

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKULTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

PHILADELPHIA KROMOZOMU NEGATİF MYELOPROLİFERATİF
NEOPLAZİLERDE JAK-2 V617F MUTASYON YÜKÜNÜN PROGNOSTİK
FAKTÖRLERLE İLİŞKİSİ

UZMANLIK TEZİ

Dr. Nuh KAYA

TRABZON-2015

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKULTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

PHILADELPHIA KROMOZOMU NEGATİF MYELOPROLİFERATİF
NEOPLAZİLERDE JAK-2 V617F MUTASYON YÜKÜNÜN PROGNOSTİK
FAKTÖRLERLE İLİŞKİSİ

UZMANLIK TEZİ

Dr. Nuh KAYA

Danışman: Doç. Dr. Mustafa YILMAZ

TRABZON - 2015

ÖNSÖZ

Varlığıma vesile olan, hayatımın zorluklarında bana destek veren ve beni bugünlere getiren değerli anne ve babama, çocukluk aşkım, biricik sevgilim ve canım eşim Serap AKKUŞ KAYA'ya, gelişiyile evliliğimize anlam katan gözümün nuru kızım Hümeyra KAYA'ya, eğitimimde ve tezimde hiçbir zaman yardımlarını esirgemeyen hocam Doç. Dr. Mustafa YILMAZ'a, bana mesleğimi ve iç hastalıklarımı sevdiren Prof. Dr. Abdurrahman KADAYIFÇI ve Prof. Dr. Celalettin USALAN'a, beraber çalıştığım meslektaşlarıma ve çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Dr. Nuh KAYA

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No.</u>
ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER	iii
TABLO LİSTESİ	v
ŞEKİLLER LİSTESİ	vi
KISALTMALAR LİSTESİ	vii
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Miyeloproliferatif Hastalıklara Genel Bakış	2
2.1.1. Miyeloproliferatif Hastalıklar.	2
2.1.2. JAK2 V617F ve MPL Mutasyonları	4
2.2. Polistemia Vera	7
2.2.1. Epidemiyoloji	7
2.2.2. Klinik Özellikler	8
2.2.3. Prognoz	9
2.2.4. Tedavi	10
2.3. Esansiyel Trombositemi	11
2.3.1. Epidemiyoloji	11
2.3.2. Klinik Özellikler	11
2.3.3. Prognoz	12
2.3.4. Tedavi	12
2.4. Primer Miyelofibrozis	13
2.4.1. Epidemiyoloji	13
2.4.2. Klinik Özellikler	13
2.4.3. Prognoz	15
2.4.4. Tedavi	15
3. GEREÇ ve YÖNTEM	17

	iv
3.1. JAK-2 Geni V617F Mutasyonunun Belirlenmesi	20
3.1.1. DNA İzolasyonu	20
3.1.2. JAK-2 V617F Nokta Mutasyonunun Saptanması	21
3.2. İstatistiksel Analiz	22
4. BULGULAR	23
5. TARTIŞMA	32
6. SONUÇLAR	37
7. ÖZET	39
8. ABSTRACT	41
9. KAYNAKLAR	43



TABLULAR LİSTESİ

	<u>Sayfa No.</u>
Tablo 1. PV olgularında sitoreduktif tedavi seçenekleri	10
Tablo 2. PV olgularında risk sınıflaması	18
Tablo 3. PMF' de DIPSS-plus risk değerlendimesi	20
Tablo 4. Çalışmaya dahil edilen hastaların demografik özellikleri	23
Tablo 5. JAK-2 V617F gen mutasyon yükü ile yaş arasındaki ilişki	26
Tablo 6. PV hastalarında lökosit dağılımı ve trombosit sayısı	27
Tablo 7. ET hastalarında lökosit dağılımı ve trombosit sayısı	30
Tablo 8. PMF hastalarında lökosit dağılımı ve trombosit sayısı	31

ŞEKİLLER LİSTESİ

	<u>Sayfa No.</u>
Şekil 1. JAK-2 geninin yapısı	5
Şekil 2. JAK-STAT yolağı ve sinyal iletimi	5
Şekil 3. Çalışmaya dahil edilen hastaların dağılımı	23
Şekil 4. PV hastalarında JAK-2 V617F gen mutasyon yükü ile ≤ 60 ve >60 yaş grubu arasındaki fark	24
Şekil 5. ET hastalarında JAK-2 V617F gen mutasyon yükü ile ≤ 60 ve >60 yaş grubu arasındaki fark	25
Şekil 6. PMF hastalarında JAK-2 V617F gen mutasyon yükü ile ≤ 60 ve >60 yaş grubu arasındaki fark	26
Şekil 7. ET hastalarında JAK-2 V617F gen mutasyon yükü ile lökosit sayısı arasındaki ilişki	27
Şekil 8. ET hastalarında JAK-2 V617F gen mutasyon yükü ile nötrofil sayısı arasındaki ilişki	28
Şekil 9. ET hastalarında JAK-2 V617F gen mutasyon yükü ile bazofil sayısı arasındaki ilişki	29
Şekil 10. ET hastalarında JAK-2 V617F gen mutasyon yükü ile lenfosit sayısı arasındaki ilişki	30

KISALTMALAR LİSTESİ

allo-HKHN	: Allojenik hematopoietik kök hücre nakli
AML	: Akut Miyeloblastik Lösemi
BFU-E	: Burst forming unit-eritroid
BK	: Lökosit sayısı
CFU-E	: Colony forming unit-eritroid
c-MPL	: Trombopoietin reseptörü
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
EDTA	: Etilendiamin tetra asetik asit
EEC	: Endojen eritroid koloni
Epo	: Eritropoietin
ET	: Esansiyel trombositemi
FISH	: Floresan in situ hibridizasyon
GSIP	: Group Study Independent Projects
HM	: Hepatomegali
IFN- α	: İnterferon-alfa
IWG-MRT	: Uluslararası Myeloproliferatif Neoplazm Araştırma ve Tedavi grubu
JAK2	: Janus kinaz 2
JH	: Janus homoloji
KML	: Kronik miyeloid lösemi
MDS	: Miyelodisplastik sendrom
MPH	: Miyeloproliferatif hastalıklar
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
Ph	: Philedelphia
PMF	: Primer miyelofibrozis
PO	: Peri oral
PRV	: Polistemia rubra vera-1

PV	: Polistemia vera
PVSG	: Polistemia vera çalışma gurubu
rpm	: Devir/dakika
RT	: Reaktif trombositoz
SOCS	: Suppressors of Cytokine Signaling
STAT	: Signal Transducers and Activators of Transcription
TGF	: Transforming growth factor
TPO	: Trombopoietin
32P	: Radyoaktif fosfor



1. GİRİŞ ve AMAÇ

Miyeloproliferatif hastalıklar (MPH) miyeloeritroid hücrenin kemik iliğindeki kontrolsüz proliferasyonu ve periferik kanda matur ve immatur hücrelerin sayısının artmasıyla karakterize, akut lösemiye dönüşüm gösterebilen klonal hastalıklardır. Polistemi vera (PV), esansiyel trombositoz (ET) ve primer miyelofibrozis (PMF) bu hastalık grubundandır. Janus kinaz - 2 (JAK-2) V617F mutasyonunun keşfinden sonra MPH'ların sınıflaması ve tanı kriterleri değişmiş, tedaviye yönelik yeni ilaç geliştirilmesi için yoğun araştırmalar başlatılmıştır. Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) yeniden revize edilen kriterlerinde PV, ET ve PMF'nin tanısında JAK-2 V617F mutasyonu varlığı tanı kriterleri içine girmiştir.

Yapılan çalışmalarda; JAK-2 V617F gen mutasyon yükü ile Philadelphia kromozomu negatif myeloproliferatif hastalıkların tanı anındaki yaş, tromboz öyküsü, lökositoz, kaşıntı ve organomegali gibi bazı semptom ve bulguların ilişkisine değinilmektedir. Biz de çalışmamızda Philadelphia kromozomu negatif myeloproliferatif hastalıklar olarak takip ettiğimiz PMF, ET ve PV hastalarında JAK-2 V617F gen mutasyon yükünün prognostik faktörlerle ilişkisini araştırmayı amaçladık. Philadelphia kromozomu negatif myeloproliferatif hastalıklarda tedavi planı hastanın risk grubu temel alınarak yapılmaktadır. JAK-2 V617F gen mutasyon yükünün, hastalıkların risk grubu ile ilişkisinin saptanması hastalarda en uygun tedavi yaklaşımının seçilmesine olanak sağlayabilir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Miyeloproliferatif Hastalıklara Genel Bakış

2.1.1. Miyeloproliferatif Hastalıklar

Hematopoetik pluripotent kök hücre kendini yenileme ve farklılaşma özelliklerine sahiptir. Efektif bir hematopoez için büyüme faktörleri ve reseptör etkileşimlerinin sağlıklı olduğu mikro çevreye ihtiyaç vardır (1).

Hematolojik orjinli malign hastalıklar hücre yapısına göre lenfoid ve miyeloid, kemik iliğindeki blast (immatür prekürsör hücre) oranına göre akut ve kronik olmak üzere sınıflandırılır. Kronik miyeloid hastalıklar ise, dismiyelopoez göstermelerine göre miyelodisplastik sendromlar (MDS) ve MPH olarak tanımlanır (2).

MPH, MDS'lerin aksine periferik kanda farklılaşmanın son safhasında miyeloid hücre artışı ile karakterize olup, klasik ve atipik MPH'lar olmak üzere iki grupta tanımlanırlar. PV, ET, PMF ve kronik miyeloid lösemi (KML) klasik MPH'leri oluşturur. Atipik MPH'ler ise güncel olarak MDS veya MPH olarak tanımlanamamış hastalıkları içerir. Kronik miyelomonositik lösemi, juvenil miyelomonositik lösemi, sistemik mastositoz, hipereozinofilik sendrom, kronik eozinofilik lösemi, kronik bazofilik lösemi bunlardan bir kısmıdır (3).

Klasik miyeloproliferatif bozukluklar: Bu grup hastalıklar içerisinde yer alan KML, 9 ve 22 numaralı kromozomlar arasında karşılıklı parça değişimi t (9;22) ile karakterizedir. Bu değişimin sonucunda kısalmış 22'nci kromozom (philadelphia kromozomu) hastaların % 90-95'inde izlenir (4). Geride kalan hastalarda ise floresan in situ hibridizasyon (FISH) veya ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yardımıyla t (9;22) tesbit edilebilir (5). Bu gruptaki diğer hastalıklar; PV, ET ve PMF ise BCR/ABL negatif miyeloid bozukluklar olarak bilinmektedir (6, 7).

PV olgularının yaklaşık tümünde, ET ve PMF olgularının ise yaklaşık %50'sinde tespit edilen JAK-2 V617F mutasyonunun keşfi ile klasik MPH'lerin tanısıl kriterlerinde güncelleme gerçekleşmiştir (8, 9).

JAK-2 V617F mutasyonunun mevcudiyeti ve azalmış eritropoietin (Epo) seviyelerinin eşlik ettiği yüksek hematokrit değeri olan olgular PV tanısı alır (8, 9). ET, bir dışlama teşhisi olup; PV, KML, MDS veya PMF olarak tanımlanamayan bir olgudaki otonom, klonal trombositozu göstermektedir (6). PMF ise diğer bir MPH ile ilişkilendirilemeyen kemik iliği fibrozisi ile karakterizedir (10).

MPH'ler içerisinde artmış eritrosit kitlesi PV için spesifik olsa da, KML ve MDS olgularının, ET tanısı düşündürülen izole trombositoz veya PMF ile karışabilecek izole miyolefibroz ile prezente olmaları mümkündür. Bundan dolayı MPH tanısı düşünülen tüm hastalarda t (9;22) varlığını dışlamaya yönelik sitogenetik inceleme (KML) ve dismiyelopoez ayırıcı tanısı için (MDS) kemik iliği morfolojik incelemesi yapılmalıdır (7).

Klonal değişim ve malign dönüşüm MPH'ler için fatal bir komplikasyondur. AML'ye dönüşüm sıklığı MPH alt grupları arasında farklılık göstermektedir. Etkin bir tedavi yokluğunda KML hastaları için malign dönüşüm sıklığı %90 ve üzerinde saptanırken, ET için bu oran %5'in de altındadır (11).

Miyelofibrotik evreye dönüşüm MPH'lerin bir başka komplikasyonu olup, PV hastalarında 10 yıllık izlemde yaklaşık %10 riski vardır (12).

Trombohemorajik komplikasyonlar ise özellikle PV ve ET açısından belirgin risk oluşturan problemlerdir (13). Hemorajik episodlar genellikle hafif seyirli olup, spontan hemorajiler özellikle yüksek platelet sayıları olan hastada gerçekleşmektedir. Çünkü kalitatif platelet bozuklukları tabloya eşlik eder. Trombotik komplikasyonlar arteriyel ve venöz trombozlar olabileceği gibi görme bozukluğu, nörolojik semptomlar ve eritromelalji gibi mikrodolaşım bozuklukları olarak da gerçekleşebilir (13). Eritromelalji mikrovasküler alanda trombus oluşumları ve platelet tüketimi ile ilgili bir tablodur. Aspirin kullanımı ile semptomatik iyileşme ve kısalmış olan platelet ömründe uzama gerçekleşir. Aspirinin sağladığı bu yararın warfarin ve heparin ile elde edilememesi, prostaglandin sentez ürünlerinin patogeneizde rolü olduğunu düşündürür (14).

Blastik transformasyon ve tromboz ilişkili ölüm risklerinin MPH alt gruplarında farklılık göstermesi sebebiyle ortalama yaşam beklentisi ET hastalarında normale yakın iken, PMF için beş yıldan azdır (15).

Hemoraji, tromboz, AML'ye dönüşüm gibi major komplikasyonların yanı sıra MPH'ler hastaların yaşam kalitesini kısıtlayan semptomlara yol açmaktadır (16).

MPH'lerde hematopoietik büyüme faktörlerinin klonal prosesin gelişimine katkısı gösterilmemiştir. Bu nedenle; MPH'lar spontan (büyüme faktörüne ihtiyaç duymayan) hematopoietik koloni oluşumu ile karakterizedir (10).

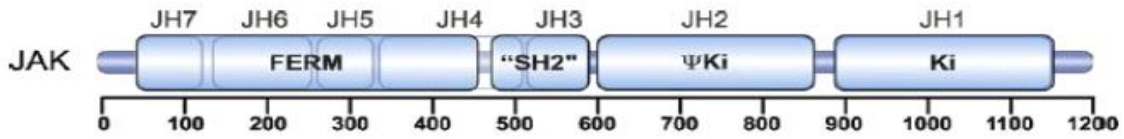
PV hastalarında Epo seviyeleri bariz olarak azalmıştır ve moleküler çalışmalar Epo reseptörü ile ilgili mutasyon ortaya koymamıştır. Bununla birlikte PV'de eritroid öncülerinde bcl-x (bir apoptoz inhibitörü) aşırı ekspresyonunun gösterilmesi bu hücrelerin Epo yokluğundaki otonom çoğalmalarına açıklık getirebilmektedir (17).

ET'de gerek trombopoietin (TPO), gerekse TPO reseptörü (c-MPL) için klonal prosesin TPO'dan bağımsız olduğunu işaret eden moleküler lezyonlar tanımlanabilmiş değildir (18). Bununla beraber ET hastalarında serum TPO düzeylerinin normal veya normalden yüksek düzeyde bulunması feedback mekanizmasının bozuk olduğunu düşündürmektedir (19). Bu gözlemler uyumlu olarak ET hastalarında platelet ve megakaryositlerde TPO reseptör ekspresyonu azalmıştır (7). Platelet ve megakaryositlerde TPO reseptör ekspresyonu PV'de de bariz olarak azalmıştır. Yani bu hastalıkta da platelet çoğalması ET'de olduğu gibi TPO'dan bağımsızdır (20).

2.1.2. JAK-2 V617F ve MPL Mutasyonları

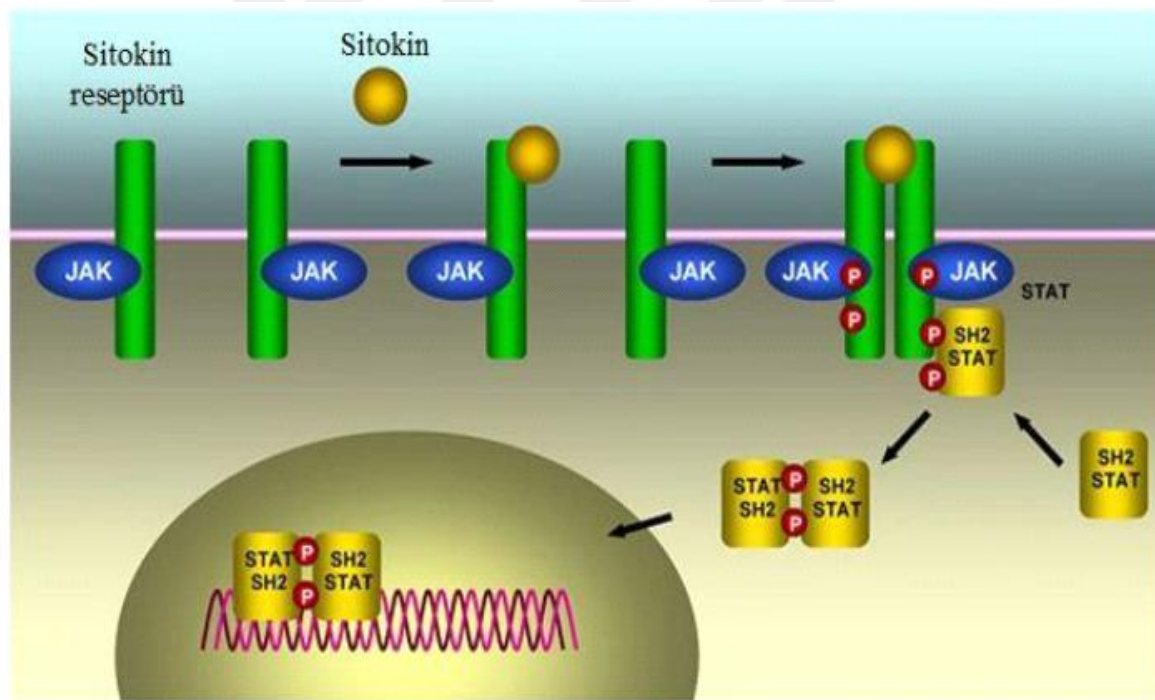
Hematopoietik hücreler; farklılaşma, büyüme ve süreklilik için büyüme faktörlerine ihtiyaç duyarlar. Bu büyüme faktörleri kendilerine ait reseptörlere bağlanarak, bir çeşit protein kinaz ailesi üyesi olan JAK aktivasyonuna ve hücre içi sinyal iletimine sebep olurlar (21, 22). JAK ailesi, sitokin aracılı sinyal üretiminde görev alıp hücre içi reseptörü olmayan bir grup tirozin kinazın ismidir. Bu aktivasyondan sonra "Signal Transducers and Activators of Transcription" (STAT) adı verilen transkripsiyon faktörleri devreye girer. Bu yolağa JAK-STAT yolağı adı verilir. Bu yolak hematopoietik hücrelerin bölünmesi, farklılaşması ve apoptozisin düzenlenmesi için önemlidir. İnflamasyonda da görev almaktadırlar (23, 24).

JAK ailesi şu ana kadar tanımlanan dört üyeden oluşmaktadır. Bunlar JAK-1, JAK-2, JAK-3 ve Tirozin Kinaz 2'dir. JAK ailesi üyeleri farklı kromozomal yerleşime sahiptir. JAK' lar büyük proteinler olup, 1000'den fazla aminoasit içerirler (25).



Şekil 1. JAK geninin yapısı (26)

JAK' lar sitokin reseptörlerinin sinyal üretimini düzenlerler. Hücre yüzeyindeki sitokin reseptörlerine tutunan JAK enzimleri, sitokinin reseptör glandına bağlanmasıyla beraber fosforile hale gelir ve reseptör dimerizasyona uğrar. JAK fosforile olduğu zaman aktive olur. Aktive JAK - reseptör kompleksi, substrat molekülü ve transkripsiyon faktörü olan STAT'ları fosforile ederek aktifleşmelerine sebep olur. Aktive STAT dimerleri nükleusa hareket eder, sitokine cevap veren ilgili genin promotor bölgesindeki özel DNA dizilerine bağlanır ve gen transkripsiyonunu aktive ederler (27, 28).



Şekil 2. JAK-STAT yolağı ve sinyal iletimi (29)

JAK-2; Epo, TPO, interleukin-3 (IL-3), G-CSF, prolaktin, leptin, interferon alfa (IFN-a), gama ve beta gibi reseptörler üzerinden sinyal iletiminde rol oynarlar (30,31). Epo reseptörünün önemli bir sinyal ileticisidir. Epo; reseptörüne bağlanarak JAK'ın fosforillenmesini ve aktive JAK'ın intrasellüler sinyal kaskadını başlatmasını sağlar (32).

JAK-2 V617F Mutasyonu ve Sinyal İletimine Etkisi

JAK-2 bir sitoplazmik fosfotirozinkinazdır. Yapısında birbirine benzer iki kinaz domaini bulundurur: Fonksiyonel olan JAK homoloji 1 (JH1) ve kinaz aktivitesi olmayan JAK homoloji 2 (JH2) domainidir. JAK' lar bu iki bölge içeren yapıları nedeniyle eski Roma tanrısı olan, ikiyüzlü Janus'dan esinlenerek isimlendirilmiştir. JH1 domaini aktif bir tirozin kinaz domaini iken, hemen yakınında olan JH2 domaini, katalitik olarak inaktiftir ve bu nedenle pseudokinaz adını alır (33, 34).

JAK-2 V617F mutasyonu; JAK-2'nin pseudokinaz parçasının (JH2) 617. kodonunda bulunan valinin, fenilalanin ile yer değiştirmesidir. PV hastalarında bu mutasyon yüzdesi yaklaşık %90-95 arasındadır (35). İnaktif durumda bulunan JH2, bu mutasyonla beraber aktifleşir ve artmış JAK-2 aktivitesine neden olur. Bu yüzden JAK-2 V617F'in JH2 parçasının normal şartlar altında, tirozin kinaz özelliği gösteren ve aktif olan JH1 bölgesini baskıladığı düşünülür. JH2 bölgesindeki bu mutasyon sonucunda JH1 bölgesinin üzerindeki inhibisyon ortadan kalkar ve devamlı tirozin kinaz aktivitesi meydana gelir (36). JAK-2 V617F mutasyonu, tirozin kinaz aktivitesini arttırmakta ve hücrelerde aşırı Epo duyarlılığı yaratmaktadır. Deneysel olarak farelere JAK-2 V617F mutasyonu içeren kemik iliği hücreleri verildiğinde PV fenotipi geliştiği görülmüştür (37). EPO reseptörü (EpoR) taşıyan Ba/F3 (insan kemik iliğinden elde edilmiş hücreler) hücrelerinde JAK-2 V617F mutasyonu oluşturulduğunda ise; hücrelerin Epo'dan bağımsız olarak bölündüğü ve hücrelerin eritropoietine aşırı duyarlılığa sahip olduğu görülmüştür (38). EpoR tıpkı JAK-2 V617F gibi, homodimerik tip 1 sitokin reseptörüdür. EpoR'a benzer olarak JAK-2 V617F'nin hematopoietik hücrelerin sitokinden bağımsız olarak bölünebildiği, çünkü JAK-STAT sinyal ileti yolağını aktive ettiği gözlenmiştir (36).

JAK-2 V617F mutasyonu hücre içi transkripsiyon faktörleri üzerinde de etkilidir. Bu transkripsiyon faktörleri başlıca STAT5, STAT3, MAP kinazdır (39,40). Bu faktörlerden STAT5; prolaktin, Epo, granülosit-makrofaj stimüle edici faktör (GM-CSF), trombopoietin, IL-2, 3, 5, 6 ile aktive olur (32). Aktive olan STAT5 daha sonra fosforile olarak ilgili gen transkripsiyonuna neden olur. STAT5 hedef genleri arasında PV'de de önemi gösterilen apopitoz inhibitörü Bcl-X vardır (35). Son çalışmalarda hematopoietik öncül hücrelerde STAT5 ve Bcl-X aktivasyonunun endojen eritroid koloni formasyonuna (EEC) yol açtığı görülmektedir (41).

JAK-2 V617F mutasyonunun keşfi ile myeloproliferatif hastalıkların patogenezi önemli ölçüde aydınlatılmıştır (30). Fakat bir kısım hastada ise JAK-2 V617F mutasyonu negatiftir ve bu hastalarda patogenez tam aydınlatılamamıştır. Yapılan çalışmalarda MPL (Myeloproliferative Leukemia Virus) geninde triptofan-lösin yer değiştirmesi sonucu oluşan MPLW515L mutasyonu, yine 515. kodonda triptofan ile lizin yer değiştirmesi sonucu oluşan MPLW515K mutasyonları bulunmuştur (42, 43). Bu mutasyonlar JAK-2 V617F mutasyonu negatif olan PMF hastaların yaklaşık %10'unda, ET ve PV hastalarının çok az bir kısmında görülmüştür. JAK-2 V617F mutasyonu negatif olan ET ve PMF'li hastalarda JAK-2 exon 12 mutasyonu gösterilmiştir. İlginç olarak; hem JAK-2 V617F, hem MPL negatif olan ET ve PMF'li hastalar bulunmaktadır. JAK-STAT sinyal yolunun diğer genleri üzerinde yapılan taramalar ve yeni araştırmalar PV, ET ve PMF için yeni hastalık genlerini ortaya çıkarabilir (44).

2.2. Polistemia Vera

2.2.1. Epidemiyoloji

PV başta kırmızı kan hücreleri olmak üzere her üç hematopoietik hücre serisinin aşırı üretimi ile karakterize, edinilmiş miyeloproliferatif bir bozukluktur. Hastalığa neden olan mutasyon sonucu hematopoietik kök hücre zamanla baskın miyeloid öncül hücre haline gelmektedir (45).

PV genellikle altıncı dekatta ortaya çıkan sinsi bir hastalıktır (45). Hastaların yaklaşık olarak %60'ı erkektir (46). Minnesota'da yapılan bir çalışmada PV insidansı 1,9 olgu/100.000 popülasyon/yıl olarak bildirilmiştir (46). Ortalama yaşam beklentisi tedavi edilmeyen olgularda 6-18 ay, tedavi ile 11-15 yıl olarak saptanmıştır (47).

PV, klinik olarak diğer MPH, kırmızı hücre kitlesindeki belirgin artış ile ayrılır. Ancak kırmızı hücre kitlesindeki artış tek başına PV tanısı için yeterli değildir, çünkü bu bulgu kronik hipoksi ile ilişkili olan birçok durum ve nadiren de olsa Epo salgılayan tümörlerde de görülmektedir (45).

PV hastalarının kemik iliği örneklerinden elde edilen kolonilerde normal Epo duyarlılığı olan "burst forming unit-eritroid" (BFU-E) kolonilerinin yanı sıra Epo olmadan da çoğalan koloniler gösterilmiştir. Bununla beraber PV olgularında trombositlerde TPO reseptör seviyesinde azalma, Bcl-x (bir apoptoz inhibitörü) regülasyon bozukluğu, eritrosit

öncülerinde (BFU-E, colony forming unit-erythroidCFU-E) protein tirozin fosfataz ekspresyonu artışı, periferik kan granulositlerinde polistemia rubra vera (PRV)-1 geni aşırı ekspresyonu, 9p kromozomunda heterozigosite kaybı gibi anormallikler de tanımlanmıştır (45).

Son yıllarda Philedelphia kromozomu negatif [Ph (-)] kronik MPH'larda JAK-2 V617F mutasyonunun tespit edilmesi PV patogenezi açısından önemli bir buluş oldu. Hastalığın progresyonu ile kemik iliğinde gözlenen fibroblast birikimi ise anormal klonun bir parçası olmayıp, muhtemelen çoğalan megakaryositlerin ürettiği “platelet derived fibroblast growth factor (PDGF)” etkisine bağlıdır (45).

2.2.2. Klinik Özellikler

Baş ağrısı, halsizlik, kaşıntı, baş dönmesi, kulak çınlaması, terleme PV'de sık karşılaşılan yakınmalardır. Bunun yanında bazı PV hastaları asemptomatik olup, herhangi bir nedenle tam kan sayımı yapıldığında rastlantısal olarak hematokrit yüksekliği saptanması sonrasında tanı alır (45).

PV'de yaklaşık üç olgudan birinde gözlenen trombotik olaylar bu hastalar için major mortalite ve morbidite nedenidir (45). Trombotik olayların sık olması artmış serum viskozitesi ve trombositoz ile ilişkilidir. Daha çok arteriyel olmakla beraber venöz sistemde de görülen trombotik olaylar sıklık sırasına göre; kalıcı serebral iskemi, geçici iskemik atak, miyokard enfarktüsü, derin ven trombozu, pulmoner tromboemboli ve Budd-Chiari sendromudur (48, 49). Hiperviskoziteye bağlı oluşan anjina pektoris ve nörolojik bulguların sorgulanması önemlidir (45). Tromboz ile çelişkili gibi görünmekle birlikte, kalitatif trombosit bozukluğu ve peptik ülser hastalığının artmış insidansı PV olgularında gastrointestinal hemoraji ile kliniğe yansıyabilmektedir (45).

Bazı hastalar için özellikle sıcak bir banyodan sonrası görülen kaşıntı ön plandaki semptom olabilir. Hastaların yaklaşık olarak % 40 kadarında kaşıntı yakınması mevcuttur. Bu durumun sebebi olarak bazofil sayısındaki artışa sekonder histamin salınımı düşünülmektedir (50).

El ve ayaklarda kızarıklık ve morarmanın eşlik ettiği ağrı ve yanma hissi olarak belirtilen ve vazomotor bir bozukluk olan eritromelalji ET kliniğinde daha sık karşılaşılan bir bulgu olmakla beraber, özellikle trombosit sayısının yüksek seyrettiği PV olgularında da görülebilmektedir (45).

PV'de sık karşılaşılan fizik muayene bulguları olarak plethora, splenomegali ve hepatomegali dikkati çeker. Sırasıyla bu üç bulgu, PV çalışma gurubunun (PVSG) verilerine göre % 70, % 67 ve % 40 oranlarında izlenmektedir (45). Serum viskozitesindeki artış kan basıncında artışa sebep olabilir. Daha nadir rastlanan bulgular ise kaşıntı nedeniyle deride oluşan lezyonlar, eski trombotik olaylara bağlı olan cilt üzerindeki lekelenmeler, optik fundus venlerinde tıkanmalar ve gut artriti olarak bildirilmektedir (45).

PV'de eritrosit morfolojisi normaldir. Bununla birlikte demir eksikliğinin eşlik ettiği olgularda hipokromi, mikrositoz ve poikilositoz izlenir. Demir eksikliği; demirin artmış eritrosit kitlesine transferi, gastrointestinal sistemden kronik hemoraji ve hiperviskozite nedeniyle uygulanan flebotomilere sekonderdir. Postpolistemik miyeloid metaplazi fazında ise belirgin anizopoikilositoz ve gözyaşı damlası şeklinde eritrositler gözlenir (45).

PV'de nötrofil hastaların çoğunda mevcut olup, lökosit sayısı genellikle 10-20 x10³/µL aralığındadır. Beyaz küre morfolojisi sıklıkla normal olmakla birlikte seyrek olarak gözlenen miyelosit ve metamiyelositlere hastalığın ileri safhalarında daha sık rastlanır. Lökosit alkalen fosfataz düzeyi artmıştır (45). Lökositozun PV ilişkili tromboz için önemli bir faktör olduğunu belirtilmiştir (51). Bazofili ve eosinofili genellikle eşlik eder (45).

Eritrositozu olan hastanın ilk değerlendirmesinde serum Eritropoietin (Epo) düzeyi ölçümü her ne kadar önemli olsa da PV tanısını doğrulamada serum Epo düzeyini normal veya düşük bulunması tek başına yeterli değildir. Bununla birlikte serum Epo düzeyinin yüksek saptanması halinde (Epo >5IU/L) eritrositoz PV'ye değil, sekonder bir nedene bağlıdır. Bu sebeple, serum Epo düzeyinin ölçümü primer polistemilerin prototipi olan bu hastalığın dışlanmasında çok önemlidir. Güncel tanısal sınıflamalar Epo seviyesi düşüklüğünü minör kriter olarak tanımlar (9, 52, 53).

2.2.3. Prognoz

PV tanısı olan ve tedavi edilmeyen semptomatik hastaların ortalama sağkalım süresi 6 ile 18 ay arasında tahmin edilirken, tedavi ile bu süre 10 yılın üzerine çıkmaktadır (47). Yaş ve cins açılarından uyumlu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, tedavi gören hastalar için toplam mortalite riski 1,6 kat artmakta ve olası nedenler içinde kardiyovasküler ölümler başı çekmektedir (53, 54). PV, tedavi ile yaşam beklentisi normal

olmasa bile normale yakın olan bir hastalıktır. Ölüm sebepleri arasında tromboz % 29 ile ilk sırada bulunurken, hematolojik malignansiler % 23, hematolojik olmayan malignansiler % 16, hemorajiler % 7 ve miyelofibroz gelişimi % 3 olarak kaydedilmiştir (45).

Trombotik olaylar temel olarak hiperviskozite sebebiyledir (54). Başta akut koroner sendrom ve serebrovasküler olay olmak üzere, derin ven trombozu, pulmoner embolizm, hepatik ven trombozu gibi komplikasyonlar görülebilir (45). Klinik çalışmalar ileri yaş (> 60 yıl) ve geçirilmiş tromboz öyküsünün kardiyovasküler olay gelişimi için risk faktörü olabileceğini ortaya koymuştur (47, 52).

2.2.4. Tedavi

PV'de tedavi uygulanırken hastanın semptomlarının ortadan kaldırılması, uzun dönem komplikasyonların (trombotik olaylar, kanama, miyelofibroz, akut lösemi ve diğer maligniteler) önlenmesi amaçlanır (55). Bundan dolayı uygulanacak tedavi planı tromboz risk grubuna göre belirlenir (59).

P.Vera ile ilişkili prognostik faktörler gereç ve yöntem bölümünde belirtilmiştir.

Flebotomi: Hematokrit seviyesi erkekler için % 45, kadınlar için ise % 42 seviyelerinin altında tutacak şekilde flebotomi sıklığı ayarlanmalıdır (57).

Aspirin: Aspirin 75-100 mg/gün, kontrendike olmadıkça, tüm PV hastalarına başlanmalıdır (56).

Sitoredüksiyon: Yüksek risk grubu hastalarda kullanılır (58)

Tablo 1. Polisitemia vera olgularında sitoredüktif tedavi seçenekleri (58)

	1.BASAMAK	2.BASAMAK	3.BASAMAK
<60 yaş	İnterferon/Hidroksiüre	Hidroksiüre	Anagrelide
60-75 yaş	Hidroksiüre	İnterferon	Anagrelide
>75 yaş	Hidroksiüre	Kombine (Hidroksiüre+anagrelide veya interferon)	Busulfan

2.3. Esansiyel Trombositemi

2.3.1. Epidemiyoloji

ET, reaktif trombositoz (RT) ve kronik miyeloid bozuklukların varlığının dışlanması ile tanı konulabilir (6).

Epidemiyolojik çalışmalarda ET'nin yıllık insidansı 100,000 popülasyonda 2,5 yeni vaka olarak saptanmıştır (59). Ortalama tanı yaşı 60 olup kadın hastaların sayısı erkek hastaların sayısından yaklaşık iki kat daha fazladır (60). On yıllık sağ kalım süresi % 61-84 olarak belirtilmiştir ki bu da normal veya normale yakın bir yaşam beklentisi demektir (61, 62).

Gerek trombopoietinin (TPO), gerek trombopoietin reseptörünün (c-Mpl) ET patogeneziğine katkısı gösterilebilmiş değildir (62). Buna karşın ailesel otozomal dominant ET'de TPO veya c-Mpl genlerindeki aktive edici mutasyonlar TPO ilişkili trombositozu neden olmaktadır (7). ET hastalarında serum TPO seviyeleri beklenmedik şekilde normal veya yüksek izlenmiştir (63). Kemik iliğindeki stromal üretim artışının bu durumu açıklık getirebilmesi mümkündür (60).

2.3.2. Klinik Özellikler

ET hastalarının yaklaşık yarısı asemptomatik iken diğer yarısı vazomotor semptomlar veya trombohemorajik komplikasyonlar göstermektedir. Vazomotor semptomlar; baş ağrısı, baş dönmesi, senkop, atipik göğüs ağrısı, akral paresteziler, livedo retikularis, eritromelalji ve geçici vizuel bozukluklar olarak sayılabilir (7, 64).

ET'de miyeloid metaplazili myelofibroza ve polistemia veraya dönüşebilir (64). PMF'ye dönüşüm insidansı daha yüksektir (65, 66). AML'ye dönüşüm de olasıdır. Retrospektif çalışmalarda 3-7 yıllık izlemde % 0,6-5 oranında lösemik dönüşüm rapor edilmiştir (7, 62, 65). Bu hastaların büyük çoğunluğunda birden fazla ajanla sitoreduktif tedavi uygulanma öyküsü dikkati çekmektedir (64).

ET'nin en önemli fizik muayene bulgusu hastaların % 25-48'inde saptanan splenomegalidir (7). PMF'ye dönüşüm durumunda ise splenomegali kaçınılmazdır. Hepatomegali ve lenfadenopati nadir bulgulardır (64).

2.3.3. Prognoz

ET tanısı olan hastaların çoğu hastalık ilişkili komplikasyonlar olmaksızın normal bir yaşam beklentisine sahiptir (60, 67). AML veya miyelofibroz gelişimi nadir bir durumdur (64).

ET için trombotik komplikasyonlar hemorajik komplikasyonlardan çok daha önemlidir. Vaka-kontrol tasarımlı bir çalışmada trombotik olaylar ET hastalarında % 6,6/hasta-yıl, kontrol grubunda ise % 1,2/hasta-yıl olarak saptanmıştır (68). Bu hasta grubunda tromboz için risk faktörleri 60 yaşın üzerinde olmak, tromboz öyküsü ve uzun süreli trombositozdur. Hastalığın tüm klinik seyri sırasında majör kanama gelişimi % 5'in altındadır ve trombosit sayıları 1 milyon/ μ L'nin altında seyrettiği sürece düşük doz aspirin (81 mg/gün) kullanımı bu riski artırmamaktadır (63, 68-69). Lökositozun trombotik komplikasyonlar için bağımsız bir risk faktörü olduğu da vurgulanmaktadır (69).

ET hastalarının büyük çoğunluğu normal bir yaşam süresine sahiptir. Bununla birlikte, oluşabilecek bazı komplikasyonlar tedavi endikasyonu oluşturur (7). En sık vazomotor komplikasyonlar görülür ve bunların çoğu düşük doz aspirin (40-81 mg/gün PO) kullanımı ile kontrol altına alınabilir (70). ET hastalarının % 20 kadarının trombotik olaylar ile prezente olduğunu göstermektedir (70, 71). Düşük risk grubundaki hastalarda trombotik olaylarla çok nadiren karşılaşılır. Bu nedenle potansiyel zararları bulunan ilaçların kullanımı uygun görülmemektedir (71).

ET ile ilişkili prognostik faktörler gereç ve yöntem kısmında belirtilmiştir.

2.3.4. Tedavi

Tüm hastalar ET ile ilişkili tromboz riski açısından değerlendirilir. Sigara, hipertansiyon, diyabet, hiperlipidemi, obezite gibi diğer risk faktörleri belirlenir ve tedavi edilir (72, 73).

ET hastaların tedavisinde aspirin (75-100 mg/gün), hidroksiüre (15 mg/kg/gün), anagrelid (başlangıç dozu günde 1,5 mg 3 bölünmüş doz halinde olup, 1-4 mg/gün dozlarda idame yapılır) kullanılır (7).

2.4. Primer Miyelofibrozis

2.4.1. Epidemiyoloji

PMF miyeloid hücrelerin değişken morfolojik maturasyonu ve klonal proliferasyonu ile karakterize bir MPH'dir (76,15). PMF, MPH'lar arasında en nadir rastlanılanı olup, Minnesota'da yapılan bir çalışmada sıklığı 100,000'de 1,5 vaka/yıl olarak bildirilmiştir. Genellikle orta yaş üzeri erkeklerde görülen bir hastalıktır (75).

2.4.2. Klinik Özellikler

PMF'de en sık rastlanan semptom hastaların % 50-70'inde görülen şiddetli halsizliktir (76, 77). Olguların % 25-30 kadarı asemptomatiktir. Bazı hastalar ise (%5-20), kilo kaybı, ateş ve gece terlemesi gibi hipermetabolik duruma işaret eden semptomlara sahiptir (5, 78). Asemptomatik olgular genellikle splenomegali, hepatomegali veya anormal kan sayımı nedeniyle incelenirken tanı almaktadır. PMF'deki karaciğer ve dalak büyümesine ekstramedüller hematopoez yol açar (5). Splenomegali PMF'nin en önemli klinik bulgusu olarak karşımıza çıkar ve hastaların % 90'dan fazlasında mevcuttur (75). Dalak bazı olgularda pelvik bölgeye kadar uzanım gösterecek oranda büyüebilir, dalağın sağ kenarı orta hattı karşıya geçebilir. Splenomegali splanknik akım artışına, ekstramedüller hematopoez ise intrahepatik obstruksiyona neden olarak portal hipertansiyona yol açabilir. Assit, özofageal ve gastrik varisler, gastrointestinal kanama, hepatik ensefalopati ve portal venöz tromboz portal hipertansiyonun komplikasyonları olarak sayılabilir. Hepatomegali ise hastaların % 40- 70'inde mevcuttur (5).

PMF'de hemen her organda ekstramedüller hematopoez odakları gelişebilir (5). Organ tutulumları, splenomegali, hepatomegali, lenfadenopati, plevral, perikardiyal veya abdominal efüzyonlar veya disüri ve solunum sıkıntısı gibi semptom ve bulgulara yol açan genitoüriner ve akciğer tutulumları şeklinde olabilmektedir (79). Merkezi sinir sistemi tutulması durumunda intrakraniyal basınç artışı ve sensorimotor kayıplar gelişmesi olasıdır (65). Cilt tutulumu ise eritamatöz plaklar, nodüller, ülser ve büller şeklinde izlenebilen nadir bir tablodur (80).

PMF'ye iskelet sistemi değişiklikleri eşlik edebilir. Bu bozukluklar asemptomatik olabileceği gibi, ağrılı kemik ve eklem tutulumları, özellikle de alt ekstremitelere ağrı, hassasiyet, ısı artışı semptomları bulunabilir.

Anemi PMF'nin en önemli laboratuvar bulgusu olarak ortaya çıkar. Hastaların yaklaşık yarısında hemoglobinin 10g/dl'nin altındadır (76). Anemi sebepleri arasında; kemik iliğindeki eritropoietik alanların azalması, inefektif eritropoez, dolaşımdaki eritrositlerin dalaktaki sekestrasyonu, trombositopeniye veya portal hipertansiyona bağlı gelişen kanamalar, otoimmün hemoliz, dilusyonel anemi, trombopoietin mutasyonlarının (MPL) etkisi gibi durumlar sayılabilir (81). Anemi başlangıcından sonra hastaların çoğunda tekrarlayan eritrosit transfüzyonlarına gereksinim ortaya çıkar. Periferik kan yaymasında anizositoz, poikilositoz, göz yaşı hücreleri (dakrositler) görülmektedir (5).

PMF'de tanı anında belirgin lökositoz (>30,000/ μ L) ve trombositoz (platelet sayısı >500,000/ μ L) olabileceği gibi, lökopeni ve trombositopeni de görülebilir (76).

Kemik iliği fibrozu hastalığının temel özelliği olsa da kemik iliği yaygın fibrotik değişim göstermeyebilir. Kemik iliği değerlendirilmesi direkt aspirasyon, biopsi yöntemi ile olabileceği gibi, manyetik rezonans görüntüleme (MRI) veya sintigrafik inceleme ile de yapılabilir. PMF'de kemik iliğini aspire etmek oldukça güçtür ve işlem genellikle "dry tap" ile sonuçlanır. Aspirasyon yapılabilirse dahi vereceği sonuçlar tanısal olmayabilir. En sık karşılaşılan bulgular nötrofilik ve megakaryositik hiperplazi şeklindedir. Megakaryositlerde morfolojik bozukluklar, nötrofillerde hiperlobulasyon görülür (5).

Kemik iliği biopsisi fibrozisin gösterilmesi için gereklidir. Fibroz atipik megakaryositik hiperplazi ile ilişkilidir. Retikülin lifler gümüş boyamaya, matür kollagen trikrom boyamadan daha çok yanıt verir. Kemik iliği sinuzoidleri genişlemiştir ve intravasküler hematopoiezis mevcuttur. Kemik trabeküler yapısında düzensizlik ve kalınlaşma (osteosklerozis) meydana gelir. Bazı hastalarda kemik iliği incelemesi fibrozis olmaksızın belirgin hipersellüler yapı gösterir (5).

Akut lösemi daha önce alkilleyici ajanlar veya radyasyon ile tedavi uygulanmamış PMF hastalarının çok az bir kısmında gelişen terminal bir komplikasyondur. Lösemik dönüşümlerin hemen tamamı miyeloid olsa da nadiren lenfoid, eritroid, megakaryositik dönüşümler olabilmektedir. Lösemik blastların fokal odaklar oluşturması da (kloroma veya granulositik sarkom) mümkündür (81).

2.4.3. Prognoz

PMF hastalarının çoğu anemi, belirgin splenomegali, erken doyma halsizlik, ateş, gece terlemesi ve kilo kaybı gibi hiperkatabolik semptomlarla baş vurur. Klinik seyirde hastaların çoğunda sık eritrosit transfüzyonu gerektiren şiddetli anemi ortaya çıkar. Gerek masif splenomegali, gerekse intrahepatik obstruksiyona bağlı portal hipertansiyon gelişebilir. Bazı hastalarda spinal kolon etrafında, plevral ve peritoneal alanda ekstramedüller hematopoez gelişimi kord basısı, plörezi ve assite yol açabilir (5).

PMF ile ilişkili prognostik faktörler gereç ve yöntem kısmında belirtilmiştir.

2.4.4. Tedavi

PMF’de sitoredüktif tedavi (58)

Klonal miyeloproliferasyon ve miyeloid metaplazi ile ilişkili hipermetabolik semptomların (halsizlik, iştahsızlık, kilo kaybı, gece terlemesi) varlığında sitoredüktif tedaviye başlanır.

Transplantasyon adayı olmayan PMF hastalarında ilk basamak tedavide HU önerilmektedir.

Transplantasyon adayı olabilecek hiperproliferatif evredeki PMF, PV ve ET sonrası miyelofibrozun tedavisinde de IFN önerilmektedir.

Diğer konvansiyonel sitoredüktif ajanlara dirençli semptomatik hastalarda (özellikle splenektomi sonrasında) 2-klorodeoksiadenozin önerilmektedir. Konvansiyonel sitoredüktif ajanları kaldıramayan semptomatik trombositozlu hastalarda anagrelide önerilmektedir.

PMF’de anemi tedavisi (58)

Öncelikle demir, folik asit ve vitamin B12 eksiklikleri dışlanmalıdır. Özellikle orta derecede splenomegalili ve normal sitogenetiği olan hastalarda androjen tedavisine iyi yanıt (%40 civarında) alınmaktadır. Bu nedenle danazol PMF’de aneminin tedavisinde ilk basamakta önerilmektedir.

Glukokortikoidler; Coombs pozitif hemolitik anemi tedavisinde, immün hemoliz bulgusu olmayan bazı anemili hastalarda da faydalı olabilir.

Danazol'a yanıt vermeyen veya danazol kullanımının uygun olmadığı hastalarda aneminin tedavisinde eritropoetin kullanılması önerilmektedir.

Danazol veya eritropoetin tedavilerine yanıt vermeyen hastalarda düşük doz talidomid (50 mg/gün) + prednizolon tedavisi önerilmektedir.

Del 5q taşıyan nadir hastalarda lenalidomid düşünülmelidir.

Splenektomi (58)

Dekompanse koagülopatisi ve eşlik eden ciddi kronik hastalıkları olan olgular dışında splenektomi aşağıdaki durumlarda yapılabilirse de sağkalıma olumlu etkisi, gösterilememiştir:

- Narkotik analjezik kullanımını gerektiren ağrılı splenomegali
- Hipersplenizm ile ilişkilendirilen ağır sitopenilerin varlığı
- Allogeneik kök hücre nakli öncesinde engraftmanı kolaylaştırmak amacıyla

Radyoterapi (58)

Dalak ışınlanması semptomatik splenomegalisi olan, konvansiyonel sitoredüktif tedaviye dirençli ve splenektomi adayı olmayan yaşlı hastalarda düşünülmelidir.

Akciğer ışınlanması, miyeloid metaplazi sonucu oluşan pulmoner hipertansiyona bağlı semptomları hafifletmek için kullanılabilir.

Diğer bölgelerdeki miyeloid metaplaziye bağlı semptomlar düşük doz radyoterapi ile azaltılabilir.

PMF'de allo-HKHN Endikasyonları (58)

Miyeloablative veya azaltılmış yoğunluklu hazırlama rejimleri ile yapılan allo-HKHN yüksek riskli genç (<40 yaş) hastalarda uygulanabilir.

Düşük yoğunluklu hazırlama rejimi ile transplantasyon; biyolojik yaşı 40-65 arasında olan, tanı sırasında veya hastalığın seyri esnasında yüksek risk bulguları olan hastalarda düşünülmelidir. Nakil tipi ve yaş sınırları merkezin deneyimine göre değiştirilebilir.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Karadeniz Teknik Üniveristesi Tıp Fakültesi Hematoloji Bilim Dalı Polikliniğinde Ocak 2011 ile Şubat 2015 tarihleri arasında değerlendirilen ve 2008 DSÖ kriterlerine göre tanı alan 63 ET, 30 PV ve 6 PMF olmak üzere 99 hasta çalışmaya dahil edildi.

Çalışmada hastaların adı, soyadı, protokol numarası, yaş, cinsiyet, fizik muayene bulguları, tanıdaki laboratuvar değerleri, abdomenin ultrasonografik görüntülemesi, kemik iliği aspirasyon ve biyopsi verileri, JAK-2 V617F gen mutasyon sonuçları ve görülen komplikasyonları içeren bilgiler retrospektif olarak incelendi ve kaydedildi.

Bütün hastaların periferik kan granüositlerinde JAK-2 V617F mutasyon analizi, “Light Cycler FastStart DNA Master Hybridization Probe” (Roche Diagnostics kullanıma hazır reaksiyon karışımı, Berlin, Almanya) ile test edilerek, Real Time (RT)- PCR (gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu) yöntemi ile gerçekleştirildi. JAK-2 V617F mutasyon yükü değerleri %0-12 , %12-24, %25-49 , %50-75 ve %>75 olmak üzere beş farklı şekilde sonuçlandı.

PV tanısı için DSÖ 2008 kriterleri kullanıldı (82). Buna göre;

Tanı için 2 majör ve 1 minör veya iki minör kriterle beraber birinci majör kriterin varlığı gerekir.

Majör Kriterler:

1. Hemoglobin erkek için >18,5 gr/dl, kadın için >16,5 gr/dl veya eritrosit kütlesi artışının diğer bulguları*

2. JAK-2 V617F veya JAK-2 exon 12 mutasyonu gibi diğer fonksiyonel olarak benzer mutasyonların varlığı

Minör Kriterler:

1. Yaşa göre hipersellülarite gösteren kemik iliği biyopsisi; belirgin eritroid, granüositik ve megakaryositik çoğalma ile kendini gösteren üç dizi hiperplazisi (panmiyelozis)

2. Normal referans aralığının altında serum eritropoetin düzeyi

3. In vitro endojen eritroid koloni oluşumu

(*Yaş, cinsiyet, yaşanan yerdeki yükseltiye göre belirlenmiş referans aralığının 99 persentil üzerindeki hemoglobin veya hematokrit değeri. Kişiye özel bazal hemoglobin değerinde, demir eksikliği anemisinin düzeltilmesi ile ilişkisiz olarak, en az 2 gr/dl düzeyinde, belgelenmiş ve devamlılık gösteren bir artışın varlığında, erkekte 17 gr/dl, kadında 15 gr/dl hemoglobin değeri. Eritrosit kütlelerinin öngörülen normal ortalama değerinden % 25'den daha fazla artışı).

NOT: PV düşündürülen bulguların (suyla temasla tetiklenen –akuajenik- kaşıntı, eritromelalji, atipik yerleşimli tromboz veya juvenil tromboz, splenomegali, trombositoz ve/veya lökositoz) olması halinde birinci majör kriter yoksa da PV araştırılmalıdır (60). Prodromal MPH'lara DSÖ 2008 kriterleri ile tanı konulamayabilir (83).

Tablo 2. Polisitemia vera olgularında risk sınıflaması (82)

Risk Kategorisi	Yaş>60 / Tromboz Öyküsü	Genel Kardiovasküler Risk Faktörleri*
Düşük	Yok	Yok
Orta	Yok	Var
Yüksek	Var	Var veya yok

*Hipertansiyon, hiperkolesterolemi, diyabet, sigara içimi

Çok yüksek trombosit sayısı (>1500 000/ μ L) kanama açısından potansiyel risk faktörüdür. Lökosit sayısı ve yüksek JAK-2 V617F allel yükü tromboz açısından potansiyel risk faktörleridir (57, 84).

ET diğer kronik miyeloproliferatif bozukluklardan farklı olarak bir dışlama teşhisi olarak dikkati çeker. Öyle ki reaktif veya klonal bir nedeni olmayan persistan trombositoz varlığında ET'den bahsetmek mümkün olabilir (6). Bu anlamda, ET'den mutlaka ayırımı yapılması gereken durumlar KML, PV, PMF, MDS ve RT olarak sıralanabilir (6,7).

ET için DSÖ 2008 Tanı Kriterleri;

Tanı için 4 kriterin tümünün karşılanması gerekir.

1. Trombosit sayısının sürekli olarak $\geq 450.000/\mu$ L olması
2. Megakaryositik dizinin hakimiyetinde, büyük olgun megakaryositlerin sayısında artış bulunan, proliferasyon gösteren kemik iliği biyopsi örneği. Nötrofilik granülopoezde dikkate değer artış ve sola kayma olmamalıdır. Eritropoezde dikkate değer bir artış yoktur.

3. PV, PMF, BCR-ABL pozitif KML, MDS veya diğer MPH'lerin DSÖ tanı kriterlerinin bulunmaması

4. JAK-2 V617F veya diğer klonal bir belirteçin gösterilmesi veya JAK-2 V617F yokluğunda RT bulgusunun olmaması (82)

ET'de klonal sitogenetik anormalliklerin insidansı yaklaşık % 5'dir ve bu anormalliklerin hiçbirisi ET için tanısal özelliğe sahip değildir (67). Periferik kandaki granulositlerde PRV-1 geni aşırı ekspresyonu PV ve ET'de için bildirilmiş olup, sekonder eritrositlerde ise gösterilmemiştir (68). Serum TPO seviyeleri ise ET ve RT'de genellikle yüksek saptanacağından ayırım açısından kıymet oluşturmaz (59).

ET hastaları tromboz ve hemoraji açısından düşük ve yüksek riskli olmak üzere iki grupta sınıflandırılabilir (68).

Risk Değerlendirilmesi:

Düşük Risk: Yaş<60 ve diğer yüksek risk bulguları yok

Yüksek Risk: Yaş>60 veya ET ilişkili trombozlu veya kanamalı olay geçirmiş veya trombosit sayısı > 1.500.000/μl olan hastalar

Mikrovasküler semptomlar ciddiye ve aspirine yanıt vermiyorsa bu hastalar yüksek riskli kabul edilebilir. Tanı sırasında lökositozu olan olgularda tromboz riskinin yüksek olduğu bildirilmektedir (72, 73).

PMF tanısında fibrozisin gösterilmesi ve malignitenin dışlanması için kemik iliği biyopsisi yapılmalıdır (5). Biyopsi ile kemik iliğindeki fibrozis gösterildikten sonra PMF tanısının doğrulanması için kemik iliği fibrozisine yol açabilecek sekonder nedenler dışlanmalıdır. Sekonder nedenler arasında kronik miyeloproliferatif hastalıklar, MDS, akut lösemiler, lenfoid hastalıklar, metastatik kanserler, bağ doku hastalıkları, enfeksiyonlar, D vitamini eksikliği sayılabilir (85).

PMF için DSÖ Tanı Kriterleri (82)

Tanı için 3 majör ve 2 minör kriter gereklidir.

Majör Kriterler

1. Genellikle retikülin ve/veya kollajen fibrozla birlikte megakaryositik proliferasyon ve atipi varlığına, veya belirgin retikülin fibrozu yokluğunda, megakaryosit değişikliklerine, granülositik çoğalma ve sıklıkla eritropoez azalması ile kendini gösteren, artmış kemik iliği hücreliliği eşlik etmelidir.

2. PV, BCR-ABL pozitif KML, MDS veya diğer MPH'ler için DSÖ kriterlerinin karşılanmaması

3. JAK-2 V617F veya diğer klonal belirteçlerin (örn MPLW515K/L) gösterilmesi veya klonal belirteç yokluğunda, kemik iliği fibrozu veya diğer değişikliklerin infeksiyon, otoimmün bozukluk, diğer yangısal durumlar, saçlı hücreli lösemi ve diğer lenfoid neoplaziler, metastazlı tümör veya toksik (kronik) miyelopatilere sekonder olduğunu gösteren bulgu olmaması.

Minör Kriterler

1. Lökoeitroblastozis
2. Serum laktat dehidrogenaz düzeyinde artış
3. Anemi
4. Splenomegali

PMF için risk faktörleri ise: ileri yaş (>60 yıl), hepatomegali, kilo kaybı, anemi (hemoglobin < 10 g/dl), lökositoz (>30.000/ μ L), lökopeni (<4000/ μ L), dolaşımdaki blastların artışı (>% 2), trombositopeni (< 150.000/ μ L) ve anormal karyotip olarak saptanırken, splenomegali ve kemik iliğindeki fibrozis derecesinin sağ kalımı olumsuz etkilediği görülmemiştir.

Tablo 3. PMF’de DIPSS-plus risk değerlendirmesi (12, 13)

Kötü Prognostik Faktör Sayısı	Risk Grubu	Ortanca Yaşam Süresi (Yıl)
0	Düşük	15.4
1	Orta-1	6.5
2 veya 3	Orta-2	2.9
4 ve >4	Yüksek	1.3

3.1. JAK-2 Geni V617F Nokta Mutasyonunun Belirlenmesi

3.1.1. DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu Miller ve arkadaşlarının tuzla çöktürme (salting out) yöntemi ile yapıldı. Yapılan işlemler aşağıda belirtilmiştir.

- Antikoagülanlı (EDTA) tüp ile laboratuara getirilen kan örneği yaklaşık 3000 devir/dakika (rpm) hızında beş dakika santrifüj edildikten sonra plazması uzaklaştırıldı. Geriye kalan kısmı pipetle homojen hale getirildi.

- 1,5 ml'lik bir eppendorf tüpe 900 µl 1X eritrosit lizis tampon ve üzerine 600 µl plazması uzaklaştırılmış kan örneği ilave edilerek iyice pipetlendi. Tüp aralıklı olarak alt üst edilirken, oda sıcaklığında beş dakika bekletildi. Ardından, örnek 7000 rpm'de beş dakika santrifüj edilip, süpernatant uzaklaştırıldı.
- Bir sonraki aşamada dipte kalan pellet üzerine 900 µl X lizis buffer eklendi. Pipetlenerek karıştırıldı, 5000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi ve üst sıvısı uzaklaştırıldı.
- Pellet üzerine 0,5 ml % 10 SDS ve 10 µl proteinaz K koyuldu, köpürtmeden iyice pipetlendi.
- 65 °C'de 30 dakika süreyle aralıklı olarak alt üst etmek suretiyle inkübe edildikten sonra, buzdolabında beş dakika bekletilip, 200 µl 6M NaCl ilave edilerek iyice çalkalandı.
- 14.000 rpm'de on dakika santrifüj edildikten sonra, üzerine 300 µl kloroform/izoamil alkol karışımı (24/1 oranında) konularak çalkalandı.
- 14.000 rpm'de beş dakika santrifüj edilip, üst sıvı döküldü. Steril bir tüpe alınıp, üzerine 1/1 oranında % 100 etil alkol eklenerek tüp alt üst edildi. Bu arada genomik DNA görüldü.
- 14.000 rpm'de beş dakika santrifüj edildi, üst sıvısı döküldü. Tüpe 1 ml % 70'lik alkol konularak birkaç kez alt üst edildi.
- 14.000 rpm'de beş dakika santrifüj edildi. Tüp ters çevirildi, alkol döküldü Bu aşamada DNA'nın kaynamamasına dikkat edildi. Bir kurutma kağıdının üzerinde alkolün uzaklaştırılması için on beş dakika bekletildi.
- DNA üzerine yeterince enjeksiyonluk su koyuldu, çalkalandı ve kısa bir süre santrifüj edilip 75-80 °C'de inkübe edildi.
- DNA konsantrasyonu ölçüldükten sonra, elde edilen genomik DNA'lar kullanılıncaya kadar -20 °C'de muhafaza edildi.

3.1.2. JAK-2 V617F Nokta Mutasyonunun Saptanması

JAK-2 geni V617F nokta mutasyonunun Real Time-PCR Tekniği ile saptanması için, Light Mix kiti aşağıda tarif edildiği şekilde kullanılmıştır. Light Mix, genomik cDNA hedeflerinde insan DNA JAK-2 V617F genotipini saptayan bir sistemdir. Yeterli DNA bulunduğu % 1'i JAK-2 V617F mutant olan DNA'yı saptama duyarlılığına sahiptir.

Light Mix sistemi, “Light Cycler Fast Start DNA Master Hybridization Probe” (Roche Diagnostics kullanıma hazır reaksiyon karışımı) ile test edilmiştir.

Çalışmamızda, sırası ile JAK-2 V617F'nin 165 baz çiftli ve genomik cDNA hedefin 179 baz çiftli fragmanları spesifik primerlerle amplifiye edildi ve Light Cycler Red 640 adlı problemlerle saptandı. Seçilmiş nükleik asitlerin genotipleri (genomik DNA veya cDNA), mutant olan için 61 oC'de ve wildtype (doğal tip) için 57 oC'de saptanan ergime eğrileri ile belirlendi. 116 baz çiftinden oluşan ilave bir ürün, ayrı bir reaksiyon ile örneklerin DNA miktarını ölçmek için kullanıldı (kantifikasyon). Uygulanan program 4 aşamadan oluşmaktadır.

Elde edilen veriler (DNA kantifikasyonu ve ergime eğrileri) Light Cycler kılavuzu kullanılarak analiz edildi.

Program aşamaları:

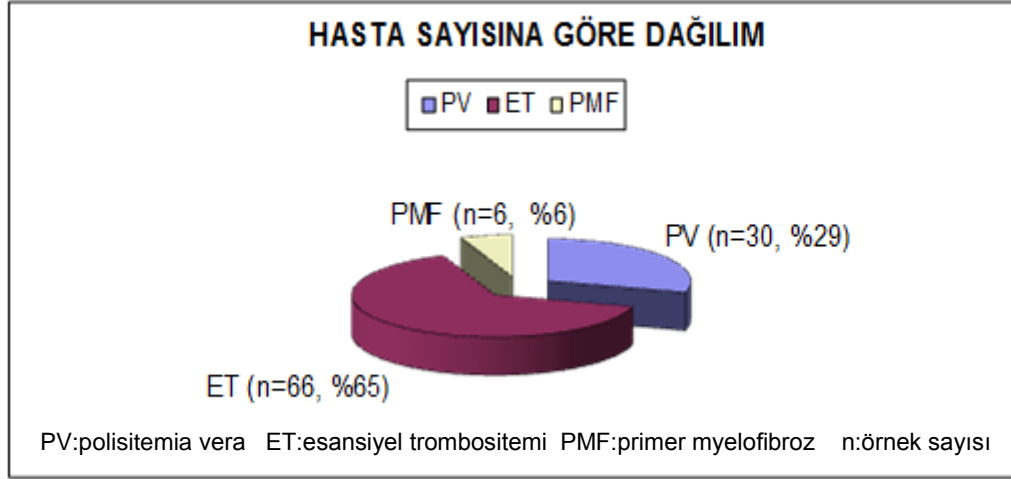
1. Örneğin denatürasyonu ve enzim aktivasyonu
2. Hedef DNA'nın PCR amplifikasyonu (siklus)
3. Hedef DNA kaynaklı PCR ürününü belirleyen ergime eğrisi
4. Soğutma

3.2. İstatistiksel Analiz

Bu çalışmada yapılan analizlerde Statistical Package for Social Sciences for Windows Version 22 (SPSS Inc; Chicago USA) programı kullanılmıştır. Sonuçlar tanımlayıcı istatistikler, independent samples t test ve mann-whitney u testi ile değerlendirildi. Korelasyon analizinde Pearson ve Sperman korelasyon testi kullanıldı. Verilerin analizinde $p < 0,05$ olması anlamlı olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

Ph kromozomu negatif MPH tanısı almış ve JAK-2 V617F gen mutasyonu saptanmış 99 hasta çalışmaya dahil edildi. Hastaların 30'u (%29) PV, 63'ü (%65) ET ve 6'sı (%6) PMF tanılıydı. Hastalar DSÖ 2008 kriterlerine göre tanı almışlardı.



Şekil 3. Çalışmaya dahil edilen hastaların dağılımı

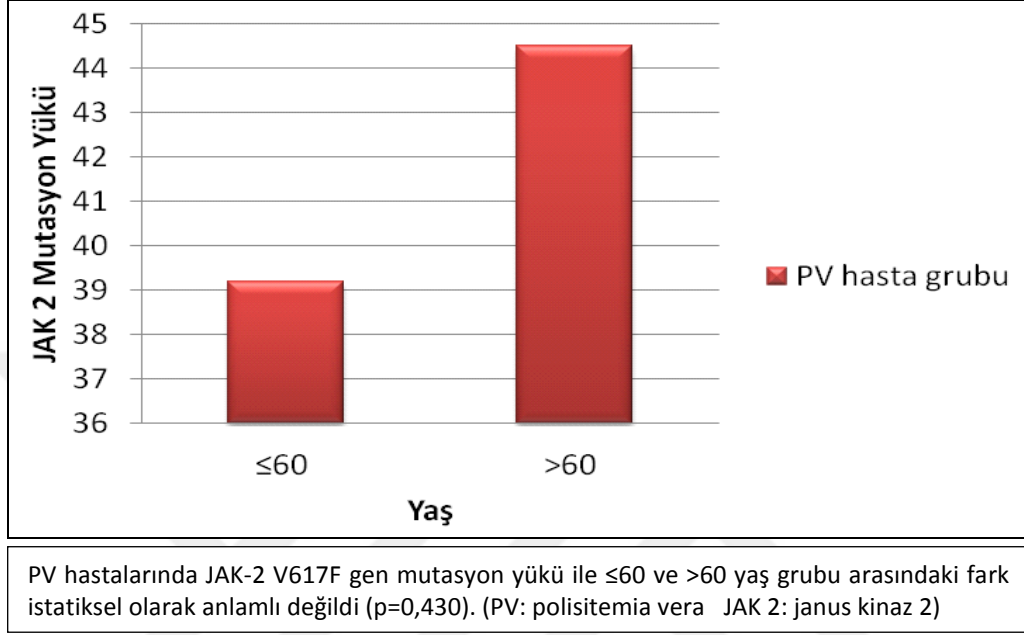
PV hastalarının 11'i (%36,7) kadın ve 19'u (%63,3) erkek, ET hastalarının 45'i (%71,4) kadın ve 18'i (%28,6) erkek, PMF hastalarının 4'ü (%66,7) kadın ve 2'i (%33,3) erkek idi. (Tablo 4) PV hastalarının yaş ortalaması $57,3 \pm 13,5$, ET hastalarının yaş ortalaması $63,4 \pm 16,2$ ve PMF hastalarının yaş ortalaması $66 \pm 15,4$ idi. (Tablo 4)

Tablo 4. Çalışmaya dahil edilen hastaların demografik özellikleri

	PV / n=30 (%29)	ET / n=66 (%65)	PMF / n=6 (%6)
Yaş (yıl) (ortalama \pm SS)	57,3 \pm 13,5	63,4 \pm 16,2	66 \pm 15,4
Cinsiyet E/K	19/11	18/45	2/4

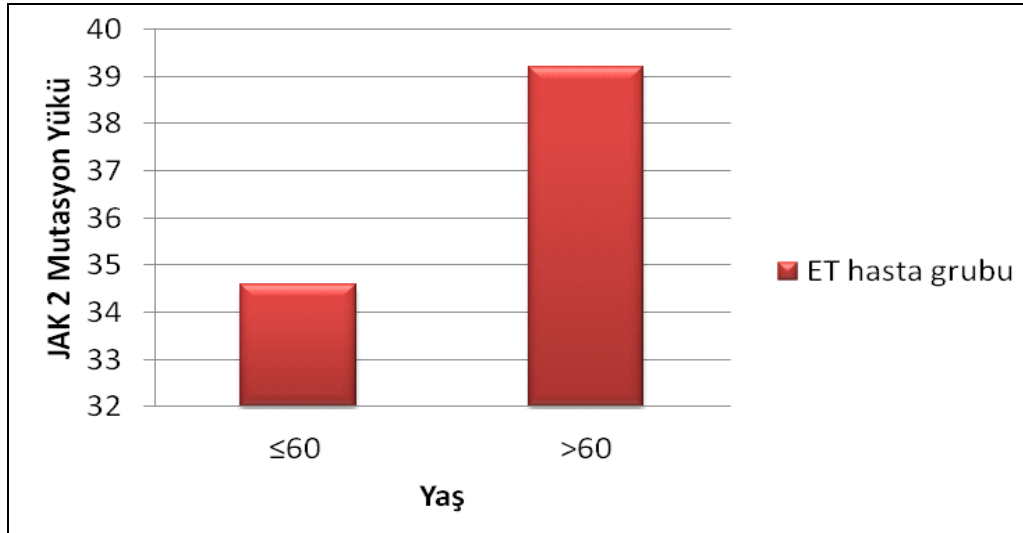
PV: polisitemia vera ET:esansiyel trombositemi PMF:primer myelofibroz n:örnek sayısı E:erkek K:kadın SS:standart sapma

PV hastalarından ≤ 60 yaş grubundaki JAK-2 V617F gen mutasyon yükü $\%39,2 \pm 14,4$ iken, >60 yaş grubundaki JAK-2 V617F gen mutasyon yükü $\%44,5 \pm 18,6$ olarak saptandı ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0,430$). (Şekil 4)



Şekil 4. PV hastalarında JAK-2 V617F gen mutasyon yükü ile ≤ 60 ve >60 yaş grubu arasındaki fark

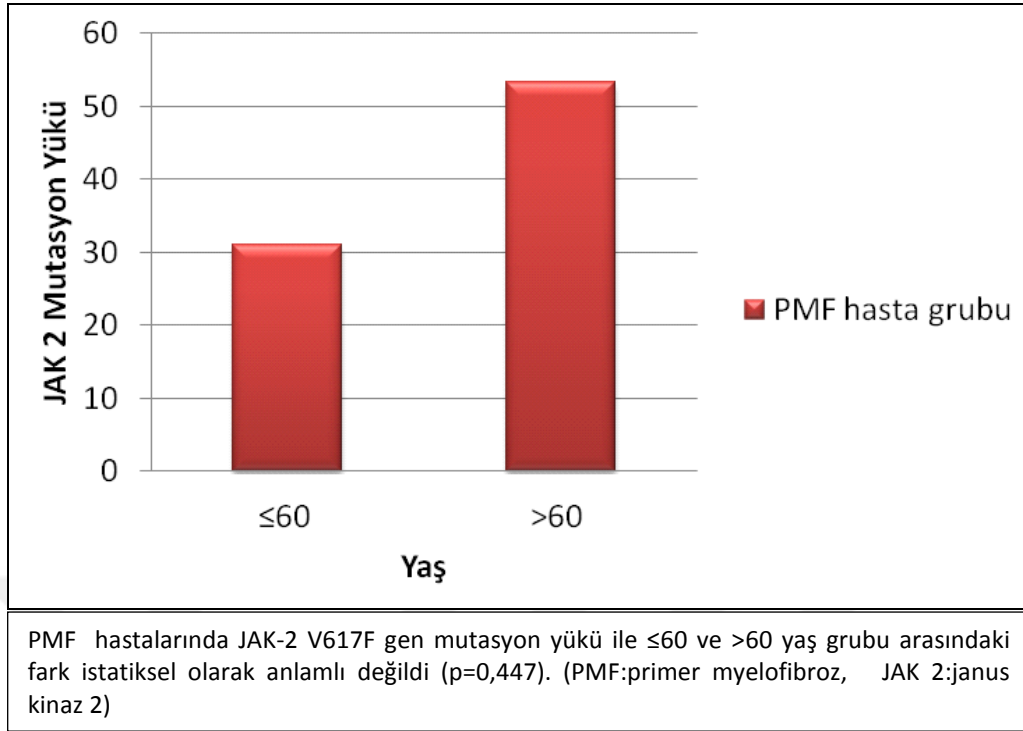
ET hastalarından ≤ 60 yaş grubundaki JAK-2 V617F gen mutasyon yükü $\%34,6 \pm 19,3$ iken; >60 yaş grubundaki JAK-2 V617F gen mutasyon yükü $\%39,2 \pm 19,1$ olarak bulundu ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0,362$), (Şekil 5).



ET hastalarında JAK-2 V617F gen mutasyon yükü ile ≤60 ve >60 yaş grubu arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir (p=0,362). (ET: esansiyel trombositemi, JAK 2:janus kinaz 2)

Şekil 5. ET hastalarında JAK-2 V617F gen mutasyon yükü ile ≤60 ve >60 yaş grubu arasındaki fark

PMF hastalarından ≤60 yaş grubundaki JAK-2 V617F gen mutasyon yükü %31 iken >60 yaş grubundaki JAK-2 V617F gen mutasyon yükü %53,2±24 olarak bulundu ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildir (p=0,447), (Şekil 6).



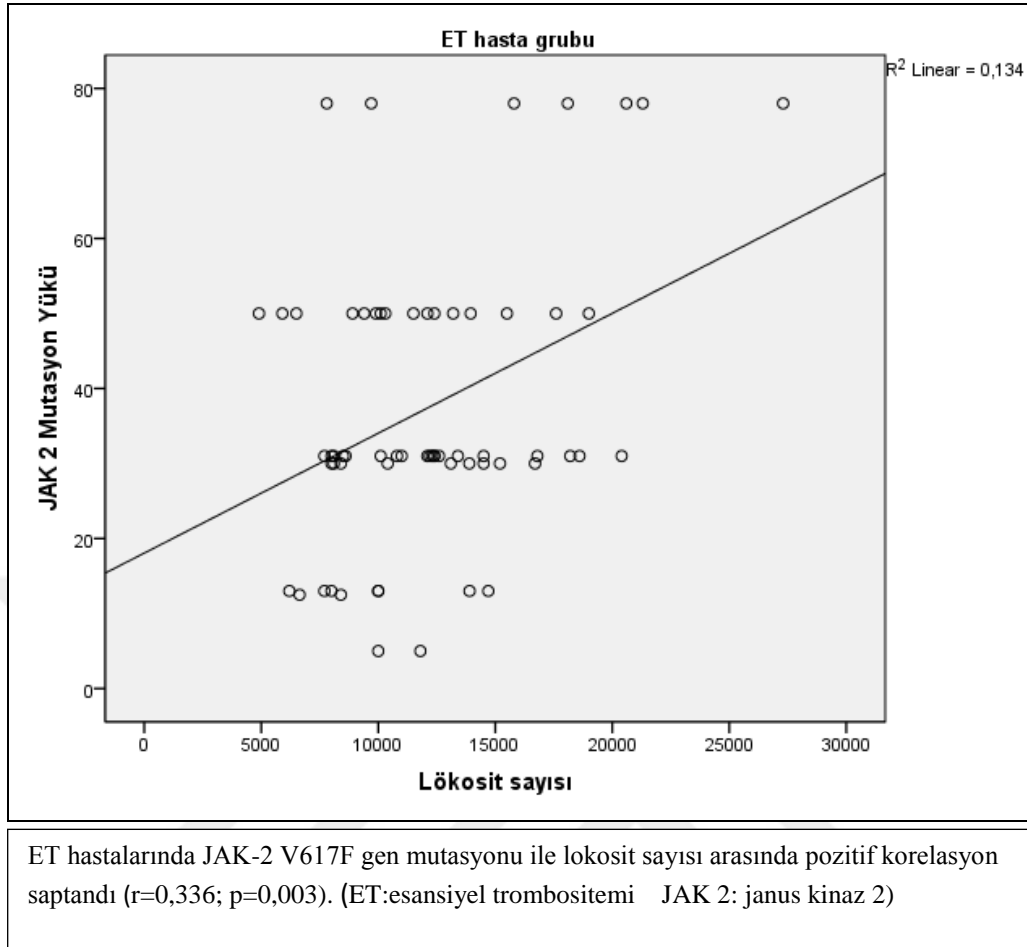
Şekil 6. PMF hastalarında JAK-2 V617F gen mutasyon yükü ile ≤60 ve >60 yaş grubu arasındaki fark

Tablo 5. Jak- 2 gen mutasyon yükü ile yaş arasındaki ilişki

	Yaş / n	Jak 2 V617F Mutasyon Yükü	p Değeri
PV	≤60 / 19	39,2±14,4	p=0,430
	>60 / 11	44,5±18,6	
ET	≤60 / 24	34,6±15,3	p=,362
	>60 / 39	39,2±19,1	
PMF	≤60 / 1	31,0	p=0,447
	>60 / 5	53,2±24,06	

PV: polisitemia vera ET:esansiyel trombositemi PMF:primer myelofibroz n:örnek sayısı JAK 2:janus kinaz 2

PV ve PMF hastalarında JAK-2 V617F gen mutasyon yükü ile lökosit sayısı arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı (p>0,05). Ancak ET hastalarında JAK-2 V617F gen mutasyon yükü ile lökosit sayısı arasında pozitif korelasyon saptandı (r=0,336; p=0,003). (Şekil 7)



Şekil 7. ET hasta grubunda JAK- 2 V617F gen mutasyon yükü ile lökosit sayısı arasındaki ilişki

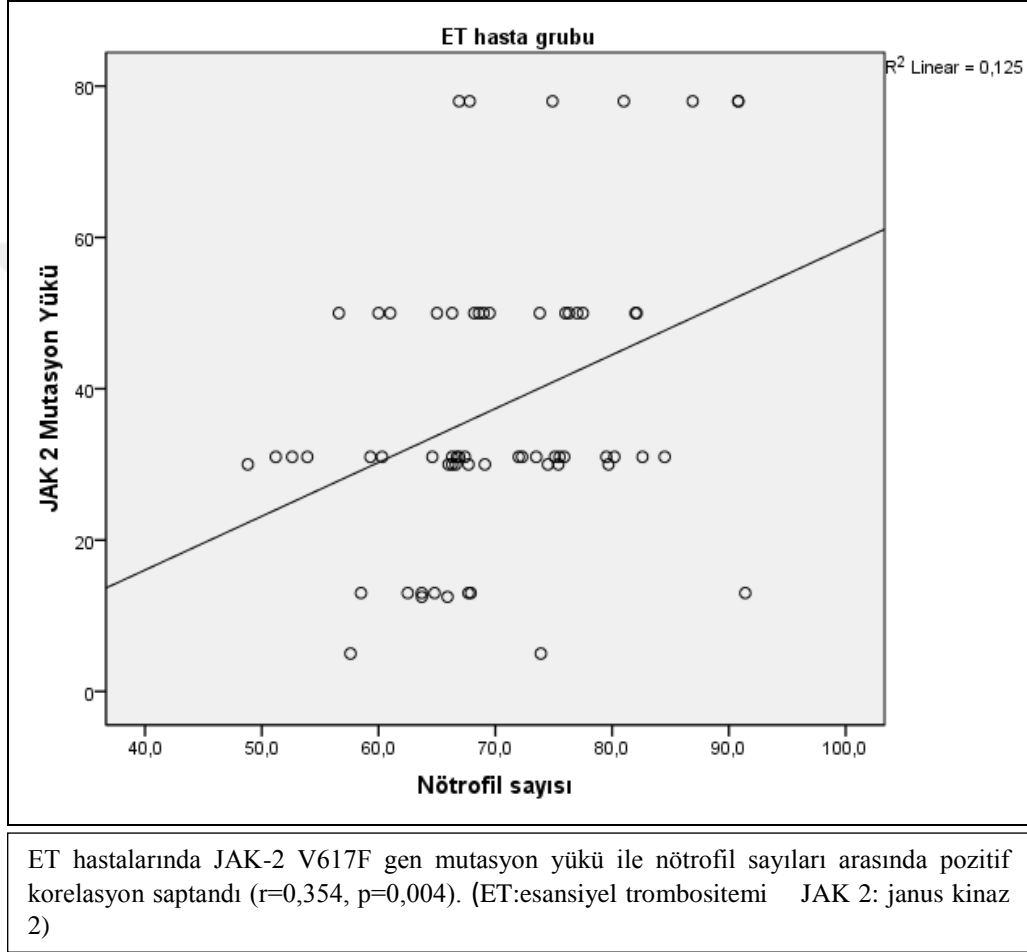
PV hastalarında JAK-2 V617F gen mutasyon yükü ile nötrofil, lenfosit, monosit, eozinofil ve bazofil ve trombosit sayıları arasında anlamlı bir ilişki yoktu ($p>0,05$).

Tablo 6: PV hastalarında lökosit dağılımı ve trombosit sayısı

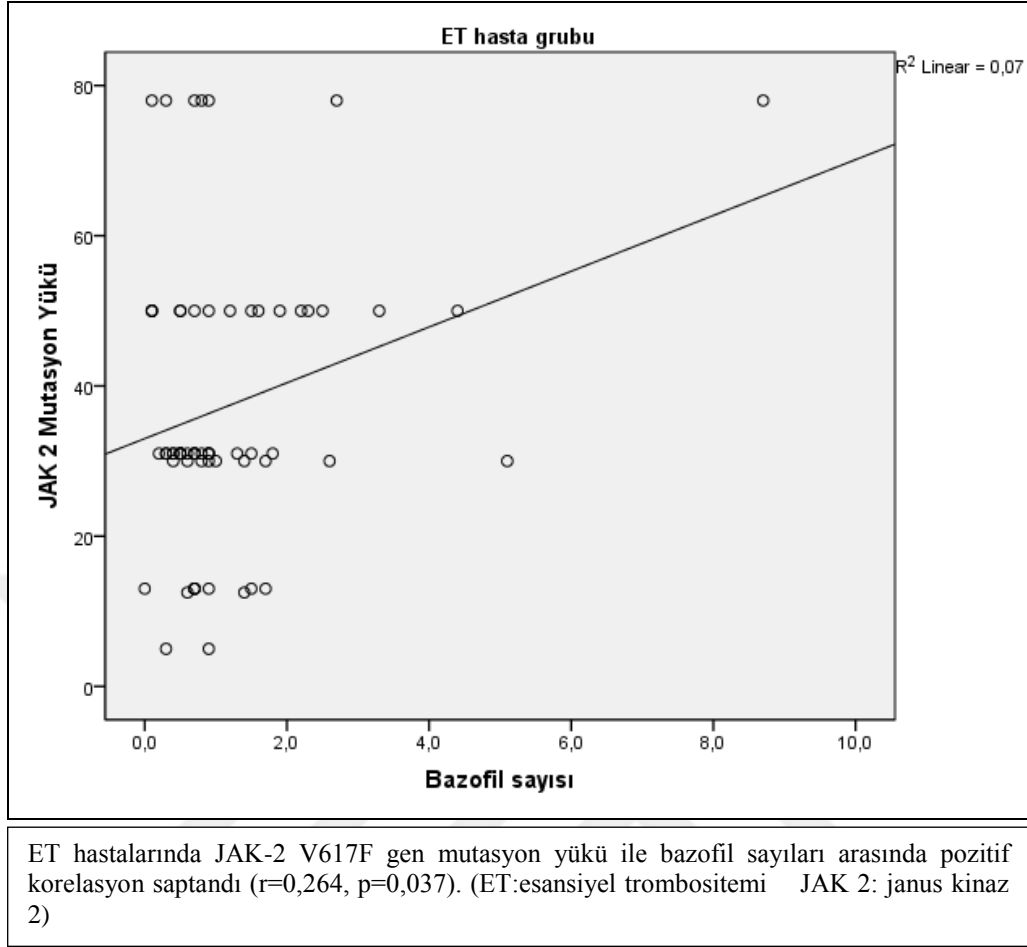
PV (n=30)	Ortalama ± SS
Lökosit Sayısı	12390±5381
Nötrofil	9321±956,9
Lenfosit	2069±792,9
Monosit	588±222,8
Eozinofil	297±166,9
Bazofil	99±97,7
Trombosit	523400,00±216,342

PV:polisitemi vera SS:standart sapma n:örnek sayısı

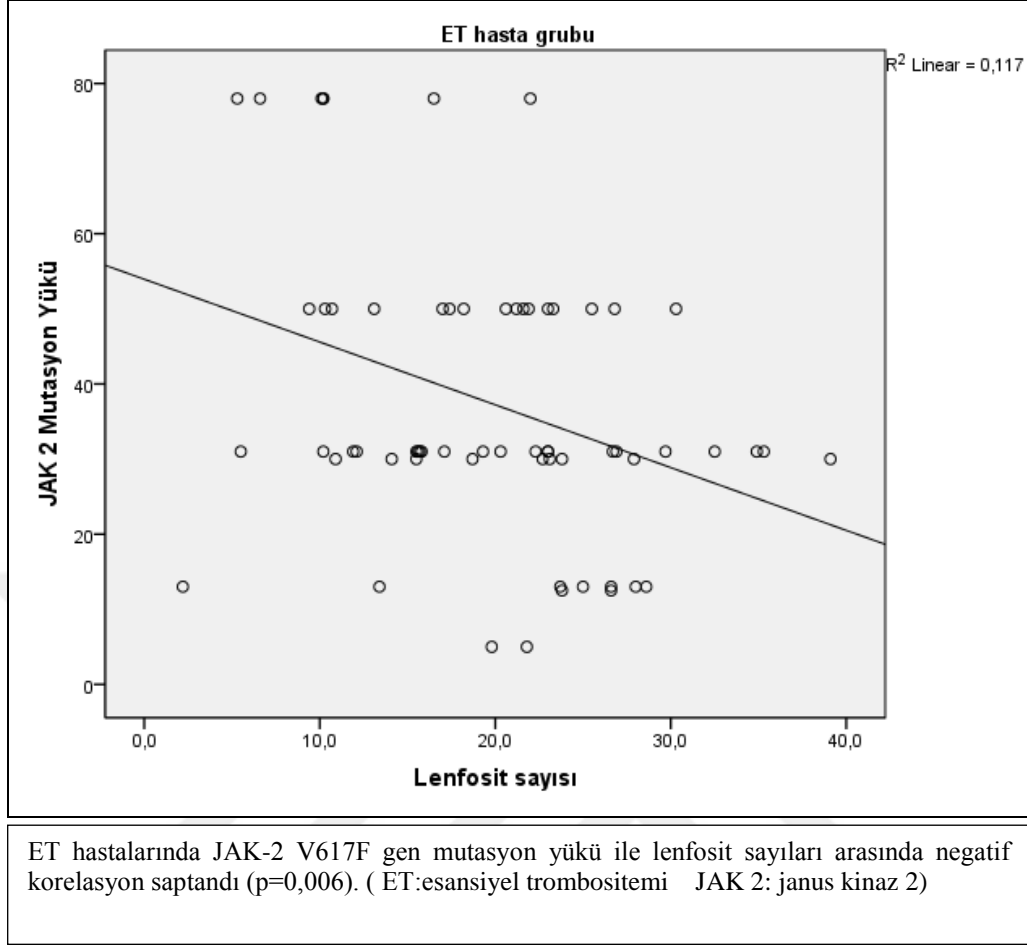
ET hastalarında JAK-2 V617F gen mutasyon yükü ile nötrofil ve bazofil sayıları arasında pozitif korelasyon saptandı (sırasıyla $r=0,354$, $p=0,004$; $r=0,264$, $p=0,037$). (Şekil 8,9). JAK-2 V617F gen mutasyon yükü ile lenfosit sayısı arasında ise negatif korelasyon saptandı ($p=0,006$). (Şekil 10). JAK-2 V617F gen mutasyon yükü ile monosit, eozinofil ve trombosit sayıları arasında ilişki saptanmadı ($p>0,05$).



Şekil 8. ET hastalarında JAK- 2 V617F gen mutasyon yükü ile nötrofil sayısı arasındaki ilişki



Şekil 9. ET hastalarında JAK- 2 V617F gen mutasyon yükü ile bazofil sayısı arasındaki ilişki



Şekil 10. ET hasta grubunda JAK- 2 gen V617F mutasyon yükü ile lenfosit sayısı arasındaki ilişki

Tablo 7. ET hastalarında lökosit dağılımı ve trombosit sayısı

ET (n=63)	Ortalama \pm SS
Lökosit Sayısı	12160 \pm 4395
Nötrofil	8530 \pm 1155
Lenfosit	2383 \pm 948
Monosit	741 \pm 400,8
Eozinofil	316 \pm 303,8
Bazofil	145 \pm 157,0
Trombosit	815492,06 \pm 278141,10

ET:esansiyel trombositemi SS:standart sapma n:örnek sayısı

PMF hastalarında JAK-2 V617F gen mutasyon yükü ile monosit sayısı arasında negatif korelasyon saptandı ($p=0,20$). Nötrofil, lenfosit, eozinofil, bazofil ve trombosit sayıları arasında anlamlı ilişki saptanmadı ($p>0,05$).

Tablo 8. PMF hastalarında lökosit dağılımı ve trombosit sayısı

PMF (n=6)	Ortalama \pm SS
Lökosit Sayısı	14150 \pm 6199
Nötrofil	10902 \pm 1485
Lenfosit	1768 \pm 703
Monosit	1154 \pm 1937
Eozinofil	216,4 \pm 201
Bazofil	113,2 \pm 127
Trombosit	269500 \pm 186189,95

PMF:primer myelofibroz SS:standart sapma n:örnek sayısı

PV hastalarının 26'sında (%86,6) trombotik ve hemorajik komplikasyon yoktu, 4'ünde (%13,4) derin ven trombozu, pulmoner tromboemboli, serebral enfarktüs, hepatik ven trombozu vardı. ET hastalarının 60'ında (%95,2) trombotik ve hemorajik komplikasyon yoktu, sadece 3'ünde (%4,8) derin ven trombozu, pulmoner tromboemboli, hepatik ven trombozu vardı. PMF hastalarının hiçbirinde komplikasyon yoktu. PV ve ET hastalarında komplikasyon gelişen ve komplikasyon gelişmeyen hastalar arasında JAK-2 V617F mutasyon yükü açısından fark yoktu ($p=0,589$; $p=0,177$).

Dalak boyutu için üst sınırı 130 cm kabul ettiğimizde PV hastalarının %68' inde, ET hastalarının %46,7'sinde ve PMF hastalarının % 75' inde splenomegali vardı ayrıca ET hastalarının %6,7'sinde splenektomi öyküsü vardı.

5. TARTIŞMA

MPH' larda mortalite, morbidite tahmini ve en uygun tedavi seçeneğini belirleyecek olan prognostik faktörlerdir. Philadelphia kromozomu negatif myeloproliferatif hastalıklarda tanı için de en değerli bulgulardan biri olan JAK-2 V617F mutasyonu ile klinik ve laboratuvar bulguları arasındaki ilişki daha önce çalışılmıştır. Biz bu çalışmamızda PV, ET ve PMF hastalarında JAK-2 V617F gen mutasyon yükü ile prognostik faktörler arasındaki ilişkiyi araştırdık.

Çalışmamızda PV hastalarının 11'i (%36,7) kadın ve 19'u (%63,3) erkek; hastaların yaş ortalaması $57,3 \pm 13,5$ olarak bulundu. Türkiye'de 2009'da Akay ve ark. tarafından yapılan 58 hasta içeren en son çalışmada tanı sırasındaki yaş ortalaması 61 (28-81 yıl) olarak rapor edilmişti (86). Polisitemia vera çalışma grubunun (PVSG) 325 hastada yaptığı bir araştırmada ortalama yaş 60 (20-85 yıl) olduğu görülmüştür (87). Uluslararası Myeloproliferatif Neoplazm Araştırma ve Tedavi grubunun (IWG-MRT) 1545 PV hastasında ortalama yaş 61 (18-95 yıl) olarak belirlenmiştir (88). Toplanan verilerde PV sıklığının erkeklerde daha fazla olduğu gösterilmiştir. Erkeklerde bu oran 100000'de 2,8 iken kadınlarda 100000'de 1,3 olarak saptanmıştır. En fazla görülen grup ise 70-79 yaş arası erkek populasyondur (89). Bu bulgular literatürle uyumluydu.

PV hastalarında ≤ 60 yaş grubundaki JAK-2 V617F gen mutasyon yükü $\%39,2 \pm 14,4$ iken, >60 yaş grubundaki JAK-2 V617F gen mutasyon yükü $\%44,5 \pm 18,6$ olarak saptandı ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0,430$). Hastaların 26'sında (%86,6) trombotik veya hemorajik komplikasyon yoktu, 4'ünde (%13,4) derin ven trombozu, pulmoner tromboemboli, serebral enfarktüs, hepatik ven trombozu vardı. Komplikasyon gelişen ve komplikasyon gelişmeyen hastalar arasında JAK-2 V617F mutasyon yükü açısından fark yoktu ($p=0,589$). Yapılan çalışmalarda JAK-2 V617F mutasyon pozitifliği ile yüksek hemogloblin düzeyi, lökosit sayısı ve kaşıntı ile istatistiksel olarak ilişki saptanırken; JAK-2 V617F mutasyonu ile yaş, trombosit sayısı, splenomegali, tromboz riski, lösemik veya fibrotik dönüşüm ilgili farklı istatistiksel

sonuçlar mevcuttur (90). Campbell P.J. ve arkadaşları PV'li hastalarla ilgili olarak yaptıkları çalışmada JAK-2 V617F mutasyon pozitifliği ile yüksek hemoglobin düzeyi ve lökosit sayısı arasında ilişki saptamışlar, aynı ilişkiyi trombosit sayısı, hematokrit düzeyi ve yaş arasında saptamamışlar (91). Dupont S. ve arkadaşları PV ve ET'li hastalarla ilgili yaptıkları çalışmada PV grubu hastalarda JAK-2 V617F mutasyon sıklığını % 82,5 (179/216) olarak saptamışlar. JAK-2 V617F mutasyon varlığı ile yüksek hemoglobin ve lökosit sayısı arasında istatistiksel olarak ilişki saptarlarken; trombosit sayısı, hematokrit düzeyi ve yaş arasında ilişki saptamamışlar (92). Lucia E. ve arkadaşları yaptıkları çalışmada PV grubu hastalarda JAK-2 V617F mutasyon varlığı ile yüksek hematokrit, lökosit ve trombosit sayısı arasında istatistiksel olarak ilişki saptarlarken; hemoglobin ve yaş için aynı ilişkiyi saptamamışlar (93). Xiao Z. ve arkadaşları yaptıkları çalışmada PV grubu için JAK-2 V617F mutasyon varlığı ile yüksek hemoglobin düzeyi arasında istatistiksel olarak ilişki saptarlarken ($P=0,033$); yaş, lökosit, hematokrit ve trombosit düzeyleri arasında ilişki saptamamışlar (94).

JAK-2 V617F mutasyonunun PV'de prognozu kötü yönde etkilediği belirtilmiş ve mutasyon pozitifliğinin hematokrit, hemoglobin düzeylerini ve tromboza yatkınlığı arttırdığı gösterilmiştir (95). Vannuchi ve arkadaşlarının 173 PV hastasıyla yapılan bir çalışmada JAK-2 V617F mutasyon durumunun hematokrit ve lökosit sayısını arttırabileceği, trombosit sayısını ise azaltabileceği gösterilmiştir. Bu çalışmada aynı zamanda kaşıntı, tinnitus, görme bozukluğu gibi semptomların, mutasyon yükü fazla olan hastalarda daha sık olduğu gösterilmiştir(95).Literaturde bu bulgular ile ilgili farklı sonuçların olduğu görüldü.

Çalışmamızda PV hastalarında JAK-2 V617F gen mutasyon yükü ile lökosit, nötrofil, lenfosit, monosit, eozinofil, bazofil ve trombosit sayıları arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı ($p>0,05$). Yukarıda belirtildiği gibi literaturde lökosit ve trombosit ile ilgili farklı sonuçlar görüldü ancak nötrofil, lenfosit, monosit, eozinofil sayıları ile ilgili çalışmalara rastlanmadı.

Çalışmamızda ET hastalarının 45'i (%71,4) kadın ve 18'i (%28,6) erkek; yaş ortalaması $63,4\pm 16,2$ olarak bulundu. McNally ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada tanı koyma yaşı geniş bir aralıkta olsa da 50—70 yaş arasında zirve yaptığı görülmüş (96). Passomonti ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada 435 ET hastasının ortalama tanı yaşı 55 olarak sonuçlanmış (97). Fenaux ve arkadaşlarının 143 ET hastası ile yaptıkları çalışmada

ortalama yaş 60 olarak bulunmuş ve kadınlarda erkeklere göre iki kat daha fazla görüldüğü tespit edilmiş (77). Bu bulgular literatur ile uyumluydu.

ET hastalarından ≤ 60 yaş grubundaki JAK-2 V617F gen mutasyon yükü $\%34,6 \pm 19,3$ iken, >60 yaş grubundaki JAK-2 V617F gen mutasyon yükü $\%39,2 \pm 19,1$ olarak bulundu ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0,362$). ET hastalarının 60'ında ($\%95,2$) trombotik veya hemorajik komplikasyon yoktu, sadece 3'ünde ($\%4,8$) derin ven trombozu, pulmoner tromboemboli, hepatik ven trombozu vardı. Komplikasyon gelişen ve komplikasyon gelişmeyen hastalar arasında JAK-2 V617F mutasyon yükü açısından fark yoktu ($p=0,177$). Yapılan çalışmalarda istatistiksel olarak JAK-2 V617F mutasyon varlığı ile ileri yaş, yüksek hemoglobin düzeyi, artmış lökosit sayısı, tanı anında düşük trombosit sayısı, artmış venöz tromboz riski ve splenomegali varlığı arasında anlamlı ilişki bulunmuştur (98). Heller P.G ve arkadaşları yaptıkları çalışmada ET'li 50 hastanın 24 ünde ($\%48$) JAK-2 V617F mutasyonu tespit etmişler; JAK-2 V617F mutasyon varlığı ile ileri yaş ($p=0,001$), yüksek hemoglobin düzeyi ($p=0,002$), hematokrit düzeyi ($p=0,0003$), trombosit sayısı ($p=0,03$) arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptamışlar. Lökosit sayısı ile istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki tespit etmemişler (98). Cheung B. ve arkadaşları ET'li hastalarla ilgili yaptıkları çalışmada JAK-2 V617F mutasyon varlığı ile yüksek hemoglobin düzeyi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulmuşlar; aynı ilişkiyi yaş, lökosit sayısı, trombosit düzeyi ve hemotokrit düzeyi arasında saptamamışlar (99). Literatürde bu bulgularla ilgili farkla sonuçların olduğu görüldü.

Kittur J. ve arkadaşları yaptıkları çalışmada 176 ET'li hastanın 96 sında ($\%55$) JAK-2 V617F mutasyonunu pozitif olarak saptamışlar. JAK-2 V617F mutasyonu varlığı ile ileri yaş, yüksek hemoglobin düzeyi, yüksek lökosit sayısı arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptamışlar (100). Campbell P.J. ve arkadaşları yaptıkları çalışmada ET'li hastaların $\% 53$ ünde mutasyon pozitif saptamışlar. Hastalarda JAK-2 V617F mutasyonu ile yüksek hemoglobin düzeyi ($p<0,0001$), artmış lökosit sayısı ($p<0,0001$) ve trombosit sayısı ($p<0,0001$) arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulmuşlar (91). Xiao Z. ve arkadaşları yaptıkları çalışmada ET'li 153 hastanın 122 sinde ($\%79$) JAK-2 V617F mutasyon saptamışlar. Aynı çalışmada mutasyon varlığı ile yüksek trombosit sayısı arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki tespit etmişler ($p=0,024$) (94).

Wolanskyj A.P. ve arkadaşları ET'li 150 hastanın 73 ünde (% 48,7) JAK-2 V617F mutasyonu pozitif olarak tespit etmişler. Çalışmalarında mutasyon pozitifliği ile ileri yaş arasında ($p=0,02$), yüksek hemoglobin düzeyi ($p=0,0002$), artmış lökosit sayısı 43 ($p=0,005$) arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptamışlar (101). Vannuchi A.M ve arkadaşları yaptıkları çalışmada ET'li 130 hastanın 74 ünde (%57) JAK-2 V617F mutasyonu tespit etmişler. JAK-2 V617F mutasyon pozitifliği ile yüksek hemoglobin düzeyi ($p=0,001$), hematokrit düzeyi ($p=0,0001$), trombosit sayısı ($p=0,004$) arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptamışlar (102). Dupont S. ve arkadaşları 281 ET'li hastanın 157 sinde (%55,9) JAK-2 V617F mutasyonu pozitif olarak bulmuşlar. Aynı hasta grubunda JAK-2 V617F mutasyon varlığı ile trombosit düzeyi ve lökosit sayısı arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki tespit etmişler (92). Literatürde bu bulgularla ilgili farklı sonuçların olduğu görüldü.

JAK-2 V617F gen mutasyon yükü ile lökosit, nötrofil, bazofil sayıları arasında pozitif korelasyon saptandı (sırasıyla $p=0,003$; $0,004$; $0,037$). JAK-2 V617F gen mutasyon yükü ile lenfosit sayısı arasında ise negatif korelasyon saptandı ($p=0,006$). JAK-2 V617F gen mutasyon yükü ile monosit, eozinofil ve trombosit sayıları arasında ilişki saptanmadı ($p>0,05$). Yukarıda belirtildiği gibi literatürde lökosit ve trombosit ile ilgili farklı sonuçlar görüldü ancak nötrofil, lenfosit, monosit, eozinofil sayıları ile ilgili çalışmalara rastlanmadı.

Çalışmamızda PMF hastalarının 4'ü (%66,7) kadın ve 2'si (%33,3) erkek, yaş ortalaması $66\pm 15,4$ olarak bulundu. PMF hastalarından ≤ 60 yaş grubundaki JAK-2 V617F gen mutasyon yükü %31 iken >60 yaş grubundaki JAK-2 V617F gen mutasyon yükü $\%53,2\pm 24$ olarak bulundu ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0,447$). PMF hastalarında JAK-2 V617F gen mutasyon yükü ile monosit sayısı arasında negatif korelasyon saptandı ($p=0,20$). Nötrofil, lenfosit, eozinofil, bazofil ve trombosit sayıları arasında anlamlı ilişki saptanmadı ($p>0,05$).

Tefferi A. ve arkadaşları yaptıkları çalışmada 157 PMF hastasının 80 inde (% 51) JAK-2 V617F mutasyonunu pozitif olarak saptamışlar. Çalışmada JAK-2 V617F mutasyonu varlığı ile klinik bulgular arasındaki ilişki tayininde ileri yaş ile JAK-2 V617F mutasyon varlığı arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki tespit etmişler. Cinsiyet, hemoglobin düzeyi, lökosit sayısı, trombosit düzeyi ve dalak büyüklüğü ile anlamlı ilişki saptamamışlar (103). Barosi G. ve arkadaşları yaptıkları çalışmada 304 PMF hastasının 193 ünde (% 63,5) JAK-2 V617F mutasyonunu pozitif saptamışlar. Mutasyon pozitif olguların

%27,6 sı homozigot olarak saptanmış. Çalışmada yüksek hemoglobin düzeyi ve platelet sayısı ile heterozigot mutasyon pozitifliği arasında; lökosit sayısı ve dalak büyüklüğü ile homozigot mutasyon arasında istatistiksel olarak ilişki saptamışlar (104). Speletas M. ve arkadaşları yaptıkları çalışmada PMF li hastalarda JAK-2 V617F mutasyon pozitifliği ile yaş, hemoglobin düzeyi, lökosit sayısı ,trombosit düzeyi ve dalak büyüklüğü arasındaki istatistiksel ilişkiyi değerlendirmişler; JAK-2 V617F mutasyonu varlığı ile ileri yaş ve hemoglobin düzeyi arasında anlamlı ilişki saptamışlar (105). Xiao Z. ve arkadaşları 142 PMF li hasta ile yaptıkları çalışmada 111 hastada (% 78) JAK-2 V617F mutasyonunu pozitif saptamışlar. Çalışmada JAK-2 V617F mutasyonu varlığı ile hepatosplenomegali arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulmuşlar (P=0,001) (92). PMF hasta sayısı az olduğundan literatürle sağlıklı bir karşılaştırma yapılamadı.

Sonuç olarak, PV ve ET hastalarında JAK-2 V617F mutasyon yükünün prognostik faktörlerle ilişkisinin olmadığı saptandı. PMF hastalarında ise vaka sayısı az olduğundan sağlıklı değerlendirme yapılamamıştır. Daha fazla hasta sayısı ile yapılacak çalışmalara ihtiyaç vardır.

6. SONUÇLAR

- PV hastalarında ≤ 60 yaş grubundaki JAK-2 V617F gen mutasyon yükü $\%39,2 \pm 14,4$ iken, >60 yaş grubundaki JAK-2 V617F gen mutasyon yükü $\%44,5 \pm 18,6$ olarak bulundu ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0,430$).
- PV hastalarında JAK-2 V617F gen mutasyon yükü ile lokosit, nötrofil, lenfosit, monosit, eozinofil ve bazofil ve trombosit sayıları arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı ($p>0,05$).
- PV hastaların 26'sında trombotik veya hemorajik komplikasyon yoktu, 4'ünde ise derin ven trombozu, pulmoner tromboemboli, serebral enfarktüs, hepatik ven trombozu vardı. Komplikasyon gelişen ve komplikasyon gelişmeyen hastalar arasında JAK-2 V617F mutasyon yükü açısından fark yoktu ($p=0,589$).
- ET hastalarından ≤ 60 yaş grubundaki JAK-2 V617F gen mutasyon yükü $\%34,6 \pm 19,3$ iken, >60 yaş grubundaki JAK-2 V617F gen mutasyon yükü $\%39,2 \pm 19,1$ olarak bulundu ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0,362$).
- ET hastalarında JAK-2 V617F gen mutasyon yükü ile lokosit, nötrofil, bazofil sayıları arasında pozitif korelasyon saptandı (sırasıyla $p=0,003$; $0,004$; $0,037$). JAK-2 V617F gen mutasyon yükü ile lenfosit sayısı arasında ise negatif korelasyon saptandı ($p=0,006$). JAK-2 V617F gen mutasyon yükü ile monosit, eozinofil ve trombosit sayıları arasında ilişki saptanmadı ($p>0,05$). ET hastalarının 60'ında ($\%95,2$) trombotik veya hemorajik komplikasyon yoktu, sadece 3'ünde ($\%4,8$) derin ven trombozu, pulmoner tromboemboli, hepatik ven trombozu vardı. Komplikasyon gelişen ve komplikasyon gelişmeyen hastalar arasında JAK-2 V617F mutasyon yükü açısından fark yoktu ($p=0,177$).
- PMF hastalarının 4'ü ($\%66,7$) kadın ve 2'si ($\%33,3$) erkek, yaş ortalaması $66 \pm 15,4$ olarak bulundu. PMF hastalarından ≤ 60 yaş grubundaki JAK-2 V617F

gen mutasyon yükü %31 iken >60 yaş grubundaki JAK-2 V617F gen mutasyon yükü %53,2±24 olarak saptandı ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi (p=0,447). PMF hastalarında JAK-2 V617F gen mutasyon yükü ile monosit sayısı arasında negatif korelasyon saptandı (p=0.20). Nötrofil, lenfosit, eozinofil, bazofil ve trombosit sayıları arasında anlamlı ilişki saptanmadı (p>0,05).

- Sonuç olarak, PV ve ET hastalarında JAK-2 V617F mutasyon yükünün prognostik faktörlerle ilişkisinin olmadığı saptandı. PMF hastalarında ise vaka sayısı az olduğundan sağlıklı değerlendirme yapılamamıştır. Daha fazla hasta sayısı ile yapılacak çalışmalara ihtiyaç vardır.



7. ÖZET

Philadelphia Kromozomu Negatif Myeloproliferatif Neoplazilerde JAK-2 V617F Mutasyon Yükünün Prognostik Faktörlerle İlişkisi

Amaç: Janus Kinaz (JAK-2 V617F) gen mutasyonunun tesbit edilmesi; Philadelphia kromozomu negatif myeloproliferatif hastalıkların patogenezi ile ilgili mekanizmaların anlaşılmasını, tanı yöntemlerinin geliştirilmesini ve tedavi için alternatifler oluşturulmasını sağlamıştır. Yapılan çalışmalarda; JAK-2 V617F gen mutasyon yükü ile Philadelphia kromozomu negatif myeloproliferatif hastalıkların tanı anındaki yaş, tromboz öyküsü, lökositoz, kaşıntı ve organomegali gibi bazı semptom ve bulguların ilişkisine değinilmektedir. Biz de çalışmamızda Philadelphia kromozomu negatif myeloproliferatif hastalıklar olarak takip ettiğimiz primer myelofibrozis, esansiyel trombositemi ve polisitemia vera hastalarında JAK-2 V617F gen mutasyon yükünün; klinik, laboratuvar ve prognostik faktörlerle ilişkisini araştırmayı amaçladık. Philadelphia kromozomu negatif myeloproliferatif hastalıklarda tedavi planı hastanın risk grubu temel alınarak yapılmaktadır. JAK-2 V617F gen mutasyon yükünün, hastalıkların risk grubu ile ilişkisinin saptanması hastalarda en uygun tedavi yaklaşımının seçilmesine olanak sağlayabilir.

Gereç ve yöntem: Çalışmaya Karadeniz Teknik Üniveristesi Tıp Fakültesi Hematoloji Bilim Dalı Polikliniğinde Ocak 2011 ile Şubat 2015 tarihleri arasında değerlendirilen ve 2008 DSÖ tanı kriterlerine göre 63 esansiyel trombositemi, 30 polisitemia vera ve 6 primer myelofibroz tanılı toplamda 99 hasta dahil edildi. Bütün hastaların periferik kan granülositlerinde JAK2 V617F mutasyon analizi, “Light Cycler Fast Start DNA Master Hybridization Probe” (Roche Diagnostics kullanıma hazır reaksiyon karışımı, Berlin, Almanya) ile test edilerek, Real Time (RT)- PCR (gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu) yöntemi ile gerçekleştirildi.

Bulgular: ET hastalarında JAK-2 V617F gen mutasyonu ile lokosit, nötrofil, bazofil sayıları arasında pozitif korelasyon saptandı (sırasıyla $p=0,003$; $0,004$; $0,037$), lenfosit sayıları arasında ise negatif korelasyon saptandı ($p=0.004$). PMF hastalarında

JAK-2 V617F gen mutasyon yükü ile monosit sayısı arasında negatif korelasyon saptandı ($p=0.20$).

Sonuç: PV ve ET hastalarında JAK-2 V617F mutasyon yükünün prognostik faktörlerle ilişkisinin olmadığı saptandı. PMF hastalarında ise vaka sayısı az olduğundan sağlıklı değerlendirme yapılamamıştır. Daha fazla hasta sayısı ile yapılacak çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar sözcükler: Myeloproliferatif hastalıklar, JAK-2 V617F gen mutasyon yükü, prognostik faktörler,



8. ABSTRACT

The relationship between load of JAK-2 V617F mutation and prognostic factors in Philadelphia chromosome negative myeloproliferative neoplasms

Objective: The determine Janus Kinase (JAK-2 V617F) gene mutations; understanding of the mechanisms associated with Philadelphia chromosome negative myeloproliferative disease pathogenesis, developing of diagnostic methods and creating treatment alternatives. In studies; they touch on relationship with JAK-2 V617F gene mutation load and age at diagnosis, thrombosis history, leukocytosis, some symptoms and signs such as itching and organomegaly at Philadelphia chromosome negative myeloproliferative disease. In our study, we investigated the relationship of JAK-2 V617F gene mutation load with clinical, laboratory and prognostic factor at patients with Philadelphia chromosome negative myeloproliferative disorders ;primary myelofibrosis, essential thrombocythemia and polycythemia vera patients. Philadelphia chromosome negative myeloproliferative disease treatment plans would made based on the patient's risk group.the determining of relationship with JAK-2 V617F gene mutation load and disease risk group may allow the selection of optimal treatment for patients.

Materials and methods :We took 99 patients as 63 essential thrombocythemia, 30 polycythemia vera and 6 primary myelofibrosis diagnosed patients at Karadeniz Teknik Univercity Faculty of Medicine Hematology department's polyclinic patients between January 2011 and February 2015 according to the 2008 WHO diagnostic criteria. JAK-2 V617F mutation analysis of all patients peripheral blood granulocytes were tested with "Light Cyler FastStart DNA Master Hybridization Probe" (Roche Diagnostics ready to use the reaction mixture, Berlin, Germany), and performed with Real Time (RT) - PCR (real-time polymerase chain reaction) method.

Findings: We found positive correlation between JAK-2 V617F gene mutation load and leukocytes, neutrophils, basophils counts at ET patients (in order of $p = 0.003$; 0.004 ; 0.037).And we found a negative correlation between JAK-2 V617F gene mutation load and lymphocytes counts at complete blood count ($p=0,004$). We found negative

correlation between JAK-2 V617F gene mutation load JAK-2 V617F and monocytes counts at complete blood count at PMF patients ($p = 0.020$).

Result: We couldnt find a relationship between JAK-2 V617F mutation load and prognostic factors at PV and ET patients. We couldnt do a healthy assesment at PMF patients because of we had less case. There need to be studies with much more number of patients.

Key Words: myeloproliferative diseases, JAK-2 V617F gene mutation load, prognostic factors



9. KAYNAKLAR

1. McCulloch EA. Stem cell renewal and determination during clonal expansion in normal and leukaemic haemopoiesis. *Cell Prolif* 1993; 26:399-425.
2. Tefferi A. Chronic myeloid disorders: Classification and treatment overview. *Semin Hematol* 2001; 38:1-4.38:1-4.
3. 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, 14–22
4. Faderl S, Kantarjian HM, Talpaz M. Chronic myelogenous leukemia: *update on biology and treatment*. *Oncology (Williston Park)*. 1999;13:169-180.
5. Lichtman MA, Liesveld JL. Chronic myelogenous leukemia and related disorders. In: Lichtman MA, Beutler E, Kipps TJ, Seligshon U, Kaushansky K, Prchal JT, Eds. *Williams Hematology*, New York: McGraw-Hill; 2006:1237-1294.
6. Harrison CN. Current trends in essential thrombocythaemia. *Br J Haematol* 2002; 117:796-808.
7. Schafer AI. Essential Thrombocythemia and Thrombocytosis. In: Lichtman MA, Beutler E, Kipps TJ, Seligshon U, Kaushansky K, Prchal JT, Eds. *Williams Hematology*, New York: McGraw-Hill, 2006: 1785-1794.
8. Tefferi A, Thiele J, Orazi A et al. Proposals and rationale for revision of the World Health Organization diagnostic criteria for polycythemia vera, essential thrombocythemia, and primary myelofibrosis: recommendations from an ad hoc international expert panel. *Blood* 2007; 110:1092- 1097.
9. Tefferi A, Pardanani A. Evaluation of "increased" hemoglobin in the JAK2 mutations era: A diagnostic algorithm based on genetic tests. *Mayo Clin Proc* 2007; 82:599-604.
10. Siitonen T, Zheng A, Savolainen ER, Koistinen P. Spontaneous granulocyte-macrophage colony growth by peripheral blood mononuclear cells in myeloproliferative disorders. *Leuk Res* 1996; 20:187- 195.
11. Champion KM, Gilbert JG, Asimakopoulos FA et al. Clonal haemopoiesis in normal elderly women: Implications for the myeloproliferative disorders and myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol* 1997; 97:920-926.

12. Najean Y, Rain JD. The very long-term evolution of polycythemia vera — an analysis of 318 patients initially treated by phlebotomy or P-32 between 1969 and 1981. *Semin Hematol* 1997; 34:6-16.
13. Landolfi R, Marchioli R, Patrono C. Mechanisms of bleeding and thrombosis in myeloproliferative disorders. *Thromb Haemost* 1997; 78:617-621.
14. van Genderen PJ, Lucas IS, van Strik R et al. Erythromelalgia in essential thrombocythemia is characterized by platelet activation and endothelial cell damage but not by thrombin generation. *Thromb Haemost* 1996; 76:333-338.
15. Rozman C, Giralt M, Feliu E et al. Life expectancy of patients with chronic nonleukemic myeloproliferative disorders. *Cancer* 1991; 67:2658-2663.
16. Mesa RA, Niblack J, Wadleigh M et al. The burden of fatigue and quality of life in myeloproliferative disorders (MPDs): an international internet-based survey of 1179 MPD patients. *Cancer* 2007; 109:68-76.
17. Silva M, Richard C, Benito A et al. Expression of Bcl-x in erythroid precursors from patients with polycythemia vera. *N Engl J Med* 1998; 338:564-571.
18. Toyama K, Karasawa M, Yamane A et al. JAK2-V617F mutation analysis of granulocytes and platelets from patients with chronic myeloproliferative disorders: advantage of studying platelets. *Br J Haematol* 2007; 139:64-69.
19. Campbell PJ, Green AR. The myeloproliferative disorders. *N Engl J Med* 2006; 355:2452-2466.
20. Prchal JT, Beutler E. Primary and Secondary Polycythemia (Erythrocytosis). In: Lichtman MA, Beutler E, Kipps TJ, Seligshon U, Kaushansky K, Prchal JT, Eds. *Williams Hematology*, New York: McGraw-Hill, 2006:779-802.
21. Bittorf T, Seiler J, Lüdtke B, et al. Activation of STAT5 during EPO-directed suppression of apoptosis. *Cell Signal* 2000;12:23–30.
22. Jatiani SS, Baker SJ, Silverman LR, Reddy EP. Jak/STAT pathways in cytokine signaling and myeloproliferative disorders: approaches for targeted therapies. *Genes Cancer* 2010;1:979–93.
23. Nicolas CS, Peineau S, Amici M, et al. The Jak/STAT pathway is involved in synaptic plasticity. *Neuron* 2012;73:374–90.
24. Ghoreschi K, Laurence A, O’Shea JJ. Janus kinases in immune cell signaling. *Immunol Rev* 2009;228:273–87.
25. Zou H, Yan D, Mohi G. Differential biological activity of disease-associated JAK2 mutants. *FEBS Lett* 2011;585:1007–13.
26. Schindler C, Plumlee C. Interferons use the JAK-STAT pathway. *Semin Cell Dev Biol* 2008;19:311–8.

27. Benekli M, Baer MR, Baumann H, Wetzler M. Signal transducer and activator of transcription proteins in leukemias. *Blood* 2003;101:2940–54.
28. Levy DE, Darnell JE. Stats: transcriptional control and biological impact. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002;3:651–62.
29. Vera J, Rateitschak K, Lange F, et al. Systems biology of JAK-STAT signalling in human malignancies. *Prog Biophys Mol Biol* 2011;106:426–34.
30. Sandberg EM, Wallace TA, Godeny MD, VonDerLinden D, Sayeski PP. Jak2 tyrosine kinase: a true jak of all trades? *Cell Biochem Biophys* 2004;41:207–32.
31. Kisseleva T, Bhattacharya S, Braunstein J, Schindler CW. Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges. *Gene* 2002;285:1–24.
32. Witthuhn BA, Quelle FW, Silvennoinen O, et al. JAK2 associates with the erythropoietin receptor and is tyrosine phosphorylated and activated following stimulation with erythropoietin. *Cell* 1993;74:227–36.
33. Levine RL, Belisle C, Wadleigh M, et al. X-inactivation-based clonality analysis and quantitative JAK2V617F assessment reveal a strong association between clonality and JAK2V617F in PV but not ET/MMM, and identifies a subset of JAK2V617F-negative ET and MMM patients with clonal hematopoiesis. *Blood* 2006;107:4139–41.
34. Silva M, Richard C, Benito A, et al. Expression of Bcl-x in erythroid precursors from patients with polycythemia vera. *N. Engl J Med* 1998;338:564–71.
35. Tefferi A, Rumi E, Finazzi G, et al. Survival and prognosis among 1545 patients with contemporary polycythemia vera: an international study. *Leukemia* 2013;27:1874–81
36. Delhommeau F, Jeziorowska D, Marzac C, Casadevall N. Molecular aspects of myeloproliferative neoplasms. *Int J Hematol* 2010;91:165–73.
37. Slattery ML, Lundgreen A, Kadlubar SA, Bondurant KL, Wolff RK. JAK/STAT/SOCS-signaling pathway and colon and rectal cancer. *Mol Carcinog* 2013;52:155–66.
38. Santos FPS, Verstovsek S. JAK2 inhibitors: are they the solution? *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 2011;11:28–36. 31
39. Levine RL, Wadleigh M, Cools J, et al. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell* 2005;7:387–97.
40. Lu X, Levine R, Tong W, et al. Expression of a homodimeric type I cytokine receptor is required for JAK2V617F-mediated transformation. *Proc Natl Aca Sci U S A*. 2005;102:18962–7.

41. Garçon L, Rivat C, James C, et al. Constitutive activation of STAT5 and Bel-xL overexpression can induce endogenous erythroid colony formation in human primary cells. *Blood* 2006;108:1551–4.
42. Pikman Y, Lee BH, Mercher T, et al. MPLW515L is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *PLoS Med* 2006;3:e270.
43. Pardanani AD, Levine RL, Lasho T, et al. MPL515 mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: a study of 1182 patients. *Blood* 2006;108:3472–6.
44. Levine RL, Wernig G. Role of JAK-STAT signaling in the pathogenesis of myeloproliferative disorders. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2006;233:9- 510.
45. Prchal JT, Beutler E. Primary and Secondary Polycythemia (Erythrocytosis). In: Lichtman MA, Beutler E, Kipps TJ, Seligshon U, Kaushansky K, Prchal JT, Eds. *Williams Hematology*, New York: McGraw-Hill, 2006:779-802.
46. Ania BJ, Suman VJ, Sobell JL et al. Trends in the incidence of polycythemia vera among Olmsted county, Minnesota residents, 1935-1989. *Am J Hematol* 1994; 47:89-93.
47. Berk PD, Goldberg JD, Donovan PB et al. Therapeutic recommendations in polycythemia vera based on Polycythemia Vera Study Group protocols. *Semin Hematol* 1986; 23:132-143.
48. Acharya J, Westwood AJ, Sawyer BM, et al. Identification of latent myeloproliferative disease in patients with Budd-Chiari syndrome using X-chromosome inactivation patterns and in vitro erythroid colony formation. *Eur J Haematol* 1995; 55:315-321.
49. Michiels JJ, van Genderen PJ, Jansen PH, Koudstaal PJ. Atypical transient ischemic attacks in thrombocythemia of various myeloproliferative disorders. *Leuk Lymphoma* 1996; 1 65-70.
50. Steinman HK, Kobza-Black A, Lotti TM, et al. Polycythaemia rubra vera and water-induced pruritus: Blood histamine levels and cutaneous fibrinolytic activity before and after water challenge. *Br J Dermatol* 1987; 116:329-333.
51. Jackson N, Burt D, Crocker J, Boughton B. Skin mast cells in polycythaemia vera: Relationship to the pathogenesis and treatment of pruritus. *Br J Dermatol* 1987; 116:21-29.
52. Landolfi R, Di Gennaro L, Barbui T, De Stefano V, Finazzi G, Marfisi R, Tognoni G, Marchioli R. European Collaboration on Low-Dose Aspirin in Polycythemia Vera (ECLAP): Leukocytosis as a major thrombotic risk factor in patients with polycythemia vera. *Blood* 2007;109:2446-2452.

53. Spivak JL, Silver RT. The revised World Health Organization diagnostic criteria for polycythemia vera, essential thrombocytosis, and primary myelofibrosis: an alternative proposal. *Blood* 2008; 112: 231-239.
54. Gruppo Italiano Studio Policitemia. Polycythemia vera: the natural history of 1213 patients followed for 20 years. *Ann Intern Med* 1995; 123:656-664. 55
55. Gangat N, Strand J, Li CY, et al. Leucocytosis in polycythaemia vera predicts both inferior survival and leukaemic transformation. *Br J Haematol*, 2007; 138:354-358.
56. Elliot MA, Tefferi A. Thrombosis and haemorrhage in polycythaemia vera and essential thrombocythaemia. *BrJ Haematol* 2005; 128:275-290.
57. Vannucchi AM, Guglielmelli P, Tefferi A. Advances in Understanding and Management of Myeloproliferative Neoplasms. *CA Cancer J Clin* 2009;59;171-191
58. Nordic MPD Study Group Guideline 2009.<http://www.nordicmpd.org/guidelines.shtml>.
59. Streiff MB, Smith B, Spivak JL. The diagnosis and management of polycythemia vera in the era since the Polycythemia Vera Study Group: a survey of American Society of Hematology members' practice patterns. *Blood* 2002; 99:1144-1149.
60. Anagrelide Study Group. Anagrelide, a therapy for thrombocythemic states: experience in 577 patients. *Am J Med* 1992; 92:69-76
61. Samuelsson J, Hasselbalch H, Bruserud O, et al. A phase II trial of pegylated interferon alpha-2b therapy for polycythemia vera and essential thrombocythemia: feasibility, clinical and biologic effects, and impact on quality of life. *Cancer* 2006; 106:2397-2405.
62. Harrison C. Pregnancy and its management in the Philadelphia negative myeloproliferative diseases. *Br J Haematol* 2005; 129:293-306.
63. Fruchtman SM, Mack K, Kaplan ME, et al. From efficacy to safety - A Polycythemia Vera Study Group report on hydroxyurea in patients with polycythemia vera. *Semin Hematol* 1997; 34:17-23.
64. Elliott MA, Tefferi A. Interferon-alpha therapy in polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Semin Thromb Hemost* 1997; 23:463-472.
65. Balan KK, Critchley M. Outcome of 259 patients with primary proliferative polycythaemia (Ppp) and idiopathic thrombocythaemia (It) treated in a regional nuclear medicine department with phosphorus- 32--a 15 year review. *Br J Radiol* 1997; 70:1169-1173.
66. Mesa RA, Silverstein MN, Jacobsen, SJ et al. Population-based incidence and survival figures in essential thrombocythemia and agnogenic myeloid metaplasia: an Olmsted County Study, 1976-1995. *Am J Hematol* 1999; 61:10-15.

67. Rozman C, Giralt M, Feliu E, et al. Life expectancy of patients with chronic nonleukemic myeloproliferative disorders. *Cancer* 1991; 67:2658-2663.
68. Tefferi A, Fonseca R, Pereira DL, Hoagland HC. A long-term retrospective study of young women with essential thrombocythemia. *Mayo Clin Proc* 2001; 76:22-28.
69. Pardanani AD, Levine RL, Lasho T, et al. MPL515 mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: a study of 1182 patients. *Blood* 2006; 108:3472-3476.
70. Tefferi A, Lasho TL, Wolanskyj AP, Mesa RA. Neutrophil PRV-1 expression across the chronic myeloproliferative disorders and in secondary or spurious polycythemia. *Blood* 2004; 103:3547-3548.
71. Iland H, Laszlo J, Murphy S. Essential thrombocythemia. In: Wasserman LR, Berk PD, Berlin NI, Eds. *Polycythemia Vera and the Myeloproliferative Disorders*, Philadelphia: Saunders, 1995:292.
72. Hirayama Y, Sakamaki S, Matsunaga T, et al. Concentrations of thrombopoietin in bone marrow in normal subjects and in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura, aplastic anemia, and essential thrombocythemia correlate with its mRNA expression of bone marrow stromal cells. *Blood* 1998; 92:46-52.
73. Teofili L, Martini M, Luongo M, et al. Overexpression of the polycythemia rubra vera-1 gene in essential thrombocythemia. *J Clin Oncol* 2002; 20:4249-4254.
74. Carobbio A, Finazzi G, Guerini V et al. Leukocytosis is a risk factor for thrombosis in essential thrombocythemia: interaction with treatment, standard risk factors, and Jak2 mutation status. *Blood* 2007; 109:2310-2313.
75. Gangat N, Wolanskyj AP, McClure RF et al. Risk stratification for survival and leukemic transformation in essential.
76. Gangat N, Wolanskyj AP, Schwager SM et al. Estrogen-based hormone therapy and thrombosis risk in women with essential thrombocythemia. *Cancer* 2006; 106:2406-2411.
77. Schafer AI. Molecular basis of the diagnosis and treatment of polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Blood* 2006; 107:4214-4222.
78. Passamonti F, Rumi E, Pungolino E et al. Life expectancy and prognostic factors for survival in patients with polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Am J Med* 2004; 117:755-761.
79. Michiels JJ, Koudstaal PJ, Mulder AH et al. Transient neurologic and ocular manifestations in primary thrombocythemia. *Neurology* 1993; 43:1107-1110
80. Cortelazzo S, Viero P, Finazzi G, D'Emilio A, Rodeghiero F, Barbui T. Incidence and risk factors for thrombotic complications in a historical cohort of 100 patients with essential thrombocythemia. *J Clin Oncol*. 1990; 8:556-62

81. Tefferi A. Risk-based management in essential thrombocythemia. ASH Education Program Book. *Hematology* 1999; :172
82. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al, eds. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, France: IARC; 2008
83. Hans Michael Kvasnicka and Juergen Thiele. Prodromal myeloproliferative neoplasms: The 2008 WHO classification. *Am. J. Hematol.* 85:62-69, 2010
84. Landolfi R, Di Gennaro L, Barbui T, et al. Leukocytosis as a major thrombotic risk factor in patients with polycythemia vera. *Blood* 2007;109:2446-2452.
85. Carobbio A, Finazzi G, Guerini V, et al. Leukocytosis is a risk factor for thrombosis in essential thrombocythemia: interaction with treatment, standard risk factors, and Jak2 mutation status. *Blood* 2007;109: 2310-2313.
86. Akay O.M, Yaşar N.Ş. et al.: Retrospective analysis of 111 cases with Chronic Myeloproliferative Disorders: Clinical Features and Survival. *Turkiye Klinikleri J Med Sci* 2009,29 (1)162-8
87. Berlin NI. Diagnosis and classification of the polycythemias. *Semin Hematol* 1975;12:339–51.
88. Tefferi A, Rumi E, Finazzi G, et al. Survival and prognosis among 1545 patients with contemporary polycythemia vera: an international study. *Leukemia* 2013;27:1874–81
89. Anía BJ, Suman VJ, Sobell JL, et al. Trends in the incidence of polycythemia vera among Olmsted County, Minnesota residents, 1935-1989. *Am J Hematol* 1994;47:89–93.
90. Wilks AF. Two putative protein-tyrosine kinases identified by application of the polymerase chain reaction. *PNAS* 1989; 86:1603-16077.
91. Janus Roman God of Begginings; www.novareinna.com/festive/janus.html; Erişim tarihi: 14.10.2008
92. Rodig SJ, Meraz MA, White JM, Lampe PA, Riley JK, Arthur CD, King KL, Sheehan KC, Yin L, Pennica D, Johnson EM, Schreiber RD (). "Disruption of the Jak1 gene demonstrates obligatory and nonredundant roles of the Jaks in cytokine-induced biologic responses". *Cell* 1998; 93:373-383.
93. Liesveld JL, Lichtman MA. Acute myelogenous leukemia. In: Lichtman MA, Beutler E, Kipps TJ, Seligshon U, Kaushansky K, Prchal JT, Eds. *Williams Hematology*, New York: McGraw-Hill; 2006: 1183-1236
94. Valent P. 1995 Mack-Forster Award Lecture. Review. Mast cell differentiation antigens: expression in normal and malignant cells and use for diagnostic purposes, *Eur. J. Clin. Invest.* 1995; 25:715-720

95. Vannucchi AM, Antonioli E, Guglielmelli P, et al. Prospective identification of highrisk polycythemia vera patients based on JAK2 (V617F) allele burden. *Leukemia* 2007;21:1952–9.
96. McNally RJ, Rowland D, Roman E, Cartwright RA. Age and sex distributions of hematological malignancies in the U.K. *Hematol Oncol* 1997;15:173-89
97. Passamonti F, Rumi E, Pungolino E, Malabarba L, Bertazzoni P, Valentini M, Orlandi E, Arcaini L, Brusamolino E, Pascutto C, Cazzola M, Morra E, Lazzarino M. Life expectancy and prognostic factors for survival in patients with polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Am J Med.* 2004;117 (10):755-61
98. Stoiber D, Kovacic B, Schuster C, Schellack C, Karaghiosoff M, Kreibich R, Weisz E, Artwohl M, Kleine OC, Muller M, Baumgartner-Parzer S, Ghysdael J, Freissmuth M, Sexl V. TYK2 is a key regulator of the surveillance of B lymphoid tumors. *J. Clin. Invest.* 2004; 114:1650-1658
99. Hebenstreit D, Horejs-Hoeck J and Duschl A. JAK/STAT-dependent gene regulation by cytokines. *Drug News Perspect* 2005; 18:243-249
100. Dick R, Watkinson A. The liver and spleen. In: Sutton D, Ed. *Textbook of Radiology and Imaging*, London: Churchill Livingstone 2003; 737-786
101. D. L. Krebs and D. J. Hilton. SOCS proteins: negative regulators of cytokine signaling. *Stem Cells.* 2001; 19:378-387
102. Shuai K. Regulation of cytokine signaling pathways by PIAS proteins" *Cell Research* 2006; 16:196- 202
103. Olsen RJ, Tang Z, Farkas DH, Bernard DW, MD, Zu Y, Chang CC. Detection of the JAK2V617F Mutation in Myeloproliferative Disorders by Melting Curve Analysis Using the LightCycler System. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine:* 2006; 130:997-1003
104. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*, 1988; 16:1215
105. Mesa RA. Navigating the evolving paradigms in the diagnosis and treatment of myeloproliferative disorders. *Hematology* 2007; 355-362.