlıklı bireyler ya da sekonder eritrositozu olanlarda bu durum görülmez (23).

PV hastalarında serum EPO düzeyi genellikle düşüktür. Ancak düşük değerler hastalığa spesifik değildir. Ailesel polisitemialı olgularda ve diğer MPN olgularında da düşük olabilir. Yüksek EPO değerleri ise PV'da pek görülmez. Bu nedenle düşük ya da normal EPO seviyesi PV tanısını destekleyicidir ve minör tanı kriterleri arasında yer almaktadır. Hastalarda ayrıca düşük eritrosit sedimentasyon hızı, yüksek serum ürik asit ve laktat dehidrojenaz seviyeleri görülebilir (7).

2.1.1.6. Tedavi

PV'da ortalama yaşam süresi 15 yılın üzerindedir. 10 yıl içerisinde

miyelofibrozise ve AML'ye dönüşüm riski sırasıyla %10 ve %6 kadardır. Günümüzde uygulanan ilaç tedavisi ortalama yaşam süresi, miyelofibrozis ve AML'ye dönüşüm riski üzerinde anlamlı bir etkiye sahip değildir (21,22). Ancak en önemli mortalite ve morbidite nedenleri olan vasküler komplikasyonları (tromboz, kanama) önleme konusunda tedavinin önemi büyüktür.

PV'lı hastalar, prognozu ve tedavi seçimini belirlemede yol gösterici olması açısından, düşük risk ve yüksek risk olmak üzere iki gruba ayrılır. 60 yaşın altında ve geçirilmiş trombotik atak öyküsü olmayan hastalar düşük risk, 60 yaşın üstünde ve trombotik atak öyküsü olan hastalar ise yüksek risk grubunda değerlendirilirler.

Tedavide düşük risk grubundaki hastalar flebotomi ve düşük doz aspirin kullanılırken, yüksek risk grubundaki hastaların tedavisinde sitoredüktif ilaçlar kullanılır (15). Yüksek platelet düzeyleri trombozdan ziyade kanama riskini artırır. Özellikle $1500 \times 10^9/L$ 'den yüksek platelet değerlerinde kazanılmış Tip 2 Von-Willebrand hastalığı (VWH) nedeniyle kanama riski artar (24). Lökositoz ve kuantitatif olarak belirlenen JAK2 mutasyonu allel yükünün trombotik olaylarda rol oynadığına dair yayınlar vardır (25,26).

PV tedavisindeki amaç hem semptomların giderilmesi hem de komplikasyonların önlenmesine yöneliktir.

Flebotomi Tedavisi: PV tedavisinde ilk seçeneklerden biri flebotomidir (7). Yüksek hematokrit ile tromboz arasındaki ilişkinin gösterilmesiyle bu tedavi uygulanmaya başlanmıştır. Flebotominin amacı hematokrit değerlerini erkeklerde %45, kadınlarda %42'den aşağıda tutabilmektir. Flebotomi 2 ile 4 günde bir 450-500ml kan olarak uygulanır. Bu tedavi ile demir eksikliği anemisi görülebilir (27).

Aspirin Tedavisi: Düşük doz aspirinin PV'daki etkinliği kanıtlanmıştır. Yaklaşık 100mg/gün aspirin kullanan hastalarda vasküler komplikasyonlar anlamlı ölçüde azalmıştır (28).

Miyelosüpresyon Tedavisi: Miyelosüpresyon kan sayımını düzeltir, vasküler olayları azaltır ve semptomları iyileştirir. Hastaların uzun süreli sağ kalımını artırdığı düşünülür ancak bunu kanıtlayacak uzun süreli çalışmalara ihtiyaç vardır (27). Miyelosüpresif ajanlar:

1- Hidroksiüre (HU), PV tedavisinde en sık kullanılan miyelosüpresif ajandır. Önerilen

günlük doz 10-30 mg/kg/gündür. Miyelosüpresif etkisi kısa sürelidir bu yüzden rölatif olarak güvenilir bir ajandır. Alkilyeyici bir ajan olmadığı için daha az lökomojenik etkisi vardır. Genel olarak iyi tolere edilir ancak sitopeni, gastrointestinal sistem semptomları, mukokutanöz ülserler, ateş ve alopesi gibi yan etkiler de görülebilir (29,30).

2- Busulfan, kontrol altına alınamayan ya da hidroküüre ile yan etki ortaya çıkan hastalarda kullanılan bir ilaçtır. Miyelosüpresif etkisi uzun sürelidir. Bu durum hastalığın tedavisi için avantaj sağlamakla birlikte, kemik iliğini uzun süreli baskılaması ile oluşan pansitopeni riski dezavantaj oluşturmaktadır (30).

3- Radyoaktif Fosfor, PV tedavisinde kullanılan ilk tedavi yöntemlerinden biridir. Günümüzde yaşlı ve takibi zor olan hastalar için nadiren kullanılmaktadır (31).

4- İnterferon-alfa (IFN-α), PV hastalarında klinik ve hematolojik düzelmeye neden olur. Pruritiste dahil olmak üzere pek çok semptomu düzeltir ve çoğu hastada hematolojik tam yanıt sağlar. Gebelik döneminde tercih edilen bir ilaçtır. Ancak enjeksiyonlar halinde uygulanması ve maliyetli oluşu gibi dezavantajları vardır (32).

Anagrelid Tedavisi: Trombositler üzerine selektif etkili bir ilaçtır. Trombositozu olan 113 PV hastasında anagrelid uygulaması ile %75 yanıt elde edilmiştir (33). Çoğu hastada bir haftada istenen yanıt alınır. Yan etkileri arasında baş ağrısı, çarpıntı, diare vardır ancak genelde iyi tolere edilir. PV'da hidroküüre ve interferona dirençli vakalarda anagrelid tercih edilir (34).

JAK2 İnhibitörleri ile Tedavi: MPN patogeneğinde JAK-STAT yolağının keşfi ile birlikte umut verici yeni terapötik ajanlardır. JAK2 inhibitörlerinin PV'da kullanımına dair klinik testler mevcut olmasına rağmen etkinliği ve güvenilirliği için yeni çalışmalara ihtiyaç vardır (35).

Histondeasetilaz (HDAC) İnhibitörleri ile Tedavi : HDCA inhibitörü, vorinostat, HU'ye yanıtız olgularda HU ile birlikte semptomları gidermede ve splenomegalide etkinliği gösterilmiş yeni ilaçlardandır (36).

2.1.2 Esansiyel Trombositoz

Miyeloproliferatif sendromlardan biri olan esansiyel trombositoz, kemik iliğinde megakaryositlerin progresif olarak artması ve periferik kanda trombosit sayısında artışla

karakterize klonal hematopoietik kök hücre hastalığıdır. Trombotik ve hemorajik komplikasyonlara neden olabilir. Hastalık ilk kez 1934 yılında tanımlanmış, 1981 yılında klonal bir hastalık olduğu ortaya konmuştur (37).

2.1.2.1 Epidemiyoloji

ET'un yıllık insidansı 100.000'de 1 ile 2.5 arasında değişmektedir. Hastalık 50 ile 70 yaş arası pik yapmaktadır ve kadınlarda daha siktir. Çocuklarda nadir olarak görülür (38).

2.1.2.2 Patogenez

ET, hiperaktif sitokin sinyali ile karakterize olup, vakaların %50 ile %60'ında JAK2 ve MPL geninde somatik mutasyonlar gösterilmiştir. Son yıllarda JAK2/MPL geninde mutasyon olmayan hastaların çoğunda yeni bir mutasyon, **kalretikulin** mutasyonu tanımlanmıştır. Hastaların %10'una yakın bir kısmında bu üç mutasyonda saptanmazken, küçük bir kısmında transkripsiyonel düzenlenme basamaklarında mutasyonlar vardır (27). ET patogenezinde PV'nin aksine EPO, TPO yada reseptörü olan c-MPL'nin belirgin bir rolü yoktur (39,40).

ET hastalarında primer moleküler patolojiyi tespit etmek güçtür. Hastalığın kliniği ve laboratuvar özelliklerindeki heterojenite birden fazla mutasyonun varlığını düşündürmektedir. Tanı sırasında ET hastalarının yaklaşık %5'inde sitogenetik anomali görülebilir. Bunlar trizomi 9, trizomi 8, kromozom 5, 7, 13, 17 ve 20'deki sayısal ve yapısal anomalilerdir (41).

Klonal miyeloproliferasyona ek olarak ET'de, mikrovasküler semptomlar ve artmış trombohemorajik olay riski vardır. Mikrovasküler semptomların patogenezinde ise tromboksan A2 ve anormal trombosit-endotel etkileşimi yatmaktadır. ET'de kanama diyatezinden kazanılmış Von-Willebrand Sendromunun sorumlu olduğu düşünülmektedir. Bu hastalarda trombosit sayısı çok yüksektir. ET'de diğer trombosit kusurları arasında uzamış kanama zamanı, epinefrin, kollagen ve ADP ile indüklenen trombosit agregasyonunda defekt, ATP sekresyonunda azalma gibi kanamaya katkısı olan başka faktörler de vardır (42,43).

2.1.2.3. Tanı

WHO miyeloproliferatif neoplazi sınıflandırması, ilk olarak 2001 yılında yayınlanmış ve 2008 yılında güncellenmiştir (44,45). WHO 2008 sınıflandırması yeni klinik, prognostik, morfolojik, immünofenotipik ve genetik veriler ile birleştirilerek 2016 yılında tekrar gözden geçirilmiştir (**Tablo 4**). 2016'ya dek tabloda sadece JAK2 V617F mutasyonu yer almakta iken artık JAK2 V617F mutasyonunun yanısıra MPL ve kalretikulin (CALR) mutasyonlarını da içermektedir. Reaktif trombositoz ve üç majör klonal mutasyon (JAK2 V617F, CALR ve MPL mutasyonu) dışındaki klonal genetik belirteçlerin varlığı ise minör kriterler arasına alınmıştır (**Tablo 5**) (12).

ET'un, erken MF ve maskelenmiş PV'den (Hb ve Hct değeri beklenenden düşük olduğu halde PV'nin diğer kriterlerini karşılaması) ayırımının yapılabilmesi için majör tanı kriterleri içinde yer alan kemik iliği biyopsisi büyük önem taşımaktadır (46,47). ET tanısında diğer önemli durum ise reaktif trombositoz nedenlerinin ayırt edilmesidir. Reaktif trombositoz nedenleri başlıca akut hemoraji, trombositopeni iyileşme dönemi, enfeksiyonlar, inflamatuvar hastalıklar, doku hasarı, demir eksikliği anemisi, hemolitik anemi, splenektomi sonrası, kriyoglobulinemi, ilaçlar ve neoplaziler olmak üzere pekçok nedene bağlı olarak meydana gelebilir (48).

Tanı için 4 major kriterin olması veya ilk 3 major kriterle minör kriterin birlikteliği gereklidir.

Tablo 4. WHO 2016 ET Tanı Kriterleri

<p>Major Kriterler:</p> <ol style="list-style-type: none">1- Trombosit sayısının $\geq 450.000/\text{mm}^3$ olması2- Büyük ve olgun morfolojideki megakaryositlerin proliferasyonu ile karakterize kemik iliği. Nötrofilik granülopoezde sola kayma yok ve eritropoezde artış yok, çok ender olarak retikülin liflerinde minör artış (derece 1) olabilir.3- Polisitemia vera, primer miyelofibroz, bcr/abl pozitif kronik miyeloid lösemi, miyelodisplastik sendrom veya diğer miyeloid neoplazilerin WHO kriterlerinin bulunmaması4- JAK2, CALR veya MPL mutasyonu varlığı
<p>Minör Kriterler:</p> <ol style="list-style-type: none">1- Klonal bir belirteç varlığı (örneğin patolojik karyotip) veya reaktif

trombositoz bulgusu olmaması

Tablo 5. WHO 2008 ve 2016 ET Kriterlerinin Karşılaştırılması

ET	WHO 2008	WHO 2016
Platelet	A1 $\geq 450 \times 10^9/L$	A1 $\geq 450 \times 10^9/L$
Kemik iliği morfolojisi	A2 Büyük ve olgun morfolojideki megakaryositlerin proliferasyonu ile karakterize kemik iliği. Nötrofilik granülopoezde sola kayma yok ve eritropoezde artış yok.	A2 Büyük ve olgun morfolojideki megakaryositlerin proliferasyonu ile karakterize kemik iliği. Nötrofilik granülopoezde sola kayma yok ve eritropoezde artış yok, çok ender olarak retikülin liflerinde minör artış (derece 1) olabilir.
Dışlama kriteri	A3 PV, PMF, BCR/ABL+ KML, MDS veya diğer miyeloid neoplazilerin WHO kriterlerinin bulunmaması	A3 PV, PMF, BCR/ABL+ KML, MDS veya diğer miyeloid neoplazilerin WHO kriterlerinin bulunmaması
Klonal genetik belirteçler	A4 JAK2 V617F veya diğer klonal belirteçlerin gösterilmesi veya JAK2 V617F yokluğunda reaktif trombositoz bulgusunun olmaması	A4 JAK2, CALR ya da MPL mutasyonunun varlığı
Minör kriter	-	B Klonal bir markır varlığı veya reaktif trombositoz bulgusu olmaması

WHO 2008 ET tanısı için; A1-A4

WHO 2016 ET tanısı için; A1-4 ya da A1-3 ve B kriterlerinden bir tanesinin olması

2.1.2.4. Klinik

ET hastalarının çoğu asemptomatik olup, başka nedenlerle yapılan kan tetkiki sırasında tesadüfen saptanırlar. Hastalarda mikrodolaşımı etkileyen vazomotor semptomların yanısıra fatal olabilen tromboz, kanama, miyelofibrozis veya AML'ye dönüşüm de görülebilir (49).

ET hastalarında vazomotor semptomlar ağırlıklıdır: baş ağrısı, baş dönmesi, kulak çınlaması, senkop, karıncalanma, görsel değişiklikler, akrosiyanoz veya eritromelalji bunlar arasındadır. Eritromelalji, küçük kan damarlarındaki tıkanma sonucu ortaya çıkan, el ve ayaklarda yanma ve renk değişikliği ile karakterize bir tablodur (50). Hafif splenomegali, %40'a varan oranda bulunur. Trombositler $1000 \times 10^9/L$ 'yi aştığında gastrointestinal sistemde spontan kanama riski artar. Hastalarda santral sinir sistemi, nazal ve bukkal mukoza kanamaları da görülebilir (29). ET'de kanama nedeni tam olarak açıklanamamakla beraber hastalarda uzamış kanama zamanı, anormal trombosit agregasyonu ve büyük von-willebrand dimerlerinin kaybı görülebilir (42).

Trombotik hadiseler ET'deki majör mortalite ve morbidite nedenleri arasındadır. Arteriyel tromboz kendini santral sinir sisteminde inme ya da geçici iskemik atak, kardiyovasküler sistemde miyokard infarktüsü, anstabil angina pectoris ve periferik damar tıkanıklığı şeklinde, venöz tromboz ise kendini derin ven trombozu, pulmoner emboli şeklinde gösterebilir. ET tanısı almadan önce hastalarda hepatik, portal veya mesenterik venlerde trombotik olaylar da meydana gelebilir. Bir çalışmada hepatik ven trombozu ile gelen bir grup hastanın yarısında JAK2 mutasyonu pozitif bulunmuş ve bu hastalarında dörtte biri ileride ET başta olmak üzere MPN şeklinde kendini göstermiştir (50). 60 yaş üzerinde ve tromboz öyküsü olan hastalar trombotik olaylar açısından en yüksek riske sahiptir. Ayrıca tanı anındaki platelet ve lökosit sayısındaki yükseklik ya da JAK2 mutasyonu pozitifliği trombotik komplikasyonlar açısından riski artırır (51,52).

2.1.2.5. Laboratuvar

ET'de trombosit sayısı $\geq 450 \times 10^9/L$ olmak üzere tüm hastalarda yüksektir. Beyaz küre sayısı orta derecede yüksektir ve genellikle $20 \times 10^9/L$ 'yi aşmaz. Hemogloblin değeri normal ya da orta derecede yüksektir. Biyokimyasal incelemede LDH ve ürik asit

yüksekliği ve belirgin trombositozu olanlarda yalancı hiperkalemi görülebilir. Kanama zamanı bazı hastalarda hafif yükselmiştir (53,54). ET’de kemik iliği aspirasyonunda büyük hiperlobule megakaryositler görülür. Tipik olarak retikülin fibrozisi olmaksızın megakaryosit kümelenmesi ve nükleer hiperlobülasyonla birlikte megakaryosit sayısında artış görülebilmektedir. Kemik iliği hücreliliği genellikle normal ya da hafif artmıştır (55).

2.1.2.6. Tedavi

ET’da tedavi semptomların giderilmesi ve uzun dönemde komplikasyonların önlenmesine yöneliktir. Bu amaçla yapılan retrospektif ve prospektif çalışmalar sonucunda hastalık düşük, orta ve yüksek risk gruplarına ayrılmıştır. 60 yaşın üstünde geçirilmiş kanama ve tromboz öyküsü olan, trombosit sayısı $1.500 \times 10^9/L$ olan hastalar yüksek risk grubundadır (56). ET’nin risk gruplarına göre sınıflaması **Tablo 6**’da verilmiştir (56). Ayrıca JAK2 mutasyonunun varlığı ve lökosit sayısının $1.000 \times 10^9/L$ ’den fazla olması tromboz için yüksek risk olarak kabul edilmiştir (52).

ET’da başağrısı ve eritromelalji gibi semptomları ortadan kaldıracak düşük doz aspirin hemen hemen tüm hastalara önerilmektedir (42). Günümüzde aspirini tolere edemeyen hastalarda antitrombotik ajan olan klopidogrel önerilmektedir.

Yüksek riskli ET hastalarında trombozu önlemek için hidroksiüre kullanılmaktadır. Randomize kontrollü bir çalışmada trombotik olayları önlediği kanıtlanan sadece sitoredüktif tedavidir (57). Hidroksiüre ve düşük doz aspirin kombinasyonu ilk tercih edilecek ilaç grubudur. Düşük risk grubunda hidroksiürenin koruyucu etkisi gösterilememiştir. Hidroksiüre’nin majör komplikasyonu reversible miyelosupresyon, alt ekstremitte ve bukkal mukozada ülserasyonlardır.

Anagrelid, ‘quinazoline’ derivativesi olarak bilinir ve megakaryosit farklılaşmasını inhibe ederek trombosit değerini azaltır. Bu ilaç, lökosit değerini etkilemezken hemoglobin değerinde progresif düşüş yapabilir (58). Taşikardi, aritmi, baş ağrısı ve sıvı retansiyonu gibi yan etkilerinden dolayı çoğu hasta tarafından tolere edilememektedir (34). Günümüzde anagrelid, hidroksiüre’nin kullanılmayacağı hastalarda ikinci basamak tedavi olarak tercih edilen bir ilaçtır.

İnterferon alfa, ET hastalarında trombosit değerlerini kontrol altına almak için kullanılan bir diğer ilaçtır. Grip benzeri semptomlar ve psikiyatrik bozukluklar gibi

önemli yan etkileri olmasına rağmen lökomojenik ve teratojenik yan etkileri olmadığı için genç hastalarda ve gebelerde kullanımı tercih edilir (59).

Radyoaktif fosfor ve busulfan gibi alkilleyici ajanlar da trombosit değerini düşürürler ancak lösemiye progresyon gibi ciddi yan etkilerinden dolayı sadece diğer tedavilerin uygulanamadığı yaşlı hastalarda tercih edilirler (60).

Sonuç olarak ET hastaları üç risk grubuna bölünerek tedavi algoritmaları oluşturulmuştur (48).

Tablo 6. ET Hastalarında Risk Grupları

Yüksek Risk	-60 yaş ve üstü olması -Geçirilmiş kanama veya tromboz öyküsü ve/veya -Trombosit sayısının 1.500.000/mm ³ 'den fazla olması
Orta Risk	-Yaşın 40-60 yaş arasında olması -Kardiyovasküler risk faktörlerinin varlığı (sigara,hipertansiyon, dislipidemi, diabetes mellitus) -Trombosit sayısının 1.500.000/mm ³ 'den az olması
Düşük Risk	-Yaşın 40'ın altında olması -Tromboz öyküsü olmaması -Kardiyovasküler risk faktörlerinin olmaması -Trombosit sayısının 1.500.000/mm ³ 'den az olması

ET'de Risk Gruplarına Göre Tedavi

1- Düşük Risk Grubunda Tedavi: Asemptomatik hastalarda 'bekle ve gör' şeklinde izlem önerilmektedir. Bazı çalışmalar ise aspirinin trombotik komplikasyonları önlediğini ve mikrovasküler hastalıklara bağlı semptomları azalttığını göstermiştir.

2- Orta Risk Grubunda Tedavi: Kardiyovasküler risk faktörlerinin varlığında trombosit sayısı 600.000/mm³ üstünde ise aspirin tek başına veya trombosit değerini düşüren diğer ilaçlarla birlikte kullanılabilir.

3- Yüksek Risk Grubunda Tedavi: Kardiyovasküler risk grubunda olan 60 yaş üstü, trombosit sayısı 600.000/mm³ üzerindeki hastalara tedavi başlanmalıdır. Başlangıç

tedavisi hidroksiüre ile yapılır. Tolere edemeyen ya da dirençli hastalarda anagrelid veya interferon alfa gibi ikinci basamak tedavilere geçilmelidir.

2.1.3. Primer Miyelofibrozis

Primer Miyelofibrozis (PMF), reaktif kemik iliği fibrozisi, osteoskleroz, anjiogenezis, ekstrameduller hematopoiezis ve anormal sitokin salınımı ile karakterize klonal miyeloproliferatif bir hastalıktır. PMF ilk olarak Heuch tarafından 1879 yılında iki vakada tanımlanmıştır. Yirminci yüzyılın ilk yarısında hastalığın patogenezinin dair ilk veriler açıklanmış, kemik iliği kökenli olduğu, extrameduller hematopoezisin varlığı, ayrıca hematolojik değişiklikler ile fibrozis ilişkisi ortaya konmuştur (61). Hastalık için eskiden Kronik İdiopatik Miyelofibrozis, Agnojenik Miyeloid Metaplazi gibi isimler kullanılmasına rağmen WHO'nun 2008'de yayınlanan miyeloproliferatif neoplaziler sınıflamasında 'Primer Miyelofibrozis' olarak adlandırılmıştır (62). PMF, sıklıkla de-novo olarak gelişir. Polisitemia vera, esansiyel trombositoz ya da çok nadir olarak kronik miyeloid lösemi ve sınıflandırılmamış MPN zemininden gelişenler ise sekonder miyelofibrozislerdir.

2.1.3.1. Epidemiyoloji

PMF insidansı yaklaşık olarak 100.000'de 0,4 ile 1,5 arasında değişmektedir (63). Hastalık genellikle 50 yaşından sonra ortaya çıkar. Ortalama tanı yaşı 65-70 arasındadır. Kadın ile erkek arasında eşit sıklıkta görülmektedir (64). İyonize radyasyon ve benzeri gibi çevresel faktörlerin PMF'e neden olabileceği ileri sürülse de etyolojisi tam olarak bilinmemektedir (65).

2.1.3.2. Patogenez

PMF klonal bir hastalıktır. Bunu desteklemek için yapılan ilk çalışma, G6PD geni heterozigot olan bireylerde G6PD'nin X kromozomuna bağlı inaktivasyon paternlerinin ortaya konmasıdır (66). N-Ras geni mutasyon analizi ile B ve T lenfositik dizinin etkilenmesi hastalığın pluripotent kök hücre kaynağını desteklemektedir (67). Dolaşan hematopoetik öncüllerin artışı PMF'in bir özelliğidir. Bu öncül hücrelerin artışıyla periferik kanda CD34 hücre sayısında artar. CD34 sayısının PMF'i diğer Philadelphia-negatif MPN'lerden ayırmak, ayrıca blastik transformasyona dönüşümü tahmin etmek için önemli olduğu ileri sürülmektedir (68).

PMF’de sitogenetik anomaliler nadirdir. Kromozomal değişikliklerin %80’den fazlasını, trizomi 8, 13q, 20q delesyonları ve 1, 7, 9. kromozomlardaki anomaliler oluşturmaktadır. 13q delesyonu en sık görülen sitogenetik anomalidir. Bunu 20q delesyonu ve birinci kromozomun uzun kolunun parsiyel duplikasyonu izler (69). PMF’in lösemik transformasyonunda büyük oranda 5q ve 7q delesyonu görülür ve bu olgular kemoterapiye zayıf yanıt verirler (70).

PMF hastalarında inflamatuvar ve anjiogenik sitokinler olan transforming growth faktör β (TGF- β), vasküler endotelyal growth factor (VEGF), interlökin 1 (IL-1), IL-2 ve IL-6 artmıştır ve bu faktörlerle ilişkili olarak hastalarda pulmoner ve portal hipertansiyon meydana gelir. Ayrıca bu faktörler kemik iliği fibrozisi, anjiogenez ve osteosklerozdan sorumludur (71–73).

2.1.3.3. Tanı

PMF tanı kriterleri, 2016 yılında WHO tarafından revize edilerek tekrar yayınlanmıştır (**Tablo 7, Tablo 8**). 2016 WHO kriterlerine göre PMF, kemik iliği patolojik incelemesine göre erken PMF (Pre PMF) ve açık PMF olarak ayrılır. Sınıflamaya Pre PMF alt grubunun eklenmesi kemik iliği incelemesinde 1.derecede miyelofibrozisi iyi tanımladığından, hiç retiküler fibrozis olmayan ET hastalarının yanlış tanı almasının önüne geçilmesini sağlamıştır. Çünkü pre PMF trombositoz, sınırdan anemi, hafif splenomegali ve lökoeritroblastozisin yokluğu nedeni ile yanlışlıkla ET tanısı alabilmektedir (5,46). Pre PMF’de megakaryositik displazinin varlığı da ET’den ayırıcı tanıda önemlidir.

PMF’de 2016 WHO’ya göre majör kriterler arasına JAK2V617F mutasyonunun yanısıra CALR ve MPL mutasyonları da eklenmiştir (74).

WHO 2008 ve 2016 PMF tanı kriterlerinin karşılaştırılması **Tablo 9** ve **Tablo 10**’de özetlenmiştir.

Tablo 7. WHO 2016 Pre PMF Tanı Kriterleri

Pre PMF ^a
Major Kriterler
1- Yaşa göre hiperselüler kemik iliği, granüositik proliferasyon ve sıklıkla azalmış eritropoezin eşlik ettiği, derecel’den fazla retikülin fibrozisi ^b olmaksızın,

megakaryositik proliferasyon ve atipi ^c	
2- BCR/ABL pozitif KML, PV, ET, MDS veya diğer miyeloid metaplaziler için WHO kriterlerinin karşılanmaması	
3- JAK2 V617F, CALR veya MPL mutasyonlarının varlığı veya bu mutasyonların yokluğunda, diğer klonalite belirteçlerinin ^d varlığı veya minör reaktif kemik iliği retikülin fibrozisi ^e yokluğu	
Minör Kriterler (Aşağıdakilerden en az birinin varlığı: ^g)	
a- Başka bir hastalığa bağlanamayan anemi	c- Lökositoz ($\geq 11000/\mu l$)
b- Palpabl splenomegali	d- LDH yüksekliği ^h

Tablo 8. WHO 2016 Açık PMF Tanı Kriterleri

Major Kriterler
1- Retikülin ve/veya kollajen fibrozisin (derece 2-3) eşlik ettiği megakaryosit proliferasyon ve atipisi ^b
2- BCR/ABL pozitif KML, PV, ET, MDS veya diğer miyeloid neoplaziler için WHO kriterlerinin karşılanmaması
3- JAK2 V617F, CALR veya MPL mutasyonlarının varlığı veya bu mutasyonların yokluğunda, diğer klonalite belirteçlerinin ^d varlığı veya minör reaktif kemik iliği retikülin fibrozisi ^f yokluğu
Minör Kriterler (en az birinin varlığı: ^g)
a- Başka bir hastalığa bağlanamayan anemi
b- Palpabl splenomegali
c- Lökositoz ($\geq 11000/\mu l$)
d- LDH yüksekliği ^h
e- Lökoeitroblastozis

^a Tanı için 3 major kriterin tamamı ve en az bir minör kriter gereklidir. ^b Bozuk çekirdek/sitoplazma oranı, hiperkromatik, düzensiz büklümlü çekirdek ve yoğun kümeleşmelerle kendini gösteren küçükten büyüğe doğru giden değişik çapta megakaryositler ^c Derece 1 retikülin fibrozis olgularında megakaryosit değişikliklerine artmış kemik iliği hücreliliği, granülositik proliferasyon ve sıklıkla azalmış eritropoez eşlik etmelidir. ^d Söz konusu üç mutasyonun yokluğunda ASXL1, EZH2, TEET2, IDH1/IDH2, SRSF2, SF3B1 gibi mutasyonlar hastalığın klonal doğasını tespit etmeye yardımcı olur. ^e Enfeksiyon, otoimmün bozukluk veya diğer kronik inflamatuvar durumlar, saçlı hücreli lösemi veya diğer lenfoid neoplazmlar, metastatik malignite veya toksik (kronik) miyopatilere sekonder gelişen minör (derece 1) fibrozis ^f Enfeksiyon, otoimmün bozukluk veya diğer kronik inflamatuvar durumlar, saçlı hücreli lösemi

veya diğer lenfoid neoplazmlar, metastatik malignite veya toksik (kronik) miyopatilere sekonder gelişen kemik iliği fibrozisi ^g İki ardışık çalışmada tespit edilmeli. ^h Anormalliğin derecesi sınırdan veya belirgin olabilir. LDH düzeyi için kurum referans aralığı kullanılmalıdır.

Tablo 9: WHO 2008 ve 2016 Pre PMF Kriterlerinin Karşılaştırılması

PrePMF	WHO 2008	WHO 2016
Kemik iliği morfolojisi	A1 önemli retikülin fibrozisi olmaksızın, granülositik proliferasyon ve sıklıkla azalmış eritropoezin eşlik ettiği, megakaryositik proliferasyon ve atipi.	A1 Yaşa göre hiperselüler kemik iliği, granülositik proliferasyon ve sıklıkla azalmış eritropoezin eşlik ettiği, derecel'den fazla retikülin fibrozisi olmaksızın, megakaryositik proliferasyon ve atipi ^c
Dışlama kriteri	A2 bcr/abl+ KML, MDS veya diğer miyeloid neoplazilerin WHO kriterlerinin bulunmaması	A2 PV, ET, bcr/abl+ KML, MDS veya diğer miyeloid neoplazilerin WHO kriterlerinin bulunmaması
Klonal genetik belirteçlerin varlığı	A3 JAK2 V617F veya diğer klonal belirteçlerin varlığı veya reaktif kemik iliği fibrozisinin olmaması	A3 JAK2, CALR veya MPL mutasyonunun varlığı veya diğer klonal belirteçlerin varlığı veya reaktif kemik iliği fibrozisinin olmaması
Minör kriter	B 1- lökoeritroblastozis 2- LDH yüksekliği 3- Anemi 4- Splenomegali	B 1- Anemi 2- lökositöz >11K/µl 3- palpabl splenomegali 4- LDH yüksekliği

Pre PMF tanısı 2008 WHO kriterlerine göre A1-A3 ve B kriterlerinin ikisi, 2016 WHO kriterlerine göre ise A1-A3 ve B kriterlerinden en az bir tanesi varsa tanı konur.

Tablo 10: WHO 2008 ve 2016 Açık PMF Kriterlerinin Karşılaştırılması

Açık PMF	WHO 2008	WHO 2016
Kemik iliği morfolojisi	A1 Sıklıkla retikülin ve kollajen fibrozisinin eşlik ettiği megakaryositik proliferasyon ve atipinin varlığı	A1 1- Retikülin ve/veya kollajen fibrozisin (derece 2-3) eşlik ettiği megakaryosit proliferasyon ve atipisi
Dışlama kriteri	A2 bcr/abl+ KML, MDS veya diğer miyeloid neoplazilerin WHO kriterlerinin bulunmaması	A2 PV, ET, bcr/abl+ KML, MDS veya diğer miyeloid neoplazilerin WHO kriterlerinin bulunmaması
Klonal genetik belirteçlerin varlığı	A3 JAK2 V617F veya diğer klonal belirteçlerin varlığı veya reaktif kemik iliği fibrozisinin olmaması	A3 JAK2, CALR veya MPL mutasyonunun varlığı veya diğer klonal belirteçlerin varlığı veya reaktif kemik iliği fibrozisinin olmaması
Minör kriter	B 1- Lökoeritroblastozis 2- LDH yüksekliği 3- Anemi 4- Splenomegali	B 1- Anemi 2- lökositoz >11K/ μ l 3- palpabl splenomegali 4- LDH yüksekliği 5- Lökoeritroblastozis

Açık PMF tanısı 2008 WHO kriterlerine göre A1-A3 ve B kriterlerinin ikisi, 2016 WHO kriterlerine göre ise A1-A3 ve B kriterlerinden en az bir tanesi varsa tanı konur.

PMF'in yanısıra bir hastalığa sekonder olarak da miyelofibrozis gelişebilir. PV ve ET'a sekonder olarak gelişen miyelofibrozis için IWG-MRT (International Working Group for Myeloproliferative Neoplasms Research and Treatment) tarafından post ET ve post PV miyelofibrozis tanı kriterleri oluşturulmuştur (**Tablo 11**) (75).

Tablo 11. Post PV/ Post ET Miyelofibrozis Tanı Kriterleri*

<p><i>Gerekli Kriterler</i></p> <p>1- Daha önceden WHO kriterlerine uygun olarak PV ya da ET tanısı almış olmak</p> <p>2- Kemik iliği fibrozisinin derece 2-3 veya 3-4 olması</p>
<p><i>Ek Kriterler</i> (En az iki tanesinin olması gereklidir)</p> <p>1- PV için, anemi ya da sitoredüktif tedavi olmaksızın flebotomi ihtiyacının ya da eritrositöz için sitoredüktif tedavi ihtiyacının kaybolması. ET için, anemi ve bazal hemoglobin düzeyinden ≥ 2 g / dL azalma</p> <p>2- Periferik kanda lökoeritroblastozis tablosu</p> <p>3- ≥ 5cm palpabl splenomegali artışı ya da yeni gelişen splenomegali varlığı</p> <p>4- Şu üç konstitüsyonel semptomun birinden fazlasının görülmesi</p> <ul style="list-style-type: none">- 6 ayda %10'dan fazla kilo kaybı- Gece terlemesi- Nedeni açıklanamayan ateş ($\geq 37,5$)

(75)*

2.1.3.4. Laboratuvar

Hastaların tanı anındaki kan sayımı değerleri geniş bir aralıkta seyreder. Çoğu hastada normokrom normositer bir anemi vardır. Ortalama hemoglobin değeri 9 ile 12

mg/dl arasında değişir. Hastaların periferik kan yaymasında anizositoz, poikülositoz ve gözyaşı şeklinde hücreler görülür. Sıklıkla retikülositoz vardır (76). Beyaz hücre sayısı granülopoez sonucunda orta derecede artmıştır ve yaklaşık 10.000 ile 14.000/ μ l arasındadır. Hastaların çoğunda kanda tanıda %0,5-2 arasında blast vardır. Bu oranın %20'den daha yüksek olduğu durumlarda AML dönüşümü göz önünde bulundurulmalıdır. Platelet değerleri 175.000 ile 580.000/ mm^3 arasındadır. Hastaların platelet değeri ortalama %40 normal limitin üstündedir. Masif splenomegali olan hastalarda orta derecede trombositopeni üçte bir oranında gözlenmektedir. Hastalıkta dev ve anormal granülasyona sahip plateletler karakteristiktir (77). Hastaların %10'unda kemik iliği fibrozisi ile ilişkili pansitopeni vardır. Kanda CD34+ hücrelerin artması primer miyelofibrozis için oldukça karakteristik bir bulgudur ayrıca hastalık progresyonu hakkında da bilgi verir (68). Serum ürik asit, laktat dehidrojenaz, bilirubin değerleri yüksek, albümin ve kolesterol değerleri ise genellikle düşüktür. Hipokalsemi ya da hiperkalsemi görülebilir (78). PMF'de antieritrosit antikörleri ve dolaşan immün komplekslerde artış gözlenmiştir. Hastalığın SLE ve PAN ile birlikteliğinin olabilmesi bu hipotezi destekler (79,80).

Kemik iliği biyopsisi fibrozis nedeniyle alınamayabilir. Kemik iliği selülerdir ve granülositik ve megakaryositik hiperplazi ve değişik boyutlarda, anormal lobülasyonlu nükleus içeren atipik megakaryositler vardır. Eritroid hücreler azalmış, normal ya da artmış olabilir. Yoğun fibrotik kemik iliğinde selülarite azalır ancak megakaryositler belirgindir. Kemik iliği histomorfometrik analizleri ile osteoskleroz gösterilebilir. Bauermeister skalası kullanılarak kemik iliği fibrozisi 0'dan 4'e kadar derecelendirilir. Pre PMF aşamasında retiküler fibrozis çok belirgin olmayabilir. Artmış ve anormal megakaryopoezis bu dönemin en karakteristik bulgusudur (12).

2.1.3.5. Klinik

Hastaların yaklaşık %25'lik bir kısmı teşhis sırasında asemptomatiktir. Halsizlik, nefes darlığı, kaşıntı ve çarpıntı nonspesifik ancak sık şikayetler arasındadır. Anemi derecesinden bağımsız olarak halsizlik en sık şikayettir. Konstitüsyonel semptomlar olarakta adlandırılan ateş, gece terlemesi ve kilo kaybı miyelofibrozis hastalarında aynı zamanda tedavi yanıtının değerlendirilmesinde sık kullanılır (77,81).

Splenomegali hastaların üçte ikisinde palpasyon ya da görüntüleme yöntemleriyle gösterilebilir. Hastaların dörtte birinde hafif, yarısında orta derece ve kalan kısmında masif splenomegali görülür. PMF’de ‘sweet sendromu’ olarak adlandırılan nötrofilik dermatozlar görülebilir. Bu cilt lezyonlarını lösemik infiltrasyonlardan ayırmak gereklidir. Extrameduller hematopoez veya miyeloid metaplazi, etkilenen organlara özgü spesifik semptomlara neden olur. Santral sinir sistemi, adrenal gland, lenf nodları, böbrek, akciğer, karaciğer ve cilt gibi pek çok organ tutulum şekline bağlı olarak değişik bulgular verebilir (82,83). PMF hastalarında portal ven trombozu yada masif splenomegali sonucu artmış portal kan akımı ve azalmış hepatic vasküler akım nedeniyle özefagus varisleri, gastrointestinal sistem kanamaları ve hepatic ensefalopati tablosu meydana gelebilir (84). PMF’de arteriyal ve venöz tromboz riski, ET ve PV kadar olmasa da artmıştır. Hastalığın ilk dört yılında yaklaşık %10 hasta anlamlı trombotik bir olayla karşılaşır. Bu durum için en önemli risk faktörü, JAK2 pozitifliği, lökosit sayısının yüksekliği ve ileri yaştır (85).

PMF’de ölümün majör nedenleri enfeksiyon, kanama, kalp yetersizliği ve akut lösemik transformasyondur. Olguların yaklaşık %15’inde akut lösemiye dönüşüm gözlenmektedir (86).

2.1.3.6. Tedavi

Asemptomatik hastaların çoğu yıllarca stabil kalır ve tedaviye ihtiyaç duymazlar. Anemi, trombositopeni ve splenomegali başlangıç tedavisinin temel nedenidir. 10g/dl altında hemoglobin, 4.000 / μ l altı ya da 30.000/ μ l üstü beyaz küre sayısı, 100.000/ μ l altında trombosit sayısı ve %1’in üzerinde periferik blast sayısı hastalığın hızlı ilerleyeceğini öngören bulgulardır.

PMF’de tedavinin amacı miyeloid proliferasyonu azaltmak, hastanın semptomlarını iyileştirmek ve lösemiye dönüşüm riskini en aza indirmektir. Bu amaçla Uluslararası Prognostik Puanlama Sistemi (IPSS), Dinamik Uluslararası Puanlama Sistemi (DIPSS) ve DIPSS artı puanlama sistemi geliştirilmiştir (**Tablo 12, 13, 14**) (87–89). Bu prognostik sistemler sadece PMF’de değil aynı zamanda post PV-MF ve post ET-MF hastalarında da kullanılır. IPSS tanı sırasında, DIPSS-plus tanı ve tedavi boyunca, DIPSS ise karyotip sonucuna ulaşılamadığı durumlarda kullanılır. Hastalar bu

skorlama sistemleri ile düşük, orta ve yüksek risk gruplarına ayrılırlar. PMF’de tedavi risk skorlama sistemlerine göre geliştirilmiştir.

Tablo 12. Primer Miyelofibrozis IPSS risk skorlaması

1- Yaş >65
2- Hb <10 g/dl
3- Lökosit sayısı>25.000/mm ³
4- Dolaşan blast sayısı ≥ %1
5- Konstitüsyonel semptomların varlığı

Skor: Her biri 1 puan olmak üzere; düşük risk 0 puan, orta-1 risk 1 puan, orta-2 risk 2 puan ve yüksek risk ≥ 3 puan

Tablo 13. Primer Miyelofibrozis DIPSS risk skorlaması

1- Yaş > 65
2- Hgb <10 g/dl
3- Lökosit sayısı >25.000/mm ³
4- Dolaşan blast sayısı ≥ %1
5- Konstitüsyonel semptomların varlığı

Skor: Hgb <10 g/dl için 2 puan olmak üzere; diğerleri için 1 puan almaktadır; düşük risk 0 puan, orta-1 risk 1-2 puan, orta-2 risk 3-4 puan ve yüksek risk 5-6 puan

Tablo 14. Primer Miyelofibrozis DIPSS-plus risk skorlaması

1- Yaş > 65
2- Hgb <10 g/dl
3- Lökosit sayısı > 25.000/mm ³
4- Dolaşan blast sayısı ≥ %1
5- Konstitüsyonel semptomların varlığı
6- Eritrosit transfüzyon ihtiyacı
7- Trombositopeni (trombosit sayısı <100.000/mm ³)
8- Patolojik karyotip (kompleks karyotip veya trizomi 8, 7/7q, i(17q), inv(3), 5/5q, 12p veya 11q23 rearanjmanını içeren bir veya iki karyotip anomalisi)

Skor: Her biri 1 puan olmak üzere; düşük risk 0 puan, orta-1 risk 1 puan, orta-2 risk 2 veya 3 puan ve

yüksek risk ≥ 4 puan

Düşük ve orta risk grubu hastalar asemptomatik ise spesifik tedavinin yararı gösterilememiştir. Konstitüsyonel semptomların varlığında, semptomatik anemi, splenomegali, karaciğer dalak dışındaki extramedüller hematopoez gibi durumlarda tedavi gerekir. Belirgin lökositoz ve trombositoz varlığında da sitoredüktif tedavi başlanmalıdır. Splenomegali tedavisi için hidroksiüre kullanılabilir ancak portal hipertansiyon, tedaviye dirençli splenomegali, transfüzyon bağımlı anemi, belirgin trombositopeni gibi durumlarda splenektomi uygulanması önerilir. Pansitopenide ya da karaciğer-dalak dışındaki ekstramedüller hematopoezin tedavisinde radyoterapi kullanılır.

Intermediate 1 risk grubundaki hastalarda anemi tedavisi için androjenler, danazol, kortikosteroidler, talidomid ve lenalidomid kullanılabilir. Androjenlerin en önemli yan etkileri hepatotoksisite ve virilizasyon, talidomidin periferik nöropati ve lenalidomidin miyelosüpresyondur (90,91).

Intermediate 2 ve yüksek risk grubundaki hastalar ise daha düşük sağkalım oranına sahip olup, ilaç tedavisine gereksinim duyarlar. Anemi ve splenomegali tedavisi düşük risk grubu ile aynıdır. Lökositoz, trombositoz, splenomegali ve kemik ağrılarının tedavisinde hidroksiüre kullanılabilir. Ayrıca deneysel ilaç tedavisi ve allojenik kök hücre transplantasyonu önerilen diğer tedaviler arasındadır.

Deneysel ilaç tedavisinde kullanılan JAK inhibitörü ATP mimetik ilaçlar ruxolitinib, fedratinib, momelotinib ve pacritinib'tir. Bu ilaçlardan ruxolitinib FDA onaylı kullanımdadır. Momelotinib faz 3 çalışmasındadır. Diğerleri ise yan etkileri nedeniyle kullanılmamaktadır. Bir JAK1/JAK2 inhibitörü olan ruxolitinib, ile yapılan çalışmalarda hastalarda konstitüsyonel semptomlarda iyileşme ve dalak boyutunda küçülme tespit edilmiştir. İlacın JAK2 V617F allel yükü ya da kemik iliği patolojisi üzerine etkisi belirsizdir. Uzun dönemde yan etkilere (ensefalopati, anemi, trombositopeni, diyare gibi) bağlı ilaç bırakıldığında hastalık semptomlarının akut relapsı ve septik şok benzeri hemodinamik dekompanseasyon ile kendini gösteren "ruxolitinib çekilme sendromu" meydana gelebilir (92,93).

JAK-STAT aktivasyonunun mTOR aktivasyonuna neden olduğu bilindiği için PMF'de bu yolağın inhibisyonu ile ilgili çalışmalar everolimus ve insan telomeraz

revers transkriptazı olan imetelestat ile yürütülmektedir (94).

Sonuç olarak PMF'in etkin tedavisinin olmadığını dikkate alarak ortalama beş yıldan kısa yaşam süresi ve %20'den fazla lösemik transformasyon riski nedeni ile komplikasyonlar göze alınarak hastalar transplantasyona yönlendirilebilir ya da bunun mümkün olmadığı durumlarda deneysel ilaçlar kullanılabilir. Ayrıca dirençli splenomegali durumunda da deneysel ilaçlar splenektomi ve radyoterapiye alternatif olarak denenmelidir (95).

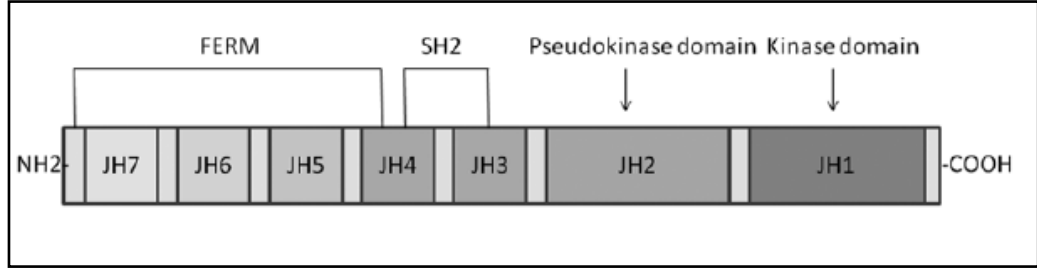
2.2. Miyeloproliferatif Neoplazilerde Mutasyonlar

MPN'lerde sitogenetik değişiklikler nonspesifiktir ve tanısız olmaktan ziyade prognoz hakkında bilgi verirler. 2005 yılında JAK2 V617F ve sonra sırasıyla MPL ve CALR mutasyonlarının keşfedilmesi ile birlikte bu hastalıklardaki moleküler genetik belirteçler tanıda yerini almıştır. MPN'lerde JAK-STAT yolağında yer alan bu üç ana mutasyonun yanısıra daha az sıklıkta görülen ve epigenetik regülasyon, sitokin sinyali ve m-RNA splicing yoluyla etkili, hastalığa spesifik olmayan başka moleküler klonal belirteçler de vardır.

Günümüzde BCR/ABL negatif MPN'de altta yatan spesifik moleküler değişiklikten bağımsız olarak JAK-STAT yolağının merkezi rol oynadığı gösterilmiştir. JAK-STAT yolu, hücre içi sinyalleri, büyüme faktörleri ve sitokin reseptörlerine aktarmadaki temel yollardan biridir. Bu mekanizma çoğalmayı, farklılaşmayı, hücre göçünü, apoptozu ve hücre sağ kalımını düzenler. Bu yolağın aktivasyonu MPN patogenezinde temel rolü oynamaktadır (96).

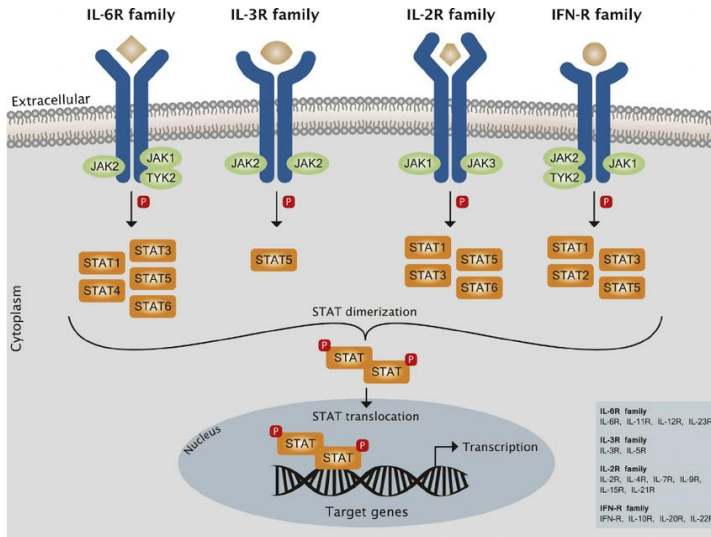
2.2.1. JAK2 V617F Mutasyonu

JAK proteinleri, 120-140 kDa büyüklüğünde ve 7 tane Janus homology (JH1-7) bölgesi taşıyan proteinlerdir (**Şekil 1**). JH1 bölgesinin kinaz aktivitesi vardır. JH2 ise psödokinaz bölgesi olup, JH1 aktivitesini düzenler. JAK ailesi, Tyk2, JAK1, JAK2 ve JAK3'den oluşur ve sırasıyla kromozom lokalizasyonları 19p13.2, 1p31.3, 9p24 ve 19p13.1'dir.



Şekil 1. JAK Proteininin Yapısı

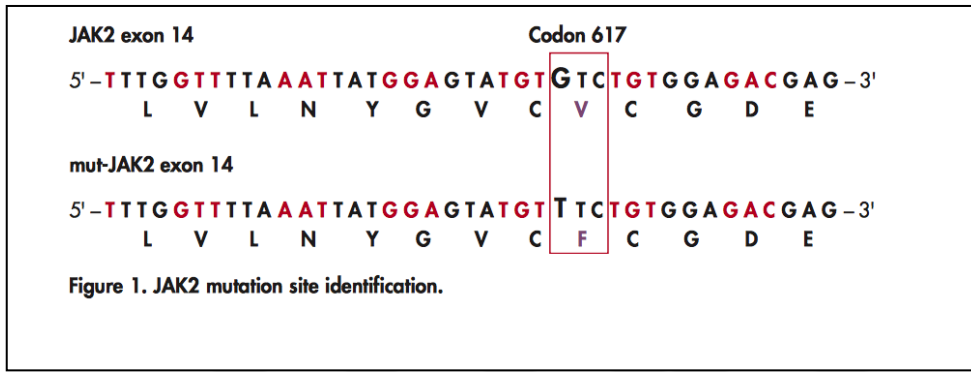
JAK2, 25 ekzon ve 1132 aminoasit içeren bir proteindir. Eritropoetin, trombopoetin ve interlökinler sitokin reseptörüne bağlandığında JAK-STAT yolağındaki JAK2 proteini, reseptörün sitoplazmik alanı ile etkileşime girer ve tirozin fosforilasyonunu katalize eder. Tirozin bölgelerinden fosfor bağlanan reseptörler, STAT (Transkripsiyon sinyal aracı molekülü ve aktivatörü) proteinlerinin bağlanması için uygun hale gelir. Reseptöre bağlanan STAT proteinleri, JAK tarafından fosfat bağlanarak aktifleştirilirler. Aktifleşen STAT proteinleri serbest kalarak dimer oluşturur, nükleusa gider ve genlerin aktivasyonunu sağlarlar (**Şekil 2**) (96). Miyeloid hücrelerin salınımı, çoğalması ve farklılaşmasını düzenlerler (97).



Şekil 2. JAK-STAT Sinyal Yolağı

JAK2 genindeki spesifik somatik mutasyon ilk kez 2005 yılında tanımlanmıştır. PV'da, JAK2'nin inhibisyonu ile EPO bağımsız koloni oluşumunun azaldığının

gösterilmesi üzerine, JAK2 geni sekanslanmış ve psödokinaz bölgesinde JAK2 V617F mutasyonu tespit edilmiştir. Bu mutasyon, JAK2 geni ekzon 14’de 1849. pozisyondaki guaninin timine dönüşmesi sonucunda, 617. pozisyondaki valinin fenilalanine dönüşümü ile meydana gelir (**Şekil 3**) (11). Mutasyon sonucunda proliferasyonda artış ve apoptozda düzensizlikler meydana gelir. Mutasyonun ortaya konması ile birlikte BCR/ABL negatif klasik MPN’lerin tanısında yeni bir dönem başlamış ve 2008 yılında da MPN tanı kriterleri arasına girmiştir. Ancak mutasyon PV, ET ve PMF’in üçünde de varolduğu için hastalıkların ayırımında tek başına yeterli değildir.



Şekil 3. JAK2 V617F Mutasyon Bölgesi

JAK2 V617F mutasyonu, PV’da %95, ET’da %50-70 ve PMF’de %40-50 oranında görülmektedir. Ayrıca daha az oranda kronik miyelomonositik lösemi (CMML), juvenil miyelomonositik lösemi (JMML), atipik KML (aCML) ve “refractory anemia with ring sideroblasts and thrombocytosis” (RARS-T) ve akut miyeloid lösemide de görülebilir (91).

JAK2 V617F mutasyonu, 9. kromozomun kısa kolunda mitotik rekombinasyonla heterozigotluğun kaybı ile homozigot forma geçebilir. PV’da sıklıkla homozigot formda bulunmakla birlikte ET’da nadiren homozigottur (98).

Ayrıca kantitatif PCR metodu ile granülositlerdeki JAK2 V617F mutasyonu allel yükü de tespit edilebilmektedir. Yapılan çalışmalarda ET’da bu oran genellikle %25’in altında, PV’da ise %50’nin üstündedir. Post-PV MF ve post-ET MF’de oran %100’e yakındır. PMF’de genellikle yüksek olmakla birlikte değişkendir (99).

PV’da JAK2 V617F mutasyonu, yüksek hemoglobin düzeyi, pruritis ve post-PV MF oranında artış ile ilişkilidir. JAK2 mutant allel yükü fazla olan hastalarda lökositöz, splenomegali oranında artış ve kemik iliği fibrozisine ilerlemenin daha hızlı olduğu

gösterilmiştir (100).

ET'da JAK2 V617F mutasyonu, yüksek hemoglobin ve lökosit sayısı, diğer ET'lardan daha düşük trombosit sayısı ve özellikle yaşlı bireylerde trombotik olaylarda artmış risk ile karakterizedir. (101).

PMF'da da JAK2 V671F mutasyonu, yüksek lökosit sayısı, hemoglobin ve platelet değerleriyle ilişkilidir. Hastalarda dalak boyutu artmış olup, lösemik transformasyon ile sağkalım oranı azalmıştır. Çalışmalarda bu mutasyonu taşıyan hastaların daha yaşlı oldukları gözlenmiş ancak trombotik olaylarda belirgin bir risk artışı gösterilememiştir (102).

JAK2 V617F mutasyonun, fenotipik olarak birbirinden farklı MPN gruplarında farklı klinikte görülmesi, bu hastalıkların fenotipinde JAK2 V617F'den başka eşlik eden yolaklar ve mutasyonların varlığını düşündürmektedir.

2.2.2. JAK2 Ekzon 12 Mutasyonu

PV'da yaklaşık %5 hasta JAK2 V617F mutasyonu için negatiftir. JAK2 V617F negatif PV ve esansiyel eritrositozu olan hastalarda yaklaşık %2 oranında JAK2 ekzon 12'de mutasyon tanımlanmıştır. Bu mutasyonlar JH3 ile JH2 bölgesi arasında yerleşmiş, sıklıkla delesyon ve insersiyon tipi mutasyonlardır ve tirozin fosforile JAK2 ve STAT5 düzeylerinin artması ile, sitokine bağlı olmayan eritropoietin reseptörü (EpoR) ekspresyonunu indüklerler (103) ve sonuç olarak eritrositozu içeren miyeloproliferatif hastalık fenotipi ortaya çıkar.

JAK2 ekzon 12 mutasyonu olan hastalar tanı anında daha genç, yüksek hemoglobin ve eritrosit düzeyi, düşük beyaz küre ve trombosit sayısı olan hastalardır. Sıklıkla subnormal serum EPO düzeyleri gözlenir. PV hastaları için JAK2 ekzon 12 mutasyonu, JAK2 V617F mutasyonuna benzer şekilde prognostik özellik gösterir (104).

2.2.3. Trombopoetin Reseptör Gen (MPL) Mutasyonu

JAK-STAT yolağında trombopoetin reseptörü, megakaryopoezin düzenlenmesinde önemli rol oynar. MPL, kromozom 1p34'de lokalize 12 ekzondan oluşan bir moleküldür. Extraselüler yerleşimli bir büyüme faktörü olan trombopoetin

(TPO), JAK2'nin fosforilasyonu ve aktivasyonuna neden olur ve JAK2, MPL fosforilasyonuna ve böylece STAT ve ERK gibi sinyal yollarının aktivasyonuna yol açar.

Çalışmalar MPN gelişimi ve progresyonunda MPL ekspresyonunun önemli rolü olduğunu göstermiştir. İlk olarak Pikman ve arkadaşları 2006 yılında, JAK2 V617F negatif MF hastalarında, MPL transmembran bölgesinde (MPLW515L) somatik bir mutasyon göstermişlerdir. MPLW515L mutasyonu, ekzon 10'da 1544. nükleotidin guaninden timine dönüşmesi sonucu 515. aminoasitin triptofandan lösine dönüşmesi ile oluşur (105). Daha sonra triptofanın lizine dönüşümü ile oluşan MPLW515K mutasyonu da tanımlanmıştır. MPL W515L/K mutasyonu bu geni ilgilendiren hemen hemen tek mutasyondur. Ancak W515A ve W515R mutasyonlarını bildiren az sayıda yayın vardır. MPL mutasyonları, PMF ve ET'de sırasıyla %5-10 ile %3-5 oranlarında bildirilmiştir.

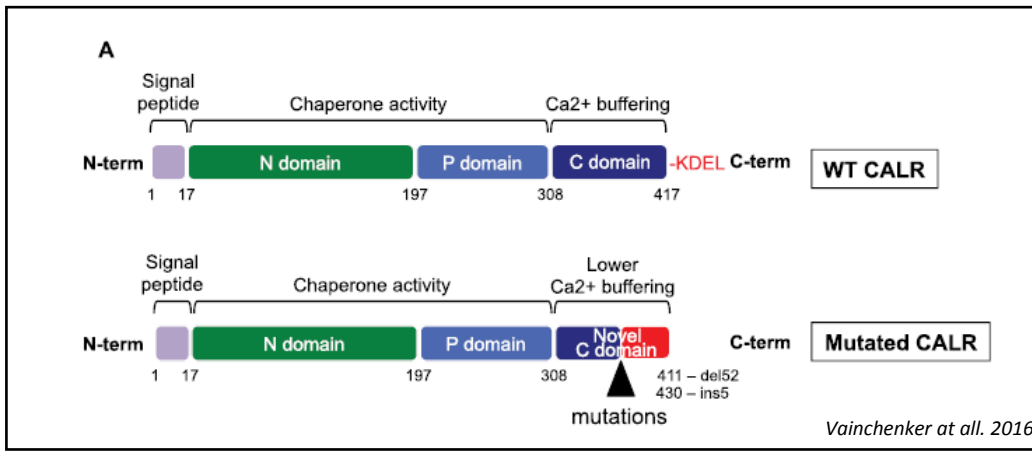
MPL mutasyonu olan hastalar, tanı sırasında yaşlı, yüksek platelet ve serum EPO düzeyleri ile düşük hemoglobin düzeyi ve azalmış kemik iliği selülaritesine sahip hastalardır. Trombotik komplikasyon riski JAK2 pozitif hastalara göre artmıştır (106).

2.2.4. Kalretikulin (CALR) Mutasyonları

MPN'lerin yaklaşık %30-45'inde JAK2 ve MPL mutasyonları negatiftir. 2013 yılında Klampfl ve arkadaşları JAK2 ve MPL negatif PMF'de tüm ekzon sekanslama işlemini gerçekleştirmiştir. Daha sonra elde edilen veriler ile CALR geni sekanslanmış ve CALR geninin 9. ekzonunda 32 farklı somatik mutasyon tespit edilmiştir. Sonraki çalışmalarda sadece MPN'de değil MDS, RARS-T, CMML gibi miyeloid neoplazilerde de düşük oranlarda CALR mutasyonu gösterilmiştir (107).

CALR, 19p13.1'de lokalize 9 ekzondan oluşan bir genidir. Kalretikulin, hücre proliferasyonu, farklılaşması, apoptoz ve immünojenik hücre ölümünde önemli rol oynayan, şaperon aktivitesi gösteren ve kalsiyum dengesinde rolü olan, çok fonksiyonlu bir endoplazmik retikulum proteindir. Bu protein üç bölgeden oluşur. Birincisi, şaperon aktivitesinde rol oynayan N-terminal lektin bağlayıcı bölge ve Zn-bağlayıcı bölge, ikincisi düşük kapasite ve yüksek afinite ile Ca^{2+} bağlayan prolin-zengin P bölgesi ve üçüncüsü çoklu Ca^{2+} bağlayan bölge içeren C bölgesidir. Mutasyona uğramamış

kalretikulin C terminal ucunda lizin, aspartik asit, glutarik asit ve lösinden oluşan KDEL adı verilen aminoasit sekansı içerir. Tüm CALR mutasyonlarında C terminalindeki KDEL motifi kaybolur. CALR tip 1 mutasyonları tüm negatif yüklü aminoasitleri, Tip 2 mutasyonları ise negatif yüklerin yarısını değiştirerek pozitif yüklü aminoasitlere çevirir. Sonuç olarak proteinin Ca bağlama kapasitesini değiştirir. C-terminal bölgesindeki değişikliklerin ikinci önemli sonucu, bu değişimle şaperonları endoplazmik retikuluma geri getiren ER-golgi arasındaki sinyal motifi (KDEL), mutant protein içinde kaybolarak Ca'un ER'ye geri dönüşünü engeller (**Şekil 4**) (108).



Şekil 4. Kalretikulin Proteininin Yapısı

CALR'deki tüm mutasyonlar 9. ekzondaki insersiyon ve delesyon mutasyonlarıdır. Gözlenen en sık değişiklikler 52-bp delesyondan oluşan p.L367fs*46 (tip 1 mutasyonu) ve 5-bp insersiyondan oluşan p.K385fs*47 (tip 2 mutasyonu)'dur. Bu mutasyonlar PMF'de sırasıyla %75 ve %15, ET'de ise sırasıyla %55 ve %35 oranında görülmektedir (109). Yaklaşık %10 hasta CALR, MPL, JAK2 V617F mutasyonları için negatiftir. Birkaç yayında JAK2 V617F ve CALR mutasyonunun birlikte olduğu az sayıda hasta rapor edilmiştir (107).

ET'da CALR mutasyonu olan hastalar, genellikle genç yaşta ve erkektir. JAK2 V617F mutasyonu olan ET'a göre daha düşük hemoglobin ve beyaz küre değerleri, daha yüksek trombosit değerlerine sahiplerdir. Serum EPO düzeyleri daha yüksek, tromboz riski daha düşüktür. Splenik ven trombozu olan 144 hastada JAK2 V617F mutasyonu %18 iken hiç CALR mutasyonu gözlenmemiştir. Miyelofibroze dönüşme

riski net değildir. Bazı çalışmalarda yüksek iken (110) bazı çalışmalarda ise anlamlı fark gözlenmemiştir (111). Toplam sağkalım süresi JAK2 V617F ile fark göstermez ancak “triple negatif“ olan yada MPL mutasyonu olanlardan daha uzundur.

PMF’de CALR mutasyonu olanlar, JAK2 V617F mutasyonu olan hastalara kıyasla daha genç yaştaadır. Düşük beyaz küre ve yüksek platelet değerleri, transfüzyon ihtiyacı olan anemileri vardır. Tromboz riskinde ise artış gözlenmemiştir (107). CALR mutasyonu olan PMF’de ortalama yaşam süresi DIPPS-plus kriterleri ve ASXL1 mutasyonundan bağımsız olarak daha iyidir. Ayrıca “Triple negatif” olan yada CALR-/ASXL1+ olan hastalardan ortalama sağkalımları yüksektir (112). Tip 1 CALR mutasyonu olan hastalar, JAK2 V617F yada tip 2 CALR mutasyonu olan PMF hastalarından daha uzun sağkalıma sahiptir (113).

2.2.5. MPN’lerde Görülen Diğer Mutasyonlar

MPN’de üç ana mutasyonun (JAK2, MPL ve CALR) yanısıra MPN’ye özgün olmayan başka klonal mutasyonlar da vardır. Bu mutasyonlar etkilerini başlıca epigenetik regülasyon, sitokin sinyali ve “m-RNA splicing” üzerinden gösterirler (Tablo 15) (114).

Tablo 15. MPN’de Görülen Mutasyonlar ve Etki Mekanizmaları*

<i>GENLER</i>	<i>Mutasyon Etki Mekanizması</i>	<i>PV (%)</i>	<i>ET (%)</i>	<i>MF (%)</i>
JAK2 V617F	JAK/STAT Sinyal Yolağı	95-97	50-60	50-60
JAK2 Ekzon 12		1-2	0	0
CALR		0	25	30
MPL		0	3-5	5-10
CBL		NF	0-2	5-10
SH2B3/LNK		2-20	2-6	3-6
ASXL1	Epigenetik Modifikasyon	2	5-10	10-35
EZH2		1-2	1-2	7-10
IDH1/2		2	1-	5
DNMT3A		5-10	2-5	8-12
TET2		10-20	4-5	10-20

SF3B1	mRNA Splicing	2	2	4
SRSF2		NF	NF	4-17
U2AF1		<1	<1	1-8
ZRSR2		<1	<1	<1
TP53	DNA Onarımı	1-2	1-2	1-2

NF: mutasyon gözlenmedi, *(114)

Epigenetik regülasyon; DNA metilasyonu ve “kromatin remodeling” olmak üzere iki temel yol üzerinden gen ekspresyonunu düzenler. TET2, DNMT3A ve IDH1/IDH2 DNA metilasyonu, EZH2 ve ASXL1 ise “kromatin remodeling”inde rol oynayan başlıca genlerdir.

TET2 geni, DNA metilasyon sürecinde rol alan metilsitozin dioksijenaz ailesinden bir proteini kodlar. TET2 mutasyonları fonksiyon kaybına yol açarak DNA metilasyonunu artırır ve hidroksimetil sitozin seviyesinde azalmaya neden olur. JAK2 V617F mutasyonu negatif ya da pozitif MPN’lerde gözlenebilir. Bazı çalışmalarda TET2 mutasyonu lösemiye dönüşüm riskinde artış ve kısa sağkalım ile ilişkili bulunduğu halde, tromboz oranını, lösemiye dönüşümü veya ortalama yaşam süresini etkilemediği yönünde çalışmalarda vardır (114). Bu mutasyon PMF’de %17, ET’de %11 ve PV’de %7-16 oranlarında bildirilmiştir (115).

DNMT3A, DNA metiltransferazı kodlayan gen ailesinin bir üyesidir. Bu gendeki mutasyonlar AML’de yaklaşık %20 oranında gözlenmekle birlikte, MPN’de oldukça nadir bildirilmiştir (116).

İzositrat dehidrojenaz 1 (IDH1) ve izositrat dehidrojenaz 2 (IDH2) mutasyonları, izositratı alfa-ketoglutarata dönüştüren nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADP⁺) bağımlı enzimlerdir. Bu genlerdeki mutasyonlar, histon demetilasyonu yoluyla hematopoietik farklılaşmayı engeller. IDH1 ve IDH2 mutasyonları MPN’de çok düşük oranlarda bildirilmiştir. ET’de %0.8, PV’de %1.9, PMF’de %4.1, post-ET/PV miyelofibroza %1, blastik faz ET’de %0, blastik faz PV’de %25 ve blastik faz PMF’de %25 oranında saptanmıştır (117).

EZH2 geni, histon H3 üzerinde lizinin trimetilasyonundan sorumlu multiprotein enzim kompleksidir. Kromatinin kompakt hale gelmesinde rol oynar. B hücreli lenfoma, meme ve prostat kanseri gibi solid tümörlerde daha önceden tanımlanmış olan bu

mutasyon MPN’de de gösterilmiştir. PMF’de %13, PV’de %3 oranında bildirilmiş ancak ET’de gözlenmemiştir. Mutasyonu taşıyan vakalarda prognoz kötüdür (118).

Addition Sex Comb Like 1 (ASXL1) mutasyonu, miyeloid neoplazilerde sık görülen mutasyonlardandır. ASXL1 20q11.1’de lokalizedir. Bu protein transkripsiyonel düzenlenmelerde rolü olan “polycomb ailesi” ile ilişkilidir. ASXL1’in “loss of function mutasyonları” onkogen aktivasyonuna yol açar. ASXL1 mutasyonu MPN’lerde düşük sıklıkta bildirilmiştir ve PMF’de kötü prognoza işaret eder (119). ASXL1 mutasyon sıklığı PV’da %2-5, ET’da %5-10, PMF’de %13-26 ve post-PV/ET MF’de %22-38,5 olarak bildirilmiştir. Son çalışmalara göre CALR+/ASXL1- olanların, CALR+/ASXL1+ ve CALR-/ASXL1+ olanlara göre daha uzun sağkalıma sahip olduğu gösterilmiştir (112).

Lenfosit-spesifik adaptör protein (LNK) olarak bilinen SH2B3, bir JAK-STAT inhibitör proteindir. TPO ve MPL aracılı JAK2 aktivasyonu için negatif düzenleyicidir ve bu yol ile hematopoezde önemli rol oynar. Prolinden zengin amino bölgesi, PH domaini ve MPL/JAK2’ye bağlanan SH2 domaini olmak üzere üç ana bölümden meydana gelir. Mutasyonların çoğu PH domaininde ekzon 2 mutasyonlarıdır (120). PV’da %2-20, ET ve PMF’de %2-6 oranında bildirilmiştir (114).

CBL, kromozom 11q23.3’de yerleşmiş 16 ekzondan oluşan bir protoonkogendir. CBL mutasyonları sonucunda ubiquitin ligaz aktivitesi bozulur (121). ET’da %0-2 ve PMF’de %5-10 oranında bildirilmiştir (114).

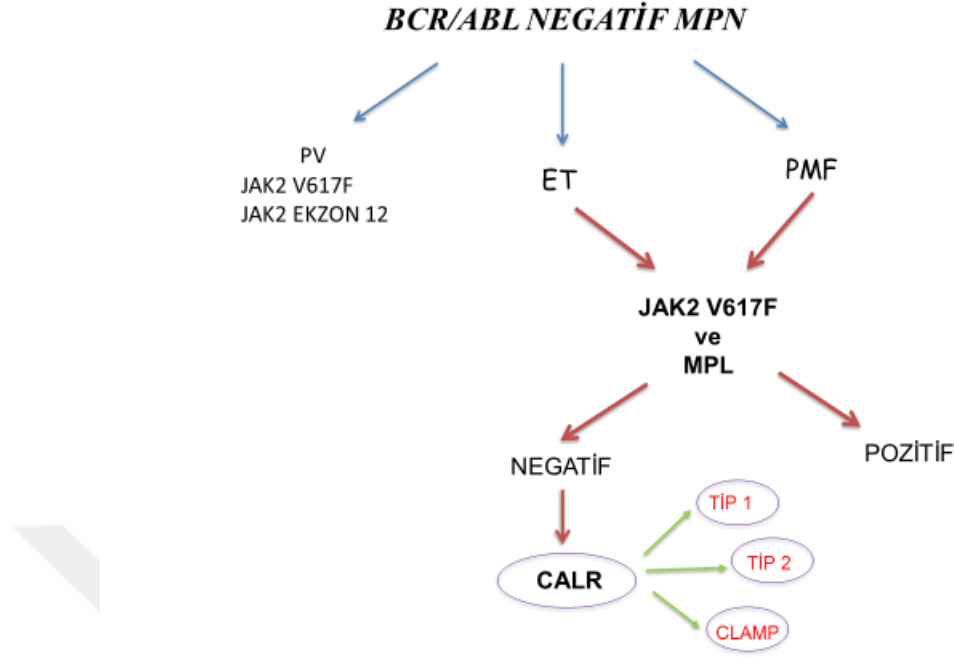
Epigenetik düzenleyicilerin yanında “RNA splicing” mutasyonları da MPN’lerde bildirilmiştir. Bu mutasyonlar başlıca SF3B1, SRSF2 ve U2AF1’dir. PMF’de daha sık görülür ve kötü prognozla seyrederek (122).

Tp53 geni, hücre siklus kontrolü, apoptozis ve DNA onarımı gibi fonksiyonlarda düzenleyici rol oynayan bir tümör supresör genidir. TP53 mutasyonu MPN’den AML’ye dönüşen hastaların yaklaşık %25 gösterilmiştir (123). ET ve PMF’de görülme oranları %1-2 civarındadır.

3. HASTALAR VE YÖNTEM

3.1. Hasta Seçimi

Çalışma 129 Miyeloproliferatif Neoplazi (MPN) hasta grubunun alt grupları olan ET (98) ve PMF (31) hastalarında yürütüldü. Sınıflandırma 2016 WHO MPN kriterlerine göre yapıldı. 2015-2017 yılları arasında Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Hematoloji Bilim Dalı'ında MPN ön tanısıyla takip edilen ya da yeni tanı olarak Tıbbi Genetik bölümüne yönlendirilen, 18 yaş üstü bireylerden oluşmaktaydı. Tüm hastalara JAK2 V617F ve MPL W515L/K mutasyonları bakılmıştı. CALR mutasyonu bu iki mutasyon için negatif olan hastalara uygulanmıştı (Şekil 5).



Şekil 5. Hasta Seçim Algoritmi

Hastalardan ilgili mutasyon analizleri için bilgilendirilmiş onam formlarının alınmasının yanı sıra OMÜ Klinik Araştırmalar Etik Kurulundan da onay alındı.

Hasta bilgileri, retrospektif dosya tarama yöntemi ile gerçekleştirildi. Ayrıca hastane nükleus bilgi sisteminden ve laboratuvar kayıt defterlerinden gerekli diğer bilgiler elde edildi. Kesitsel olarak yapılan bu çalışmada mutasyon analizi için örnek alınan tarihteki yaşları, cinsiyetleri, beyaz küre sayıları, hemogloblin ve trombosit değerleri, LDH düzeyleri ile splenomegali varlığı değerlendirildi. LDH düzeyi üst sınırı OMÜ Tıp Fakültesi Biyokimya laboratuvarının referans aralığı dikkate alınarak 509 kabul edildi. Tüm hastaların kemik iliği patoloji sonuçları değerlendirildi. Skoru koşulları temelinde klinik tanı için zorunlu olan kemik iliği patolojik incelemesi, ET ön tanısı ile gelen 26'sı hariç tüm hastalarda yapılmıştı. Hastaların dalak boyutu longitudinal çapın 130 mm'nin altında olması normal ve 160 mm üzeri olması masif splenomegali olarak değerlendirildi.

Hasta dosyaları ayrıca tromboz, kanama, ET için miyelofibroze dönüşüm (post-ET MF), lösemiye dönüşüm ve *excitus* parametreleri açısından tarandı.

Öncelikle, ET ve PMF'in hematolojik ve klinik verilerle ilişkisi, JAK2, MPL ve CALR mutasyonlarının bu hastalıklardaki dağılımı belirlendi. Mutasyonların CALR

için Tip 1, Tip 2, CLAMP ve MPL için ise W515L ve W515K olmak üzere alt grup dağılımları yapıldı.

Kuantitatif olarak bakılan JAK2 mutasyonu allel yükünün hastalıklarla, klinik ve hematolojik verilerle olan ilişkisi değerlendirildi.

ET ve PMF grubu hastalarda her mutasyonun ayrı ayrı klinik ve hematolojik verilerle ilişkisi belirlendi. Ayrıca CALR tip 1 ve tip 2 mutasyonları kendi arasında ve JAK2 V617F mutasyonu olan hastalar ile klinik ve hematolojik veriler açısından karşılaştırıldı.

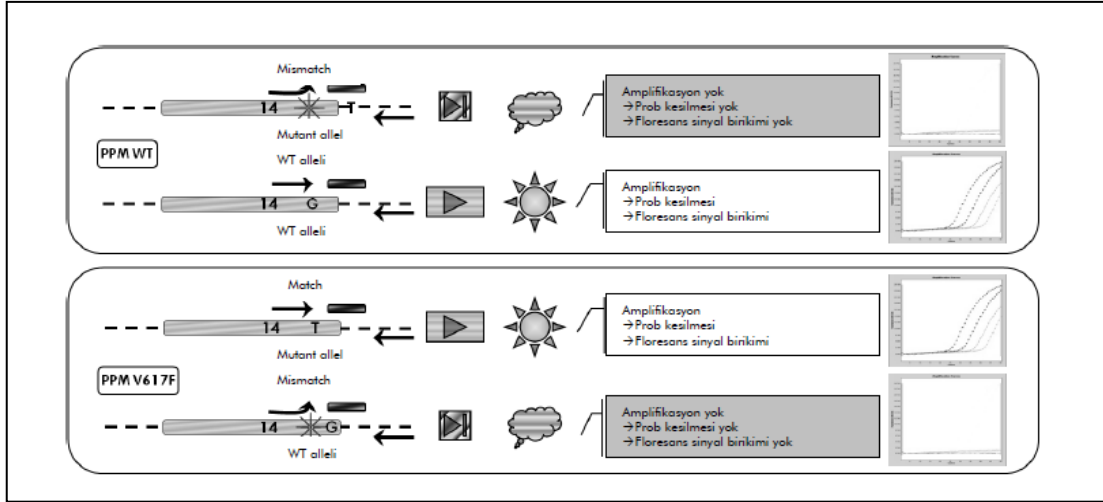
3.2. Yöntem

3.2.1. Periferik Kandan DNA İzolasyonu

Hastaların periferik kan örneklerinden *QIAamp DNA kit* (qiagenGmbH, Hilden, Almanya) ile DNA elde edildi. Spektrofotometri cihazıyla 260 nm ve 280 nm boylarında yapılan ölçümlerle elde edilen DNA ürünlerinin konsantrasyon ve saflık dereceleri belirlendi. Elde edilen ürünler -20 °C'de saklandı.

3.2.2. JAK2 V617F Mutasyon Analizi

JAK2 V617F mutasyon analizi, *İpsogen JAK2 MutaQuant Kit* kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemde gerçek zamanlı PCR ile JAK2 V617F mutasyonu kuantitatif olarak saptanmıştır. PCR sırasında ilgilenilen hedef mevcutsa, amplifikasyon ve beraberinde floresans sinyal artışı meydana gelir. Allel spesifik PCR ile WT veya V617F primer ve prob karışımının kullanılması aynı örnek kullanılarak yürütülen iki ayrı reaksiyonda WT veya mutant allelin spesifik olarak saptanmasını sağlar (**Şekil 6**). Sonuçlar toplam JAK2 kopyaları içinde VF kopyaları yüzdesi olarak ifade edilir.



Şekil 6. JAK2 V617F Mutasyon Tespiti (Allel Spesifik PCR)

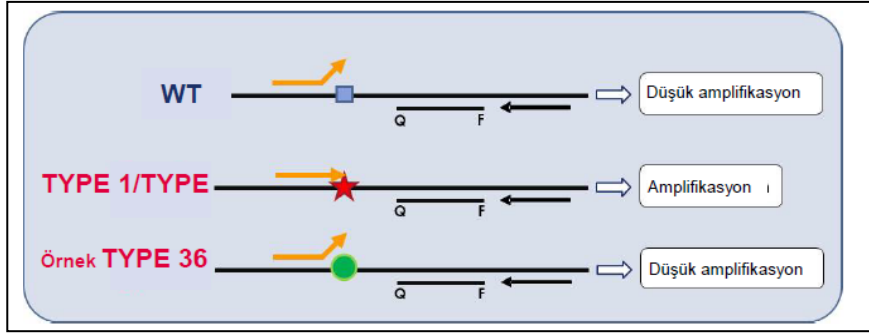
3.2.3. CALR Mutasyon Analizi

CALR geni mutasyon analizi amacıyla *İpsogen CALR RGQ Kiti* kullanılmıştır. Kit, CALR geninin ekzon 9'unun c.1091_1162 bölgesindeki somatik mutasyonların kalitatif tayinini yapan gerçek zamanlı PCR (qPCR) testidir. Bu test tip 1 ve tip 2 olarak adlandırılan iki önemli CALR mutasyonunun yanı sıra CLAMP olarak adlandırılan 32 farklı minör değişikliklerin de tespitini sağlar. CALR tip 1 mutasyonu 52-bp delesyondan (p.L367fs*46) ve tip 2 mutasyonu 5-bp insersiyondan oluşan (p.K385fs*47) en sık görülen mutasyonlardır. CLAMP mutasyonlarının görülme sıklığı ise %3'ün altındadır.

PCR sırasında ilgilenilen hedef mevcutsa hem ileri hem de geri primerler spesifik olarak bağlanır. Floresan sinyaldeki artış, yalnızca hedef dizinin primerleri ve probu tamamlayıcı nitelikte olması ve bu sayede PCR esnasında amplifiye edilmesi durumunda algılanır.

CALR mutasyonlarını ayırt etmek için primerlerin tamamlayıcı diziye özgü hibridizasyonu ve DNA polimerazın PCR primerinin 3' ucundaki eşleşmeyi veya eşleşmemeyi ayırt etme yeteneğini kullanan ARMS (Allele Refractory Mutation System) teknolojisi sayesinde allele özel bir amplifikasyon elde edilir.

PCR primeri tam olarak eşleştiğinde, amplifikasyon tam verimlilikle ilerler. 3' baz eşleşmesi olmadığında, yalnızca düşük seviyeli amplifikasyon oluşur (**Şekil 7**).



Şekil 7. CALR Mutasyonlarının ARMS-PCR ile saptanması

3.2.4. MPL Mutasyon Analizi

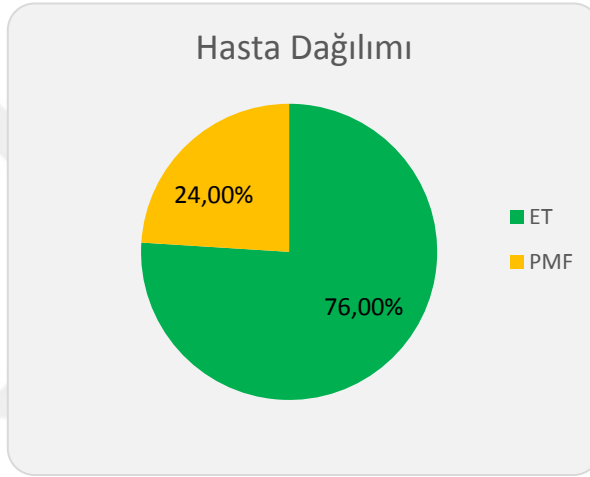
MPL mutasyon analizi için *Qia-gene mutascreen kit* kullanılarak semi-kantitatif MPL W515L ve W515K mutasyon tayini yapılmıştır. Kit TaqMan allelik ayırımını kullanarak genomik DNA'da doğal-tip MPL, MPL W515L ve MPL W515K allellerini tespit edebilmektedir. Allelik ayırımın değerlendirilmesinde iki TaqMan probu, multipleks ölçüm için kullanılmaktadır. Problardan biri allel 2 dizisine uyum sağlarken (doğal tip allel) diğeri allel 1 dizisine (mutasyonu taşıyan allel) uyum göstermektedir. Her bir prob 5' ucunda ayırt edici floresan boya (FAM veya VIC) ile işaretlenmiştir ve 3' ucunda floresan olmayan bir baskılayıcı içermektedir. PCR'ın çoğalma fazı sırasında tam uyum sağlayan prob, Taq DNA polimerazın 5'→3' ekzonükleaz aktivitesi tarafından kesilmektedir. Böylece indikatör boya, baskılayıcısından ayrılarak floresan ışığa yapmaktadır. Tam uyum sağlamayan prob, Taq DNA polimeraz tarafından kesilmez ancak yeri değiştirilir. Böylece indikatör boya salınmaz. PCR sonunda floresan sinyali (VIC veya FAM) toplanır ve hedef dizilerin varlığı (doğal-tip allel, mutant allel veya her ikisi) saptanır.

3.2.5. İstatistiksel Değerlendirme

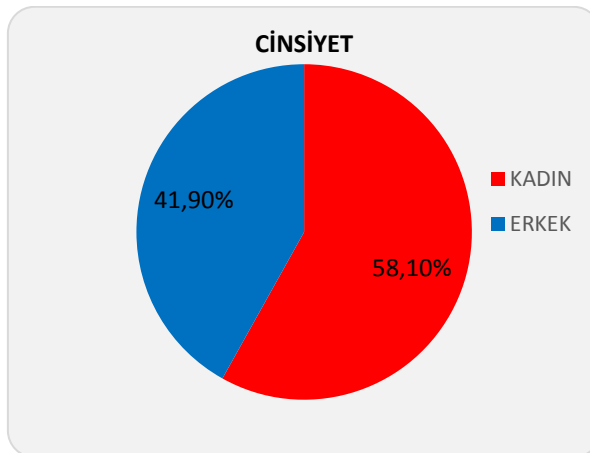
Hastaların bulgu ve sonuçları SPSS (Statistical Package For Science Studies) for windows 22.0 paket programı ile değerlendirilmiştir. Oranlar ki-kare testi ile karşılaştırılmış, sonuçlar mean (SD) olarak verilmiştir. Parametrik verilerin analizi "student t testi" ve tek yönlü varyans analizi, nonparametrik veriler Mann-Whitney testi ve Kruskal-Wallis testi ile analiz edilmiştir. Sonuçlar için p değeri <0,05 olanlar anlamlı kabul edilmiştir. Yaşam eğrileri Kaplan Meier analizi ile, gruplar arası karşılaştırma log rank testi ile yapılmıştır.

4. BULGULAR

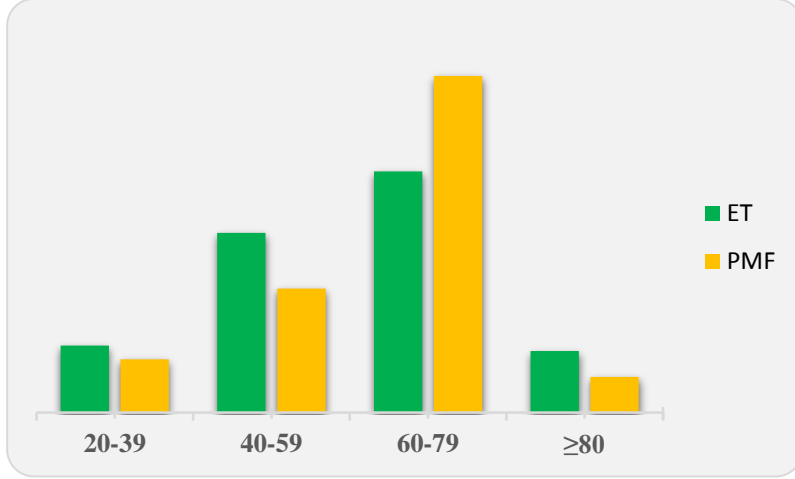
Çalışmada toplam 129 miyeloproliferatif neoplazi hastası incelendi. Bunların 98'i esansiyel trombositoz (%76) ve 31'i primer miyelofibrozis (%24)'den oluşuyordu (**Şekil 8**). Hastaların kemik iliği incelemesinin yapılması planlanan 26 tanesi hariç hepsi (103 hasta) 2016 WHO MPN kriterlerini karşılıyordu. Hastaların 75'i kadın (%58.1) ve 54'ü (%41.9) erkekti (**Şekil 9**). En küçüğü 21 ve en büyüğü 93 olmak üzere ortalama yaş 60.7 ± 15.5 idi. Hasta yaş aralıkları dağılımına bakıldığında 60 ile 80 arasında yoğunlaşmakta idi (**Şekil 10**).



Şekil 8. ET ve PMF Hastalarının Dağılımı

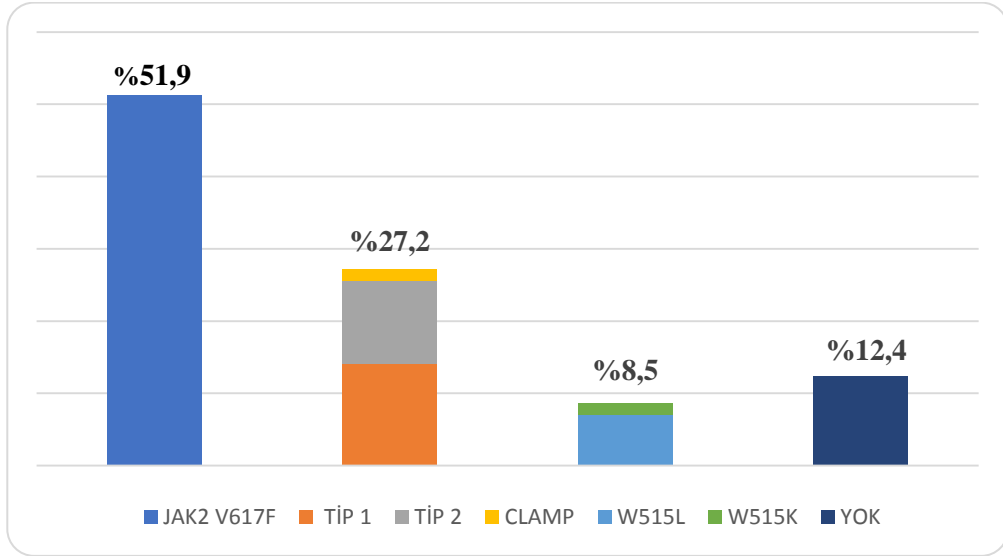


Şekil 9. ET ve PMF hastalarının cinsiyete göre dağılımı

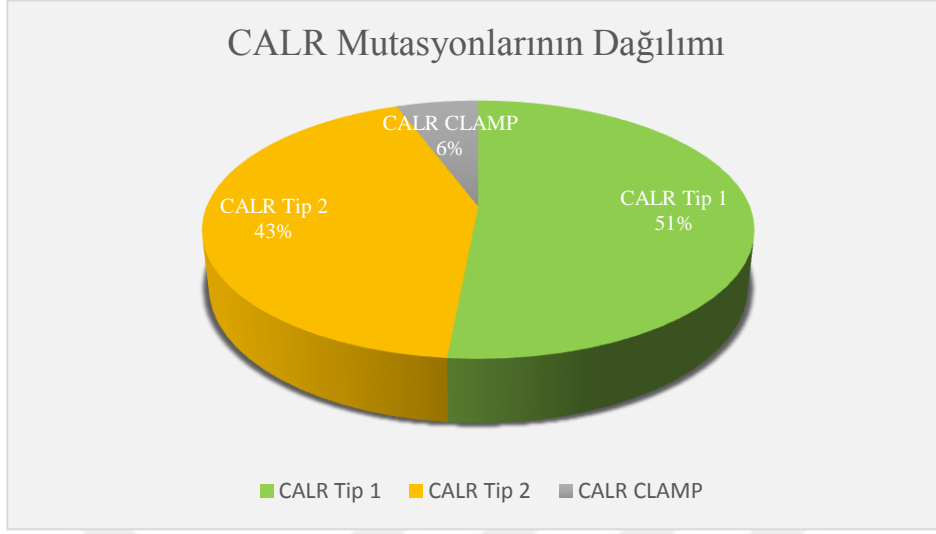


Şekil 10. ET ve PMF hastalarının yaş aralıklarına göre dağılımı

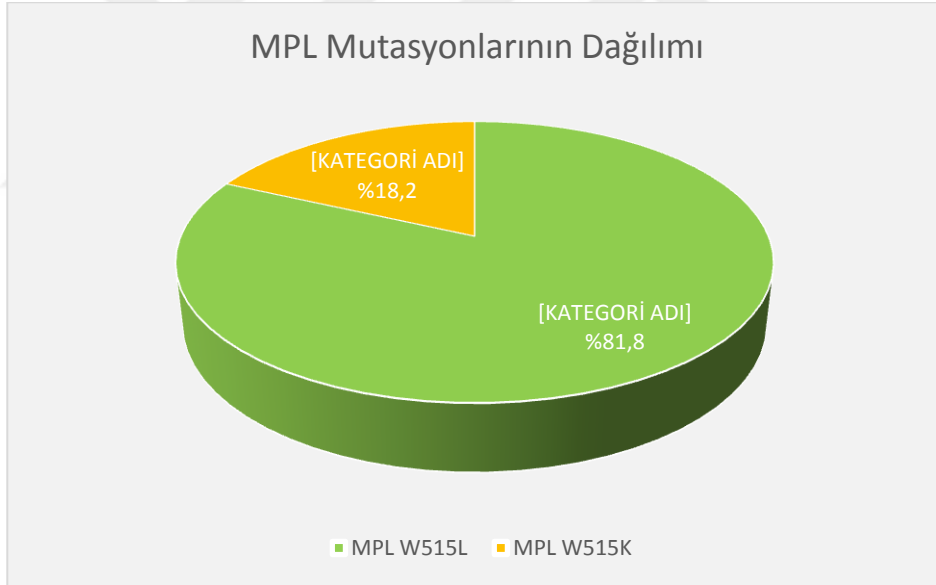
Hastaların mutasyon analizinde, toplam 129 hastanın 113'ünde (%87.5) mutasyon tespit edildi. Bu mutasyonların 67'si (%51.9) JAK2 V617F, 35'i (%27.2) CALR ve 11'i (%8.5) MPL idi (**Şekil 11**). JAK2 ve MPL mutasyonu olmayan hastaların %68.7'sinde CALR mutasyonu vardı. Bu hastaların 18'i (%51.5) CALR tip 1, 15'i (%42.8) CALR tip 2 ve 2'si (%5.7) CLAMP mutasyonu idi (**Şekil 12**). MPL mutasyonlarının ise 9'u (%81.8) W515L ve 2'si (%18.2) W515K şeklindeydi (**Şekil 13**).



Şekil 11. Hasta Populasyonundaki Mutasyonların Dağılımı



Şekil 12. Hasta Populasyonundaki CALR Mutasyonlarının Dağılımı



Şekil 13. Hasta Populasyonundaki MPL Mutasyonlarının Dağılımı

JAK2 V617F, CALR ve MPL mutasyonları hastalık bazında incelendi.

4.1. ET Grubu Hastalar

ET grubunda 60'ı kadın (%61.2), 38'i erkek (%38.8) olmak üzere toplam 98 hasta bulunmaktaydı. Hastaların en küçüğü 21 en büyüğü 93 olmak üzere yaş ortalaması 60.2 ± 15.6 olarak saptandı. Hastaların 72'sine kemik iliği patolojik inceleme yapılmıştı.

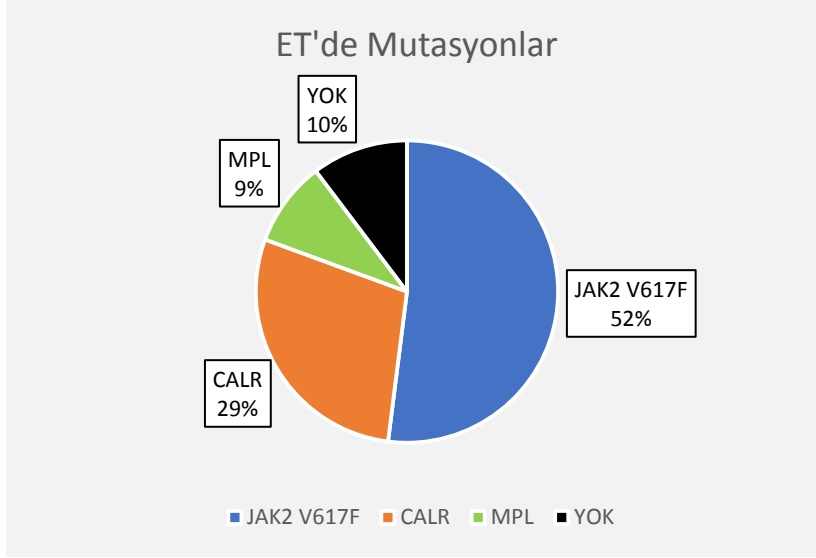
54'ünün kemik iliği patolojik incelemesi ET ile 18'i ise post-ET MF ile uyumluydu. 26 hastaya ise kemik iliği aspirasyonu uygulanması planlandı.

Hastaların başvuru sırasındaki ortalama lökosit sayısı hafif yüksek, [11.45/mm³ (\pm 7.1)], hb düzeyi normal [12.7g/dl (\pm 2.0)], platelet düzeyi yüksek [942.7/mm³ (\pm 414.4)], LDH değeri ise normal [344.49 U/L (\pm 143.439)] idi. 27 hastada (%27.6) splenomegali vardı. 46 hastada lökositoz saptandı [en küçüğü 10.200 ve en büyüğü 56.000 olmak üzere ortalama 15.711 (\pm 8.510)]. LDH düzeyi 82 hastada (%83.7) üst sınır olan 509U/L'nin altındaydı. Hb değeri 14 hastada anemiyi (hb 10g/dl'nin altında) yansıtıyordu. Platelet değerleri 36 hastada 1.000.000/mm³ üzerindeydi (**Tablo 16**).

Tablo 16. ET Hastalarındaki Klinik ve Hematolojik Veriler

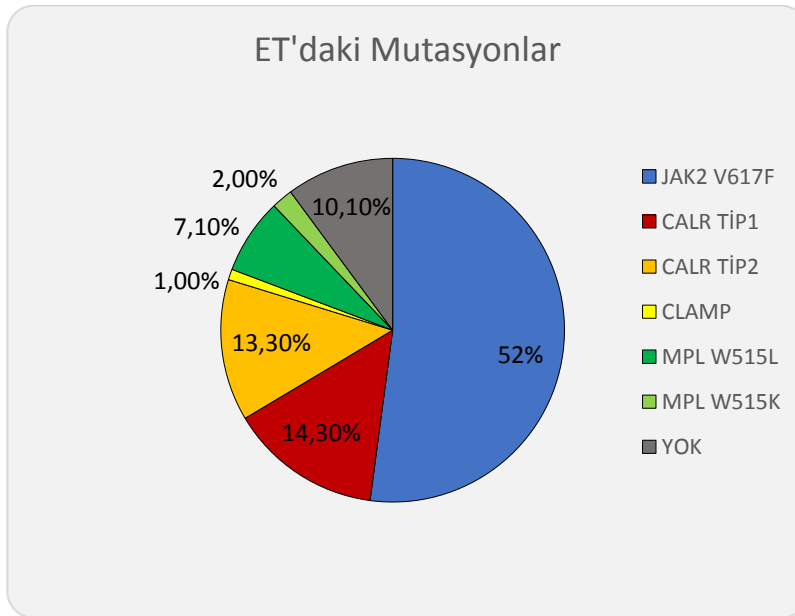
	ET
Hasta Sayısı	98
Ortalama Yaş	60.22 (\pm 15.6)
Cinsiyet K/E (%)	60 (%61.2) / 38 (%38.8)
Lökosit (mm ³)	11.45 (\pm 7.17)
Hemoglobin (g/dl)	12.7 (\pm 2.0)
Trombosit (mm ³)	942.7 (\pm 414.4)
LDH (U/L)	344.49 (\pm 143.439)
Splenomegali varlığı (%)	27 (%27.6)

Moleküler genetik belirteçlerin dağılımını göstermek üzere yapılan mutasyon analizinde, toplam 98 ET hastasının %89,8'inde mutasyon (JAK2 V617F, CALR ve MPL) gözlemlendi. 51'inde (%52) JAK2 V617F mutasyonu, 28'inde (%28.6) CALR mutasyonu, 9'unda (%9.1) MPL mutasyonu vardı (**Şekil 14**).



Şekil 14. ET Hastalarında Mutasyonların Dağılımı

JAK2 ve MPL mutasyonu olmayan 38 hastanın 28'inde (%73.6) CALR mutasyonu vardı. Tüm 28 CALR pozitif ET'un 14'ü (%50) tip 1, 13'ü (%46.4) tip 2 ve 1'i (%3.6) CLAMP mutasyonu şeklindeydi. MPL mutasyonlarının ise 7'si (%77.7) W515L ve 2'si (%22.3) W515K şeklindeydi. 10 hastada (%10.2) ise üç mutasyonda saptanmamıştı (**Şekil 15**). Kantitatif JAK2 çalışmasında ise, JAK2 kuantifikasyonu %72 (37) hastada %50'nin altında idi.



Şekil 15. ET Hastalarındaki Mutasyonların Alt Gruplarının Dağılımı

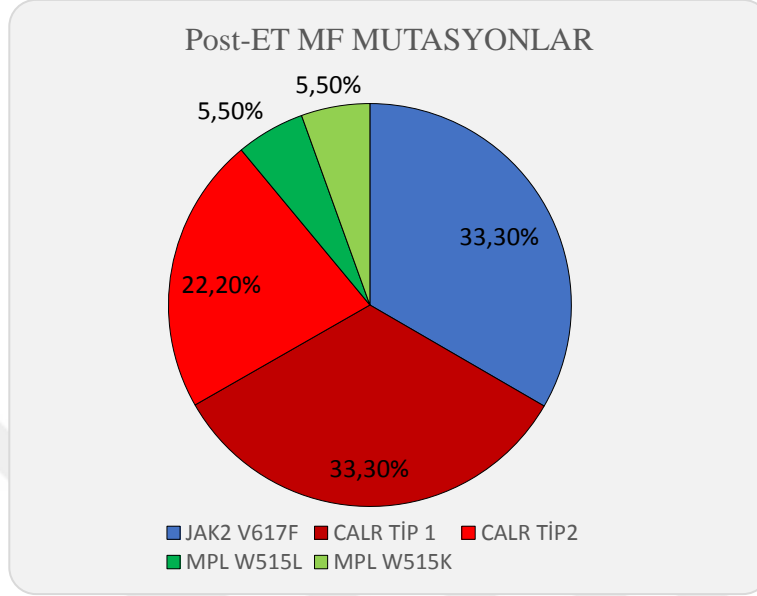
ET hastalarının takipleri sırasında, 18'inin (%18.3) miyelofibroze (post-ET MF) dönüştüğü gözlemlendi. 6 hastada koroner arter hastalığı, 3 hastada portal venöz tromboz, 2 hastada derin ven trombozu, bir hastada serebrovasküler olay gelişmişti ve üç hasta *excitus* olmuştu. Hastaların hiçbirinde lösemiye dönüşüm olmamıştı.

ET'nin alt grubu olan post-ET MF hastalarının yaşı ortalama 66.17 (± 10.8) idi. Lökosit değerleri yüksek [14.978 (± 14.83)], ortalama hb değerleri normale yakın [10.9 (± 1.7)], plt değerleri yüksek [872.94 (± 453.1)], LDH düzeyi ise 473.61 (± 125.78) olup yüksek olma eğiliminde idi. Hastaların yarısında splenomegali vardı. Bu hastaların Kİ ET ile uyumlu hastalara göre yaş ortalaması, lökosit ve LDH düzeyleri daha yüksek, Hb değerleri ise anlamlı olarak daha düşüktü (**Tablo 17**).

Tablo 17. Kemik İliği ET ve Post-ET MF İle Uyumlu Hastaların Klinik ve Hematolojik Yönden Karşılaştırılması

ET	Kİ ET İle Uyumlu (A)	Kİ Post-ET MF İle Uyumlu (B)	p değeri (A-B)
Hasta Sayısı	54	18	
Ortalama Yaş	57.93 (± 15.23)	66.17 (± 10.87)	*0.038
Kadın (%)	18 (%75)	6 (%75)	0.607
Lökosit (mm ³)	10.08 (± 2.91)	14.97 (± 14.83)	*0.023
Hb (g/dl)	13.03 (± 1.74)	10.92 (± 1.79)	*0.000
Plt (mm ³)	986.50 (± 486.13)	872.9 (± 453.1)	0.330
LDH (U/L)	309.13 (± 120.8)	473.6 (± 125.7)	*0.000
SM varlığı	7 (%25)	20 (%28.6)	0.806
Komplikasyonlar			
-tromboz	4 (%7.4)	1 (%5.6)	0.553
-kardiovasküler olay	1 (%1.9)	3 (%16.7)	*0.046
-lösemi	0	0	-
<i>Excitus</i>	1	2 (%11.1)	0.152

Hastaların tamamında üç mutasyondan biri mevcuttu. 6 hastada JAK2 V617F (%33.3), 10 hastada CALR (%55.5) (6'sı tip 1, 4'ü tip 2), 2 hastada ise MPL (%11) (1'i W515L, 1'i W515K) vardı (Şekil 16).



Şekil 16. Post-ET MF'de Mutasyonların Dağılımı

Kemik iliği patolojik incelemesi ET ile uyumlu hastalarla kıyaslandığında, CALR mutasyonu görülme oranı post-ET MF'de daha yüksekti ($p=0.019$). Bu hastaların birinde derin ven trombozu, üç hastada koroner arter hastalığı mevcuttu. Kardiovasküler olay bu hastalarda anlamlı şekilde daha fazla idi ($p=0.046$). Lösemiye dönüşüm olmamıştı. İki hasta *excitus* olmuştu.

Yine 98 ET'un 26'sında kemik iliği morfolojik incelemesi yapılmamıştı ancak WHO 2016 ET kriterlerinin kalanını karşılıyorlardı. Bu hastalar MPN tanı algoritmine bağlı olarak ET ön tanısıyla öncelikli olarak mutasyon analizi için yönlendirilmişlerdi. Bu grup hastaların 16'sında JAK2 V617F, 6'sında CALR ve 4'ünde MPL olmak üzere tamamında mutasyon vardı.

4.2. PMF Grubu Hastalar

PMF grubunda 15'i kadın (%48.4), 16'sı erkek (%51.6) olmak üzere toplam 31 hasta bulunmaktaydı. Hastaların en küçüğü 31 en büyüğü 89 olmak üzere yaş ortalaması

62.45 (± 15.2) olarak saptanmıştı. Hastaların başvuru sırasındaki ortalama lökosit sayısı yüksek [$12.41/\text{mm}^3$ (± 11.5)], hb düzeyi düşük [9.8g/dl (± 2.4)], platelet değeri normal sınırlarda [$237.4/\text{mm}^3$ (± 222.2)] idi. LDH değeri ise üst sınıra yakın [495.58U/L (± 270.284)] idi. Bir hasta dışında hastaların tümünde (%96.8) splenomegali vardı (**Tablo 18**).

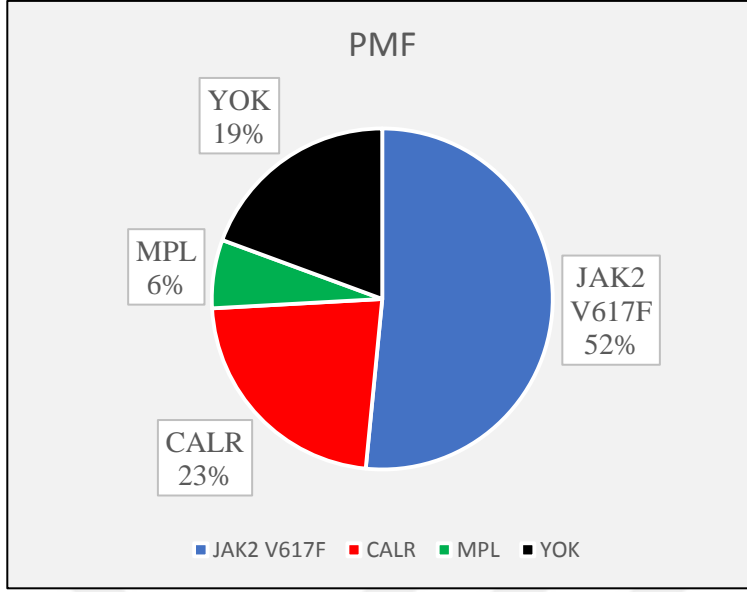
Tablo 18. PMF Hastalarındaki Klinik ve Hematolojik Veriler

	PMF
Hasta Sayısı	31
Ortalama Yaş	62.45 (± 15.22)
Kadın (%)	15 (%48.4)
Lökosit (mm^3)	12.41 (± 11.5)
Hemoglobin (g/dl)	9.8 (± 2.4)
Trombosit (mm^3)	237.4 (± 222.2)
LDH (U/L)	495.58 (± 270.284)
Splenomegali varlığı (%)	30 (%96.8)

Dalak boyutu 24 hastada 160mm (%77.4) üzerinde olup masif splenomegali vardı. PMF’de LDH düzeyi 16 hastada (%51.6) üst sınır olan 509 U/L’nin üzerindeydi. 16 hastada anemi olup hb değeri 10g/dl’nin altındaydı.

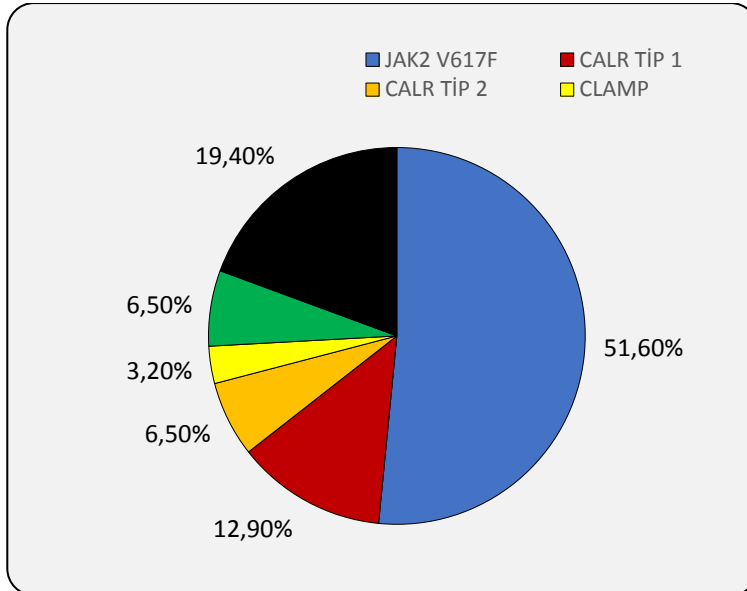
Hastaların kemik iliği patolojik incelemesinde 26 hasta açık PMF ve 5 hasta pre PMF ile uyumluydu.

Toplam 31 PMF hastasının 25’inde (%80,6) mutasyon vardı. 16’sında (%51.6) JAK2 V617F mutasyonu, 7’sinde (%22.6) CALR mutasyonu, 2’sinde (%6.5) MPL mutasyonu vardı. 6 hastada (%19.4) ise üç mutasyonda saptanmamıştı (**Şekil 17**).



Şekil 17. PMF Hastalarındaki Mutasyonların Dağılımı

JAK2 ve MPL olmayanların %53.8'inde CALR mutasyonu vardı. CALR mutasyonlarının ise 4'ü (%57.2) tip 1, 2'si (%28.5) tip 2 ve 1'i (%14.3) CLAMP mutasyonu şeklinde dağılım gösteriyordu. MPL mutasyonlarının ise 2'side W515L idi (**Şekil 18**). Kantitatif JAK2 çalışmasında ise, JAK2 kuantifikasyonu 27 (%87.1) hastada %50'nin üstünde idi.



Şekil 18. PMF Hastalarındaki Mutasyonların Alt Gruplarının Dağılımı

PMF hastalarından 2'sinde portal venöz tromboz, 3'ünde serebrovasküler hadise, 6'sında koroner arter hastalığı, birinde hem CVH ve akut lösemi, birinde akut lösemi gelişmişti ve bir hasta *excitus* olmuştu.

4.3. ET ve PMF Grubu Hastaların Karşılaştırılması

ET ve PMF hastaları karşılaştırıldığında ortalama yaş, cinsiyet ve lökosit değerleri açısından anlamlı farklılık saptanmadı ($p>0.05$). Ortalama hb değeri PMF'de anlamlı olarak düşük ($p=0.000$), platelet değerleri ise ET'da anlamlı olarak yüksekti ($p=0.000$). LDH yüksekliği PMF için anlamlı idi ($p=0.000$). PMF'de splenomegali görülme oranı ET'dan anlamlı derecede yüksek saptandı. Ayrıca splenomegali gruplarına bakıldığında PMF olgularında masif splenomegali oranı anlamlı derecede yüksekti ($p=0.000$). Lösemiye dönüşüm ET'da görülmez iken PMF'de iki hastada vardı. Diğer komplikasyonlar ve *excitus* açısından anlamlı farklılık yoktu (**Tablo 19**).

Tablo 19. ET ve PMF Hastalarının Klinik ve Laboratuvar Bulguları

	ET	PMF	Toplam	p değeri
Hasta Sayısı	98	31	129	-
Ortalama Yaş	60.22 (± 15.6)	62.45 (± 15.22)	60.7 (± 15.5)	0.488
Kadın (%)	60 (%61.2)	15 (%48.4)	75 (%58.1)	0.292
Ortalama Lökosit (mm^3)	11.45 (± 7.17)	12.41 (± 11.5)	11.682 (± 8.4)	0.485
Ortalama Hemoglobin (g/dl)	12.7 (± 2.0)	9.8 (± 2.4)	12,046 ($\pm 2,4$)	*0.000
Ortalama Trombosit (mm^3)	942.7 (± 414.4)	237.4 (± 222.2)	771.65 (± 484.5)	*0.000
LDH (U/L)	344.49 (± 143.439)	495.58 (± 270.284)	380.8 (± 192.1)	*0.009
LDH 509U/L üstü (%)	16 (%16.3)	16 (%51.6)	32 (%24.8)	*0.000
Splenomegali varlığı (%)	27 (%27.6)	30 (%96.8)	57 (%44.2)	*0.000
Masif SM (160mm üstü)	10 (%10.2)	24 (%77.4)	34 (%26.4)	*0.000
Hemoglobin 10g/dl altı	14 (%14.3)	16 (%51.6)	30 (%23.3)	*0.000
Lökosit 10.000/ mm^3 üstü	46 (%46.9)	13 (%41.9)	59 (%45.7)	0.626
Komplikasyonlar				-
-tromboz	6 (%6.1)	6 (%19.4)	12 (%9.3)	
-kardiovasküler olay	6 (%6.1)	2 (%6.4)	8 (%6.2)	
-miyelofibrozis	18 (%18.4)	-	-	
-lösemi	0	2 (%6.4)	2 (%6.4)	
<i>Excitus</i>	3 (%3)	1 (%3.2)	4 (%3.1)	-

ET ve PMF hastalarında mutasyonların dağılımı karşılaştırıldığında, JAK2 V617F, CALR ve MPL mutasyonlarının görülme sıklığı benzerdi (**Tablo 20**). Kantitatif JAK2 allel yükünün oranı ise ET'da %50'nin altında, PMF'de ise %50'nin üstünde olmak üzere anlamlı farklılık gösteriyordu (p=0.006).

Tablo 20. ET ve PMF de Mutasyonların Dağılımı

	ET	PMF	TOPLAM	p değeri
JAK2 V617F Mutasyonu (%)	51 (%52)	16 (%51.6)	67 (%51.2)	0.882
JAK2 Allel Yüğü Ortalama	38.93 (±23.7)	61.39 (±23.79)	44.29 (±25.44)	
JAK2 Allel Yüğü				*0.006
-%50'nin altı (%)	37 (%72.5)	4 (%25)	41 (%61.2)	
-%50'nin altı ortalama	26.27 (±12.51)	38.41 (±9.39)	74.61 (±14.79)	
-%50'nin üstü (%)	14 (%27.5)	12 (%75)	26 (%38.8)	
-%50'nin üstü ortalama	69.31 (±14.65)	75.18 (±18.19)	29.47 (%13.51)	
MPL Mutasyonu	9 (%9.2)	2 (%6.5)	11 (%8.5)	0.916
-W515L	7	2	9	
-W515K	2	0	2	
CALR Mutasyonu	28 (%28.6)	7 (%22.6)	35 (%27.2)	0.580
-Tip 1	14	4	18	
-Tip 2	13	2	15	
-CLAMP	1	1	2	
Mutasyon Yok	10 (%10.2)	6 (%19.4)	16 (%12.4)	0.683

4.4. ET'da Mutasyonlar

ET'da CALR mutasyonu olanlar olmayanlar ile (**Tablo 21**) ve JAK2 V617F, MPL ve üç mutasyonu da taşımayan grup ile klinik ve hematolojik veriler açısından ayrı ayrı karşılaştırıldı (**Tablo 22**).

ET'da CALR mutasyonu olan ve olmayan grup karşılaştırıldığında yaş ve cinsiyet açısından anlamlı farklılık gözlenmedi. Hematolojik verilere bakıldığı zaman ortalama lökosit değerleri CALR mutasyonu olan hastalarda olmayanlardan anlamlı şekilde düşüktü (p=0.019). Her iki grubun ortalama hb değerleri normal, plt değerleri yüksek ve LDH değerleri normal olup anlamlı farklılık yoktu. Splenomegali varlığı da benzer oranlardaydı (p>0.05).

Tromboz, koroner arter hastalığı, lösemiye dönüşüm ve *excitus* açısından her iki grup arasında anlamlı farklılık gözlenmemiştir ($p>0.05$). Ancak ET hastalarında toplamda görülen 3 *excitus* CALR mutasyonu olmayan gruptaydı. Post-ET MF dönüşümü CALR mutasyonu olan hastalarda olmayanlardan anlamlı şekilde yüksekti ($p=0.007$).

Tablo 21. ET’da CALR Mutasyonu Olan ve Olmayan Grubun Karşılaştırılması

ET	CALR Mutasyonu Var (A)	CALR Mutasyonu Yok (B)	p değeri (A-B)
Hasta Sayısı	28	70	
Ortalama Yaş	58.82 (± 12.58)	60.79 (± 16.75)	*0.038
Kadın/Erkek (%)	18/10 (%64.3 / %35.7)	42/28 (%60 / %40)	0.694
Lökosit (mm^3)	8.78 (± 3.43)	12.517 (± 7.98)	*0.019
Hb (g/dl)	12.34 (± 2.19)	12.88 (± 1.93)	0.237
Plt (mm^3)	980.36 (± 412.19)	927.74 (± 417.4)	0.572
LDH (U/L)	374.1 (± 132.15)	332.63 (± 146.8)	0.197
SM varlığı	7 (%25)	20 (%28.6)	0.806
Lökosit $10.000/\text{mm}^3$ Üstü	8 (%28.6)	38 (%54.3)	*0.019
Hb 10g/dl altı	6 (%21.4)	8 (%11.4)	0.408
Plt $1000/\text{mm}^3$ üstü	1 (%39.2)	23 (%32.9)	0.561
LDH U/L Üstü	7 (%25)	9 (%12.9)	0.144
Komplikasyonlar			
-tromboz	2 (%7.1)	4 (%5.7)	0.553
-kardiovasküler olay	2 (%7.1)	4 (%5.7)	0.553
-lösemi	0	0	-
-post-ET MF	10 (%35.7)	8 (%11.4)	*0.007
<i>Excitus</i>	0	3 (%4.3)	0.360

ET’da CALR mutasyonu olan ile JAK2 V617F, CALR ve MPL mutasyonu olan hastalar ayrı ayrı karşılaştırıldığında (**Tablo 22**);

ET’da CALR ile JAK2 V617F mutasyonu olan hastalar karşılaştırıldığında, JAK2 V617F mutasyonu olan 51 ve CALR mutasyonu olan 25 hasta vardı. Ortalama yaş ve cinsiyet her iki grupta da benzerdi. Lökosit değerleri CALR mutasyonu pozitif ET hastalarında %71.4’ünde $10.000/mm^3$ altında olmak üzere anlamlı şekilde düşüktü ($p=0.014$). Hb, Plt, LDH değerleri ve splenomegali varlığı açısından iki grup arasında anlamlı fark yoktu ($p>0.05$).

Tromboz, koroner arter hastalığı, lösemiye dönüşüm ve ölüm açısından her iki grup arasında anlamlı farklılık gözlenmemiştir ($p>0.05$).

ET’da CALR ve MPL mutasyonu olan hastalar değerlendirildiğinde, CALR mutasyonu olanların yaş ortalaması MPL mutasyonu olanlara göre daha düşüktü ($p=0.05$). Cinsiyet, lökosit, Hb, Plt, LDH düzeyleri ve splenomegali varlığı açısından anlamlı fark yoktu.

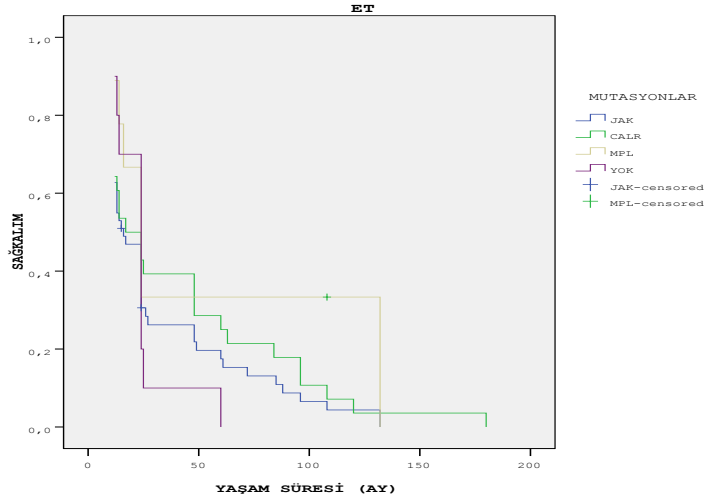
MPL mutasyonu olan ET’da tromboz, koroner arter hastalığı, lösemiye dönüşüm ve ölüm gözlenmemiştir.

ET’da CALR ve her üç mutasyonu taşımayan grup karşılaştırıldığında, ortalama yaş mutasyon olmayan grupta anlamlı derecede düşüktü ($p=0.004$) ve kadın cinsiyet ön plandaydı ($p=0.009$). Lökosit değeri CALR mutasyonu olanlarda daha düşüktü ($p=0.045$). CALR mutasyonu olan hastaların hiçbirinde lökositoz yoktu.

Hemoglobin, platelet, LDH değerleri ve splenomegali varlığı açısından anlamlı fark yoktu.

Tromboz, koroner arter hastalığı, lösemiye dönüşüm ve ölüm açısından da anlamlı fark gözlenmemiştir.

Kesit olarak kısa bir dönemdeki hasta grubu ile çalışma yapılmış olmasına rağmen bu haliyle baktığımız ET hastalarında mutasyonlar arasındaki ortalama sağkalım JAK2 V617F’de ortalama 33.1 (± 4.7) ay, CALR’de 42.9 (± 8.2) ay, MPL’de 55.6 (± 19) ay ve her üç mutasyonu taşımayan grupta 24.4 (± 4.2) ay olup, mutasyonlar arasında anlamlı fark yoktu ($p>0.05$) (**Şekil 19**).



Şekil 19: ET hastalarında JAK2 V671F, CALR, MPL mutasyonu olan ve her üç mutasyonu taşımayan hastaların ortalama sağkalımı ($p>0.05$)

Tablo 22. ET’da Mutasyonlar Arasında Klinik ve Hematolojik Verilerin Karşılaştırılması

ET	JAK2(A)	CALR(B)	MPL(C)	Mutasyon Yok (D)	p (A-B)	p (B-C)	p (B-D)
Hasta Sayısı	51	28	9	10			
Ortalama Yaş	62.67 (± 15.48)	58.82 (± 12.58)	68.89 (± 14.17)	43.90 (± 15.39)	0.264	*0.050	*0.004
Kadın (%)	28 (%54.9)	18 (%64.3)	5 (%55.6)	9 (%90)	0.480	0.643	*0.009
Lökosit (mm^3)	13.27 (± 9.06)	8.78 (± 3.43)	9.86 (± 3.74)	11.06 (± 2.66)	*0.014	0.426	*0.045
Hb (g/dl)	13.19 (± 1.73)	12.34 (± 2.19)	12.46 (± 2.29)	11.66 (± 2.22)	0.063	0.888	0.402
Plt (mm^3)	900.49 (± 398.31)	980.36 (± 412.19)	851.00 (± 366.01)	1135.80 (± 526.47)	0.402	0.407	0.348
LDH (IU/L)	337.10 (± 139.69)	374.14 (± 132.15)	330.22 (± 95.95)	312.0 (± 219.48)	0.254	0.365	0.295
SM varlığı	17 (%33.3)	7 (%25)	2 (%22.2)	1 (%10)	0.610	0.868	0.324
LDH 509U/L Üstü	7 (%17.7)	7 (%25)	0	2(%20)	0.214	0.100	0.7539
Komplikasyonlar							
-tromboz	3 (%5.9)	2 (%7.1)	0	1 (%10)			
-kardiovasküler	2 (%3.9)	2 (%7.1)	1 (%11.1)	1 (%10)			
-lösemi	0	0	0	0			
-miyelofibrozis	6 (%11.8)	10 (%35.7)	2 (%22.2)	0			

Excitus	2 (%3.9)	0	1 (%11.1)	0			
---------	----------	---	-----------	---	--	--	--

ET’da CALR tip 1 ve tip 2 mutasyonları kendi arasında ve JAK2 V617F mutasyonu ile karşılaştırıldığında lökositöz JAK2 V617F mutasyonu olan hastalarda anlamlı olarak daha fazlaydı. Diğer klinik ve hematolojik verilerde anlamlı farklılık saptanmadı (**Tablo 23**).

Tablo 23. ET’da CALR tip 1 ve tip 2 ve JAK2 V617F mutasyonunun Karşılaştırılması

ET	CALR Tip 1(A)	CALR Tip 2 (B)	JAK2 V617F (C)	p değeri A-B	p değeri A-C	p değeri B-C
Hasta Sayısı	14	13	51		-	-
Ortalama Yaş	60.29 (±8.62)	58.31 (±16.03)	62.67 (±15.48)	0.985	0.950	0.776
Kadın (%)	8 (%57.1)	9 (%69.2)	28 (%54.9)	0.524	0.882	0.354
Lökosit (mm ³)	9.300 (±3.92)	8.346 (±3.01)	13.27 (±9.06)	0.986	0.280	0.140
Hb (g/dl)	12.214 (±2.39)	12.469 (±2.13)	13.19 (±1.73)	0.987	0.355	0.636
Plt (mm ³)	1079.21 (±523.155)	873.38 (±248.96)	900.49 (±398.31)	0.581	0.494	0.997
LDH (U/L)	386.50 (±128.98)	376.23 (±133.67)	337.10 (±139.69)	0.587	0.483	0.149
SM varlığı	2 (%14.3)	5 (%38.5)	17 (%33.3)	0.160	0.168	0.730
Lökosit10.000/mm ³ Üstü	5 (%35.7)	3 (%23.1)	28 (%54.9)	0.481	0.207	0.042
Hb 10g/dl altı	3 (%21.4)	3 (%23.1)	3 (%5.9)	0.952	0.222	0.204
Plt 1.000/mm ³ üstü	6 (%42.8)	5 (%38.5)	14 (%27.4)	0.524	0.231	0.617
LDH 509U/L üstü	3 (%21.4)	4 (%30.8)	7 (%13.7)	0.587	0.483	0.149
Komplikasyonlar						-
-tromboz	1 (%7.1)	1 (%7.1)	3 (%5.9)	-	-	-
-kardiovasküler	0	2 (%15.4)	2 (%3.9)			
-lösemi	0	0	0			
-MF	6 (%42.9)	4 (%30.8)	6 (%11.8)			
Ölüm	0	0	2 (%3.9)		-	-

4.5. PMF’de Mutasyonlar

PMF’de CALR mutasyonu olanlar olmayanlar ile (Tablo 24) ve JAK2 V617F, MPL ve üç mutasyonu da taşımayan grup ile klinik ve hematolojik veriler açısından karşılaştırıldı (Tablo 25).

PMF’da CALR mutasyonu olan ve olmayan grup karşılaştırıldığında yaş ve cinsiyet açısından anlamlı farklılık gözlenmedi. Hematolojik verilere bakıldığı zaman CALR mutasyonu olan hastaların ortalama lökosit değerleri, platelet ve LDH seviyesi CALR mutasyonu olmayan PMF’e göre düşük olma eğiliminde olmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlı değildi. Her iki grubunda ortalama hb değerleri düşüktü.

Tromboz, koroner arter hastalığı, lösemiye dönüşüm ve ölüm açısından bakıldığında CALR mutasyonu olan PMF’de hiçbir komplikasyon gözlenmemişti. CALR mutasyonu olmayan 2 hastada lösemiye dönüşüm dikkat çekiciydi. Ancak sayı yeterli olmadığı için istatistiksel anlamlılık tam olarak değerlendirilemedi. CALR mutasyonu olan bir hasta *excitus* olmuştu. CALR mutasyonu olmayan hastalarda *excitus* yoktu.

Tablo 24. PMF’de CALR Mutasyonu Olan ve Olmayan Grubun Karşılaştırılması

PMF	CALR Mutasyonu Var (A)	CALR Mutasyonu Yok (B)	p değeri (A-B)
Hasta Sayısı	7	24	
Ortalama Yaş	56.00 (±16.45)	64.33 (±14.67)	0.208
Kadın (%)	3 (%42.9)	12 (%50)	0.539
Lökosit (mm ³)	5.914 (±2.94)	14.312 (±12.39)	0.089
Hb (g/dl)	9.85 (±1.75)	9.89 (±2.60)	0.971
Plt (mm ³)	313.86 (±194.75)	215.17 (±228.55)	0.309
LDH (U/L)	547.29 (±313.91)	480.50 (±261.78)	0.574
SM varlığı	7 (%100)	23 (%95.8)	0.774
Lökosit 10.000/mm ³ Üstü	0	12 (%50)	*0.034
Hb 10g/dl altı	4 (%57.1)	12 (%50)	0.749
LDH 509 U/L Üstü	4 (%57.1)	12 (%50)	0,749

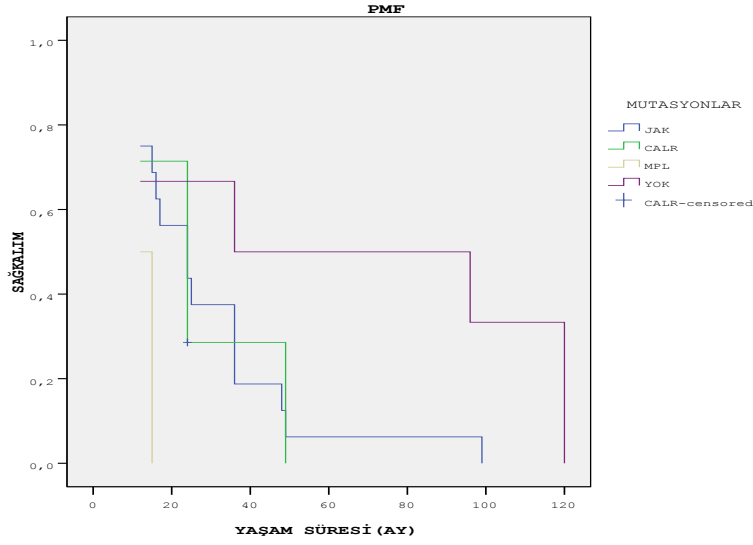
Komplikasyonlar			-
-tromboz	0	6 (%25)	
-kardiovasküler	0	2 (%8.3)	
-lösemi	0	2 (%8.3)	
Excitus	1(%14.3)	0	-

PMF’de CALR ile JAK2 V617F mutasyonu değerlendirildiğinde ortalama yaş ve cinsiyet açısından anlamlı fark gözlenmedi. Lökosit değeri ise CALR mutasyonu olanlarda anlamlı ölçüde düşük tespit edildi (p=0.010). Her iki grup arasında splenomegali açısından fark gözlenmedi. Ancak CALR mutasyonu olan hastaların hepsinde masif splenomegali vardı (p=0.000). JAK2 V617F mutasyonu olan hastalarda trombotik olay 6 hastada gözlenirken, lösemiye dönüşüm CALR pozitif hastada gözlenmişti.

CALR ile MPL mutasyonu karşılaştırması MPL mutasyonu olan sadece iki hasta olduğu için yapılmadı.

CALR ile her üç mutasyonda olmayan hastalar karşılaştırıldığında ortalama yaş ve cinsiyet açısından anlamlı fark yoktu. Her iki grubunda lökosit ortalaması normal sınırlarda ve hafif anemiklerdi. Platelet değerleri ise CALR mutasyonu olan hastalarda anlamlı şekilde yüksekti (p=0.042). LDH değerleri CALR mutasyonu olanlarda normalin üstünde iken mutasyonu olmayan hastalarda normal sınırdıydı. Splenomegali her iki grupta hastaların tamamında vardı. Tromboz, koroner arter hastalığı, lösemiye dönüşüm ve ölüm açısından bakıldığında gruplar arasında fark yoktu.

Kesit olarak kısa bir dönemdeki hasta grubu ile çalışma yapılmış olmasına rağmen bu haliyle baktığımız PMF hastalarında mutasyonlar arasındaki ortalama sağkalım JAK2 V617F’de ortalama 35.7 (±4.3) ay, CALR’de 41.7 (±7.3) ay, MPL’de 50.4 (±16.3) ay ve her üç mutasyonu taşımayan grupta 42.2 (±10.0) ay olup, mutasyonlar arasında anlamlı fark yoktu (p>0.05) (**Şekil 20**).



Şekil 20. PMF hastalarında JAK2 V671F, CALR, MPL mutasyonu olan ve her üç mutasyonu taşımayan hastaların ortalama sağkalım ilişkisi ($p>0.05$)

Tablo 25. PMF’de Mutasyonlar Arasında Klinik ve Hematolojik Verilerin Karşılaştırılması

PMF	JAK2 (A)	CALR (B)	MPL (C)	Mutasyon Yok (D)	Pdeğeri (A-B)	Pdeğeri (B-D)
Hasta Sayısı	16	7	2	6		
Ortalama Yaş	67.06 (± 15.16)	56.0 (± 16.45)	65.5 (± 7.77)	56.67 (± 13.89)	0.131	0.939
Kadın (%)	8 (%50)	3 (%42.9)	2 (%100)	2(%33.3)	0.758	0.735
Lökosit (mm^3)	14.78 (± 11.48)	5.91 (± 2.64)	29.4 (± 26.16)	8.01 (± 5.92)	*0.010	0.424
Hb (g/dl)	10.23 (± 2.61)	9.85 (± 1.75)	6.85 (± 1.76)	10.0 (± 2.42)	0.730	0.904
Plt (mm^3)	253.56 (± 263.33)	313.86 (± 194.75)	202.50 (± 219.91)	117.0 (± 78.93)	0.594	*0.042
LDH (U/L)	478.94 (± 252.89)	547.29 (± 313.91)	903.50 (± 152.02)	343.67 (± 157.16)	0.585	0.179
SM varlığı	15 (%93.8)	7 (%100)	2 (%100)	6 (%100)	0.508	1
Masif Splenomegali	3 (%18.7)	7 (%100)	2 (%100)	6 (%100)	*0.000	1
LDH 509 U/L Üstü	9 (%56.2)	4 (%57.1)	2 (%100)	1(%16.7)	0.969	0.151
Komplikasyonlar						
-tromboz	5 (%31.2)	0	1 (%50)	0		
-kardiovasküler	0	0	0	0		
-lösemi	1 (%6.2)	0	1 (%50)	0		
Ölüm	0	1 (%14.3)	0	0		

4.6. ET'da JAK2 Allel Yüklerinin Karşılaştırılması

ET hastalarında JAK2 V617F mutasyonu kuantitatif değerlendirilmesinde,

JAK2 allel yükü %50'nin altı ile %50'nin üstü hastalar karşılaştırıldığında (Tablo 26) ortalama yaş ve cinsiyet açısından iki grup arasında anlamlı fark saptanmadı. Allel yükü %50'nin üzerinde olan hastalarda lökosit değerleri anlamlı olarak yüksekti ($p=0.000$). Her iki grubun Hb ortalaması normal, Plt değeri ise yüksekti. LDH değeri ise allel yükü %50'nin üzerinde olan grupta anlamlı şekilde yüksek idi ($p=0.002$). Splenomegali varlığı açısından gruplar arası anlamlı farklılık yoktu. Tromboz, koroner arter hastalığı, lösemiye dönüşüm açısından bakıldığında gruplar arasında fark yoktu. Miyelofibroze dönüşüm JAK2 allel yükü yüksek olan hastalarda anlamlı şekilde fazlaydı ($p=0.023$). Ölüm allel yükü yüksek olan hastalarda daha fazla gözlemlendi ancak sayı az olduğu için istatistikî anlamı belirlenemedi.

JAK2 allel yükü düşük olan grup ve JAK2 V617F mutasyonu olmayanlar arasında klinik ve hematolojik veriler açısından anlamlı fark yoktu. Sadece miyelofibroze dönüşüm oranı JAK2 mutasyonu olmayanlarda anlamlı şekilde yüksekti ($p=0.015$)

JAK2 allel yükü yüksek olan grup ve JAK2 V617F mutasyonu olmayanlar arasında ise lökosit değeri allel yükü %50'nin üzerinde olan hastalarda anlamlı şekilde yüksekti ($p=0.000$). Diğer klinik ve hematolojik veriler arasında anlamlı fark yoktu.

Tablo 26. ET Hastalarında JAK2 Allel Yüğü Yüksek ve Düşük Olanlarla JAK2 Mutasyonu olmayan Hastaların Karşılaştırılması

ET	JAK2 Allel Yüğü %50 Altı (A)	JAK2 Allel Yüğü %50 Üstü (B)	JAK2 Mutasyonu Yok (C)	A-B Pdeğeri	A-C P değeri	B-C P değeri
Hasta Sayısı	37	14	47			
Ortalama Yaş	60.73 (±16.87)	67.79 (±9.4)	57.57 (±15.52)	0.315	0.622	0.081
Kadın (%)	28 (%54.9)	18 (%64.3)	5 (%55.6)	0.286	0.287	0.122
Lökosit (mm ³)	11.01 (±4.7)	19.24 (±14.2)	9.41 (±3.42)	*0.000	0.527	*0.000
Hb (g/dl)	13.19 (±1.81)	13.2 (±1.54)	12.22 (±2.18)	1.000	0.071	0.241
Plt (mm ³)	864.54 (±367.3)	995.50 (±472.46)	988.66 (±430.9)	0.574	0.364	0.998
LDH (U/L)	296.5 (±113.6)	444.2 (±149.1)	352.5 (±148.5)	*0.002	0.154	0.075
SM varlığı	10 (%27)	7 (%50)	10 (%21.3)	0.107	0.127	0.501
Komplikasyonlar						
-tromboz	1 (%2.7)	2 (%14.3)	3 (%6.4)	0.304	0.327	0.541
-kardiovasküler	1 (%2.7)	1 (%7.1)	4 (%8.5)	0.537	0.501	0.277
-lösemi	0	0	0	-	-	-
-miyelofibrozis	2 (%5.4)	4 (%28.6)	12 (%25.5)	*0.023	*0.015	0.822
Excitus	0	2	1	-	-	-

4.7. PMF'de JAK2 Allel Yüğülerinin Karşılaştırılması

PMF hastalarında JAK2 V617F mutasyonu kuantitatif değerlendirmesinde, JAK2 allel yüğü %50'nin altı ile %50'nin üstü hastalar karşılaştırıldığında cinsiyet açısından iki grup arasında anlamlı fark saptanmadı. Ortalama yaş JAK2 allel yüğü yüksek olan hastalarda daha yüksekti (p=0.020). Lökosit değerleri allel yüğü yüksek olan hastalarda daha yüksekti. Her iki grupta hafif anemi vardı. Platelet değerleri normal sınırlardaydı. LDH değerlerinin ortalaması allel yüğü düşük olanlarda normal iken diğer grupta yüksekti. Splenomegali varlığı allel yüğü yüksek olanlarda anlamlı oranda fazlaydı (p=0.031). Tromboz komplikasyonu da yine allel yüğü yüksek olanlarda daha sık görüldü. Ancak sayının az oluşu nedeniyle istatistiki anlamlılığı belirlenemedi (**Tablo 27**).

JAK2 allel yükü düşük olan grup ve JAK2 V617F mutasyonu olmayanlar arasında klinik ve hematolojik veriler açısından anlamlı fark yoktu. Sadece splenomegali görülme oranı JAK2 V617F mutasyonu olmayanlarda daha yüksekti (p=0.031) (**Tablo 27**).

JAK2 allel yükü yüksek olan grup ve JAK2 V617F mutasyonu olmayanlar arasında ise lökosit değeri allel yükü yüksek olan hastalarda anlamlı şekilde yüksekti (p=0.000). Diğer klinik ve hematolojik veriler açısından anlamlı fark yoktu. Trombotik komplikasyonda alle yükü %50 üzerinde olan grupta daha sık gözlenmişti (**Tablo 27**).

Tablo 27. PMF Hastalarında JAK2 Allel Yükü Yüksek ve Düşük Olanlarla JAK2 Mutasyonu olmayan Hastaların Karşılaştırılması

PMF	JAK2 Allel Yükü %50 Altı (A)	JAK2 Allel Yükü %50 Üstü (B)	JAK2 Mutasyonu Yok (C)	A-B Pdeğeri	A-C P değeri	B-C P değeri
Hasta Sayısı	4	12	15			
Ortalama Yaş	56.50 (±21.74)	70.58 (±11.42)	57.57 (±15.52)	*0.020	0.622	0.081
Kadın (%)	28 (%54.9)	18 (%64.3)	5 (%55.6)	0.286	0.287	0.122
Lökosit (mm ³)	10.65 (±6.17)	16.16 (±12.69)	9.41 (±3.42)	0.214	0.527	*0.000
Hb (g/dl)	9.97 (±0.86)	10.32 (±3.01)	12.22 (±2.18)	0.091	0.071	0.241
Plt (mm ³)	270.75 (±345.9)	247.83 (±248.61)	88.66 (±430.9)	0.393	0.364	0.998
LDH (U/L)	304.75 (±188.30)	537.0 (±250.6)	352.5 (±148.5)	0.731	0.154	0.075
SM varlığı	3 (%75)	12 (%100)	15 (%100)	*0.031	*0.031	0.916
Komplikasyonlar						
-tromboz	1 (%25)	4 (%33.3)	1 (%6.7)			
-kardiovasküler	0	0	2 (%13.3)			
-lösemi	0	1 (%8.3)	1 (%6.7)			
Ölüm	0	0	1 (%6.7)			

4.8. ET ve PMF Hastalarında JAK2 Allel Yüklerinin Karşılaştırılması

ET ve PMF hastalarında JAK2 allel yükü %50 altında ve üstünde olmasına göre anlamlı farklılık gösterdi. ET hastalarının 37 si yani %72.5 hasta %50 nin altında allel yüküne sahipti. PMF de ise %75 hasta %50 nin üzerinde allel yüküne sahipti (p=0.001).

5. TARTIŞMA

Klasik BCR/ABL negatif miyeloproliferatif neoplaziler, polisitemia vera, esansiyel trombositoz ve primer miyelofibrozis'dir. MPN'lerin tanısı ve prognozunun tayininde moleküler genetik ve sitogenetik belirteçler son yıllarda artan bir önem kazanmıştır. 2005 yılında JAK2 V617F mutasyonunun keşfi, bu hastalıkların moleküler mekanizmasını anlamak için dönüm noktası olmuştur. JAK2 V617F mutasyonu PV hastalarının %95'den fazlasında tespit edilmiştir. Genetik olarak heterojen bir hastalık grubu olan ET ve PMF hastalarında ise JAK2 V617F mutasyon oranı %50-60 civarındadır.

2006 yılında JAK2 mutasyonu olmayan ET ve PMF hastalarında MPL mutasyonları bildirilmiştir. Bu oran ET'da %3-5 ve PMF'de %8-10'dur. 2013 yılında JAK2 ve MPL negatif PMF ve ET hastalarında CALR mutasyonları yüksek oranda gösterilmiş (%60-88) ve CALR, MPN'lerin tanısı, patogenezi ve yönetiminde önemli bir rol üstlenmiştir (107,114). Bu önem temelinde, 2016 yılında CALR mutasyonları, WHO'ya göre ET ve PMF'nin majör kriterleri arasında yerini almıştır (5).

CALR mutasyonlarının MPN hastalarında 2013 yılında keşfedilmesinin ardından mutasyonun sıklığı ve dağılımı ve hastalık tanısındaki gücü, klinik, hematolojik veriler ile ilişkisi, prognoza olan katkısı ve ilerleyen zamanlarda tedaviye katkıları ile ilgili literatürde pek çok çalışma yürütülmüştür. Ülkemizden bu konuda ulusal yada uluslararası bir yayın bulunmamaktadır. Ancak kısıtlı sayıda hastada uygulanmış iki tez çalışmasına rastlanmıştır (124,125). Çalışmamız bugün için Ülkemizden bu konuda yapılmış en kapsamlı çalışma olarak sunulmaktadır.

Literatürde MPN'lerde CALR mutasyonu için ilk çalışma 2013 yılında Klampfl ve arkadaşları tarafından yapılmıştır. Bu çalışmada 1215 ET ve PMF hastasının %63.4'ünde JAK2 V617F mutasyonu, %4.4'ünde MPL mutasyonu ve %23.5'inde CALR mutasyonu tespit edilmiştir. %8.8 hastada ise her üç mutasyonun da tespit edilemediği bildirilmiştir. İlginç olarak CALR mutasyonu, JAK2 ve MPL negatif olanların %72.7'sinde saptanmıştır. CALR mutasyonu olanların %53'ü tip 1, %31.7'si tip 2 ve %15.3'ü diğer mutasyonlar şeklindedir (107).

Çalışmamızda ise CALR mutasyonu, toplam 129 ET ve PMF hastasına literatürdeki bu ilk çalışmadan daha düşük oranda (%51.2) JAK2 V617F mutasyonu, daha yüksek (%8.5) MPL mutasyonu ve benzer oranda (%27.2) CALR mutasyonu saptandı. JAK2 ve MPL negatif olanların ise %68.7'sinde CALR mutasyonu olup Klampfl ve arkadaşlarının literatür verileri ile benzer orandaydı. CALR mutasyonlarının 18'i (%51.5) tip 1, 15'i (%42.8) tip 2 ve 2'si (%5.7) CLAMP mutasyonu şeklinde olup tip 1 ve tip 2 mutasyon oranları birbirine yakındı ve CLAMP mutasyonu daha düşük orandaydı.

Klampfl ve ark. (2013), 894 ET hastasının 581'inde (%65) JAK2 V617F mutasyonu, 186'sında (%20.8) CALR mutasyonu, 35'inde (%3.9) MPL mutasyonu tanımlamışlardı. 92'si (%10.3) üç mutasyonu da taşıyordu. JAK2 V617F ve MPL mutasyonu olmayan hastaların ise %67'sinde CALR mutasyonu vardı (107).

Al Assaf ve ark. (2015), Belçika'da 160 ET hastasında, yaklaşık %35.6 oranında JAK2 V617F mutasyonu, JAK2 V617F mutasyonu negatif hastaların %56'sında CALR, %12'sinde MPL mutasyonu tespit etmişlerdi. Hastaların %32'si üç mutasyonu da taşıyordu. JAK2 ve MPL negatif olanların ise %63.7'sinde CALR pozitif. CALR mutasyonlarının %60,3'ü tip 1 ve %32'si tip 2 mutasyonu şeklindeydi (127).

Andrikovics ve ark. (2014), ET'da %53 JAK2 V617F, %33 CALR, %3 MPL mutasyonu tespit etmişlerdi. %11 hasta her üç mutasyonu da taşıyordu. JAK2 ve MPL negatiflerin ise %76.2'sinde CALR mutasyonu vardı. CALR mutasyonlarının %50'si tip 1, %32'si tip 2 ve %18'i diğer mutasyonlardı (128).

Rotunno ve ark. (2014), 576 ET hastasında %64.1 JAK2 V617F mutasyonu, %4.3 MPL, %15.5 CALR mutasyonu tespit etmişlerdi. Hastaların %16.1'inde her üç mutasyonda bulunmuyordu. JAK2 ve MPL negatif hastaların ise %48.9'unda CALR mutasyonu göstermişlerdi. CALR mutasyonunun ise %60.7'si tip 1 ve %39.3'ü tip 2 mutasyonu şeklindeydi (129).

Uzakdoğu'dan yapılan çalışmalarda ET hastalarında yaklaşık %50-60 JAK2 V617F mutasyonu, %17-28 CALR ve %1-5 MPL mutasyonu vardı. Hastaların %13-20 kadarı her üç mutasyonu da taşıyordu. JAK2 V617F ve MPL mutasyonu olmayanlarda ise %51-67 oranında CALR mutasyonu vardı. CALR mutasyonlarının

%45-65'i tip 1 ve %30-39'u tip 2 mutasyonu şeklinde olup tip 1 mutasyonları daha sıklıkla (130–134).

Tüm bu değerler gözönünde bulundurulduğunda bu çalışmada JAK2 V617F mutasyon dağılımı (%52), tek bir yayın hariç, literatür ile uyumlu bulundu; sözkonusu tek yayında ise Al Assaf ve ark., (2015) bu değeri %35 olarak bildirmişlerdi. ET'da MPL mutasyonu ve JAK2 V617F ve MPL negatif hastalarda CALR mutasyon oranı genel literatüre göre oldukça yüksekti (sırasıyla %9 versus %4; %73,7 versus %60) (127,129–133,135–138).

Çalışmamızda 98 ET hastasının 10'unun her üç mutasyonda negatifi. Ancak yüksek oranda (%89.2) JAK2 V617F, CALR ve MPL mutasyonu bulunmuştu. Ayrıca JAK2 ve MPL mutasyonu olmayan hastalarda %73.7 oranında tespit edilen CALR mutasyonu oranı genel literatür ortalamasından oldukça yüksekti.

Çalışmamızda JAK2 ve MPL negatif hastalardaki CALR mutasyon oranının genel olarak Avrupa'dan yapılan yayınlarla benzer olduğu ancak Uzakdoğu'dan yapılan yayınlardan daha yüksek olduğu tespit edildi.

ET'da CALR mutasyonlarının alt gruplarına bakıldığında, Uzakdoğu'dan yapılan yayınlarda CALR tip 1 ve tip 2 mutasyon oranları birbirine yakındı (107,127,128,137). Ancak farklı etnik gruplardan olan yayınların çoğunda tip 1 mutasyonu, tip 2 mutasyonundan anlamlı oranda daha yüksekti. Çalışmamızda ise Uzakdoğu'ya benzer şekilde CALR tip 1 mutasyonu tip 2 mutasyonuna yakın oranlardaydı. Literatürde kimi yayınlarda CALR'de tip 1 ve tip 2 dışındaki diğer mutasyonları (CLAMP) %18-24 olmak üzere yüksek oranda bulmuşlardı (113,128,137). Bizim çalışmamızda ise literatürdeki çoğu çalışmaya benzer şekilde tip1 ve tip 2 dışındaki CALR mutasyonları düşük oranlardaydı (%3.6).

Literatürde CALR pozitif ET hastaları JAK2 pozitif olanlara kıyasla daha genç ve çoğunlukla erkek hastalardan oluşuyordu. Bu hastalar daha yüksek platelet ve daha düşük hemoglobin ve lökosit değerlerine sahipti. LDH değerleri ve splenomegali varlığında ise anlamlı farklılık yoktu (107,127,128,137). Kim BH ve arkadaşlarının çalışmasında ise CALR mutasyonu olanlar JAK2 pozitiflere göre daha düşük lökosit sayısı ve daha yüksek platelet düzeyine sahipti. Ancak yaş, cinsiyet, hb değeri, LDH düzeyleri ve splenomegali varlığı açısından anlamlı farklılık gözlenmemişti (130).

Çalışmamızda ise Kim ve ark. benzer şekilde CALR mutasyonu ile JAK2 V617F mutasyonu olan ET hastaları ile kıyaslandığında lökosit düzeyleri anlamlı olarak düşük tespit edildi ($p=0.014$). Yaş, cinsiyet ve diğer hematolojik verilerde anlamlı farklılık gözlenmedi.

Al Assaf ve Andrikovics CALR mutasyonu olanlar ile JAK2 V617F, CALR ve MPL mutasyonu olmayan hastaları karşılaştırdıklarında hematolojik ve klinik veriler arasında anlamlı bir farklılık bulamamışlardı. Ancak Andrikovics'in çalışmasında kadın cinsiyet ön plandaydı (127,128). Kim BH ve ark. ise CALR pozitiflerde lökosit değerini daha düşük, LDH değerini anlamlı olarak yüksek bulmuşlardı (130).

Çalışmamızda, her üç mutasyonu taşımayan hastalar, CALR mutasyonu olanlara göre daha genç ($p=0.004$) ve literatüre benzer şekilde kadınlardan ($p=0.009$) oluşuyordu ve yine literatürle uyumlu olarak CALR mutasyonu olan hastalardan daha yüksek lökosit düzeyine sahiplerdi ($p=0.045$).

Literatürde çoğu çalışmada, ET hastalarında, komplikasyonlar açısından mutasyonlar arasında anlamlı fark yoktu (127,128,130,137,139). Ancak bazı çalışmalar CALR pozitif ET hastalarında JAK2 pozitif ve her üç mutasyon negatif olan hastalardan daha az tromboz geliştiğini ortaya koymuştu (140). Miyelofibrozise dönüşüm (Post-ET MF) ise CALR mutasyonu olanlarda, JAK2'den ve üç mutasyonu da taşımayan hastalardan anlamlı şekilde yüksekti (110). Post-ET MF dönüşümü bir yayında CALR, JAK2 ve MPL mutasyonları için sırasıyla %18, %4, %0 (127), bir başka yayında bu oran %15, %6 ve %3 şeklindeydi (128). Çalışmamızda da ET hastalarında mutasyonlar arasında trombotik ve vasküler diğer komplikasyonlar açısından anlamlı fark yoktu. Post-ET MF ise CALR pozitif hastalarda JAK2 ($p=0.015$) ve her üç mutasyonu taşımayan ($p=0.001$) hastalara göre anlamlı şekilde yüksekti.

Andrikovics ve ark., 99 PMF'de %57 JAK2 V617F, %25 CALR, %7 MPL mutasyonu tespit etmişlerdi. %11 hastada ise üç mutasyonda yoktu. JAK2 ve MPL negatiflerin %69.5'u CALR mutasyonu taşıyordu. PMF'de CALR'nin %64 tip 1, %12 tip 2 ve %24'ü diğer mutasyonlar şeklinde idi.

Rozovski ve arkadaşları çalışmalarında 344 PMF'de, 226 (%66) JAK2 V617F, 43 (%12) CALR ve 16 (%5) MPL mutasyonu göstermişlerdi. Hastaların %17'si bu mutasyonları taşıyordu. JAK2 V617F ve MPL mutasyonu olmayan hastalarda ise

%57.3 CALR mutasyonu vardı. CALR mutasyonlarının 40'ı tip 1 (%93.1), 3'ü (%6.9) tip 2 şeklindeydi.

Kim ve arkadaşlarının çalışmasında 50 PMF'de, %54 JAK2 V617F, %22 CALR ve %4 MPL mutasyonu vardı. %20 hastada üç mutasyonda yoktu. JAK2 ve MPL mutasyonu olmayanlarda CALR mutasyonu %52.4 şeklindeydi. CALR mutasyonlarının %81.8'i tip 1, %9.1'i tip 2 ve %9.1'i diğer mutasyonlardı.

Çalışmamızda PMF'deki JAK2 ve MPL mutasyonu sırasıyla %51.6 ve %6.5 olmak üzere genel literatür ile uyumluydu. Avrupa'dan yayınlarda, JAK2 ve MPL negatif hastalarda CALR mutasyon oranı yüksek iken (%69.5-%77.8) (128,139), Ortadoğu ve Uzakdoğu'dan (%44-52) yapılan yayınlarda (130,131,141,142) bu oran daha düşüktü. Çalışmamızda %53.8 oranı ile Ortadoğu ve Uzakdoğu'ya benziyordu.

PMF'de CALR tip 1 mutasyonu literatürdeki gibi çalışmamızda da yüksekti. Tip 2 mutasyon oranı tip 1'den daha az olmakla birlikte, genel literatürden yüksekti. Ayrıca çoğu yayında CLAMP mutasyonu görülme oranı %5'in altında iken Andrikovicz'in yaptığı çalışmaya benzer şekilde (%24) çalışmamızda da CLAMP mutasyonu görülme oranı oldukça yüksekti (%14.3).

Tefferi ve arkadaşları CALR mutasyonu olan PMF hastalarını diğer mutasyonları taşıyanlara göre daha genç, yüksek platelet düzeyine sahip, anemi ve lökositözün daha az görüldüğü hastalar olarak tanımlamışlardı (136). Lösemiye dönüşüm oranı her üç mutasyon için negatif hastalarda CALR ve JAK2 mutasyonu olan hastalara göre daha yüksek tespit edilmişti. Diğer komplikasyonlar açısından mutasyonlar arasında anlamlı farklılık gözlenmemiştir (128).

Bir başka çalışmada CALR pozitif PMF hastalarında JAK2 mutasyonu olanlara göre platelet değerleri yüksek, üç mutasyonun negatif olduğu gruba göre hemoglobinin değeri yüksekti. Diğer parametrelerde anlamlı farklılık gözlenmemiştir (130,143). Bizim çalışmamızda da literatürle uyumlu olarak JAK2 pozitif hastalar CALR'ye göre anlamlı lökosit yüksekliğine sahipti ($p=0.01$). Her üç mutasyonda olmayan hastalara göre CALR mutasyonu olan hastalarda platelet değerleri yüksek tespit edilmişti ($p=0.004$). Hastalarımızda JAK2 mutasyonu olanlarda trombotik olay görülme riski daha sık tespit edildi. Çalışmamızdaki hasta grubu kesit olarak son iki yılı içerdiği için, uzun dönem

komplifikasyon oranlarının belirlenmesinde mevcut sayı ile istatistiki anlamlılık belirlenememiş olmakla birlikte sonuç literatürle uyumlu bulunmuştur.

Literatürde JAK2 allel yükünün dağılımı PV'da yüksek, ET'da düşük ve PMF'de orta-yüksek olduğunu bildiren yayınlar vardı (144). Çalışmamızda da ET'da düşük allel yükü, PMF'de ise yüksek allel yükü vardı ve iki grup hastalık arasında anlamlı farklılığa sahipti ($p=0.001$).

MPN'lerde JAK2 V617F allel yükünün hastalık fenotipine olan etkisini ortaya koyan çalışmalar da yapılmıştır (145). Bu çalışmalara göre yüksek allel yükü ET ve PMF hastalarında lökositoz ve splenomegali ile, PMF'de pruritis ve ET'de miyelofibrozis ile ilişkili bulunmuştur (146). Bizim çalışmamızda da JAK2 allel yükü fazla olan ET'de allel yükü düşük yada hiç olmayanlara göre lökosit ortalaması anlamlı derecede yüksekti ($p=0.000$). Allel yükü fazla olanlarda LDH değeri anlamlı olarak daha yüksekti ($p=0.002$).

PMF'de ise allel yükü fazla olanlar daha yaşlı, lökosit ve LDH değerleri anlamlı olarak daha yüksek bulundu ($p=0.020$ ve $p=0.031$).

PV ve ET hastalarını içeren bir çalışmada allel yükünün artması ile tromboz riskinin arttığı ancak lösemiye dönüşüm ve ortalama sağkalım açısından anlamlı farklılığın olmadığı bildirilmiştir (26,147). Bizim çalışmamızda da ET hastalarında trombotik olay riski açısından anlamlı farklılık gözlenmedi. Ancak PMF'de allel yükü yüksek olanlarda daha sık trombotik olay vardı.

CALR mutasyonları ile ilgili araştırmaların çoğunda olduğu gibi bizim çalışmamızda da ET ve PMF hastalarında üç mutasyon (JAK2 V617F, CALR ve MPL) %90'a yakın hastada gösterilebilmiştir. JAK2 V617F ve MPL mutasyonu olmayan trombositozlarda CALR mutasyonlarının gösterilmesi ile sadece noninvaziv olarak MPN tanısı koyulmakla kalmayıp aynı zamanda bu hastaların tanı ve yönetimi için önemli bir adım atılmıştır.

Çalışmamız retrospektif olarak kısa bir zaman diliminde ve tek merkezden nispeten az sayıda hasta içermesi nedeniyle bazı kısıtlılıklara sahiptir ancak yine de Ülkemizden yapılmış en kapsamlı çalışma olma niteliğindedir. Mevcut verilerin, MPN patogenezinde yer alan mutasyonların ve etkiledikleri kritik sinyal yollarının

anlaşılmasına ve bu hastalıkların tanı ve tedavi sürecinde önemli adımların atılmasına yol açacağı düşünülmektedir.

6. SONUÇLAR

1. Çalışmada toplam 129 miyeloproliferatif neoplazi hastası incelendi. Bunların 98'i esansiyel trombositoz (%76) ve 31'i primer miyelofibrozis (%24)'den oluşuyordu. Hastaların 75'i kadın (%58.1) ve 54'ü (%41.9) erkekti. En küçüğü 21 ve en büyüğü 93 olmak üzere ortalama yaş 60.7 ± 15.5 idi.

2. Hastaların mutasyon analizinde, toplam 129 hastanın 113'ünde (%87.5) mutasyon tespit edildi. Bu mutasyonların 67'si (%51.9) JAK2 V617F, 35'i (%27.2) CALR ve 11'i (%8.5) MPL idi. JAK2 ve MPL mutasyonu olmayan hastaların çoğunda (%68.7) CALR mutasyonu vardı. CALR mutasyonlarının dağılımı %51.5 CALR tip 1, %42.8 CALR tip 2 olup, birbirine yakın oranlarda saptandı. CLAMP mutasyonu ise %5.7 ile tip 1 ve 2'ye göre çok düşük orandaydı. MPL mutasyonlarından W515L, %81.8 oranı ile W515K'dan daha sık tespit edilmişti.

3. ET'da toplam 98 hasta vardı ve bunların %61.2'si kadınlardan oluşmaktaydı. Hastaların yaş ortalaması 60.2 ± 15.6 idi.

4. ET hastalarında toplam %89.8 mutasyon (JAK2 V617F, CALR ve MPL) tespit edildi. JAK2 ve MPL mutasyonu olmayan 38 hastanın 28'inde (%73.6) CALR mutasyonu vardı. Tüm 28 CALR pozitif ET'un %50'si Tip 1, %46.4'ü Tip 2 ve %3.6'sı CLAMP mutasyonu şeklindeydi. Tip 1 ve Tip 2 mutasyon oranları birbirine çok yakın, CLAMP mutasyonu ise çok düşük orandaydı.

5. ET'da JAK2 kuantifikasyonu ile elde edilen ortalama allel yükü %72 (37) hastada %50'nin altında idi.

6. ET'nin alt grubu olan post-ET MF hastalarının yaş ortalaması ($p=0.038$), lökosit ($p=0.023$) ve Plt değerleri kemik iliği ET ile uyumlu olan hastalardan daha yüksekti. Ortalama LDH düzeyleri anlamlı şekilde yüksekti ($p=0.000$). SM görülme oranı da diğer gruptan daha yüksekti. Kardiovasküler olay daha sık gözlenmişti. Post-ET MF hastalarının tamamında üç mutasyondan biri mevcuttu. CALR %55.5 oranı ile en sık görülen mutasyondur.

7. PMF grubunda cinsiyet oranı birbirine yakındı (%48.4 kadın ve %51.6 erkek) ve yaş ortalaması $62.45 (\pm 15.2)$ idi.

8. PMF hastalarında %51.6 JAK2 V617F, %22.6 CALR, %6.5 MPL mutasyonu vardı. %19.4 hastada ise üç mutasyonda saptanmamıştı. MPL mutasyonu ve üç mutasyonu taşımayan hasta oranı yüksekti.

9. JAK2 ve MPL olmayanların %53.8'inde CALR mutasyonu vardı ve bu oran ET hastalarına kıyasla daha düşük çıkmıştı. CALR mutasyonları ise %57.2 Tip 1, %28.5 Tip 2 ve %14.3 CLAMP mutasyonu şeklinde dağılım gösteriyordu. Tip 1 mutasyonu en sık mutasyondur. CLAMP mutasyon oranı da yüksekti.

10. PMF'de JAK2 kuantifikasyonu ile elde edilen allel yükü %87.1 hastada %50'nin üstünde idi.

11. Kantitatif JAK2 allel yükü ET hastalarında %50'nin altında, PMF'de ise %50'nin üstünde olmak üzere dağılım göstermesi ile anlamlı farklılık gösteriyordu ($p=0.006$).

12. ET'da CALR mutasyonu olmayanlarda ortalama lökosit değerleri, CALR mutasyonu olan hastalara göre anlamlı şekilde yüksekti ($p=0.019$). Post-ET MF dönüşümü ise CALR mutasyonu olan hastalarda anlamlı şekilde yüksekti ($p=0.007$). CALR pozitif ET'da ortalama lökosit değerleri normal sınırlarda iken JAK2 V617F mutasyonu olanlarda lökositoz vardı ($p=0.014$). ET'da CALR mutasyonu olanlar MPL mutasyonu olanlara göre daha gençti (58 versus 68) ($p=0.05$). ET'da CALR mutasyonu olanlara göre üç mutasyonu taşımayan grupta ortalama yaş düşüktü ($p=0.004$) ve kadın cinsiyet ön plandaydı ($p=0.009$). ET'da CALR tip 1 ve tip 2 mutasyonları ayrı ayrı ve JAK2 V617F mutasyonu ile karşılaştırıldığında lökositoz JAK2 V617F mutasyonu olan hastalarda daha fazla idi.

13. PMF hastalarında CALR ile JAK2 V617F mutasyonu değerlendirildiğinde lökosit değerleri JAK2 V617F mutasyonu olanlarda yüksek tespit edildi ($p=0.01$). CALR

mutasyonu olan hastaların hepsinde masif splenomegali vardı (p=0.000). CALR ile her üç mutasyonda olmayan hastalar karşılaştırıldığında platelet değerleri CALR mutasyonu olan hastalarda anlamlı şekilde yüksekti (p=0.042).

14. ET hastalarında kuantitatif JAK2 V617F allel yükü %50'nin üzerinde olan hastalarda ortalama lökosit (p=0.000) ve LDH değerleri (p=0.002) ve miyelofibroze dönüşüm (p=0.023), allel yükü %50'nin altında olan gruba kıyasla anlamlı olarak yüksekti. JAK2 V617F mutasyonu olmayan gruptan ise lökosit değerleri anlamlı olarak yüksekti (0.000).

JAK2 mutasyonu olmayanlarda JAK2 allel yükü düşük olan gruba göre miyelofibroze dönüşüm oranı anlamlı şekilde yüksekti (p=0.015).

15. PMF hastalarında JAK2 allel yükü %50'nin üstünde olan hastaların ortalama yaşı, allel yükü %50'nin altındakilere oranla anlamlı şekilde yüksekti (p=0.020), splenomegali görülme sıklığı daha fazlaydı (p=0.031). Tromboz komplikasyonu da yine allel yükü yüksek olanlarda daha fazla görüldü. Ayrıca JAK2 V617F mutasyonu olmayan hastalara kıyasla lökositöz görülme oranı anlamlı şekilde yüksekti (0.000).

7. KAYNAKLAR

1. Spivak JL. The chronic myeloproliferative disorders: Clonality and clinical heterogeneity. *Semin Hematol.* 2004 Apr 1;41(2 Suppl 3):1–5.
2. Vannucchi AM, Guglielmelli P, Tefferi A. Advances in understanding and management of myeloproliferative neoplasms. *CA Cancer J Clin.* 2009;59(3):171–91.
3. Campo E, Swerdlow SH, Harris NL, Pileri S, Stein H, Jaffe ES. The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. *Blood.* 2011 May 12;117(19):5019–32.
4. Tefferi A, Vardiman JW. Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: the 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms. *Leukemia.* 2008;22(1):14–22.
5. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. Vol. 127, *Blood.* 2016. p. 2391–405.
6. Tefferi A, Spivak JL. Polycythemia vera: Scientific advances and current practice. Vol. 42, *Seminars in Hematology.* 2005. p. 206–20.
7. Tefferi A. Polycythemia vera: a comprehensive review and clinical recommendations. *Mayo Clin Proc.* 2003;78(2):174–94.
8. Adamson JW, Fialkow PJ, Murphy S, Prchal JF, Steinmann L. Polycythemia vera: stem-cell and probable clonal origin of the disease. *N Engl J Med.* 1976 Oct

- 21;295(17):913–6.
9. Rege-Cambrin G, Mecucci C, Tricot G, Michaux JL, Louwagie A, Van Hove W, et al. A chromosomal profile of polycythemia vera. *Cancer Genet Cytogenet.* 1987 Apr;25(2):233–45.
 10. Mirza AM, Ezzat S, Axelrad AA. Insulin-like growth factor binding protein-1 is elevated in patients with polycythemia vera and stimulates erythroid burst formation in vitro. *Blood.* 1997 Mar 15;89(6):1862–9.
 11. James C, Ugo V, Le Couédic J-P, Staerk J, Delhommeau F, Lacout C, et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature.* 2005 Apr 28;434(7037):1144–8.
 12. Barbui T, Thiele J, Vannucchi AM, Tefferi A. Rationale for revision and proposed changes of the WHO diagnostic criteria for polycythemia vera, essential thrombocythemia and primary myelofibrosis. *Blood Cancer J.* 2015;5(8):e337.
 13. Berlin NI. Diagnosis and classification of the polycythemias. *Semin Hematol.* 1975 Oct;12(4):339–51.
 14. Steinman HK, Greaves MW. Aquagenic pruritus. *J Am Acad Dermatol.* 1985 Jul;13(1):91–6.
 15. Falanga A, Marchetti M. Thrombosis in Myeloproliferative Neoplasms. *Semin Thromb Hemost.* 2014 Mar 9;40(3):348–58.
 16. Berk PD, Goldberg JD, Donovan PB, Fruchtman SM, Berlin NI, Wasserman LR. Therapeutic recommendations in polycythemia vera based on Polycythemia Vera Study Group protocols. *Semin Hematol.* 1986 Apr;23(2):132–43.
 17. Spivak JL, Barosi G, Tognoni G, Barbui T, Finazzi G, Marchioli R, et al. Chronic myeloproliferative disorders. *Hematol Am Soc Hematol Educ Progr.* 2003;200–24.
 18. Anger BR, Seifried E, Scheppach J, Heimpel H. Budd-Chiari syndrome and thrombosis of other abdominal vessels in the chronic myeloproliferative diseases. *Klin Wochenschr.* 1989 Aug 17;67(16):818–25.
 19. Colaizzo D, Amitrano L, Tiscia GL, Scenna G, Grandone E, Guardascione MA, et al. The JAK2 V617F mutation frequently occurs in patients with portal and mesenteric venous thrombosis. *J Thromb Haemost.* 2007 Jan;5(1):55–61.

20. Kurzrock R, Cohen PR. Erythromelalgia and myeloproliferative disorders. *Arch Intern Med.* 1989 Jan;149(1):105–9.
21. Messinezy M, Pearson TC. Incidence of myelofibrosis following treatment of primary polycythaemia by venesection. *Br J Haematol.* 1995 Jan;89(1):228–30.
22. Finazzi G, Caruso V, Marchioli R, Capnist G, Chisesi T, Finelli C, et al. Acute leukemia in polycythemia vera: an analysis of 1638 patients enrolled in a prospective observational study. *Blood.* 2005 Apr 1;105(7):2664–70.
23. Fisher MJ, Prchal JF, Prchal JT, D'Andrea AD. Anti-erythropoietin (EPO) receptor monoclonal antibodies distinguish EPO-dependent and EPO-independent erythroid progenitors in polycythemia vera. *Blood.* 1994 Sep 15;84(6):1982–91.
24. Fabris F, Casonato A, Del Ben MG, Marco L De, Girolami A. Abnormalities of von Willebrand factor in myeloproliferative disease: a relationship with bleeding diathesis. *Br J Haematol.* 1986 May;63(1):75–83.
25. De Stefano V, Za T, Rossi E, Vannucchi AM, Ruggeri M, Elli E, et al. Leukocytosis is a risk factor for recurrent arterial thrombosis in young patients with polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Am J Hematol.* 2009 Feb;85(2):NA-NA.
26. Vannucchi AM, Pieri L, Guglielmelli P. JAK2 Allele Burden in the Myeloproliferative Neoplasms: Effects on Phenotype, Prognosis and Change with Treatment. *Ther Adv Hematol.* 2011;2(1):21–32.
27. Kaushansky K, Lichtman M, Prchal J, Levi MM, Press O, Burns L, et al. *Hematology.* 2016. 2528 p.
28. Choi CW, Bang S-M, Jang S, Jung CW, Kim H-J, Kim HY, et al. Guidelines for the management of myeloproliferative neoplasms. *Korean J Intern Med.* 2015;30:771–88.
29. Isabel Bittencourt R, Vassallo J, de Lourdes Lopes Ferrari Chauffaille M, Guerra Xavier S, Borgia Pagnano K, Clara Kneese Nascimento A, et al. Philadelphia-negative chronic myeloproliferative neoplasms. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2012;34(2):140–9.
30. Kaplan ME, Mack K, Goldberg JD, Donovan PB, Berk PD, Wasserman LR. Long-term management of polycythemia vera with hydroxyurea: a progress

- report. *Semin Hematol.* 1986 Jul;23(3):167–71.
31. Roberts BE, Smith AH. Use of radioactive phosphorus in haematology. *Blood Rev.* 1997 Sep;11(3):146–53.
 32. Hasselbalch HC. A new era for IFN- α in the treatment of Philadelphia-negative chronic myeloproliferative neoplasms. *Expert Rev Hematol.* 2011 Dec 10;4(6):637–55.
 33. Petitt RM, Silverstein MN, Petrone ME. Anagrelide for control of thrombocytopenia in polycythemia and other myeloproliferative disorders. *Semin Hematol.* 1997 Jan;34(1):51–4.
 34. Harrison CN, Campbell PJ, Buck G, Wheatley K, East CL, Bareford D, et al. Hydroxyurea Compared with Anagrelide in High-Risk Essential Thrombocytopenia. *N Engl J Med.* 2005 Jul 7;353(1):33–45.
 35. Mascarenhas JO, Cross NCP, Mesa RA. The future of JAK inhibition in myelofibrosis and beyond. *Blood Rev.* 2014 Sep;28(5):189–96.
 36. Finazzi G, Vannucchi AM, Martinelli V, Ruggeri M, Nobile F, Specchia G, et al. A phase II study of Givinostat in combination with hydroxycarbamide in patients with polycythaemia vera unresponsive to hydroxycarbamide monotherapy. *Br J Haematol.* 2013 Jun;161(5):688–94.
 37. Fialkow PJ, Faguet GB, Jacobson RJ, Vaidya K, Murphy S. Evidence that essential thrombocytopenia is a clonal disorder with origin in a multipotent stem cell. *Blood.* 1981;58(5):916–9.
 38. Mesa RA, Silverstein MN, Jacobsen SJ, Wollan PC, Tefferi A. Population-based incidence and survival figures in essential thrombocytopenia and agnogenic myeloid metaplasia: an Olmsted County Study, 1976-1995. *Am J Hematol.* 1999 May;61(1):10–5.
 39. Taksin AL, Couedic JP, Dusanter-Fourt I, Massé A, Giraudier S, Katz A, et al. Autonomous megakaryocyte growth in essential thrombocytopenia and idiopathic myelofibrosis is not related to a c-mpl mutation or to an autocrine stimulation by Mpl-L. *Blood.* 1999 Jan 1;93(1):125–39.
 40. Hess G, Rose P, Gamm H, Papadiliris S, Huber C, Seliger B. Molecular analysis of the erythropoietin receptor system in patients with polycythaemia vera. *Br J Haematol.* 1994 Dec;88(4):794–802.

41. Steensma DP, Tefferi A. Cytogenetic and molecular genetic aspects of essential thrombocythemia. *Acta Haematol.* 2002;108(2):55–65.
42. Elliott MA, Tefferi A. Thrombosis and haemorrhage in polycythaemia vera and essential thrombocythaemia. *Br J Haematol.* 2005 Feb;128(3):275–90.
43. Rocca B, Ciabattoni G, Tartaglione R, Cortelazzo S, Barbui T, Patrono C, et al. Increased thromboxane biosynthesis in essential thrombocythemia. *Thromb Haemost.* 1995 Nov;74(5):1225–30.
44. Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood.* 2002 Sep 18;100(7):2292–302.
45. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood.* 2009 Jul 30;114(5):937–51.
46. Barbui T, Thiele J, Passamonti F, Rumi E, Boveri E, Ruggeri M, et al. Survival and Disease Progression in Essential Thrombocythemia Are Significantly Influenced by Accurate Morphologic Diagnosis: An International Study. *J Clin Oncol.* 2011 Aug 10;29(23):3179–84.
47. Barbui T, Thiele J, Gisslinger H, Finazzi G, Carobbio A, Rumi E, et al. Masked polycythemia Vera (mPV): Results of an international study. *Am J Hematol.* 2014 Jan;89(1):52–4.
48. Bittencourt RI, Vassallo J, Chauffaille M de LLF, Xavier SG, Pagnano KB, Nascimento ACK, et al. Philadelphia-negative chronic myeloproliferative neoplasms. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2012;34(2):140–9.
49. Passamonti F, Rumi E, Pungolino E, Malabarba L, Bertazzoni P, Valentini M, et al. Life expectancy and prognostic factors for survival in patients with polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Am J Med.* 2004 Nov 15;117(10):755–61.
50. Michiels JJ, van Genderen PJ, Lindemans J, van Vliet HH. Erythromelalgic, thrombotic and hemorrhagic manifestations in 50 cases of thrombocythemia. *Leuk Lymphoma.* 1996 Sep;22 Suppl 1(sup1):47–56.
51. Passamonti F, Rumi E, Arcaini L, Boveri E, Elena C, Pietra D, et al. Prognostic factors for thrombosis, myelofibrosis, and leukemia in essential

- thrombocythemia: a study of 605 patients. *Haematologica*. 2008 Nov 11;93(11):1645–51.
52. Lussana F, Caberlon S, Pagani C, Kamphuisen PW, Büller HR, Cattaneo M. Association of V617F Jak2 mutation with the risk of thrombosis among patients with essential thrombocythaemia or idiopathic myelofibrosis: a systematic review. *Thromb Res*. 2009 Sep;124(4):409–17.
 53. Gangat N, Wolanskyj AP, McClure RF, Li C-Y, Schwager S, Wu W, et al. Risk stratification for survival and leukemic transformation in essential thrombocythemia: a single institutional study of 605 patients. *Leukemia*. 2007 Feb 14;21(2):270–6.
 54. Alimam S, Wilkins BS, Harrison CN. How we diagnose and treat essential thrombocythaemia. *Br J Haematol*. 2015;171(3):306–21.
 55. Campbell PJ, Scott LM, Buck G, Wheatley K, East CL, Marsden JT, et al. Definition of subtypes of essential thrombocythaemia and relation to polycythaemia vera based on JAK2 V617F mutation status: a prospective study. *Lancet (London, England)*. 2005 Dec 3;366(9501):1945–53.
 56. Isabel Bittencourt R, Vassallo J, de Lourdes Lopes Ferrari Chauffaille M, Guerra Xavier S, Borgia Pagnano K, Clara Kneese Nascimento A, et al. Philadelphia-negative chronic myeloproliferative neoplasms. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2012;34(2):140–9.
 57. Cortelazzo S, Finazzi G, Ruggeri M, Vestri O, Galli M, Rodeghiero F, et al. Hydroxyurea for patients with essential thrombocythemia and a high risk of thrombosis. *N Engl J Med*. 1995 Apr 27;332(17):1132–6.
 58. Campbell PJ, Bareford D, Erber WN, Wilkins BS, Wright P, Buck G, et al. Reticulin accumulation in essential thrombocythemia: prognostic significance and relationship to therapy. *J Clin Oncol*. 2009 Jun 20;27(18):2991–9.
 59. Kiladjian J-J, Chomienne C, Fenaux P. Interferon-alpha therapy in bcr-abl-negative myeloproliferative neoplasms. *Leukemia*. 2008 Nov 9;22(11):1990–8.
 60. Alvarez-Larrán A, Martínez-Avilés L, Hernández-Boluda JC, Ferrer-Marín F, Antelo ML, Burgaleta C, et al. Busulfan in patients with polycythemia vera or essential thrombocythemia refractory or intolerant to hydroxyurea. *Ann Hematol*. 2014 Dec 2;93(12):2037–43.

61. Silverstein MN, Gomes MR, ReMine WH, Elveback LR. Agnogenic myeloid metaplasia. Natural history and treatment. *Arch Intern Med.* 1967 Nov;120(5):546–50.
62. Tefferi A. Primary myelofibrosis. *Cancer Treat Res.* 2008;142:29–49.
63. Kutti J, Ridell B. Epidemiology of the myeloproliferative disorders: essential thrombocythaemia, polycythaemia vera and idiopathic myelofibrosis. *Pathol Biol (Paris).* 2001 Mar;49(2):164–6.
64. Barosi G, Hoffman R. Idiopathic myelofibrosis. *Semin Hematol.* 2005 Oct;42(4):248–58.
65. Hu H. Benzene-associated myelofibrosis. *Ann Intern Med.* 1987 Jan;106(1):171–2.
66. Kahn A, Bernard JF, Cottreau D, Marie J, Boivin P. Gd(–) Abrami: a deficient G-6PD variant with hemizygous expression in blood cells of a woman with primary myelofibrosis. *Humangenetik.* 1975 Oct 20;30(1):41–6.
67. Buschle M, Janssen JW, Drexler H, Lyons J, Anger B, Bartram CR. Evidence for pluripotent stem cell origin of idiopathic myelofibrosis: clonal analysis of a case characterized by a N-ras gene mutation. *Leukemia.* 1988 Oct;2(10):658–60.
68. Barosi G, Viarengo G, Pecci A, Rosti V, Piaggio G, Marchetti M, et al. Diagnostic and clinical relevance of the number of circulating CD34(+) cells in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Blood.* 2001 Dec 1;98(12):3249–55.
69. Reilly JT, Snowden JA, Spearing RL, Fitzgerald PM, Jones N, Watmore A, et al. Cytogenetic abnormalities and their prognostic significance in idiopathic myelofibrosis: a study of 106 cases. *Br J Haematol.* 1997 Jul;98(1):96–102.
70. Mesa RA, Li C-Y, Ketterling RP, Schroeder GS, Knudson RA, Tefferi A. Leukemic transformation in myelofibrosis with myeloid metaplasia: a single-institution experience with 91 cases. *Blood.* 2005 Feb 1;105(3):973–7.
71. Panteli KE, Hatzimichael EC, Bouranta PK, Katsaraki A, Seferiadis K, Stebbing J, et al. Serum interleukin (IL)-1, IL-2, sIL-2Ra, IL-6 and thrombopoietin levels in patients with chronic myeloproliferative diseases. *Br J Haematol.* 2005 Sep;130(5):709–15.
72. Martyré MC, Magdelenat H, Bryckaert MC, Laine-Bidron C, Calvo F. Increased intraplatelet levels of platelet-derived growth factor and transforming growth

- factor-beta in patients with myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Br J Haematol.* 1991 Jan;77(1):80–6.
73. Di Raimondo F, Azzaro MP, Palumbo GA, Bagnato S, Stagno F, Giustolisi GM, et al. Elevated vascular endothelial growth factor (VEGF) serum levels in idiopathic myelofibrosis. *Leukemia.* 2001 Jun;15(6):976–80.
 74. Guglielmelli P, Lasho TL, Rotunno G, Score J, Mannarelli C, Pancrazzi A, et al. The number of prognostically detrimental mutations and prognosis in primary myelofibrosis: an international study of 797 patients. *Leukemia.* 2014 Sep 19;28(9):1804–10.
 75. Barosi G, Mesa RA, Thiele J, Cervantes F, Campbell PJ, Verstovsek S, et al. Proposed criteria for the diagnosis of post-polycythemia vera and post-essential thrombocythemia myelofibrosis: a consensus statement from the International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment. *Leukemia.* 2008 Feb;22(2):437–8.
 76. Njoku OS, Lewis SM, Catovsky D, Gordon-Smith EC. Anaemia in myelofibrosis: its value in prognosis. *Br J Haematol.* 1983 May;54(1):79–89.
 77. Okamura T, Kinukawa N, Niho Y, Mizoguchi H. Primary chronic myelofibrosis: clinical and prognostic evaluation in 336 Japanese patients. *Int J Hematol.* 2001 Feb;73(2):194–8.
 78. Gregory SA, Mesa RA, Hoffman R, Shammo JM. Clinical and laboratory features of myelofibrosis and limitations of current therapies. *Clin Adv Hematol Oncol.* 2011 Sep;9(9 Suppl 22):1–16.
 79. Kaelin WG, Spivak JL. Systemic lupus erythematosus and myelofibrosis. *Am J Med.* 1986 Nov;81(5):935–8.
 80. Connelly TJ, Abruzzo JL, Schwab RH. Agnogenic myeloid metaplasia with polyarteritis. *J Rheumatol.*;9(6):954–6.
 81. Barosi G. Myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2003 Oct;17(5):1211–26.
 82. Caughman W, Stern R, Haynes H. Neutrophilic dermatosis of myeloproliferative disorders. Atypical forms of pyoderma gangrenosum and Sweet's syndrome associated with myeloproliferative disorders. *J Am Acad Dermatol.* 1983 Nov;9(5):751–8.

83. Tefferi A. Myelofibrosis with Myeloid Metaplasia. *N Engl J Med*. 2000 Apr 27;342(17):1255–65.
84. Jacobs P, Maze S, Tayob F, Harries-Jones EP. Myelofibrosis, splenomegaly, and portal hypertension. *Acta Haematol*. 1985;74(1):45–8.
85. Barbui T, Carobbio A, Cervantes F, Vannucchi AM, Guglielmelli P, Antonioli E, et al. Thrombosis in primary myelofibrosis: incidence and risk factors. *Blood*. 2010 Jan 28;115(4):778–82.
86. Silverstein MN, Brown AL, Linman JW. Idiopathic myeloid metaplasia. Its evolution into acute leukemia. *Arch Intern Med*. 1973 Nov;132(5):709–12.
87. Cervantes F, Dupriez B, Pereira A, Passamonti F, Reilly JT, Morra E, et al. New prognostic scoring system for primary myelofibrosis based on a study of the International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment. *Blood*. 2009;113(13):2895–901.
88. Passamonti F, Cervantes F, Vannucchi AM, Morra E, Rumi E, Pereira A, et al. A dynamic prognostic model to predict survival in primary myelofibrosis: a study by the IWG-MRT (International Working Group for Myeloproliferative Neoplasms Research and Treatment). *Blood*. 2010;115:1703–8.
89. Gangat N, Caramazza D, Vaidya R, George G, Begna K, Schwager S, et al. DIPSS plus: a refined Dynamic International Prognostic Scoring System for primary myelofibrosis that incorporates prognostic information from karyotype, platelet count, and transfusion status. *J Clin Oncol*. 2011 Feb 1;29(4):392–7.
90. Passamonti F, Mora B, Maffioli M. New molecular genetics in the diagnosis and treatment of myeloproliferative neoplasms. *Curr Opin Hematol*. 2016;23(2):137–43.
91. Tefferi A, Vainchenker W. Myeloproliferative neoplasms: Molecular pathophysiology, essential clinical understanding, and treatment strategies. *Journal of Clinical Oncology*. 2011. p. 573–82.
92. Verstovsek S, Mesa RA, Gotlib J, Levy RS, Gupta V, DiPersio JF, et al. A double-blind, placebo-controlled trial of ruxolitinib for myelofibrosis. *N Engl J Med*. 2012 Mar 1;366(9):799–807.
93. Harrison C, Kiladjan J-J, Al-Ali HK, Gisslinger H, Waltzman R, Stalbovska V, et al. JAK inhibition with ruxolitinib versus best available therapy for

- myelofibrosis. *N Engl J Med*. 2012 Mar 1;366(9):787–98.
94. Guglielmelli P, Barosi G, Rambaldi A, Marchioli R, Masciulli A, Tozzi L, et al. Safety and efficacy of everolimus, a mTOR inhibitor, as single agent in a phase 1/2 study in patients with myelofibrosis. *Blood*. 2011 Aug 25;118(8):2069–76.
 95. Tefferi A. Primary myelofibrosis: 2013 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol*. 2013 Feb;88(2):141–50.
 96. Ghoreschi K, Laurence A, O’Shea JJ. Janus kinases in immune cell signaling. *Immunol Rev*. 2009 Mar;228(1):273–87.
 97. Vainchenker W, Delhommeau F, Constantinescu SN, Bernard OA. New mutations and pathogenesis of myeloproliferative neoplasms. 2011;118(7):1723–35.
 98. Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, Teo S-S, Tiedt R, Passweg JR, et al. A Gain-of-Function Mutation of JAK2 in Myeloproliferative Disorders. *n engl j med*. 2005;352:17.
 99. Brooks RC, Hasley PB, Jasti H, Macpherson D. Update in general internal medicine: Evidence published in 2011. *Ann Intern Med*. 2012;156(9):649–54.
 100. Tefferi A, Pardanani A, C F, JJ K, PD B, LR W, et al. Myeloproliferative Neoplasms. *JAMA Oncol*. 2015 Apr 1;1(1):97.
 101. Barbui T, Finazzi G, Carobbio A, Thiele J, Passamonti F, Rumi E, et al. Development and validation of an International Prognostic Score of thrombosis in World Health Organization–essential thrombocythemia (IPSET-thrombosis). *Blood*. 2012;120(26):5128–33.
 102. Vannucchi AM, Lasho TL, Guglielmelli P, Biamonte F, Pardanani A, Pereira A, et al. Mutations and prognosis in primary myelofibrosis. *Leukemia*. 2013 Sep 26;27(9):1861–9.
 103. Pietra D, Li S, Brisci A, Passamonti F, Rumi E, Theocharides A, et al. Somatic mutations of JAK2 exon 12 in patients with JAK2 (V617F)-negative myeloproliferative disorders. *Blood*. 2007 Oct 25;111(3):1686–9.
 104. Passamonti F, Elena C, Schnittger S, Skoda RC, Green AR, Girodon F, et al. Molecular and clinical features of the myeloproliferative neoplasm associated with JAK2 exon 12 mutations. *Blood*. 2011;117(10):2813–6.
 105. Pikman Y, Lee BH, Mercher T, McDowell E, Ebert BL, Gozo M, et al.

- MPLW515L Is a Novel Somatic Activating Mutation in Myelofibrosis with Myeloid Metaplasia. Sawyers C, editor. PLoS Med. 2006 Jul 18;3(7):e270.
106. Pardanani AD, Levine RL, Lasho T, Pikman Y, Mesa RA, Wadleigh M, et al. MPL515 mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: a study of 1182 patients. *Blood*. 2006;108(10):3472–6.
 107. Klampfl T, Gisslinger H, Harutyunyan AS, Nivarthi H, Rumi E, Milosevic JD, et al. Somatic Mutations of Calreticulin in Myeloproliferative Neoplasms. *n engl j med*. 2013;369(19):2379–90.
 108. Michalak M, Groenendyk J, Szabo E, Gold LI, Opas M. Calreticulin, a multi-process calcium-buffering chaperone of the endoplasmic reticulum. *Biochem J*. 2009;417:651–66.
 109. Cabagnols X, Defour JP, Ugo V, Ianotto JC, Mossuz P, Mondet J, et al. Differential association of calreticulin type 1 and type 2 mutations with myelofibrosis and essential thrombocythemia: relevance for disease evolution. *Leukemia*. 2015 Jan 12;29(1):249–52.
 110. Nangalia J, Massie CEE, Baxter EJJ, Nice FLL, Gundem G, Wedge DCC, et al. Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2. *N Engl J Med*. 2013;369(25):2391–405.
 111. Tefferi A, Guglielmelli P, Larson DR, Finke C, Wassie EA, Pieri L, et al. Long-term survival and blast transformation in molecularly annotated essential thrombocythemia, polycythemia vera, and myelofibrosis. *Blood*. 2014 ;124(16):2507–13.
 112. Tefferi A, Guglielmelli P, Lasho T, Rotunno G, Finke C, Mannarelli C, et al. CALR and ASXL1 mutations-based molecular prognostication in primary myelofibrosis: an international study of 570 patients. *Leukemia*. 2014;28:1494–500.
 113. Tefferi A, Lasho TL, Finke C, Belachew AA, Wassie EA, Ketterling RP, et al. Type 1 vs type 2 calreticulin mutations in primary myelofibrosis: differences in phenotype and prognostic impact. *Leukemia*. 2014 Jul 26;28(7):1568–70.
 114. Nangalia J, Green TR. The evolving genomic landscape of myeloproliferative neoplasms. *Hematology*. 2014;2014(1):287–96.
 115. Pronier E, Delhommeau F. Role of TET2 mutations in myeloproliferative

- neoplasms. *Curr Hematol Malig Rep*. 2012 Mar 28;7(1):57–64.
116. Abdel-Wahab O, Pardanani A, Rampal R, Lasho TL, Levine RL, Tefferi A. DNMT3A mutational analysis in primary myelofibrosis, chronic myelomonocytic leukemia and advanced phases of myeloproliferative neoplasms. *Leukemia*. 2011 Jul;25(7):1219–20.
117. Tefferi A, Lasho TL, Abdel-Wahab O, Guglielmelli P, Patel J, Caramazza D, et al. IDH1 and IDH2 mutation studies in 1473 patients with chronic-, fibrotic- or blast-phase essential thrombocythemia, polycythemia vera or myelofibrosis. *Leukemia*. 2010 Jul 27;24(7):1302–9.
118. Ernst T, Chase AJ, Score J, Hidalgo-Curtis CE, Bryant C, Jones A V, et al. Inactivating mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myeloid disorders. *Nat Genet*. 2010 Aug 4;42(8):722–6.
119. Katoh M. Functional and cancer genomics of ASXL family members. *Br J Cancer*. 2013 Jul 23;109(2):299–306.
120. Tong W, Zhang J, Lodish HF. Lnk inhibits erythropoiesis and Epo-dependent JAK2 activation and downstream signaling pathways. *Blood*. 2005 Jun 15;105(12):4604–12.
121. Bacher U, Haferlach C, Schnittger S, Kohlmann A, Kern W, Haferlach T. Mutations of the TET2 and CBL genes: novel molecular markers in myeloid malignancies. *Ann Hematol*. 2010 Jul 2;89(7):643–52.
122. Langabeer SE, Andrikovics H, Asp J, Bellosillo B, Carillo S, Haslam K, et al. Molecular diagnostics of myeloproliferative neoplasms. Vol. 95, *European Journal of Haematology*. 2015. p. 270–9.
123. Lu M, Hoffman R, Lu M, Hoffman R. p53 as a target in myeloproliferative neoplasms. *Oncotarget*. 2012 Sep 7;3(10):1052–3.
124. Ulusal Tez Merkezi .Tez No:450767
125. Ulusal Tez Merkezi .Tez No:412607
126. McNally RJ, Rowland D, Roman E, Cartwright RA. Age and sex distributions of hematological malignancies in the U.K. *Hematol Oncol*. 1997 Nov;15(4):173–89.
127. Al Assaf C, Van Obbergh F, Billiet J, Lierman E, Devos T, Graux C, et al. Analysis of phenotype and outcome in essential thrombocythemia with CALR or JAK2 mutations. *Haematologica*. 2015;100(7):893–7.

128. Andrikovics H, Krahling T, Balassa K, Halm G, Bors A, Koszarska M, et al. Distinct clinical characteristics of myeloproliferative neoplasms with calreticulin mutations. *Haematologica*. 2014 Jul;99(7):1184–90.
129. Rotunno G, Mannarelli C, Guglielmelli P, Pacilli A, Pancrazzi A, Pieri L, et al. Impact of calreticulin mutations on clinical and hematological phenotype and outcome in essential thrombocythemia on behalf of the Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro Gruppo Italiano Malattie Mieloproliferative Investigators. *Blood*. 2014;123(10):1552–5.
130. Kim BH, Cho YU, Bae MH, Jang S, Seo EJ, Chi HS, et al. JAK2 V617F, MPL, and CALR mutations in Korean patients with essential thrombocythemia and primary myelofibrosis. *J Korean Med Sci*. 2015;30(7):882–8.
131. Kim SY, Im K, Park SN, Kwon J, Kim JA, Lee DS. CALR, JAK2, and MPL mutation profiles in patients with four different subtypes of myeloproliferative neoplasms: Primary myelofibrosis, essential thrombocythemia, polycythemia vera, and myeloproliferative neoplasm, unclassifiable. *Am J Clin Pathol*. 2015 May 1;143(5):635–44.
132. Wu Z, Zhang X, Xu X, Chen Y, Hu T, Kang Z, et al. The mutation profile of JAK2 and CALR in Chinese Han patients with Philadelphia chromosome-negative myeloproliferative neoplasms. *J Hematol Oncol*. 2014;7(1):48.
133. Shen H, Chao H, Ding Z, Feng Y, Cen J, Pan J, et al. CALR and ASXL1 mutation analysis in 190 patients with essential thrombocythemia. *Leuk Lymphoma*. 2015 Mar 4;56(3):820–2.
134. Chen C-C, Gau J-P, Chou H-J, You J-Y, Huang C-E, Chen Y-Y, et al. Frequencies, clinical characteristics, and outcome of somatic CALR mutations in JAK2-unmutated essential thrombocythemia. *Ann Hematol*. 2014 Dec 13;93(12):2029–36.
135. Andrikovics H, Krahling T, Balassa K, Halm G, Bors A, Koszarska M, et al. Distinct clinical characteristics of myeloproliferative neoplasms with calreticulin mutations. *Haematologica*. 2014 Jul 1;99(7):1184–90.
136. Tefferi A, Lasho TL, Finke CM, Knudson RA, Ketterling R, Hanson CH, et al. CALR vs JAK2 vs MPL-mutated or triple-negative myelofibrosis: clinical, cytogenetic and molecular comparisons. *Leukemia*. 2014 Jul 9;28(7):1472–7.

137. Rumi E, Pietra D, Ferretti V, Klampfl T, Harutyunyan AS, Milosevic JD, et al. JAK2 or CALR mutation status defines subtypes of essential thrombocythemia with substantially different clinical course and outcomes. *Blood*. 2014;123(10):1544–51
138. Pietra D, Rumi E, Ferretti V V, Di Buduo CA, Milanese C, Cavalloni C, et al. Differential clinical effects of different mutation subtypes in CALR-mutant myeloproliferative neoplasms. *Leukemia*. 2015 Feb 9;30(October):1–8.
139. Pietra D, Rumi E, Ferretti V V, Di Buduo CA, Milanese C, Cavalloni C, et al. Differential clinical effects of different mutation subtypes in CALR-mutant myeloproliferative neoplasms. *Leukemia*. 2015;30(October):1–8.
140. Chen C-C, Gau J-P, Chou H-J, You J-Y, Huang C-E, Chen Y-Y, et al. Frequencies, clinical characteristics, and outcome of somatic CALR mutations in JAK2-unmutated essential thrombocythemia. *Ann Hematol*. 2014 Dec 13;93(12):2029–36.
141. Rozovski U, Verstovsek S, Manshour T, Dembitz V, Bozinovic K, Newberry K, et al. An accurate, simple prognostic model consisting of age, JAK2 , CALR , and MPL mutation status for patients with primary myelofibrosis. *Haematologica*. 2017 Jan;102(1):79–84.
142. Li B, Xu J, Wang J, Gale RP, Xu Z, Cui Y, et al. Calreticulin mutations in Chinese with primary myelofibrosis. *Haematologica*. 2014;99(11):1697–700.
143. Pietra D, Rumi E, Ferretti V V, Di Buduo CA, Milanese C, Cavalloni C, et al. Differential clinical effects of different mutation subtypes in CALR-mutant myeloproliferative neoplasms. *Leukemia*. 2015;30(October):1–8.
144. Vannucchi a M, Antonioli E, Guglielmelli P, Pardanani A, Tefferi A. Clinical correlates of JAK2V617F presence or allele burden in myeloproliferative neoplasms: a critical reappraisal. *Leuk Off J Leuk Soc Am Leuk Res Fund, UK*. 2008;22(May):1299–307.
145. Kittur J, Knudson RA, Lasho TL, Finke CM, Gangat N, Wolanskyj AP, et al. Clinical correlates of JAK2V617F allele burden in essential thrombocythemia. *Cancer*. 2007 Jun 1;109(11):2279–84.
146. Antonioli E, Guglielmelli P, Poli G, Bogani C, Pancrazzi A, Longo G, et al.

Influence of JAK2V617F allele burden on phenotype in essential thrombocythemia. *Haematologica*. 2007;93(1).

147. Carobbio A, Finazzi G, Antonioli E, Guglielmelli P, Vannucchi AM, Dellacasa CM, et al. JAK2V617F allele burden and thrombosis: a direct comparison in essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Exp Hematol*. 2009;37(9):1016–21.

