

**T. C.  
İSTANBUL BİLİM ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**



**( UZMANLIK TEZİ )**

**MİYELOPROLİFERATİF NEOPLAZİLERDE ASXL1 GEN  
MUTASYONLARININ KLİNİK SEYİR VE PROGNOZA  
ETKİSİ**

**Dr. Neslihan Uslu**

**Tez Danışmanı  
Prof. Dr. Reyhan Diz Küçükkaya**

**İSTANBUL, 2015**

## BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar tüm aşamalarda etik dışı hiçbir davranışımın olmadığını, tezimdaki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışması sonucu elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlar için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Dr. Neslihan Uslu



## TEŞEKKÜR

İç hastalıkları uzmanlık eğitimim süresince üzerimde emeği geçen, bilgi ve deneyimleri ile mesleğimi sevmemi sağlayan başta Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr Aslı Çurgunlu'ya ve iç hastalıkları bölümünü seçmemde bana vesile olan, asistanlık sürecimde bilgi ve deneyimlerinden faydaladığım, tezimin hazırlanması aşamasında çalışmalarımı yönlendiren, büyük ilgi ve desteğini gördüğüm tez danışmanım Prof. Dr. Reyhan Diz Küçükkaya'ya, sayın Rektörümüz Prof. Dr. Çavlan Çiftçi'ye,

Asistanlığım süresince bilgi ve deneyimlerinden faydalanma fırsatı bulduğum değerli hocalarım Prof. Dr. Levent Erdem'e, Prof. Dr. Tevfik Ecdar'e, Prof. Dr. Mutlu Arat'a, Prof. Dr. Gökhan Demir'e, Prof. Dr. Hatice Betül Uğur Altun'a, Prof. Dr. Şule Yavuz'a, Prof. Dr. Süheyla Güven Apaydın'a, Prof. Dr. Coşkun Tecimer'e, Doç. Dr. Neslihan Yılmaz'a, Doç. Dr. Sezer Sağlam'a, Doç. Dr. Hakan Ümit Ünal'a, Doç. Dr. Murat Akyıldız'a, Yard. Doç. Dr. Ayşe Sinangil'e, Yard. Doç. Dr. Ahmet Vedat Çelik'e, Yard. Doç. Dr. Çetin Ordu'ya, Yard. Doç. Dr. Esat Namal'a, Yard. Doç. Dr. Semra Aktaş'a, Uzm. Dr. Serkan Güvenç'e, Uzm. Dr. Yonca Çağatay'a ve Prof. Dr. Mahmut Çarin'e ve diğer tüm hocalarıma ayrı ayrı en içten teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam sırasında yardımlarını esirgemeyen Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'ndan Yrd. Doç. Dr. Veysel Sabri Hançer'e ve hematoloji servisi çalışanlarına sonsuz teşekkür ederim. Asistanlığım süresince her türlü destek ve yardımını esirgemeyen, bilgilerinden istifade ettiğim, her problemim için çözüm önerisi olan değerli ablam Uzm. Dr. Nergis Ekmen'e, birlikte çalışmaktan her zaman mutluluk duyduğum tüm doktor arkadaşlarıma ve hastane çalışanlarına sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Hayatımın her anında yanımda olan, asistanlık sürecinin tüm zorluklarına benimle birlikte katlanan ve her konuda desteğini benden esirgemeyen sevgili eşim Eren Uslu'ya ve varlığıyla beni motive eden yaşama sevincim biricik kızıma en içten teşekkürlerimi sunarım. Her zaman yanımda olan, sevgi ve desteklerini benden hiçbir zaman esirgemeyen annem, babam ve tüm aileme en içten teşekkürü borç bilirim.

Dr. Neslihan Uslu

# İÇİNDEKİLER

BEYAN.....	I
TEŞEKKÜR .....	II
İÇİNDEKİLER.....	III
TABLolar LİSTESİ .....	V
ŞEKİLLER LİSTESİ .....	VII
KISALTMALAR .....	VIII
ÖZET .....	X
ABSTRACT.....	XIII
1.GİRİŞ ve AMAÇ .....	1
2.GENEL BİLGİLER .....	2
2.1.MİYELOPROLİFERATİF NEOPLAZİLER .....	2
2.2.POLİSİTEMİA VERA.....	5
2.2.1.Epidemiyoloji.....	5
2.2.2.Tanı .....	5
2.2.3.Klinik Özellikler .....	7
2.2.4.Prognoz .....	9
2.2.5.Tedavi.....	9
2.3.ESANSİYEL TROMBOSİTEMİ .....	11
2.3.1.Epidemiyoloji.....	11
2.3.2.Tanı .....	11
2.3.3.Klinik Özellikler .....	13
2.3.4.Prognoz .....	14
2.3.5.Tedavi.....	15
2.4.PRİMER MİYELOFİBROZİS.....	15
2.4.1.Epidemiyoloji.....	15
2.4.2.Tanı .....	16
2.4.3.Klinik Özellikler .....	17
2.4.4.Prognoz .....	19
2.4.5.Tedavi.....	20

<b>2.5.MİYELOPROLİFERATİF NEOPLAZİLERDE MUTASYONLAR.....</b>	<b>20</b>
<b>2.5.1.JAK-2 V617F Mutasyonu .....</b>	<b>22</b>
<b>2.5.2.JAK-2 ekson 12 Mutasyonu.....</b>	<b>23</b>
<b>2.5.3.MPL Mutasyonları.....</b>	<b>24</b>
<b>2.5.4.CALR (Kalretikülin) Mutasyonu.....</b>	<b>24</b>
<b>2.5.5.ASXL1 Gen Mutasyonları .....</b>	<b>25</b>
<b>3.GEREÇ VE YÖNTEM .....</b>	<b>29</b>
<b>3.1.HASTALAR VE TAKİP .....</b>	<b>29</b>
<b>3.2.METOD .....</b>	<b>30</b>
<b>3.2.1.Genomik DNA İzolasyonu .....</b>	<b>30</b>
<b>3.2.2.Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) .....</b>	<b>30</b>
<b>3.2.3.DNA Dizi Analizi.....</b>	<b>31</b>
<b>3.2.3.1.Saflaştırma Aşaması.....</b>	<b>31</b>
<b>3.2.3.2.Döngü Dizileme (Cycle Sequencing).....</b>	<b>31</b>
<b>3.2.3.3.NaAc İle Saflaştırma.....</b>	<b>32</b>
<b>3.3.İSTATİSTİKSEL ANALİZ.....</b>	<b>32</b>
<b>4.BULGULAR .....</b>	<b>33</b>
<b>5.TARTIŞMA .....</b>	<b>50</b>
<b>6.SONUÇLAR .....</b>	<b>58</b>
<b>7.KAYNAKLAR .....</b>	<b>59</b>
<b>8.EKLER .....</b>	<b>69</b>
<b>8.1.EK 1 ETİK KURUL .....</b>	<b>69</b>
<b>8.2.EK 2 ETİK KURUL .....</b>	<b>70</b>
<b>9.ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>71</b>

## TABLolar LİSTESİ

**TABLO NO:**

**SAYFA NO:**

<b>Tablo 1.</b> Miyeloid neoplazilerin 2008 DSÖ sınıflandırma şeması(3)	4
<b>Tablo 2.</b> Polisitemia Vera 2008 DSÖ tanı kriterleri(17)	5
<b>Tablo 3.</b> Sekonder Eritrositoz Nedenleri(18)	6
<b>Tablo 4.</b> PV’de risk kategorileri ve tedavi yönetimi(34)	10
<b>Tablo 5.</b> Esansiyel Trombositemi 2008 DSÖ sınıflandırma kriterleri(17)	11
<b>Tablo 6.</b> Sekonder Trombositoz Nedenleri(36)	12
<b>Tablo 7.</b> ET’de risk kategorileri ve tedavi yönetimi(34)	15
<b>Tablo 8.</b> Primer Miyelofibrozis 2008 DSÖ tanı kriterleri(17)	17
<b>Tablo 9.</b> Primer Miyelofibrozis IPSS risk skorlaması(60)	19
<b>Tablo 10.</b> Miyeloproliferatif Neoplazilerde Mutasyonlar(49-53)	26
<b>Tablo 11.</b> Eksonların çoğaltılmasında kullanılan PZR karışımı	30
<b>Tablo 12.</b> ET, PV, PMF tanısı almış hastaların demografik özellikleri	33
<b>Tablo 13.</b> ET, PV, PMF tanısı almış hastaların klinik özellikleri	34
<b>Tablo 14.</b> ET, PV, PMF tanısı almış hastaların hastalık başlangıç semptomları ve splenomegali varlığı ilişkisi	34
<b>Tablo 15.</b> ET, PV, PMF tanısı almış hastalarda tromboz ve kanama komplikasyonları görülme durumu	35
<b>Tablo 16.</b> ET, PV, PMF tanısı almış hastalarda genetik mutasyon varlığı	36
<b>Tablo 17.</b> ET, PV, PMF tanısı almış hastaların ASXL1 gen mutasyonları varlığına göre karşılaştırılması	38
<b>Tablo 18.</b> ASXL1 gen mutasyonları	38
<b>Tablo 19.</b> ET, PV, PMF tanısı almış hastaların demografik özelliklerinin ASXL1 gen mutasyonları varlığına göre karşılaştırılması	38
<b>Tablo 20.</b> ET, PV, PMF tanısı almış hastaların klinik özelliklerinin ASXL1 gen mutasyonları varlığına göre karşılaştırılması	39

<b>Tablo 21.</b> ET, PV, PMF tanısı almış hastalarda ASXL1 gen mutasyonları varlığının hastalık başlangıç semptomları ve splenomegali varlığı ile karşılaştırılması	40
<b>Tablo 22.</b> ET, PV, PMF tanısı almış hastalarda ASXL1 gen mutasyonları varlığının komplikasyonlar ile karşılaştırılması	40
<b>Tablo 23.</b> ET, PV, PMF tanısı almış hastalarda ASXL1 gen mutasyonları ile JAK-2 V617F, MPL W515L/K ve CALR ilişkisinin karşılaştırılması	41
<b>Tablo 24.</b> ET, PV ve PMF tanısı almış hastalarda JAK-2 V617F(+) ve ASXL1(+) birlikteliği	41
<b>Tablo 25.</b> PMF hastalarının genel özellikleri	41
<b>Tablo 26.</b> ASXL1 gen mutasyonları olan hastaların genel özellikleri	42
<b>Tablo 27.</b> Malignitesi bulunan hastaların genel özellikleri	49
<b>Tablo 28.</b> ET, PV ve PMF hastalarında ASXL1 gen mutasyonlarının literatürlerde görülme oranları(53, 81, 84, 85)	53

## ŞEKİLLER LİSTESİ

<b>Sekil No:</b>	<b>Sayfa No:</b>
Şekil 1. Janus Kinazların Domain Yapısı(64)	23
Şekil 2. ASXL1 domain yapısı(80)	26
Şekil 3. ET, PV, PMF tanısı almış hastaların hastalık başlangıç semptomları	35
Şekil 4. ET, PV, PMF tanısı almış hastalarda splenomegali varlığı	35
Şekil 5. ET, PV, PMF tanısı almış hastalarda tromboz ve kanama komplikasyonları varlığı	36
Şekil 6. ET, PV, PMF tanısı almış hastalarda genetik mutasyon varlığı	37
Şekil 7. ET, PV, PMF tanısı almış hastaların ASXL1 gen mutasyonları varlığı ile ilişkisi	39



## KISALTMALAR

**AML:** Akut myeloid lösemi

**Asx:** Drosophila melanogaster additional sex combs

**ASXL:** Additional sex-comb like

**BFU-E:** Burst forming unit-eritroid

**BMI:** Body Mass Index

**CALR:** Kalretikülün gen mutasyonu

**CBL:** Kasitas B hücreli lenfoma mutasyonu

**c-Mpl:** Trombopoietin reseptörü

**DNA:** Deoksiribonükleik asit

**DNMT3A:** DNA sitozin metiltransferaz

**DSÖ:** Dünya Sağlık Örgütü

**EEC:** Endojen eritroid koloni büyümesi

**EGF:** Epidermal büyüme faktörü

**EPO:** Eritropoietin

**ET:** Esansiyel Trombositemi

**EZH2:** Zest homolog 2 geliştirici

**HARE-HTH:** HB1, ASXL1, restriction endonuclease helix-turn helix domain

**hCM:** Hidroksimetil sitozin

**IDH1/IDH2:** İsositrat dehidrogenaz

**IKZF1:** İkaros ailesi çinko parmak 1 mutasyonu

**JH:** Janus homoloji

**KEL:** Kronik eozinofilik lösemi

**KML:** Kronik myeloid lösemi

**KMML:** Kronik myelomonositik lösemi

**KNL:** Kronik nötrofilik lösemi

**LAP:** Lökosit alkalin fosfataz

**mC:** Metil sitozin

**MCV:** Ortalama kırmızı küre hacmi

**MDS:** Miyelodisplastik sendrom  
**MPN:** Miyeloproliferatif neoplazi  
**Ph:** Philedelphia kromozomu  
**PHD:** Plant homeofinger domain  
**PMF:** Primer Myelofibrozis  
**POEMS:** Polinöropati, Organomegali, Endokrinopati, M Protein ve cilt (skin) bulguları  
**PRC:** Policomb represiv complex  
**PV:** Polisitemia Vera  
**PZR:** Polimeraz Zincir Reaksiyonu  
**RAEB:** Refrakter anemi artmış blastlı  
**RUNX:** Runt related transcription factor  
**SF3B1:** 3B Subuniti ekleyici faktör  
**SRSF2:** Serin arjinin ekleyici faktör 2  
**TET:** Ten eleven translocation  
**TPO:** Trombopoietin  
**TYK 2:** Tirozin kinaz 2  
**U2AF1:** Küçük nükleer yardımcı faktör 2

## ÖZET

### MİYELOPROLİFERATİF NEOPLAZİLERDE ASXL1 GEN MUTASYONLARININ KLİNİK SEYİR VE PROGNOZA ETKİSİ

**Amaç:** Kronik miyeloproliferatif neoplaziler (MPN), kemik iliğinde her üç hücre serisinde klonal çoğalmayla karakterize hastalıklar grubunu oluşturur. Bu hastalık grubunda yer alan kronik miyeloid lösemi (KML), ‘Philedelphia kromozomu’ ve bunun onkogeni BCR-ABL pozitif klondan gelişir, farklı klinik özelliklere sahiptir. Ph (-) MPN başlıca; esansiyel trombositemi (ET), polistemia vera (PV) ve primer miyelofibrozis (PMF) olarak gruplandırılır. PV; eritrosit kitlesinde artış, ET; trombosit sayısında artış, PMF ise kemik iliğinde fibrozis ile karakterizedir. 2005 yılında tanımlanan JAK-2 V617F mutasyonu ile PV hastalarının %95-98’inde, ET ve PMF hastalarının %50’sinde klonal gelişimi göstermek mümkün olmuştur. Daha sonra PV’de JAK2 exon-12 mutasyonları, PMF ve ET’de MPL W515L/K ve CALR (kalretikülin) mutasyonları tanımlanmıştır. MPN hastalarında olduğu gösterilen mutasyonlardan biri de ASXL1 gen mutasyonlarıdır. ASXL (Additional sex comb like) 1, ASXL (Additional sex comb like) 2 ve ASXL (Additional sex comb like) 3 ile birlikte HOX genini baskılayan *Asx (Drosophila melanogaster additional sex combs)* geni ile ilişkilidir. ASXL1 gen mutasyonları genelde çerçeve kayması mutasyonları şeklinde olup, genin 12. eksonunda yer alırlar ve genellikle karboksi terminalinde PHD (*plant homeofinger domain*) kaybı ile kendilerini gösterirler. ASXL1 gen mutasyonları PV’de % 2-7, ET’de % 0-10, PMF’de % 13-32 oranında bildirilmiştir. ASXL1 gen mutasyonlarının miyeloproliferatif neoplazilerin patogenezi ve kanser biyolojisinde önemli değişiklikler yaptığı düşünülmektedir. Bu mutasyonların hastalık seyrinde olumsuz etkilerinin olduğunu, bu nedenle mutasyon saptanan hastalarda daha agresif tedavi yaklaşımlarının gerektiğini ileri süren çalışmalar mevcuttur. Bu çalışmada T.C. İstanbul Bilim Üniversitesi Hematoloji Bilim Dalı Polikliniği’nde takip edilmekte olan 103 Ph(-) MPN hastasında ASXL1 gen mutasyonlarının sıklığı incelenerek, bu mutasyonların hastalığın klinik seyir ve prognozuna etkisi

araştırılmıştır.

**Gereç ve Yöntem:** Çalışmaya toplam 103 Ph(-) MPN hastası dahil edilmiştir. Bu çalışma için İstanbul Bilim Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan onay alınmıştır. Hastalardan bilgilendirilmiş onay alındıktan sonra, rutin poliklinik kontrolleri sırasında alınan kan sayımı örnekleri kullanılarak DNA dizi analizi yöntemi ile ASXL1 gen mutasyonları taranmıştır. İstatistiksel analizlerin değerlendirilmesinde ki-kare, Fisher gerçeklik testi, odds ratio (OR) değerleri, Tukey çoklu karşılaştırma testleri kullanılmıştır.

**Bulgular:** ASXL1 gen mutasyonları, kohortumuzda 6 hastada saptanmıştır (%5,8). Bu mutasyonlar ET hastalarının %6,25'inde (3/48), PV hastalarının %4,35'inde (2/46) ve PMF hastalarının %11,11'inde (1/9) bulunmuştur. ASXL1 gen mutasyonları olanlarda kadın-erkek oranı eşit bulunmuştur. ASXL1 geninin 12. eksonu tarandığında en sık c.1934dupG (p.g646TrpfsX12) mutasyonuna (4 hasta, %66,66), ikinci sıklıkta ise c.1954G.a (p.G652S) mutasyonuna (2 hasta, %33,33) rastlanmıştır, bu mutasyonlar ASXL1'in en sık görülen mutasyonlarıdır. ASXL1 c.1934 dupG (p.g646TrpfsX12) mutasyonu ET tanılı hastaların 3'ünde (%6,25), PV tanılı hastaların 1'inde (%2,22); c.1954g.a (p.G652S) mutasyonu PV tanılı hastaların 1'inde (%2,17) ve PMF tanılı hastaların 1'inde (%12,5) saptanmıştır. ASXL1 gen mutasyonları olanlarda başlangıç hemoglobin ve trombosit ortalama değerleri daha yüksek, başlangıç lökosit ve nötrofil ortalama değerleri daha düşük bulunmuştur. ASXL1 gen mutasyonları olanlarda splenomegali oranları, olmayanlara oranla daha düşük bulunmuştur. ASXL1 gen mutasyonları bulunan grupta tromboz (özellikle arter trombozu) oranlarının daha yüksek olduğu anlaşılmıştır. Ortalama takip süresi 4,1 yıl olan MPN grubumuzda hematolojik olmayan kanser oranları (solid tümör) oldukça yüksek bulunmuştur (%14,5). Bu hastaların % 80'inde JAK-2 V617F mutasyonu mevcuttur. JAK-2 V617F mutasyonu pozitif hastaların 2 tanesinde ayrıca ASXL1 c.1954G.a (p.G652S) gen mutasyonu da bulunmaktadır.

**Sonuç:** ASXL1 gen mutasyonları, literatür verileri ile benzer şekilde ET ve PV'ye kıyasla PMF hastalarında daha yüksek oranda saptanmıştır. ASXL1 gen mutasyonları olanlarda, olmayanlara kıyasla yaş ortalaması daha yüksek bulunmuştur. Kohortumuzda ASXL1 geninin en sık mutasyonları olan c.1934dupG (p.g646TrpfsX12) (4/6) ve c.1954G.a (p.G652S) (2/6) mutasyonları saptanmıştır. ASXL1 gen mutasyonları bulunanlarda tromboz (özellikle arter

trombozu) oranları daha yüksek saptanmıştır. Kohortumuzda, hematolojik olmayan kanser oranları (solid tümör) oldukça yüksek bulunmuştur (%14,5). Hastaların % 80'inde JAK-2 V617F mutasyonu mevcuttur. JAK-2 V617F pozitif hastaların 2 tanesinde de ayrıca ASXL1 c.1954G.a (p.G652S) mutasyonu olması dikkat çekici bulunmuştur. Kohortumuzda beş hastada önce MPN tanısıyla hidroksiürea kullanımı ve takibinde hematolojik olmayan kanser tanısı bulunması hidroksiürea kullanımının hematolojik olmayan kanser gelişimine sebep olabileceğini düşündürmektedir. Öte yandan iki hastada ise MPN tanısı aldıktan sonra hidroksiürea kullanmadığı halde sekonder kanser gelişmiş olması hidroksiürea dışında başka faktörlerin de hematolojik olmayan kanser gelişiminde etkili olabileceğini düşündürmektedir.

## ABSTRACT

### THE AFFECT OF ASXL1 GENE MUTATIONS ON CLINICAL COURSE AND PROGNOSIS OF MYELOPROLIFERATIVE NEOPLASMS

**Aims:** Chronic myeloproliferative neoplasms (MPN) are a group of disorders characterized by clonal proliferation in all three cell lines. One of the disorder in this group, namely chronic myelogenous leukemia (CML), develops from Philadelphia chromosome and its oncogene BCR-ABL. CML has different clinical features. Ph (-) MPN is grouped as primary polycythemia vera (PV), essential thrombocythemia (ET) and primary myelofibrosis (PMF). While increased red blood cell mass is defined as PV, increased number of platelets is called ET. PMF is characterized by the increased bone marrow fibrosis. In 2005 with the definition of the JAK-2 V617F mutation, it became possible to demonstrate the clonal growth in 95-98% of patients with PV, and almost 50% of patients with ET and PMF. Later on, JAK2 exon 12 mutations in PV patients, MPL W515L/K and CALR (calreticulin) mutations have been identified in ET and PMF patients. One of the mutations shown in MPN patients is the ASXL 1 gene mutations. ASXL 1 (Additional sex comb like1), ASXL 2 ( Additional sex comb like 2) and ASXL 3 (Additional sex comb like 3) are associated with gene *Asx* (*Drosophila melanogaster* additional sex combs) which suppresses the HOX gene. ASXL1 gene mutations are generally present in the form of shift mutations located in exon 12 of the gene and have the loss of PHD (plant homeofinger domain) at the carboxy terminus. The incidence of ASXL 1 gene mutations are in PV 2-7%, in ET 0-10%, in PMF 13-32%. ASXL1 gene mutations make some changes in the pathogenesis and cancer biology of myeloproliferative disease. The mutations are negatively impact the prognosis and some studies suggest a more aggressive therapeutic approach in patients who have ASXL1 gene mutations. In this study, we investigated the frequency of ASXL1 gene mutations of 103 Ph(-) MPN patients and how

ASXL1 gene mutations affect clinical course and prognosis of the patients followed in T.C. Istanbul Bilim University Department of Hematology.

**Materials and Methods :** Totaly 103 MPN patients were enrolled in this study. This study was approved by the Clinical Research Ethics Committee of Istanbul Bilim University. After obtaining informed consent from the patients, we performed DNA isolation from the blood that were kept in EDTA tubes. ASXL1 gene mutation analysis were done by DNA sequence analysis method. Results were evaluated and fisher reality test, chi-square test, odds ratio and tukey's multiple comparison tests were performed for statistical analysis.

**Results:** ASXL1 gene mutations were identified in 6 patients in our cohort. These mutations were found as %6,25 (3/48) in ET, %4,35' (2/46) in PV and %11,11(1/9) in PMF patients. When exon 12 of ASXL1 gene mutations were scanned, the most common mutation was c.1934dupG (p.g646TrpfsX12) and the second was c.1954G.a (p.G652S), these are the most common types of ASXL1 gene mutations. The mutation ASXL1 c.1934 dupG (p.g646TrpfsX12) was found in 3 of ET patients (%6,25) and 1 of PV patients (%2,22). The mutation of c.1954g.a (p.G652S) was found in 1 of PV patients (%2,17) and 1 of PMF patients (%12,5). While the average baseline hemoglobin and platelet values were higher, the average baseline neutrophil and leukocytes were lower in the group with ASXL1 gen mutations than the other group. Splenomegaly was found to be lower and the rate of thrombosis (especially arterial thrombosis) was found to be higher in the group with ASXL1 gene mutations. In our cohort that were followed up for 4,1 years, non-hematologic cancer rates (solid tumors) were found to be quite high (%14,5). Eightly percent of these patients have JAK-2 V617F mutation. Two of these patients with JAK-2 V617F mutation have also ASXL1 c.1954G.a (p.G652S) gene mutation.

**Conclusion:** Consistent with the literature ASXL1 gene mutations are most common in PMF patients than ET and PV patients. The mean age was higher in the group with ASXL1 gene mutations. In our cohort the most common types of in ASXL1 genes were c.1934dupG (p.g646TrpfsX12) (4/6) and c.1954G.a (p.G652S) (2/6). Thrombosis (especially arterial thrombosis) was found to be higher in the patient with ASXL1 gene mutations. In our cohort non-hematologic cancer (solid tumors) rates were found to be higher (%14,5). Two of the

patients with non-hematologic cancer were found to have both JAK-2 V617F gene mutation and ASXL1 c.1954G.a (p.G652S) gene mutation. In our cohort, five of the patients had used hydroxyurea after the diagnosis of MPN disease and then they had non-hematological cancers. On the other hand, after the diagnosis of MPN, two of the patients who did not use hydroxyurea have had non-hematologic cancer (solid tumors). So we suggest that not only using hydroxyurea but also the other factors may cause non-hematologic cancers (solid tumors) in patients with MPN.



## 1.GİRİŞ ve AMAÇ

Miyeloproliferatif neoplaziler (MPN), pluripotent hematopoietik kök hücre veya progenitör hücrelerde gelişen mutasyonlar sonucunda kemik iliğinde her üç hücre dizisinde kalıcı ve ilerleyici artış ile sonuçlanan hastalıklar grubudur. Beraberinde miyelofibrozis ve nadiren de lösemik dönüşüm saptanabilmektedir. Bu grupta bulunan kronik miyeloid lösemi (KML)'de Ph 'Philedelphia kromozomu' ve onun onkogeni olan BCR-ABL pozitif saptanır. Ph(-) MPN'ler ise; esansiyel trombositemi (ET), polistemia vera (PV) ve primer miyelofibrozis (PMF) olarak gruplandırılır. 2005 yılında JAK-2 V617F mutasyonunun keşfi ile bu mutasyon PV hastalarının %95-98'inde, ET ve PMF hastalarının %50'sinde saptanmıştır (67). Bu hastalıkların tanısında reaktif eritrositoz ve trombositoz mutlaka dışlanmalıdır (18,36).

ASXL1 (Additional sex comblike 1) geni, Drosophila'da bulunan 'Additional sex combs (Asx) geninin insan homologudur. ASXL1 geni 20q11'de yer alır ve 1084 aminoasitlik bir nükleer proteini kodlar. ASXL1 proteininin görevi tam olarak anlaşılamamakla beraber, histon modifikasyonu yoluyla epigenetik değişiklikleri kontrol ettiği düşünülmektedir. ASXL1 gen mutasyonları genelde çerçeve kayması mutasyonları şeklinde olup genin 12. eksonunda yer alırlar ve genellikle karboksi terminalinde PHD (*plant homeofinger domain*) domain kaybı ile kendilerini gösterirler. ASXL1 gen mutasyonları PV'de % 2-7, ET'de % 0-10, PMF'de % 13-32 oranında görülmektedir. Yapılan çalışmalarda; ASXL1'in kromatine bağlanarak belli bölgelerin transkripsiyonunu arttırıp, belli bölgeleri ise baskılayarak etki ettiği ileri sürülmüştür(76). Dolayısıyla bu mekanizmayla miyeloid neoplazilere neden olabileceği ileri sürülmektedir(77,78 ). ASXL1 gen mutasyonları MPN dışında MDS, AML ve KMML gibi farklı hematolojik malignitelerde de gösterilmiştir(79).

Bu çalışmada T.C. İstanbul Bilim Üniveristesi Tıp Fakültesi Hematoloji Bilim Dalı Polikliniği'nde takip edilmekte olan 103 Ph(-) MPN hastasında ASXL1 gen mutasyonlarının bulunma sıklığı, bu mutasyonların hastalığın klinik seyir ve prognozuna olan etkisi araştırılmıştır. ASXL1 gen mutasyonları rutin poliklinik kontrolleri sırasında alınan kan sayımı örnekleri kullanılarak DNA dizi analizi yöntemi ile taranmıştır. ASXL1 gen mutasyonlarının klinik seyir ve prognoz üzerine olan etkileri araştırılmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. MİYELOPROLİFERATİF NEOPLAZİLER

Miyeloproliferatif neoplaziler (MPN), kemik iliğindeki pluripotent hematopoietik kök hücre veya progenitör hücrelerde gelişen mutasyonlar sonucunda ortaya çıkar. Bu mutasyonlar hematopoietik büyüme faktörleri ve sitokinlere bağımlı olmadan veya bunlara aşırı duyarlılık yaratarak öncü hücrelerin anormal proliferasyonuna neden olur. Sonuçta kemik iliğinde her üç hücre dizisinde persistan bir artış görülür; periferik kanda granülosit, eritrosit veya trombosit sayısında kalıcı ve ilerleyici artış ile birlikte miyelofibrozis ve nadiren de lösemik dönüşüm izlenir. MPN'lerde miyeloproliferasyondan sitoplazmik veya reseptör tirozin kinazlarında gelişen ve sonuçta intrasellüler sinyal moleküllerini aktifleştiren mutasyonlar sorumlu tutulur (1).

Miyeloproliferasyon kavramı ilk kez 1951 senesinde William Damashek tarafından öne sürülmüş olup, birbirine klinik ve biyolojik benzerlikleri olan dört klasik hastalığı; polisitemia vera (PV), esansiyel trombositemi (ET), primer miyelofibrozis (PMF), kronik miyeloid lösemi (KML)'yi tarif etmek için kullanılmıştır(2). Tek tek hastalıkların tanımlanması ise daha eskilere dayanır. PV ilk defa 1892 yılında; PMF aynı yıllarda; ET ise 1930'larda tanımlanmıştır. Daha ender görülen kronik nötrofilik lösemi, kronik eosinofilik lösemi, sistemik mastositoz, atipik KML gibi hastalıklar daha sonradan MPN kapsamına alınmıştır(3). 1960 yılında Philedelphia kromozomu (Ph) ve 1980 yılında Philedelphia kromozomu üzerine yerleşmiş onkojenik mutasyon BCR-ABL'nin tanımlanması ile, bu hastalıkların kök hücrede gelişen mutasyonlar nedeniyle oluştuğu anlaşılmıştır (4, 5).

KML diğer MPN'lerden farklı bir klinik seyir izler, eğer tedavi edilmezse olguların büyük bir kısmında akut lösemi gelişir. KML; patognomonik mutasyonu Philedelphia kromozomu ve onun ürünü BCR-ABL'yi gösteren testlerle kolaylıkla tanınabilmektedir. Yine bu mutasyona göre dizayn edilmiş hedef ilaçlar sayesinde tamamen kontrol altına alınabilmektedir. Bu özel durum nedeniyle MPN'ler KML ve KML dışı Ph(-) MPN olmak üzere iki ayrı grupta ele alınmaktadır.

KML dışı MPN olgularında son on yıla kadar periferik kan yaymaları ve kemik iliği

biyopsileri ile tanı konmaya çalışılmaktaydı. Batın içi trombozlar nedeniyle splenomegali gelişen olgularda, sekonder eritrositoz ve trombositoz yapan durumların varlığında MPN tanısı koymak çok zor olmaktadır. 2005 yılında JAK-2 V617F mutasyonunun tanımlanmasıyla birlikte, bu hastalıkların da kemik iliğindeki mutasyonlar sonucunda (yani klonal olarak) oluştuğu teyit edilmiş oldu. JAK-2 V617F mutasyonu, KML'de Ph kromozomu varlığı gibi KML dışı MPN'lerde bir moleküler belirteç olarak yerini almıştır. Ancak Ph kromozomundan farklı olarak, JAK-2 V617F mutasyonu spesifik bir hastalığın tanısını tek başına koymamaktadır; PV'de %95-98, ET ve PMF'de %50 oranında bulunmaktadır. Aynı mutasyonun üç değişik klinik patolojiye (PV, ET ve PMF) neden olabilmesi, Ph(-) MPN gelişiminin farklı bir süreç olduğunu işaret etmektedir. İzleyen yıllarda JAK-2 V617F mutasyonu negatif olgularda yeni mutasyonlar tanımlanmıştır; PV'de JAK-2 ekson 12 mutasyonları, ET ve PMF olgularında MPL W515L/K mutasyonu ve CALR (kalretikülin) mutasyonları.

MPN'lere neden olan mutasyonların anlaşılmasıyla birlikte DSÖ (Dünya Sağlık Örgütü) kronik miyeloid neoplazilerin sınıflandırmasını 2008 yılında revize etmiştir. Eskiden miyeloproliferatif hastalık olarak isimlendirilen bu grup bozukluklar 'miyeloproliferatif neoplaziler' şeklinde yeniden adlandırılmıştır. Philedelphia(Ph) kromozomu, BCR-ABL translokasyon varlığı ve kendine özgü klinik özellikleriyle KML ayrı bir hastalık olarak ayrılmıştır(6) (**Tablo1**). Ph(-) MPN'ler ise PV, ET, PMF ve klasik olmayan diğer MPN'ler olarak gruplandırılmıştır. DSÖ 2008 sınıflamasında PV, ET ve PMF tanısı için JAK-2 V617F ve benzeri aktive edici mutasyonlar (MPL W515L/K, JAK-2 ekson 12 mutasyonları ve sonradan tanımlanan CALR mutasyonları gibi) ve kemik iliği morfolojik bulguları ağırlık kazanmıştır.

Bu mutasyonlar hem periferik kanda nötrofillerde hem de kemik iliği hücrelerinde DNA veya RNA düzeyinde araştırılabilir. JAK-2 mutasyonlarının miyeloproliferasyona yol açma mekanizmaları ve sinyal fonksiyonları henüz çalışma altındadır(7). JAK-2 ve MPL W515L/K dışında, KML dışı MPN'lerde, TET2 (8), LNK(9), IDH1/IDH2, ASXL1, EZH2, CBL, IKZF1, DNMT3A, ve CALR, CSF3R genlerinde mutasyonlar bulunmuştur(10).

## **Tablo 1. Miyeloid Neoplazilerin 2008 DSÖ sınıflandırması (3)**

1. Akut Myeloid Lösemi ve ilişkili prekürsör neoplazileri
2. Kronik Miyeloproliferatif Neoplaziler (MPN)
  - 2.1 Kronik miyeloid lösemi BCR-ABL pozitif (KML)
  - 2.2. BCR-ABL negatif MPN'ler
    - 2.2.1 Polisitemia vera (PV)
    - 2.2.2. Esansiyal trombositemi (ET)
    - 2.2.3. Primer miyelofibrozis (PMF)
    - 2.2.4. Prefibrotik PMF
  - 2.3. Diğer MPN'ler
    - 2.3.1 Kronik nötrofilik lösemi (KNL)
    - 2.3.2. Kronik eozinofilik lösemi- sınıflandırılmamış (KEL)
    - 2.3.3. Mastositoz
    - 2.3.4. MPN –sınıflandırılmamış, (MPN-U)
3. MDS/MPN
  - 3.1 Kronik miyelomonositik lösemi (KMML)
  - 3.2 Juvenil miyelomonositik lösemi
  - 3.3 Atipik kronik miyeloid lösemi BCR-ABL1 negatif
  - 3.4 MDS/MPN- sınıflandırılmamış
  - 3.5 Refrakter anemi halka sideroblast ve trombositozlu (RARST)
4. Eozinofili ile seyreden miyeloid ve lenfoid neoplaziler
  - 4.1 PDGFR- $\alpha$  defektli miyeloid ve lenfoid neoplaziler
  - 4.2 PDGFR- $\beta$  defektli miyeloid neoplaziler
  - 4.3 FGFR1 defektli miyeloid ve lenfoid neoplaziler
5. Miyelodisplastik sendromlar (MDS)
  - 5.1. Refrakter sitopeni-tek hücre dizisinde
    - 5.1.1. Refrakter anemi (<% 15 Ring sideroblast)
    - 5.1.2. Refrakter nötropeni
    - 5.1.3. Refrakter trombositopeni
  - 5.2. Refrakter anemi-ring sideroblastlı (RARS) (>% 15 Ring sideroblast )
  - 5.3. Refrakter anemi-artmış blastlı (RAEB)
    - 5.3.1. RAEB-1. Perifer kanında %2-4, kemik iliğinde %5-9
    - 5.3.2. RAEB-2. Perifer kanında %5-19, kemik iliğinde %10-19 veya Auer rod(+)
  - 5.4. Refrakter sitopeni-multidizi displazili, (RCMD) (Ring sideroblast sayısı önemsiz)
  - 5.5. MDS-izole del (5q)
  - 5.6. MDS –çocuklukta
  - 5.7. MDS-sınıflandırılmamış

## 2.2 POLİSİTEMİA VERA

### 2.2.1. Epidemiyoloji

Polisitemia vera (PV), başta eritroid seri olmak üzere her üç hematopoietik hücre serisinin kontrolsüz çoğalması ile karakterize kronik, klonal ve progresif bir hastalıktır. Yıllık insidansı erkeklerde 100.000'de 2,8, kadınlarda 100.000 de 1,3'dür(4). Erişkin yaş grubundaki yıllık insidansı 100.000'de 18'dir (11). Askenazi Yahudilerinde daha sık görülür(5). Ortalama tanı yaşı 60'tır ve daha çok erkeklerde görülmektedir. Nadir olarak bazı ailesel olgular tanımlanmıştır(11).

2005 yılında JAK-2 V617F mutasyonunun keşfi ile beraber PV hastalığının patogenezi ve tanısında önemli gelişmeler sağlanmıştır (12). JAK-2 V617F mutasyonu JAK2'nin JH2 domainindeki 617. kodonunda valinin fenilalanin ile yer değiştirmesi sonucu ortaya çıkar. JH2 domainindeki bu mutasyon sonucunda JAK2 ileti sistemindeki inhibisyon ortadan kalkar, JH1 domaini daha da aktive olur ve hemotopoietik büyüme faktörleri üzerinden her üç dizinin de etkilendiği bir proliferasyon sonucu PV ortaya çıkar(13-16). PV'de % 95-98 JAK-2 V617F mutasyonu ile beraber %3 JAK-2 ekson 12 mutasyonu saptanmıştır.

### 2.2.2. Tanı

2008 Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) kriterleri günümüzde en çok kullanılan tanı sistemidir(17) (**Tablo 2**).

**Tablo 2. 2008 DSÖ PV Tanı Kriterleri(17)**

**Major kriterler:**

Artmış kırmızı hücre kitlesi: Ortalama değerden %25 fazla veya erkekte hemoglobin >18,5 g/dL, kadında >16,5 g/dL veya yaş, cinsiyet ve yaşanan irtifaya göre hesaplanmış referans aralığının %99'undan büyük hemoglobin veya hemotokrit değeri

JAK-2 V617F veya JAK-2 ekson 12 mutasyonu varlığı

**Minör kriterler:**

Kemik iliğinde her üç serinin miyeloproliferasyonu

Serum EPO düzeyinin normalin altında olması

Endojen eritroid koloni büyümesi(EEC)

**Tanı:** Her iki major ve bir minör kriter ya da ilk major kriter ve iki minör kriterin birlikte bulunmasıyla tanı konur.

### **Tablo 3. Sekonder Eritrositoz Nedenleri(18)**

#### **1.Konjenital :**

- 1.1.Yüksek oksijen affiniteli hemoglobinopatiler
- 1.2.2,3 Bifosfoliserat mutaz eksikliği
- 1.3.Eritropoietin reseptör mutasyonları
- 1.4.VHL mutasyonu, Chuvash eritrositoz

#### **2.Kazanılmış :**

##### **2.1.EPO ilişkili**

- 2.1.1.Hipoksi ilişkili artmış EPO üretimi
  - 2.1.1.1.Santral
    - 2.1.1.1.1.Kronik Akciğer Hastalıkları
    - 2.1.1.1.2.Sağdan sola şanlı kardiyopulmoner hastalıklar
    - 2.1.1.1.3.Karbonmonoksit zehirlenmesi
    - 2.1.1.1.4.Sigara kullanımı
  - 2.1.1.2.Renal
    - 2.1.1.2.1.Renal soliter kist veya polikistik böbrek hastalıkları
    - 2.1.1.2.2.Renal arter stenozu
    - 2.1.1.2.3.Renal kanserler
- 2.1.2.Patolojik EPO üretimi
  - 2.1.2.1.Tümörlerde paraneoplastik sendrom
- 2.1.3.Ekzojen EPO üretimi
  - 2.1.3.1.Androjenik ilaçlar
  - 2.1.3.2.Kortikosteroidler
  - 2.1.3.3.İdiopatik eritrositoz
  - 2.1.3.4.Ekzojen EPO enjeksiyonu

#### **3.Yalancı eritrositoz (dehidratasyona bağlı)**

### 2.2.3. Klinik Özellikler

Hastaların %80'i asemptomatiktir, tanı rutin yapılan laboratuvar analizleri sırasında tesadüfen bulunan hemoglobin yüksekliği sonucu konur. Öncelikle hastada sekonder pletora (yüzde kırmızı-mor renk değişikliği) tipik bulgudur. Semptomatik hastalarda başağrısı (%48), halsizlik (%47), baş dönmesi (%43), kaşıntı (%36), terleme (%33), eritromelalji (%28), kilo kaybı (%29), parestezi (%29), nefes darlığı (%26), eklem semptomları (%26), epigastrik rahatsızlık hissi (%24) nadiren de geçici görme kaybı ve cilt ülserleri görülmektedir(19). Hipermetabolizma nedeni ile gece terlemeleri ve kilo kaybı olabilir, özellikle post-polistemik miyelofibroz gelişen olgularda bu durum daha sık görülür. Hastaların %40'ında görülen özellikle sıcak banyo sonrası ortaya çıkan kaşıntı (akuojenik pruritis) PV'nin klasik belirtisidir, bu kaşıntıya mast hücre degranulasyonu, histamin salınımı ve fibrinolitik faktörlerin sebep olduğu düşünülmektedir(20). Yüksek JAK-2 V617F mutasyonu varlığı kaşıntıya yol açabilmektedir(21). Çoğunlukla trombosit sayısının >400.000/mm<sup>3</sup> olduğu olgularda görülen parmak uçlarında belirginleşen kırmızılık ve yanma hissi ile seyreden eritromelalji hastaların %28 'inde görülür ve aspirine yanıtıdır(22). Cilt ülserleri ve akneiform değişiklikler nadiren gelişmektedir.

Yüksek hemotokrit düzeyi kan viskozitesinin artmasına yol açar; baş ağrısı, baş dönmesi, tinnitus, bulanık görme, senkop atakları, parmak uçlarında uyuşma, halsizlik ve efor dispnesi artan kan viskozitesinin yol açtığı başlıca belirti ve bulgulardandır. Hastaların yaklaşık 1/5'inde tanı anında veya öncesinde geçici iskemik atak, serebrovasküler olay, miyokard enfarktüsü gibi sıklıkla gözlenen arteriyel ve derin ven trombozu, hepatik ven trombozu (Budd-Chiari sendromu) gibi daha az oranda gözlenen venöz tromboembolik komplikasyonlar önemli morbidite ve mortalite nedeni olabilmektedir(23). Batın içi tromboz gelişen tüm hastalarda, özellikle splenomegaliye rağmen hemogram değerleri normal veya yüksek ise mutlaka MPN akla gelmelidir. PV'de tromboz gelişiminin sadece eritrositlerle ilişkili olmadığı, yüksek lökosit değerlerinin ve JAK-2 V617F mutasyonunun kendisinin de bu duruma katkısı olduğu gösterilmiştir. PV'de hemorajik komplikasyonlar tromboza göre daha

seyrektilir. Sıklıkla epistaksis (%15-20 ) ve gastrointestinal kanamalar (%5) olarak karşımıza çıkmaktadır.

PV olgularında tanı sırasında %70 hastada splenomegali görülebilitir, genellikle kot kavsini bir kaç santim geçer. PV düşünölen bir hastada masif splenomegali varlığında primer miyelofibrozis veya post-polisitemik miyelofibrozis akla gelmelidir. Mutlaka splenik ven trombozu gibi dalağı büyütecek ek durumlar da dikkate alınmalıdır. Tanı sırasında hastaların yaklaşık yarısında hepatomegali bulunur.

Pulmoner hipertansiyon, PV'li hastalarda sık görölen yaşam süresini kısaltan bir komplikasyondur, aktive trombositlerden salınan büyüme faktörleri sonucu damar düz kas hiperplazisi ve dolaşımdaki megakaryositlerin oluşturduğu tıkanıklıklar sonucu gelişir(24) Sistemik hipertansiyona bağıli sistolik kan basıncı yüksekliğı (>140 mmHg) %72, diyastolik kan basıncı yüksekliğı (>90mmHg) %32 oranında görölür (25). Eritrositözla başvuran her hastada sekonder eritrositoz nedenleri de dikkatle incelenmelidir (**Tablo 3**) (18).

PV tanısında en önemli laboratuvar bulgusu artmış hemoglobin ve eritrosit sayısıdır. DSÖ kriterlerine göre hemoglobin değeri 16,5 mg/dl'den fazla olan (hematokrit >% 50) kadınlar ve 18,5 mg/dl'den fazla olan (hematokrit >% 56) erkekler için PV tanısı düşünölmelidir. Klinik pratikte bu değeriilerin üzerindeki ölçümler saptandığında eritrosit kitlesi artmış olarak kabul edilmektedir. Eritrosit kitlesi arttığı için plazma oranı azalır, in vitro testlerde PT, aPTT yalancı olarak uzun bulunabilir. Demirin artmış eritrosit kitlesince harcanması, tekrarlanan flebotomiler ve gastrointestinal sistemden kayıp nedeni ile hipokromi, mikrositöz ve poikilositöz izlenebilir. Serum demir seviyesi azalmış, demir bağlama kapasitesi artmış ve ferritin azalmıştır. Retikölisit yüzdesi hafifçe artmıştır. Post-polisitemik miyelofibrozis safhasında belirgin lökoeritroblastozis ve gözyaşı damlası şeklinde eritrositler gözlenir(25). Trombosit morfolojisi normal olmakla beraber >450.000/mm<sup>3</sup>'ün üstünde bulunabilmektedir. Ateş ve enfeksiyon olmaksızın lökositler >12.000/mm<sup>3</sup>'ün üstündedir, ön planda miyelosit ve metamiyelositlerde artış olmakla birlikte lenfosit ve monosit değeriilerinde artış beklenmemektedir. Bazofili ve eosinofili genellikle mevcuttur. Lökositöz PV ilişkili tromboz için önemli bir risk faktörüdür (26).

Serum EPO seviyesi PV'li hastaların %85'inde düşük bulunur ve bu durum sekonder eritrositoz olgularından ayırımıni sağlar (27). Terapötik flebotomi sonrası, Budd Chiari



sendromu varlığı ve demir eksikliği durumunda eritropoietin düzeyleri normal saptanabilmektedir. Endojen eritroid koloni büyümesi (EEC) %73 görülmektedir. Lökosit alkalin fosfat düzeyi artmıştır (25). Serum laktat dehidrogenaz (LDH) düzeyi ve transkobalamin artışı nedeni ile B12 vitamin düzeyi yüksek bulunabilir.

2005 yılında JAK-2 V617F mutasyonunun keşfi ile birlikte PV tanısının konulması büyük oranda kolaylaşmıştır. JAK-2 V617F mutasyonu PV ile diğer hematokrit artışı yapan sebeplerin ayırıcı tanısında %97 sensitiviteye ve %100 spesifikliğe sahiptir (28). Tanı sırasında trizomi 8, trizomi 9, 13q delesyonu ve 20q delesyonu gibi sitogenetik anormallikler %15 hastada görülürken, klonal sitogenetik bozuklukların sıklığı yıllar içinde artarak %80'lere ulaşabilmektedir (29). PV'de plazma sitokin seviyelerinde artış görülmektedir. IL-2 hematokrit artışı; IL-1b, IL-2, IL-7, FGF-b ve HGF lökositoz; ve IFN-alpha ve IFN-gamma trombositoz ile ilişkili bulunmuştur (30).

Kemik iliğinde eritroid seri başta olmak üzere her üç seride artış söz konusudur. Geniş ve hiperlobe çekirdekli anormal megakaryosit kümeleri izlenir. Retikülin lif artışı bulunur ve ileri evre retikülin fibrozisi tanı anında hastaların % 5'inden azında görülürken, 20 yıldan sonra bu oran %50'ye ulaşır (29). Kemik iliği demir depoları tükenmiştir (31). PV hastalarında kemik iliği ve periferik kan örneklerinden elde edilen eritroid koloniler normal EPO duyarlılığı olan "burst forming unit-eritroid" (BFU-E) öncüllerinden köken alırlar, bunun yanı sıra insülin-like büyüme faktörü I'e karşı olan hipersensitiviteye bağlı olarak EPO olmadan oluşan endojen eritroid koloniler de gösterilmiştir (32).

#### **2.2.4. Prognoz**

PV tanısı olan hastalarda tedavi ile yaşam süresi 13 yılın üzerinde olmaktadır (33). Mortalitenin sebepleri arasında ilk sırada tromboz (%29) ve buna bağlı kardiyovasküler ölümler gelmektedir. Bunu sırası ile hematolojik maligniteler (%23), hematolojik olmayan maligniteler (%16), hemorajiler (%7) ve miyelofibrozis (%3) izlemektedir (25).

#### **2.2.5. Tedavi**

PV’de tromboembolik komplikasyonlar, kanama, miyelofibrozis, akut lösemi ve diğer malignansilere dönüşümden korunma ve semptomların giderilmesi tedavinin amaçlarıdır. PV tedavisi için hastalık aktivitesine ve risk faktörlerine göre çeşitli algoritmalar belirlenmiştir (**Tablo 4**) (34).

Flebotomi, komplike olmamış PV hastalarında başlangıç tedavisidir. 60 yaşın altında ve tromboz öyküsü olmayanlarda tek başına tedavi seçeneği olarak düşünülmelidir (35). Hematokrit değerini % 45 altında tutmak hedeflenmektedir.

**Tablo 4. PV’da risk kategorileri ve tedavi yönetimi (34)**

<b>Risk</b>	<b>Yaş &gt;60 veya tromboz öyküsü</b>	<b>Genel kardiyovasküler risk faktörleri *</b>	<b>Tedavi</b>
Düşük	Yok	Yok	Düşük doz aspirin + Flebotomi
Düşük risk ama trombosit sayısı 1.000.000/mm <sup>3</sup> den fazla	Yok	Var	Düşük doz aspirin (edinsel von Willebrand hastalığı yok ise) + Flebotomi
Yüksek	Var	Yok veya Var	Düşük doz aspirin + Flebotomi + Hidroksiüre
Hidroksiüre direnci/intoleransı bulunan yüksek risk	Var	Yok veya Var	Düşük doz aspirin + Flebotomi+ İnterferon alfa<60yaş+ busulfan>60 yaş

\*Hipertansiyon, hiperkolesterolemi, diyabet, sigara içimi

Çok yüksek trombosit sayısı (>1.500.000 / mm<sup>3</sup>) kanama açısından potansiyel risk faktörüdür. Yüksek lökosit sayısı ve yüksek JAK-2 V617F allel yükü tromboz açısından potansiyel risk faktörleridir (14)

## 2.3. ESANSİYEL TROMBOSİTEMI

### 2.3.1. Epidemiyoloji

Esansiyel trombositemi (ET), kronik ve reaktif olmayan bir trombositoz ile giden diğer Ph(-) MPN'lerin dışlanması ile tanı konan hematolojik klonal bir hastalıktır (36). ET'nin tahmin edilen yıllık insidansı yaklaşık 100.000'de 2,5'dir. Ortalama tanı yaşı 60'tır ve kadınlarda daha sık görülmektedir. Çocuklarda oldukça nadirdir.

Trombopoietinin (TPO) ve trombopoietin reseptörünün (c-Mpl) ET patogenezinin katkısı gösterilememiş olmasına rağmen ailesel otozomal dominant ET'de TPO veya c-Mpl genlerindeki aktive edici mutasyonlar TPO ilişkili trombositozu neden olmaktadır (37).

### 2.3.2. Tanı

ET tanısı diğer Ph(-) MPN'lerin ve olası reaktif trombositoz sebeplerinin dışlanması ile konulur (36). 2008 Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) kriterleri günümüzde en çok kullanılan tanı sistemidir (17) (**Tablo 5**).

**Tablo 5. Esansiyel Trombositemi 2008 DSÖ sınıflandırma kriterleri (17)**

1. Trombosit sayısının sürekli  $>450.000/mm^3$  olması
2. JAK-2 V617F veya diğer klonal bir belirteçin gösterilmesi veya belirteç yokluğunda enfeksiyon, enflamasyon ve diğer reaktif trombositoz bulgularının olmaması
3. PV, PMF, KML, MDS'ye ait DSÖ kriterlerini karşılamaması
4. Rutin sitogenetik çalışmada Ph kromozomunun ya da sitogenetik olarak maskelenmiş KML olguları için BCR/ABL füzyon geninin bulunmaması
5. Demir depolarının normal olması (normal serum ferritin değeri ve ortalama kırmızı hücre hacminin (MCV) normal olması).
6. Azalmış serum ferritin varlığında ise demir replasman tedavisinin hemoglobin düzeyini PV aralığına çıkaramaması
7. Kemik iliği aspirasyon veya biyopsisinde megakaryositik hiperplazi (anormal maturasyonlu megakaryosit veya lökoeritroblastozis olmamalı)
8. MDS veya PMF için periferik kan, kemik iliği ve karyotipik kanıtların bulunmaması

## **Tablo 6. Sekonder Trombositoz Nedenleri(36)**

- 1.Malign olmayan hematolojik hadiseler
  - 1.1.Akut kan kaybı
  - 1.2.Demir eksikliği anemisi
  - 1.3.Vitamin B12 eksikliği tedavisi
  - 1.4.Akut hemolitik anemi
  - 1.5.İmmün trombositopeni tedavisi sonrası rebound etki
  - 1.6.Etanol ilişkili trombositopeni sonrası rebound etki
- 2.Kronik İnfeksiyonlar
- 3.Akut ve kronik inflamatuvar hadiseler
  - 3.1.POEMS sendromu (Polinöropati, Organomegali, Endokrinopati, M Protein ve cilt (skin) bulguları)
  - 3.2.Çölyak hastalığı
  - 3.3.İnflamatuvar barsak hastalığı
  - 3.4.Romatolojik hastalıklar, vaskülitler
- 4.Doku hasarı
  - 4.1.Termal yanıklar
  - 4.2.Myokard infarktüsü
  - 4.3.Koroner arter bypass sonrası
  - 4.4.Akut pankreatit
  - 4.5.Ciddi travmalar
  - 4.6.Postop dönem
- 5.Malign hadiseler
  - 5.1.Metastatik kanserler
  - 5.2.Lenfoma
  - 5.3.Miyelosupresif ajanların kullanımı sonrası rebound etki
- 6 .İlaç reaksiyonları
  - 6.1.Trombopoietin, trombopoietin mimetikleri
  - 6.2.Epinefrin, glukokortikoid
  - 6.3.İnterlökin 1B
  - 6.4.All-trans retinoik asit
  - 6.5.Vinkristin
- 7.Aspleni-splenektomi
- 8.Allerjik reaksiyonlar
- 9.Egzersiz

### 2.3.3. Klinik Özellikler

ET hastalarının yarısı tanı anında asemptomatik olup rastlantısal olarak görülen trombositoz ile tanı alırlar. Semptomatik olgularda ise sıklıkla baş ağrısı, baş dönmesi, senkop, atipik göğüs ağrısı, akral paresteziler, livedo retikülaris, eritromelalji ve geçici görme bozuklukları gibi vazomotor semptomlar, trombozlar ve hemorajik komplikasyonlar görülür(38).

Mikrovasküler semptomlar %34 oranında meydana gelir ve çoğunlukla yaşamı tehdit etmezler. Parmak uçlarında siyanoz (akrosiyanoz), nekroz ve gangren görülebilir. Bunların arasında en tipik olanı el ve ayaklarda eritem, sıcaklık hissi, yanma ve ağrı ile bulgu veren eritromelaljidir, düşük doz aspirinle belirgin olarak düzelmektedir.

Trombotik komplikasyonlar hastaların yaklaşık beşte birinde görülmektedir. Sıklıkla inme, geçici iskemik atak, retinal arter ve ven oklüzyonu, koroner arter iskemisi, pulmoner emboli, hepatik ve portal ven trombozu, derin ven trombozu ve dijital iskemi olarak bulgu vermektedir (39).

Kanama, ET hastalarında daha nadir görülen bir bulgu olmasına rağmen özellikle trombosit sayısı  $>1.000.000/mm^3$  üzerine çıktığında görülebilmektedir. Trombosit işlev bozukluğu, edinsel vWF eksikliği ve tedavi için kullanılan ilaçların bir sonucu olarak özellikle gastrointestinal sistem, cilt ve mukozalarda boyutu büyük olmayan kanamalar görülebilir (40).

ET'de lösemik transformasyon nadirdir, değişik serilerde % 0.6-2 oranında bildirilmektedir.

ET'nin en önemli fizik muayene bulgusu hastaların %25-48'inde gözlenebilen palpabl splenomegalidir(41). Nadiren hepatomegali, lenfadenopati ve asemptomatik pulmoner hipertansiyon görülebilmektedir.

Trombosit sayısı hastaların tümünde  $450.000/mm^3$ 'den, çoğunda  $1.000.000/mm^3$  fazladır. Dev trombositler gözlenebilir. Protrombin ve parsiyel tromboplastin zamanı normaldir, ancak uzamış kanama zamanı ve bozulmuş trombosit agregasyonu gibi trombosit fonksiyonu anormallikleri görülebilir(42). Hemoglobin genellikle normaldir. Nötrofilik lökositoz görülebilir. Lökosit alkalen fosfataz (LAP) skoru normal veya yüksektir. LDH ve ürik asit yüksek olma eğilimindedir. ET'li hastaların %50'sinde JAK-2 V617F mutasyonu

(43), %5-10'unda MPL W515L/K mutasyonu ve %15-20'sinde CALR mutasyonu görülebilmektedir. CALR mutasyonu genç erkeklerde daha siktir; bu mutasyonu taşıyanlarda genellikle hemoglobin ve lökosit sayısı düşük, trombosit sayısı yüksek olma eğilimindedir (44).

Kemik iliği hiperselülerdir. Eritropoiezde ve granülopoezde önemli düzeyde olmamakla birlikte her üç seriye ait hiperplazi görülebilir ve dev megakaryositler kümeleşmiş olarak bulunur. ET'de megakaryositlerde belirgin displazi olmaması PMF ile ayırımında önemli bir kriter olarak kabul edilir. ET hastalarının kemik iliği biyopsisinde hafif düzeyde fibrozis görülebilir. Belirgin fibrozis PMF'nin erken evrelerini düşündürür.

#### **2.3.4. Prognoz**

ET hastalarında 15 yıllık sağkalım %90'ın üzerindedir (45). ET tanılı hastalar geç dönemde gelişen komplikasyonlar dışında normal yaşam süresine sahiptirler (46). AML ve miyelofibrozis gelişimi nadirdir ancak anemisi olan, trombosit sayısı  $>1.000.000/mm^3$  olan yaşlı hastalarda ardışık sitotoksik ilaç (özellikle busulfan) kullanımı ve hastalık süresi arttıkça risk yükselir (42).

ET'de morbidite ve mortaliteyi etkileyen en önemli komplikasyonlar tromboz ve kanamalardır. ET hastalarının beşte birinde görülen trombotik komplikasyonlar için risk faktörleri olarak lökositoz, ileri yaş ( $>60$ ), obezite, geçirilmiş tromboz öyküsü, ailede tromboz öyküsü(veya genetik trombofili varlığı), sigara kullanımı, oral kontraseptif kullanımı, kardiyovasküler risk faktörlerinin bulunması (diyabetes mellitus, hipertansiyon, hiperkolesterolemi ), JAK2-V617F mutasyonu varlığı sayılabilir(47). Hastaların ancak %5 kadarında majör kanama olmaktadır. Trombosit sayısı  $>1.000.000/mm^3$  ve von Willebrand hastalığı varlığında kanama riski artmaktadır.

### 2.3.5. Tedavi

ET tedavisinde amaç lösemi ve miyelofibrozis dönüşüm olasılığını arttırmadan trombohemorajik komplikasyonları azaltmaktır. Bu sebeple ET tedavisi için hastalık aktivitesine ve risk faktörlerine göre çeşitli algoritmalar belirlenmiştir (**Tablo 7**) (34)

**Tablo 7. ET’de risk kategorileri ve tedavi yönetimi(34)**

<b>Risk</b>	<b>Yaş &gt;60 veya tromboz öyküsü</b>	<b>Tedavi</b>
Düşük	Yok	Düşük doz aspirin
Düşük risk ama trombosit sayısı 1.000.000/mm <sup>3</sup> den fazla	Yok	Düşük doz aspirin (edinsel von Willebrand hastalığı yok ise)
Yüksek	Var	Düşük doz aspirin + Hidroksiüre
Hidroksiüre direnci/intoleransı bulunan yüksek risk	Var	Düşük doz aspirin + İnterferon alfa(<65 yaş) veya Busulfan (>65 yaş)

## 2.4. PRİMER MİYELOFİBROZİS

### 2.4.1. Epidemiyoloji

Primer miyelofibrozis (PMF), Ph(-) MPN’ler arasında en az sıklıkla görülen, etyolojisi tam olarak bilinmeyen, primer veya sekonder olarak gelişebilen multipotent hematopoietik progenitor hücrenin klonal bir bozukluğudur. Kemik iliği fibrozisi, ekstrameduller hematopoez, kronik miyeloproliferasyon, atipik megakaryositik hiperplazi ve splenomegali varlığı ile karakterize bir hastalıktır (48). Yıllık insidansı yaklaşık 100.000’de 1,5’tir. Tanı

anında hastaların ortalama yaşı 65-70'dir. Çocuklarda nadir görülür. PMF'li hastaların %50'sinde JAK-2 V617F mutasyonu, %5-10'unda MPL W515L/K, %20-25 CALR mutasyonu pozitif bulunur(49-53) LNK, CBL, TET2, ASXL1, IDH, IKZF1, EZH2, 20q-,13q- kromozom delesyonları başta olmak üzere del(6), t(1;6) (q21-23;p21.3), 9p, trizomi 8 veya 9, -18 - kısmi trizomi 1q gibi spesifik olmayan kromozom anormallikleri yaygın olarak görülür (48). Monozomal karyotip, inv(3)/(17q) anomalileri +8, -7/7q-, i(17q), inv3, -5/5q, 12p-veya 11q23 yeniden düzenlenmesi kötü karyotipler olarak sayılmaktadır(54).

PMF'de klonal hematopoietik kök hücre hasarı sonucu kronik miyeloproliferasyon ve atipik megakaoryopoez oluşur (55). Kemik iliği fibrozu bir fibroblast klonu tarafından oluşturulmaz (56). Başta tip 3 kollagen olmak üzere tip 1, 4 ve 5 kollagen artar. Fibrozis; transforming büyüme faktörü (TGF) ve metalloproteinaz doku inhibitörleri ile; osteoskleroz ise bir osteoklast inhibitörü olan osteoprotegrin ile ilişkilidir. Bu süreçte rol oynayan sitokinlerin başlıcaları TGF beta, PDGF, epidermal büyüme faktörü (EGF), endotelial hücre büyüme faktörü (ECGF), fibroblast büyüme faktörü (FGF)'dür.

#### 2.4.2. Tanı

PMF'de tanı anında hastaların büyük bir kısmı semptomatiktir, dev splenomegali varlığında şüphelenilir. PMF tanısı kemik iliği biyopsisinde fibrozis varlığı ile konur, bu dönemde sekonder olarak miyelofibrozis geliştiren durumların dışlanması gerekir. PV ve ET sonrası gelişen miyelofibrozis dışında, miyelodisplastik sendrom, myeloid ve lenfoid maligniteler, kemik iliği metastazı yapmış solid tümörler, bağ dokusu hastalıkları, infeksiyonlar ve D vitamini eksikliği miyelofibrozise yol açabilir. PMF tanısı için en sık Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'nün belirlediği kriterler kullanılmaktadır (**Tablo 8**) (17).



**Tablo 8. Primer Miyelofibrozis 2008 DSÖ tanı kriterleri(17)**

**Majör kriterler:**

1. Retikülin ve/veya kollojen fibrozisinin eşlik ettiği megakaryosit proliferasyonu ve atipisi olmalı veya anlamlı retikülin olmadığında megakaryosit değişimlerine artmış ilik selülaritesi, granülositik proliferasyon ve sıklıkla azalmış eritropoiez eşlik etmelidir (fibrotik PMF)
2. KML, PV, MDS veya diğer miyeloid neoplazmlar için DSÖ kriterlerini karşılamaması
3. JAK-2 V617F veya diğer klonal markırların gösterilmesi veya reaktif ilik fibrozu kanıtı olmaması

**Minör kriterler:**

1. Anemi
2. Palpabl splenomegali
3. Lökoeritroblastozis
4. LDH düzeyinde artma

**Tanı:** Tüm 3 majör ve 2 minör kriter bulunması ile tanı konur.

### 2.4.3. Klinik Özellikler

Klinik özellikler hastalığın evresiyle ilişkili olarak değişmektedir. Miyelofibrozusun erken dönemlerini ET'den ayırmak kolay değildir, kemik iliğinde fibroz gelişip splenomegali belirginleşince semptomlar, bulgular ve kan tablosu da farklı özellikler kazanır.

Halsizlik hastaların %50-70'nde görülen en sık bulgudur. Bazı hastalarda kilo kaybı, kemik ağrısı, ateş ve gece terlemesi gibi hipermetabolik durumun neden olduğu semptomlar görülebilmektedir (57). Belirgin splenomegali nedeni ile sol üst kadran ağrısı ve erken doyma hissi şikayetlere eklenebilir. Nadiren kaşıntı ve pulmoner hipertansiyon gelişebilmektedir. Arteriyel ve venöz tromboz %13 oranında görülmektedir.

Splenomegali PMF'de %90 oranla en sık rastlanan bulgudur ve extramedüller hematopoieze bağlı olarak oluşur. Dalak bazı olgularda inguinal bölgeye kadar büyüyebilir. Spleomegaliye bağlı erken doyma, sol üst kadran ve omuz ağrısı, karında şişkinlik hissi olabilir. Extramedüller hematopoieze bağlı olarak oluşan diğer bir bulgu da hepatomegalidir

ve hastaların % 40-70'inde mevcuttur. Splanknik alanda gelişen trombozlar önemli bir portal hipertansiyon nedenidir bunu dışında splenomegali ve hepatomegali splanknik kan akımı artışına, ekstramedüller hematopoiez ise intrahepatik obstruksiyona neden olarak portal hipertansiyona yol açabilir. Bunun dışında assit, özofageal ve gastrik varisler, gastrointestinal kanama, hepatic ensefalopati ve portal ven trombozu portal hipertansiyonun komplikasyonları olarak sayılabilir.

PMF'de bir çok organda gelişebilen ekstramedüller hematopoieze bağlı olarak lenfadenopati, plevral, perikardiyal veya abdominal efüzyonlar, genitoüriner, akciğer ve merkezi sinir sistemi tutulumları olabilmektedir (58).

PMF'de kemik iliği fibrozusuna bağlı iskelet sistemi değişiklikleri görülebilir. Özellikle alt ekstremitelerde ağırlı kemik ve eklem tutulumları olabilmektedir. Nadiren osteoskleroz, periostit, sekonder gut ve osteolitik lezyonlar tespit edilmektedir.

Laboratuvar tetkiklerinde en sık anemiye rastlanır. Hastaların %50'sinde Hb seviyesi <10 g/dl'dir ve % 20'sinde transfüzyona bağımlı anemi mevcuttur. Perifer kanda görülen karakteristik anizositoz, poikilositoz, granülosit öncülleri, gözyaşı hücreleri ve çekirdekli eritrositler tanı koydurucudur. Hastaların %12'sinde trombosit sayısı 500.000/mm<sup>3</sup>'den, lökosit sayısı 30.000/mm<sup>3</sup>'den fazladır. Lökoeitroblastik kan tablosuyla beraber granülosit öncülleri ve miyeloblastlar perifer kanda görülebilir. Trombositopeni, lökopeni, eozinofili ve bazofili olabilir. LAP skoru düşük, normal ya da yükselmiş bulunabilir (59). Serum ürik asit, LDH, alkalin fosfataz (ALP) ve bilirubin değerleri artmış olabilir.

Kemik iliği biyopsisinde; PMF evresine göre fibrozisin belirgin olmadığı hipersellüler bir ilikten, tamamiyle fibrotik hatta osteosklerotik iliğe varan çeşitli tablolar görülebilir. Ağır fibrozisli hastalarda kemik iliği sıklıkla aspire edilemez (*dry tap*). Kemik iliği biyopsisinde ayrıca displazik (çekirdek/sitoplazma oranı bozulmuş, hiperkromatik, düzensiz katlantılı) megakaryositlerin görülmesi tipik bulgudur. Retikülin fibrozis görülmediğinde megakaryositik değişikliklere ek olarak granülositik proliferasyonda artış ve eritropoiezde azalma saptanabilir (17, 52). Granülositlerde hiper veya hipolobülasyon, edinsel Pelger-Hüet anomalisi ve nükleositoplazmik asenkroni görülebilir.

#### 2.4.4. Prognoz

PMF 'de ortalama yaşam süresi 6-10 yıldır(60). Diğer Ph(-) MPN'lere göre yaşam süresi daha kısadır. Ciddi kemik iliği yetersizliği ve organ tutulumları sonucu gelişen anemi, enfeksiyonlar ve kanamalar morbidite ve mortaliteyi arttırmaktadır.

Hastaların yaklaşık %6-18'inde 10 yılda lösemiye dönüşüm görülür (61). Lösemiye dönüşüm riskinin trombosit sayısı düşük olan ve kötü karyotipin saptandığı hastalarda daha yüksek olduğu gösterilmiştir (62).

PMF'de prognozu etkileyen faktörler anemi, trombositopeni, yaş, kompleks sitogenetik anormallik varlığı, nedeni açıklanamayan ateş, gece terlemeleri ya da kilo kaybı gibi semptomlardan oluşmaktadır. Tedaviyi belirleme amacıyla çeşitli prognostik skorlama sistemleri geliştirilmiştir. Günümüzde en sık IPSS skorlama sistemi kullanılmaktadır(**Tablo 8**) (60). En güncel DIPSS-plus skorlama sisteminde ise bu risk faktörlerine eritrosit transfüzyon ihtiyacı, trombosit sayısının  $100.000/mm^3$  altında olması ve kötü karyotipin saptanması eklenmiştir (99). Kötü karyotip +8, -7/7q-, i(17q), inv3, -5/5q, 12p-veya 11q23 yeniden düzenlenmesi, monozomal karyotip, inv(3)/(17q) anomalileri olarak tanımlanmıştır. Üçlü (triple) negatif olarak adlandırdığımız JAK-2 V617F, MPL W515L/K ve CALR genlerinin negatif olması prognozu kötü yönde etkilemektedir.

**Tablo 9. Primer Miyelofibrozis IPSS risk skorlaması(60)**

1. Yaş >65
2. Hb < 10g/dl
3. Lökosit sayısı >25.000/ mm<sup>3</sup>
4. Periferik kanda dolasan blast yüzdesi >% 1
5. Konstitusyonel semptomlar

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

### **2.4.5. Tedavi**

PMF hastalarının tedavisini belirlerken prognostik skorlama yöntemleri kullanılmaktadır. Risk skorlamasına göre yüksek riskli genç hastalarda küratif potansiyeli olan tek tedavi modalitesi allojenik hematopoietik kök hücre naklidir. Fakat işlemin morbiditesinin ve mortalitesinin çok yüksek olduğu unutulmamalıdır. Hidroksiürea periferik kanda lökositoz ve trombositozu olan hastalarda hemoglobin düzeyi izin verdiği sürece kullanılabilir. Gerek dalak boyutlarını küçültmesi gerekse trombozu engellemesi açısından tedavide önemli bir seçenek olarak önemini korur. Anemi gelişen olgularda androjenler, kortikosteroidler ve talidomid denenebilir. Son yıllarda JAK-2 inhibitörlerinin kullanıma girmesi ile birlikte bu hastalarda kemik iliği fibrozisini azaltmak, splenomegaliyi küçültmek ve konstitüsyonel semptomları rahatlatmak mümkün olmuştur. Masif splenomegalisi olan olgularda gelişen şiddetli anemi ve konstitüsyonel semptomlar sitoredüktif ilaçların kullanımını kısıtlar. Refrakter olgularda talidomid, lenalidomid, androjen etkili ilaçlar, steroidler, interferon denenebilir. Splenektomi veya splenik radyoterapi tüm bu tedavilere refrakter olgularda ve splenik enfarkt varlığında tercih edilebilir.

## **2.5. MİYELOPROLİFERATİF NEOPLAZİLERDE MUTASYONLAR**

Genel anlamda kanser bir hücrenin normal büyüme ve farklılaşma fonksiyonlarını sağlayan mekanizmaların bozulması ve apoptozise uğramaması olarak ifade edilebilir. 1960'da KML patogenezinden Ph kromozomunun sorumlu olduğunun gösterilmesiyle birlikte, ilk kez kanserin genetik bir mutasyon sonucu oluştuğu ispatlanmış oldu. Son 50 yılda moleküler tanı yöntemlerinin hızla gelişmesi, hücre fonksiyonlarını düzenleyen genetik mekanizmaların daha iyi anlaşılması ile kanserin; DNA'da veya DNA'daki bilginin proteine aktarımı sırasında (özellikle transkripsiyon aşamasında) gelişen bozukluklardan kaynaklandığı

gösterildi.

Özellikle hematolojik malignitelerde genetik değişimlerin tanımlanması gerek tanıda, gerekse tedavide önemli bir çığır açmıştır. İlk çalışmalarda major karyotip analizleri ile kromozomlar düzeyindeki bozukluklar anlaşılabilmiştir. Philadelphia kromozomu, t(9;22); t(15;17), trisomi 21 bu gen değişimlerine örnek olarak verilebilir. Major kromozom bozuklukları FISH yöntemi ve PZR ile günlük pratikte de kolayca gösterilebilmektedir. DNA dizileme yöntemleri ile insersiyonlar, delesyonlar gibi farklı gen değişimleri de tanınabilmiştir. Bu tarz major gen değişimleri hastalıkların spesifik tanısında, sınıflandırılmasında ve prognozun değerlendirilmesinde rutin olarak kullanılmaktadır. Ayrıca geliştirilen hedef ilaçlar ile bazı hematolojik malignitelerin başarılı bir biçimde tedavisi mümkün olabilmıştır.

Moleküler tanı yöntemlerinin son 20 yılda hızla gelişmesi ile birlikte, hücrenin büyüme ve farklılaşmasında DNA'daki değişiklikler dışında, DNA'da kodlanan bilginin protein aşamasına dönüştürülmesi sırasında görev yapan transkripsiyon faktörleri ve onları düzenleyen proteinlerin de önemli rol oynadığı ortaya konmuştur. DNA dizisinde bir değişiklik yapmaksızın transkripsiyonel aşamada ortaya çıkan ve yavru hücreye aktarılabilen stabil ve uzun süreli değişiklikler '**epigenetik**' değişiklikler olarak tanımlanmaktadır. Epigenetik değişiklikler DNA metilasyonu, histon modifikasyonu ve transkripsiyonu kontrol eden proteinlerin aktivitelerinde değişiklikler olarak üç ana başlıkta incelenebilir. Bu değişikliklerin transkriptomu etkilediği, hücrenin büyümesini ve farklılaşmasını yönettiği gösterilmiştir. Son yıllarda kanser oluşumunu tetikleyen epigenetik mekanizmalar en önemli araştırma konusunu oluşturmaktadır. Her geçen gün yeni yolaklar tanımlanmakta, bu yolakların aktivatörleri ve inhibitörleri araştırılmakta ve kanserogenezin mekanizmaları anlaşılmaya çalışılmaktadır. Farklı kanser tiplerinde farklı yolakların aktive olduğu gösterilmektedir. Modern kanser tedavisinde spesifik bir kanser için, o kansere özgü yolakları bloke edecek ajanları kullanmak hedeflenmektedir(63).

MPN'ler farklı somatik gen değişimlerinin nasıl benzer sendromlara neden olabildiğini gösteren ilginç bir hastalık grubunu oluşturmaktadır. Örneğin JAK2 V617F mutasyonu PV, ET ve PMF olmak üzere üç farklı fenotiple karşımıza çıkabilmektedir. MPN kemik iliğinin aşırı aktivasyonu, periferik kanda değişik derecelerde pansitozun ve kemik iliğinde fibrozun eşlik ettiği, lösemik dönüşüm ile sonuçlanabilen bir grup kronik hematolojik maligniteyi

kapsar. Son 50 yılda bu hastalıkların genetik alt yapılarının ortaya konmasıyla birlikte hematolojik kanserler farklı bir boyuta ulaşmıştır: artık hematolojik kanserlerde tanı, tedavi ve prognozda en belirleyici özelliğin hastalığa özgü genetik değişimler olduğu anlaşılmıştır.

İlk örnek, KML hastalarında 1960 yılında gösterilen, 9. Kromozomdaki ABL onkogeni ile 22. kromozomdaki BCR geni arasında gelişen resiprokal bir translokasyon (Philedelphia kromozomu)'dur. Sonuçta oluşan BCR-ABL füzyon geninin ürünü sitoplazmik bir tirozin kinazın sürekli aktif kalmasına neden olur ve KML gelişir.

### 2.5.1 JAK-2 V617F Mutasyonu

2005 yılında Ph(-) MPN'lerde JAK-2 V617F mutasyonu tanımlanmıştır. Janus kinaz ailesi JAK-STAT yolağı ile sitokin aracılı sinyallerin dönüşümünü sağlayan bir grup tirozin kinaza verilen isimdir (64) (**Şekil 1**). Bu yolaktaki transkripsiyon faktörleri STAT'lar (*Signal Transducers and Activators of Transcription*) olarak bilinir. JAK ailesi JAK1, JAK2, JAK3 ve TYK2 olmak üzere 4 kinazdan oluşur. JAK1 ve JAK2 tip II interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) sinyal yolunda rol alırken, JAK1 ve TYK2 tip I IFN sinyallenmesi ile ilişkilidir (65). TYK2 “natural killer” fonksiyonlarına aracılık eder. JAK'lar ‘Janus homoloji domain 1-7’ (JH 1-7) olarak adlandırılan yedi bölge ihtiva ederler. JAK'ların yapısında birbirinin aynısı 2 adet fosfat transfer edici bölge mevcuttur. Bunlardan biri kinaz aktivitesi gösterirken diğeri negatif yönde regülasyondan sorumludur (66). JH1 ve JH2 domainleri bu şekilde işlev görürken JH3 ve JH4 domainleri Src-homoloji-2 (SH2) ile benzerlikler gösterir. Amino terminal uç kısmında yer alan JH4-JH7 kısmı ise FERM (4.1, ezrin, radixin, moesin) domain olarak adlandırılır ve sitozolik kısmına bağlanarak sitokin reseptörleri ve diğerk kinazlarla olan iletişimi sağlamaktadır (64). JAK-2 V617F mutasyonu JAK2'nin JH2 parçasındaki 617. kodonunda valinin fenilalanin ile yer değiştirmesi sonucu ortaya çıkar. JH2 domainindeki bu mutasyon sonucunda JAK ileti sistemindeki inhibisyon ortadan kalkar ve hematopietik progenitör hücrelerin büyüme faktörleri ve diğerk sitokinlere olan duyarlılığı artar. Eritropoietin, trombopoetin, interlökin-3, insülin like growth faktör-1, granülosit stimüle edici faktör (G-CSF) ve granülosit-makrofaj stimüle edici faktör düzeyleri artışı ile her 3 serinin de etkilendiğı bir proliferasyon durumu ortaya çıkar (12). JAK-2 V617F mutasyonu sonradan kazanılmış,

fonksiyon kazandıran (*gain-of-function*), somatik bir mutasyondur. Hayvan modellerinde JAK-2 V617F mutasyonunun ekspresyonu PV benzeri bir klinik tabloya yol açmaktadır. Bu bulgu mutasyonun patojenik olduğunun başka bir göstergesi olarak kabul edilir (67).

JAK-2 V617F mutasyonu PV’de %95-98, ET ve PMF’de %50 bulunmaktadır. PV’de ayrıca JAK-2 Ekson 12 mutasyonları ve B hücreli akut lenfoblastik lösemide JAK-2 Ekson 16 mutasyonları da tarif edilmiştir (67).

**Şekil 1. Janus Kinazların Domain Yapısı. JH: JAK homoloji domain (64)**

JH7	JH6	JH5	JH4	JH3	JH2(psödo kinaz)	JH1(kinaz)
HN						COOH

JAK-2 molekülündeki bu nokta mutasyonun nasıl olup da üç farklı fenotipe (PV, ET ve PMF) neden olabildiği konusu tam olarak aydınlatılamamıştır. Muhtemelen MPN patogenezini başlatan başka mutasyonların olduğu, bu mutasyonların JAK gelişimine yatkınlık yarattığı ileri sürülmektedir (67).

### 2.5.2 JAK-2 ekson 12 Mutasyonu

JAK-2 V617F mutasyonu bulunmayan nadir PV hastalarında bir diğer kazanılmış mutasyon JAK-2 ekson 12 mutasyonudur. JAK-2 V617F mutasyonundan farklı olarak JAK-2 ekson 12 mutasyonu yaklaşık 20 nükleotidde birden yer alarak delesyon , insersiyon ve kayıplar yapabilmektedir. SH2 ve JH2 domainleri arasında bağ görevi görür (68). PV hastalarında miyelofibroze gidişle ilişkilidir. JAK-2 V617F mutasyonu PV’de %3 görülür, ET ve PMF’de görülmez (69). Bu mutasyon JAK-2 V617F mutasyonu bulunan hastalara kıyasla daha genç hastalarda bulunmakta olup eritroid seride belirgin artışa sebep olmaktadır. Özellikle ailesel olgularda ve splenik ven trombozu bulunan olgularda gözlenmektedir(70).

### 2.5.3 MPL Mutasyonları

MPL (Miyeloproliferatif Lösemi Virüs Onkojen) mutasyonları (en sık görülenleri W515L ve W515K), ekzon 10 üzerinde tanımlanmıştır ve trombopoietin reseptör mutasyonu olarak görev alırlar. 515. kodon üzerindeki triptofanın lösin, lizin, asparajin veya alanin ile yer değiştirmesi sonucu oluşurlar (71). Aminoasit 515 transmembran domainin önünde sitoplazmada yer alır. Bu molekül reseptörün sitozolik şekli için önemli bir rol oynar ve spontan aktivasyonunu önler. Bu yer değiştirme mutasyonlarından sonra reseptörün inhibisyon mekanizması kaybolarak hücrede anormal proliferasyon olur. Bu mutasyonlar ET ve PMF’de olguların %5-10’unda görülmektedir (72, 73).

### 2.5.4. CALR (Kalretikülin) Mutasyonu

CALR geni evrimsel süreçte sıkı bir biçimde korunmuştur, bu durum proteinin elzem fonksiyonlarının bir göstergesi olarak kabul edilmektedir. CALR geni kalretikülin denen çok fonksiyonlu bir proteini kodlar. Bu protein endoplazmik retikulum, sitozol ve hücre yüzeyinde yer alır. Kalsiyum şaperon proteini olarak da tanınır. Endoplazmik retikulumda protein işlenmesi ve transportunda görev alır, proteinlerin uygun bir biçimde katlanmasını kontrol eder; ayrıca kalsiyum iyonlarının belirli düzeylerde tutulmasında görev alır. Mekanizmaları tam aydınlatılamamakla birlikte, kalretikülinin kalsiyum regülasyonu ve protein katlanması üzerindeki etkileriyle gen aktivitesini düzenlediği; hücrenin büyüme, migrasyon, farklılaşma ve apoptoz gibi major fonksiyonlarının sağlanmasında rol aldığı ileri sürülmektedir. Bu protein ayrıca yara iyileşmesi ve immün sistem fonksiyonlarında da görev almaktadır (74).

2013 yılında birbirinden bağımsız iki araştırmacı grubu (Klampfl ve ark, Naglia ve ark) JAK-2 V617F ve MPL W515L/K mutasyonları negatif olan Ph(-) MPN hastalarında CALR geninde somatik mutasyonlar tanımlamışlardır. İlginç bir şekilde bu mutasyonlar CALR geninin 9. eksonunda delesyonlar veya insersiyonlar şeklinde olmaktadır ve molekülün C-terminal ucunu değiştirmektedir (75). Mutant CALR geninin transfeksiyonunun hücre dizilerinde JAK-STAT yolağını aktive ettiği ve MPN fenotipi yarattığı gösterilmiştir. CALR mutasyonu PMF’de %20-25, ET’de %20 saptanmaktadır.



### 2.5.5. ASXL1 Gen Mutasyonları

ASXL1 (Additional sex comb-like 1) geni, *Drosophila*'da bulunan 'Additional sex combs (Asx)' geninin insan homologudur. ASXL1 geni 20q11'de yer alır, 1084 aminoasitlik bir nükleer proteini kodlar. ASXL1 proteinin görevi tam olarak anlaşılamamakla beraber, histon modifikasyonu yoluyla epigenetik değişiklikleri kontrol ettiği düşünülmektedir. Yapılan çalışmalarda ASXL1'in kromatine bağlanarak belli bölgelerin transkripsiyonunu arttırıp, belli bölgeleri baskılayarak etki ettiği ileri sürülmüştür (76).

ASXL proteinin 4 parçası tanımlanmıştır: 1) HARE-HTH (**HB1, ASXL1, *restriction endonuclease helix-turn helix domain***) DNA bağlayan bir N-terminal parçası, 2) Histon 2A'ya ubiquitin ekleyen parça, 3) Retinoik asit reseptörü ile ilişkili parça ve 4) C-Terminal kısmında PHD (*a plant homeofinger domain*) olarak tanımlanan parça.

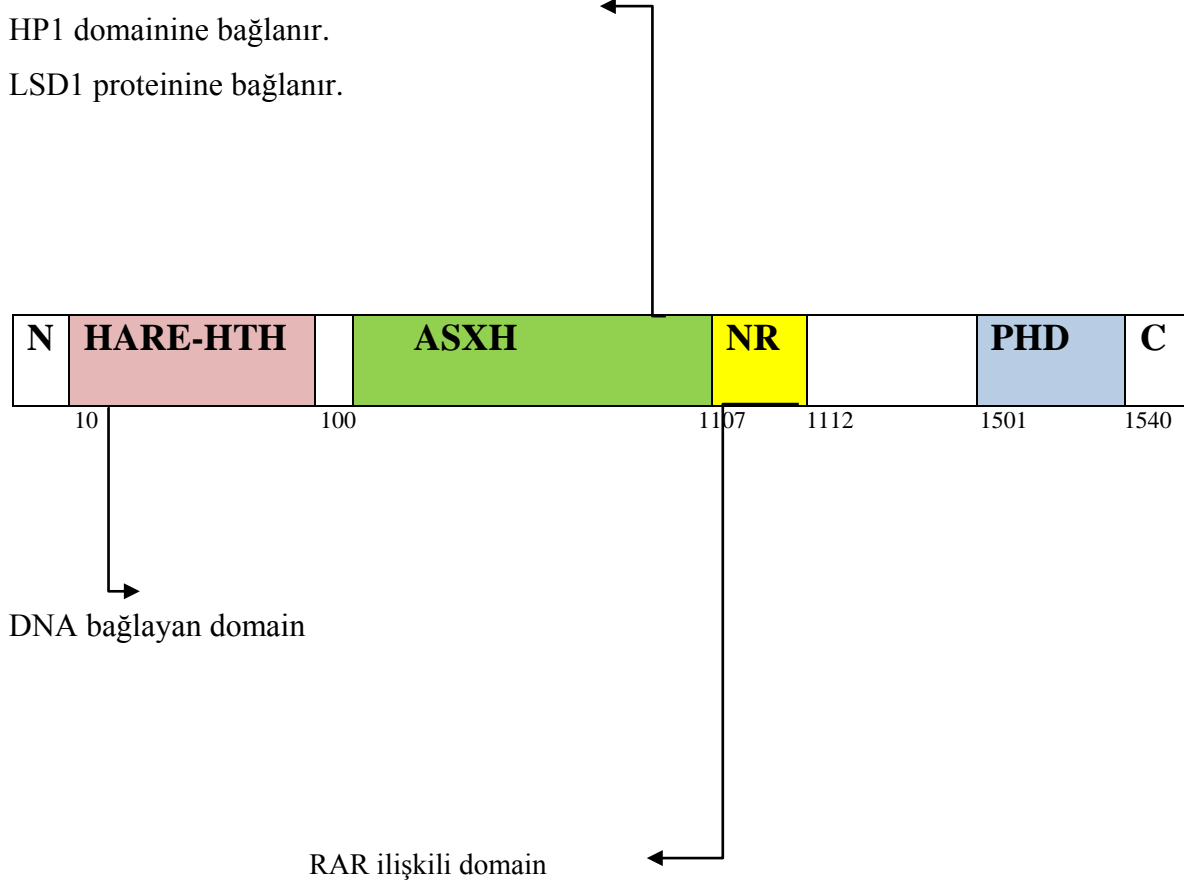
ASXL1 mutasyonlarının büyük bir kısmı C-terminal PHD olarak adlandırılan bölgenin bir kısmını kodlayan ekson 12'de tanımlanmıştır. Bu bölge kromatin modifikasyonunda görev almaktadır, histon 3 lizin metilasyonundan (H3K4) sorumludur. H3K4 transkripsiyonun represyonundan sorumlu faktörlerden biridir. Dolayısıyla ASXL1 gen mutasyonlarının transkripsiyonu arttırdığı, bu mekanizmayla myeloid kanserlere neden olabileceği ileri sürülmektedir. (77, 78). ASXL1 gen mutasyonları, MPN dışında MDS, AML ve KMML gibi farklı hematolojik malignitelerde de gösterilmiştir (79).

## Şekil 2. ASXL1 domain yapısı (80)

BAP1 memeli homoloğu *Calypso*'ya bağlanır.

HP1 domainine bağlanır.

LSD1 proteinine bağlanır.



**Tablo 10. Miyeloproliferatif Neoplazilerde Mutasyonlar(49-53)**

MUTASYON	KROMOZOM LOKASYONU	SIKLIK	PATOGENETİK ETKİ
<b>JAK-2 V617 F</b>	9p24	PV-%95-98 ET-50 PMF-%50	Miyeloproliferasyonu, progenitör hücrelerde büyüme faktörünü anormal derecede uyandır
<b>JAK-2 EKSON 12</b>	9p24	PV-%3	Miyelofibrozis ve primer

			eritroid hücre proliferasyonu,
<b>CALR (KALRETİKÜLİN) (EKSON 9 DEL/İNS)</b>	19p13.2	PMF-%20-25 ET-%15-20 PV-%0	Endoplazmik retikulum, sitozol ve hücre yüzeyinde yer alan multifonksiyonel kalsiyum bağlayıcı şaperon. Protein işlenmesi ve transport görevi
<b>MPL (MYELOPROLİFERATİF LÖSEMİ ONKOJEN VİRUSU) (MPN İLİŞKİLİ MPL EKSON 10)</b>	1p34	ET-%5-10 PMF-%5-10	Primer megakaryositik seri proliferasyonu, hücre şeklinin korunması
<b>LNK (SH2B3) (MPN İLİŞKİLİ EKSON 2 VE MONOALLEL)</b>	12q24.12	ET, PV ve PMF’de nadir BP-MPN-%10	JAK2 sinyali ile ters etki gösterir
<b>TET2 (BİRÇOK EKSON MUTASYONU)</b>	4q24	PV-%16 ET-%5 PMF-%17	TET proteinleri 5 hidroksetilmetilsitozin oluşumunda rol alır, TET1 ve TET2 bu katalitik aktivitede rol alır
<b>ASXL1 (ADDITIONAL SEX COMB LIKE 1) (EKSON 12 MUTASYONU)</b>	20q11.1	PV’de %2-7 ET-%0-10 PMF-%13-32	Epigenetik değişiklikleri kontrol eder. Wild tip ASXL1 normal hematopoiez için gereklidir, transkripsiyon faktörlerinin aktivasyon ve represyonunda rol alır
<b>IDH1/IDH2 (İSOSİTRAT DEHİDROGENAZ) (EKSON 4)</b>	2q33.3/15q26.1	PV-%2 ET-%1	2 HG TET fonksiyon bozukluğu yapar. IDH mutasyonu ile 2

<b>MUTASYONU)</b>		PMF-%4 BP-MPN%20	ketoglutarat 2 hidroksiketoglutarata(2HG) çevrilir..
<b>EZH2 (ZEST HOMOLOG 2 GELİŞTİRİCİ) (BİRÇOK EKSON MUTASYONU)</b>	7q36.1	PV-%3 PMF-%7 MDS-%6	MPN ilişkili olanlar tümör supresör görevi görür. Wild tip EZH2 histon metiltransferazın parçasıdır.
<b>DNMT3A (DNA SİTOZİN METİLTRANSFERAZ 3A) (R882 AMİNOASİT MUTASYONLARI)</b>	2p23	PV-%7 PMF-%7 BP-MPN-%14	Memelilerde DNA metilasyonu için DNA metiltransferazları elzemdir.
<b>CBL (KASİTAS B HÜCRE LENFOMA MUTASYONU (EKSON 8/9)</b>	11q23.3	PV ve ET'de nadir MF'de%6	CBL, bir E3 ibukitinidir degradasyon için mutant kinazları işaretler.
<b>IKZF1 ( IKAROS AİLESİ ÇİNKO PARMAK 1 MUTASYONU) (INTOGENIC MUTASYONLAR)</b>	7p12	CP-MPN nadir BP-MPN-%19	Transkripsiyon regülatörü ve tümör supresörüdür.
<b>TP53 (TÜMÖR PROTEİN 53) (EKSON 4-9),</b>	17p13.1	PMF-%4 BP-MPN-%27	TP 53 tümör supresör proteinidir.
<b>SF3B1 (3B SUBUNITİ EKLEYİCİ FAKTÖRÜ) (EKSON 14,15)</b>	2q33.1	PMF-%7	SF3B1, RNA siplozomunun bir komponentidir, mutasyonları ise ring sideroblast oluşumuna sebepler olur.

<b>SRSF2 (SERİN-ARJİNİN EKLEYİCİ FAKTÖRÜ 2) (EKSON 2)</b>	17q25.1	PMF-% 17	SRSF2, RNA siplozomunun bir komponentidir, disfonksiyonunda eklemelerle ilgili defekt oluşur.
<b>U2AF1 (U2 KÜÇÜK NÜKLEER RNA YARDIMCI FAKTÖR 2)</b>	21q22.3	PMF-% 16	U2 ribonükleoproteininin yardımcı faktörü ile etkileşimdedir.

### **3. GEREÇ VE YÖNTEM**

#### **3.1. HASTALAR VE TAKİP**

Bu çalışmaya İstanbul Bilim Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Hematoloji Bilim Dalı Polikliniği'nde Ph (-) MPN tanısı ile izlenen ve Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) kriterlerini karşılayan 103 hasta (48 ET, 46 PV, 9 PMF) dahil edilmiştir. Bu çalışma için İstanbul Bilim Üniversitesi Etik Kurulu'ndan onay alınmıştır (Tarih: 17.02.2015, Sayı: 44140529/ 2015-30). Hastalar bilgilendirilmiş onay ile çalışmaya dahil edilmiştir. Çalışmamız İstanbul Bilim Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir.

Çalışma dahilindeki hastaların demografik ve klinik bilgileriyle birlikte hastalığın başlangıç zamanı, başlangıç hemoglobin, lökosit, trombosit düzeyleri, başlangıç splenomegali varlığı, tromboz ve kanama komplikasyonları varlığı, malignite varlığı, sitogenetik incelemeleri ( JAK-2 V617F, JAK-2 EKSON 12, MPL W515L/K, CALR), kullanılan ilaçlar taranmıştır.

Çalışmaya dahil edilen hastaların venöz kan örnekleri toplanarak, İstanbul Bilim Üniversitesi Moleküler Hematoloji ve Onkoloji Laboratuvarı'nda DNA izolasyonu yapılarak dizi analizi yöntemi ile ASXL1 gen mutasyonları taranmıştır.

## 3.2. METOD

### 3.2.1. Genomik DNA İzolasyonu

Ph(-) MPN tanılı 103 hastadan ( 48 ET, 46 PV, 9 PMF ) DNA izolasyon kiti (HibriGen Biyoteknoloji, İstanbul, Türkiye) kullanılarak genomik DNA izolasyonu gerçekleştirildi. Santrifüj tüpüne geçen ve genomik DNA içeren sıvı analiz zamanına kadar +4 °C’de saklandı.

### 3.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Mutasyon analizi için, ASXL1 geninin 12. eksonu tasarlanan primer çifti kullanılarak PZR ile çoğaltıldı (**Tablo 11**).

**Tablo 11. Eksonların çoğaltılmasında kullanılan PZR karışımı**

PZR BİLEŞENLERİ	µl/TÜP	SON KONSANTRASYON
Steril ultra saf su	16.7	-
10X PZR tamponu	2.0	1X
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	1.0	0.25 mM
dNTP karışımı (25mM)	1.5	1.5 mM
Primer 1 (10 pmol/µl)	0.8	0.8 pmol
Primer 2 (10 pmol/µl)	0.8	0.8pmol
Taq DNA polimeraz (5U/ µl)	0.2	1U
DNA	2	-
Toplam hacim	25	

### 3.2.3. DNA Dizi Analizi

“Sanger’in dideoksi yöntemi” temeli ile çalışan bir cihaz ile (Applied Biosystems ABI 310xl Genetic Analyzer) çalışılarak dizileme ile ASXL1 gen mutasyonları analizi gerçekleştirildi. İlk olarak, incelenmesi istenen hedef bölge Tablo 11’deki PZR programı kullanılarak çoğaltıldı. PZR’de çoğaltımın gerçekleşip gerçekleşmediği ürünün 5 µl’si %2,5 (w/v)’luk agaroz jele yüklenerek kontrol edildi. Sonrasında, 4 basamaktan oluşan DNA dizileme işlemi gerçekleştirildi.

#### 3.2.3.1. Saflaştırma Aşaması

Elde edilen PZR ürünleri kolon temelli çalışan bir kit ile (PCR purification kit, HibriGen Biyoteknoloji, İstanbul, Türkiye) saflaştırıldı. Saflaştırılan örnekler %2 (w/v)’lik agaroz jelde kontrol edildi. Jelde görünmeyen ürünler için yeniden PZR uygulandı.

#### 3.2.3.2. Döngü Dizileme (*Cycle Sequencing*)

Saflaştırılan örnekler aynı gün içinde döngü dizileme işlemine tabi tutuldu. Döngü dizileme protokolü, kitin (BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems) içindeki hazır bulunan ve floresans işaretli 4 farklı dideoksi nükleotitleri de içeren “hazır reaksiyon karışımı” kullanılarak PZR cihazı ile aşağıda belirtilen protokole göre gerçekleştirildi.

Hazır reaksiyon karışımı:	8 µl
Primer (3,2 pmol)	: 4 µl
DNA örneği	: 2-5 µl
dH <sub>2</sub> O	: 3-6 µl
Toplam hacim	: 20 µl

Döngü dizilemede, PZR aşamasında kullanılmış olan ileri ve geri primerler ayrı ayrı kullanılarak dizileme karışımı hazırlandı ve aşağıda belirtilen program uygulandı.

96 0C'de 10 saniye

50 0C'de 5 saniye      25 döngü

60 0C'de 4 dakika

4 0C'de sınırsız

### **3.2.3.3. NaAc İle Saflaştırma**

Döngü dizileme sonrasında, ürünleri artıklardan temizlemek için yeniden bir saflaştırma işlemi gerçekleştirildi. PZR ürünü üzerine 2 µl mM pH 4,6 olan NaAc eklendi. Üzerine 50 µl % 95 (v/v)'lik etil alkol eklendi. Karışım, 1,5 ml'lik tüplere aktarılıp hafifçe el ile vurularak karıştırılıp buz üzerinde 15 dakika inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda 13.000 rpm hızda 20 dakika santrifüjlendi. Üst sıvı pipet ile çekilip üzerine % 70 (v/v)'lik etil alkolden 250 µl eklenip yine el ile hafifçe karıştırıldı. 13.000 rpm'de 5 dakika santrifüjlendikten sonra üst sıvı tamamen atılıp, örnekler kurumaya bırakıldı. Kurutma işlemi oda ısısında gerçekleştirildi. Liyofilize hale gelen DNA örnekleri ya hemen cihaza (ABI Prism 310 Genetic Analyzer, Applied Biosystems) yüklendi ya da daha sonra analiz edilecekler ise -20 0C'de 1 hafta süre ile saklandı.

## **3.3. İSTATİSTİKSEL ANALİZ**

Bu çalışmada istatistiksel analizler NCSS (Number Cruncher Statistical System) 2007 Statistical Software (Utah, USA) paket programı ile yapılmıştır. Verilerin değerlendirilmesinde tanımlayıcı istatistiksel metotların (standart sapma, ortalama) yanı sıra ikili grupların karşılaştırılmasında bağımsız t testi , nitel verilerin karşılaştırılmalarında ki-kare, Fisher gerçeklik testi, Odds Ratio (OR) değerleri, Tukey çoklu karşılaştırma testi kullanılmıştır. Sonuçlar, anlamlılık  $p < 0,05$  düzeyinde değerlendirilmiştir.



## 4. BULGULAR

Bu çalışmada 48 ET, 46 PV, 9 PMF olmak üzere toplam 103 Ph(-) MPN hastası incelendi. Cinsiyet dağılımı değerlendirildiğinde grubumuzun 58 kadın ve 45 erkek hastadan oluştuğu anlaşıldı. Hasta grubumuzun ortalama takip süresi 4,21 yıl (SS 3,83 yıl) idi.

Hastaların tanılarına göre dağılımında 48'inin ET, 46'sının PV ve 9 tanesinin ise PMF olduğu görüldü. ET hastalarının 16'sı erkek (33,33%), 32'si kadın (66,67%); PV hastalarının 20'si erkek (43,48%), 26'sı kadın (56,52%) idi. PMF grubunda hastaların tamamı erkek cinsiyette idi. ET, PV ve PMF hastalık grupları cinsiyet dağılımları açısından istatistiksel olarak incelendiğinde aralarında anlamlı farklılık gözlenmiştir (**p=0,0001**). ET için ortalama yaş 52,75±19,87, PV için ortalama yaş 55,33±15,72 ve PMF için ortalama yaş 58,11±16,81 olarak saptandı. ET, PV ve PMF hastalık gruplarının yaş ortalamaları, tanı yaşı ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir, ancak PMF hastalarının daha ileri yaşta olmaları dikkat çekicidir (sırası ile p=0,632, p=0,563)(**Tablo 12**).

**Tablo 12. ET, PV, PMF tanısı almış hastaların demografik özellikleri**

	ET n:48		PV n:46		PMF n:9		p
<b>Yaş</b>	52,75±19,87		55,33±15,72		58,11±16,81		0,632
<b>Tanı yaşı</b>	48,52±19,06		50,5±16,15		55,33±19,22		0,563
<b>Cinsiyet</b>	<b>Kadın</b>	32	66,67%	26	56,52%	0	0,00%
	<b>Erkek</b>	16	33,33%	20	43,48%	9	100,00%

ET, PV ve PMF hastalık gruplarının başlangıç hemoglobin, trombosit, lökosit ve nötrofil ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmiştir(**sırası ile p=0,0001, p=0,0001, p=0,0001, p=0,001**). Beklendiği üzere başlangıç kan değerleri ele alındığında ET'de trombosit sayısı, PV'de eritrosit sayısı ve PMF'de lökosit ve nötrofil sayısı yüksek bulunmuştur (**Tablo 13**).

**Tablo 13. ET, PV, PMF tanısı almış hastaların klinik özellikleri**

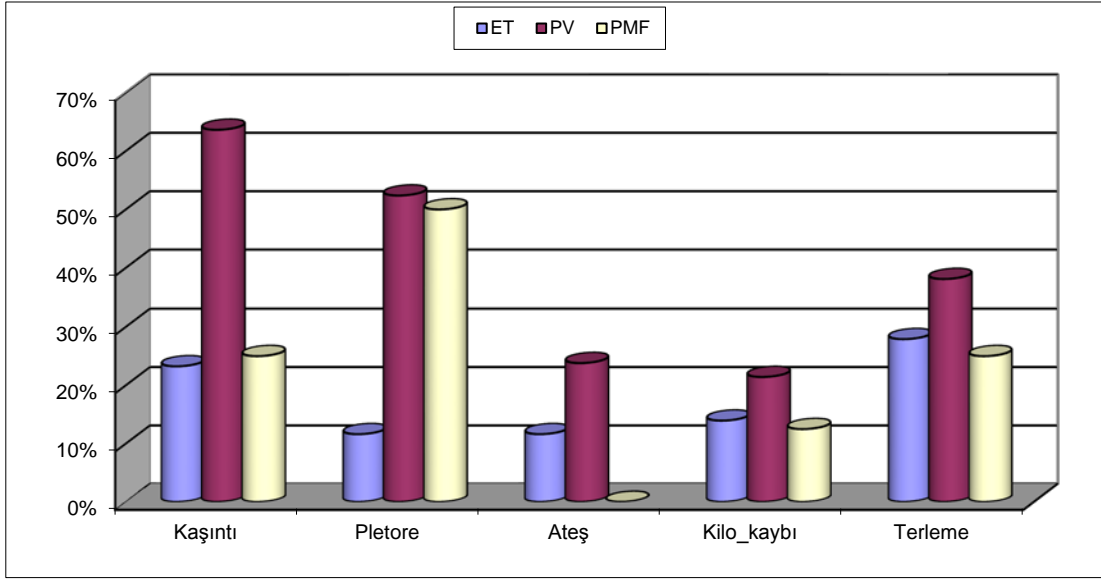
	<b>ET n:48</b>	<b>PV n:46</b>	<b>PMF n:9</b>	<b>p</b>
<b>Başlangıç Hemoglobin(g/dl)</b>	12,86±1,69	15,48±2,52	12,07±3,24	<b>0,0001</b>
<b>Başlangıç Trombosit(mm3)</b>	861,32±415,02	470,91±273,91	299,67±198,79	<b>0,0001</b>
<b>Başlangıç Lökosit(mm3)</b>	9593,91±3098,99	11558,48±5264,97	16955,56±10084,94	<b>0,0001</b>
<b>Başlangıç Nötrofil(mm<sup>3</sup>)</b>	5989,73±2611,29	8031,03±4340,88	12087,14±7361,96	<b>0,001</b>

**Tablo 14. ET, PV, PMF tanısı almış hastaların hastalık başlangıç semptomları ve splenomegali varlığı ilişkisi**

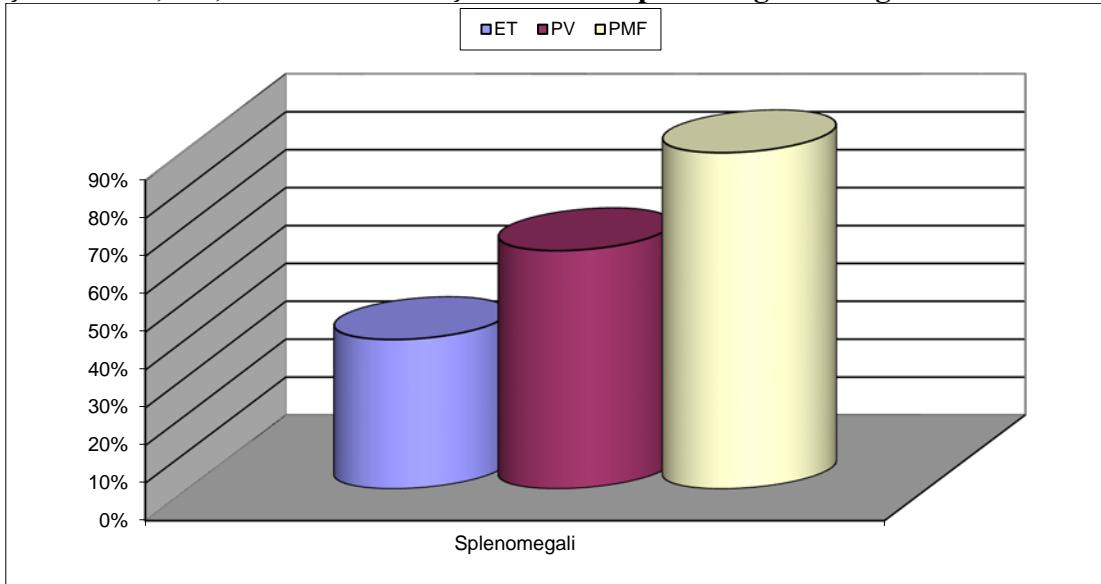
	<b>ET n:48</b>		<b>PV n:46</b>		<b>PMF n:9</b>		<b>p</b>
<b>Kaşıntı</b>	10	23,26%	28	63,64%	2	25,00%	<b>0,0001</b>
<b>Pletore</b>	5	11,63%	22	52,38%	4	50,00%	<b>0,0001</b>
<b>Ateş</b>	5	11,63%	10	23,81%	0	0,00%	0,134
<b>Kilo kaybı</b>	6	13,95%	9	21,43%	1	12,50%	0,616
<b>Terleme</b>	12	27,91%	16	38,10%	2	25,00%	0,543
<b>Splenomegali</b>	19	39,58%	29	63,04%	8	88,89%	0,007

ET, PV ve PMF hastalık gruplarının hastalık başlangıç semptomları karşılaştırıldığında PV grubunda kaşıntı ve pletore semptomu oranı oldukça yüksek bulunmuştur (sırası ile p=0,0001, 0,0001). ET, PV ve PMF gruplarında ateş, kilo kaybı ve terleme semptomlarının dağılımları benzer bulunmuştur (sırası ile p=0,134, 0,616, 0,543 ). ET, PV ve PMF gruplarının splenomegali varlığı dağılımları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmiştir. Beklendiği gibi PMF grubunda splenomegali oranları yüksek saptanmıştır (p=0,007) (**Tablo 14**) (**Şekil 3,4**).

**Şekil 3. ET, PV, PMF tanısı almış hastaların hastalık başlangıç semptomları**



**Şekil 4. ET, PV, PMF tanısı almış hastalarda splenomegali varlığı**

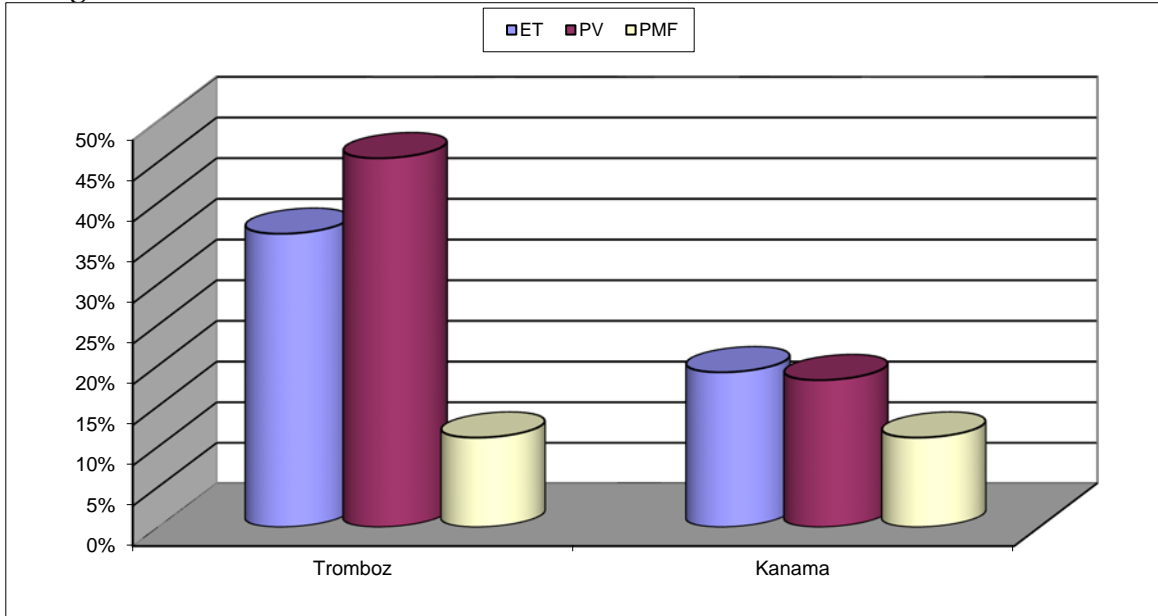


**Tablo 15. ET, PV, PMF tanısı almış hastalarda tromboz ve kanama komplikasyonları görülme durumu**

	ET n:48		PV n:46		PMF n:9		p
<b>Tromboz</b>	17	36,17%	20	45,45%	1	11,11%	0,145
<b>Kanama</b>	9	19,15%	8	18,18%	1	11,11%	0,847

ET, PV ve PMF hastalık gruplarının tromboz ve kanama komplikasyonları dağılımları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir (sırası ile  $p=0,145$ ,  $0,847$ ). Fakat PV grubunda tromboz olasılığı daha yüksek olma eğilimindedir (**Tablo 15**) (**Şekil 5**).

**Şekil 5. ET, PV, PMF tanısı almış hastalarda tromboz ve kanama komplikasyonları varlığı**

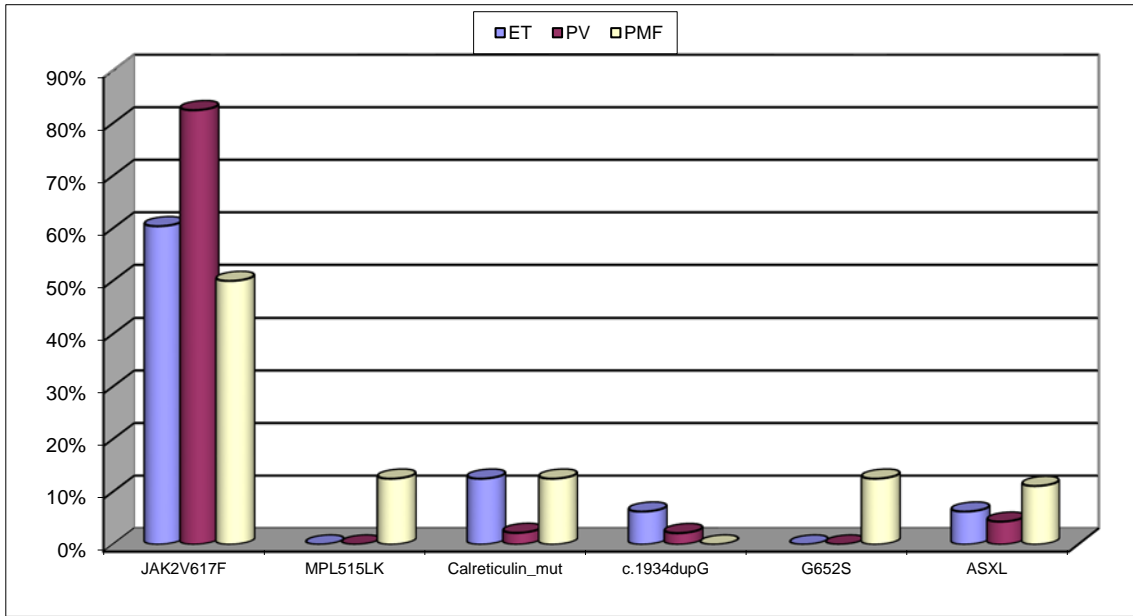


**Tablo 16. ET, PV, PMF tanısı almış hastalarda genetik mutasyon varlığı**

	ET n:48		PV n:46		PMF n:9		p
<b>JAK-2 V617F</b>	29	60,42%	39	84,78%	4	50,00%	<b>0,041</b>
<b>MPL W515L/K</b>	0	0,00%	0	0,00%	1	12,50%	<b>0,004</b>
<b>CALR</b>	6	12,50%	0	0,00%	1	12,50%	0,067
<b>ASXL1</b>	3	6,25%	2	4,35%	1	11,11%	0,720
<b>c.1934dupG (p.g646TrpfsX12)</b>	3	6,25%	1	4,44%	0	0,00%	0,509
<b>c.1954g.a (p.G652S)</b>	0	0,00%	1	0,00%	1	12,50%	0,061

PV grubunda JAK-2 V617F varlığı beklendiği üzere anlamlı derecede yüksek saptanmıştır (p=0,041). PV grubunda bir hastada JAK-2 ekson 12 mutasyonuna rastlanmıştır. MPL W515L/K mutasyonu hasta grubumuzda sadece bir PMF hastasında saptanabilmiştir. PV grubunda MPL W515L/K ve CALR mutasyonlarına rastlanmamıştır. CALR mutasyonu ET’de 6, PMF’de 1 hastada gösterilmiştir. ET ve PMF hastalık gruplarının CALR mutasyonu varlığı dağılımları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir (p=0,067) (**Tablo 16**) (**Şekil 6**).

**Şekil 6. ET, PV, PMF tanısı almış hastalarda genetik mutasyon varlığı**



Çalışma dahilinde ET, PV ve PMF tanısı almış olan 103 hastanın 6’sında (%5,8) ASXL1 gen mutasyonları saptanmıştır; 4 hastada (%66,66) c.1934 dupG (p.g646TrpfsX12) mutasyonu ve 2 hastada (%33,33) c.1954g.a (p.G652S) mutasyonu olmak üzere toplam 2 farklı mutasyon gösterilmiştir. c.1934 dupG (p.g646TrpfsX12) mutasyonu ET tanılı hastaların 3’ünde (%6,25), PV tanılı hastaların 1’inde (%2,22); c.1954g.a (p.G652S) mutasyonu PV tanılı hastaların 1’inde (%2,17) ve PMF tanılı hastaların 1’inde (%12,5) saptanmıştır (**Tablo 17,18**).

**Tablo 17. ET, PV, PMF tanısı almış hastaların ASXL1 gen mutasyonları varlığına göre karşılaştırılması**

	ET n:48		PV n:46		PMF n:9		p
ASXL1	3	6,25%	2	4,35%	1	11,11%	0,720
c.1934 dupG (p.g646TrpfsX12)	3	6,25%	1	2,22%	0	0,00%	0,509
c.1954g.a (p.G652S)	0	0,00%	1	2,17%	1	12,50%	0,061

**Tablo 18. ASXL1 gen mutasyonları**

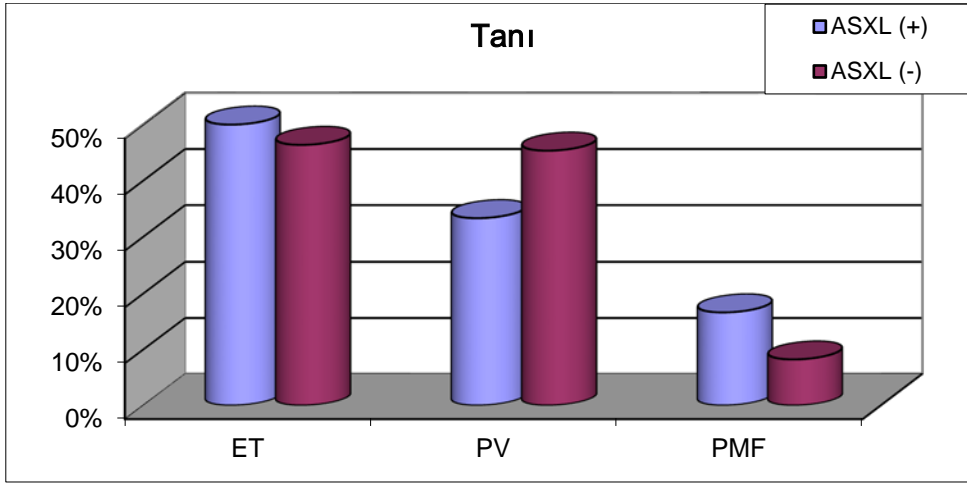
ASXL1	N (6)	%
c.1934 dupG (p.g646TrpfsX12)	4	66,66
c.1954g.a (p.G652S)	2	33,33

**Tablo 19. ET, PV, PMF tanısı almış hastaların demografik özelliklerinin ASXL1 gen mutasyonları varlığına göre karşılaştırılması**

	ASXL1 (+)		ASXL1 (-)		p
Yaş	54,51±17,82		52,17±18,49		0,756
Tanı Yaşı	50,13±17,74		47,5±20,98		0,728
Cinsiyet	Kadın	3	50,00%	55	56,70%
	Erkek	3	50,00%	42	43,30%
Tanı	ET	3	50,00%	45	46,39%
	PV	2	33,33%	44	45,36%
	PMF	1	16,67%	8	8,25%

ASXL1 gen mutasyonları olan 6 hastanın 3'ü ET (%50), 2'si PV (%33,33), 1'i PMF (%16,67) idi. Mutasyon saptanan hastaların cinsiyet dağılımı eşit bulundu (3'ü erkek, 3'ü kadın). Bu hastaların ortalama yaşı 54,51±17,82, ortalama tanı yaşı 50,13±17,74 idi. ASXL1 gen mutasyonları olan hastaların bu mutasyonu taşımayan hastalara kıyasla yaş ve tanı yaşı ortalamalarının daha yüksek olma eğiliminde olduğu dikkati çekti; ancak istatistiksel olarak anlamlı fark saptanamadı (**Tablo 19**) (**Şekil 7**).

Şekil 7. ET, PV, PMF tanısı almış hastaların ASXL1 gen mutasyonları varlığı ile ilişkisi



Tablo 20. ET, PV, PMF tanısı almış hastaların klinik özelliklerinin ASXL1 gen mutasyonları varlığına göre karşılaştırılması

	ASXL1 (+)	ASXL1 (-)	p
Başlangıç Hemoglobin(g/dl)	14,12±2,53	13,96±2,64	0,890
Başlangıç Trombosit(mm3)	733,83±559,84	629,56±392,63	0,540
Başlangıç Lökosit(mm3)	9486,67±3756,1	11249,37±5484,53	0,441
Başlangıç Nötrofil(mm3)	4948±4105,79	7596,51±4302,93	0,186

ET, PV ve PMF tanısı almış hastalar ASXL1 gen mutasyonları varlığına göre gruplandırıldığında, ASXL1 gen mutasyonları olan hastalarda başlangıç trombosit ve hemoglobin ortalamalarının daha yüksek olma eğiliminde olduğu saptanmıştır. Hastaların başlangıç lökosit ve nötrofil ortalamalarının ise daha düşük olduğu görülmüştür. Ancak hasta sayısının azlığı nedeni ile başlangıç hemoglobin, lökosit, trombosit ve nötrofil değerlerinin ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanamamıştır (Tablo 20).

**Tablo 21. ET, PV, PMF tanısı almış hastalarda ASXL1 gen mutasyonları varlığının hastalık başlangıç semptomları ve splenomegali varlığı ile karşılaştırılması**

	ASXL1 (+)		ASXL1 (-)		p	OR (%95 GA)
<b>Kaşıntı</b>	1	20,00%	39	43,33%	0,304	0,33
<b>Pletore</b>	1	20,00%	30	34,09%	0,516	0,048
<b>Ateş</b>	0	0,00%	15	17,05%	0,313	0,043
<b>Kilo kaybı</b>	0	0,00%	16	18,18%	0,295	0,04
<b>Terleme</b>	1	20,00%	29	32,95%	0,547	0,51
<b>Splenomegali</b>	2	33,33%	54	55,67%	0,286	0,41

ASXL1 gen mutasyonları olan ve olmayan hastaların başlangıç semptomları karşılaştırıldığında; bu iki grubun kaşıntı, pletore, ateş, kilo kaybı ve terleme semptomları dağılımları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir (sırası ile p=0,304, 0,516, 0,313, 0,295, 0,547 ). ASXL1 gen mutasyonları olan hastalarda konstitüsyonel semptomların çok daha az görüldüğü dikkati çekmektedir. Yine bu gruplar splenomegali varlığı açısından değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir (p=0,286). ASXL1 gen mutasyonları olmayan grupta splenomegali bulunma olasılığı daha yüksek bulunmuştur (**Tablo 21**).

**Tablo 22. ET, PV, PMF tanısı almış hastalarda ASXL1 gen mutasyonları varlığının komplikasyonlar ile karşılaştırılması**

	ASXL1 (+)		ASXL1 (-)		p	OR (%95 GA)
<b>Tromboz</b>	3	50,00%	35	36,84%	0,519	1,66
<b>Kanama</b>	0	0,00%	18	18,95%	0,282	0,38

ASXL1 gen mutasyonları olan ve olmayan hasta grupları karşılaştırıldığında ASXL1 gen mutasyonları olan grupta tromboz oranları daha fazla bulunmuştur (OR= 1,66), ancak hasta sayısının az olmasından dolayı istatistiksel olarak anlamlı farka ulaşamamıştır (p=0,519). ASXL1 gen mutasyonları olan ve olmayan hasta grupları arasında kanama



komplasyonu dağılımlarında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır (p=0,282) (Tablo 22).

**Tablo 23. ET, PV, PMF tanısı almış hastalarda ASXL1 gen mutasyonları ile JAK-2 V617F, MPL W515L/K ve CALR ilişkisinin karşılaştırılması**

	ASXL1 (+)		ASXL1 (-)		p	OR (%95 GA)
<b>JAK-2 V617F</b>	3	50,00%	63	70,00%	0,306	0,42
<b>MPL W515 L/K</b>	0	0,00%	1	1,11%	0,795	4,59
<b>CALR</b>	0	0,00%	7	7,78%	0,479	0,87

ET, PV ve PMF tanısı almış hastalarda ASXL1 gen mutasyonları sadece JAK-2 V617F ile birlikte bulunmuştur ASXL1 gen mutasyonları olan hastaların hiçbirinde MPL W515L/K ve CALR mutasyonlarına rastlanmamıştır (Tablo 23).

**Tablo 24. ET, PV ve PMF tanısı almış hastalarda JAK-2 V617F(+) ve ASXL1(+) birlikteliği**

	ET n:48		PV n:46		PMF n:9		p
<b>JAK-2 V617F(+)</b>							
<b>+ ASXL1 (+)</b>	1	2,08%	1	2,17%	1	11,11%	0,360

ET, PV ve PMF gruplarının JAK-2 V617F(+) ve ASXL1(+) birlikte varlığının dağılımları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir (p=0,360) (Tablo24).

**Tablo 25. PMF hastalarının genel özellikleri**

	HASTA1 R.M.R	HASTA2 A.A.	HASTA3 M.A.	HASTA4 B.M.	HASTA5 H.K.	HASTA6 Ş.A.	HASTA7 M.S.	HASTA8 E.B.	HASTA9 F.T.
YAŞ	58	49	33	59	83	82	40	56	63
CİNSİYET	ERKEK	ERKEK	ERKEK	ERKEK	ERKEK	ERKEK	ERKEK	ERKEK	ERKEK

TAKİP SÜRESİ (yıl)	1	2	12	4	2	1	2	1	2
ASXL1	-	-	-	-	-	-	-	-	+
JAK-2 V617F	-	+	-	+		+	-	-	+
DIPSS-plus RİSK SKORLAMASI	1	1	0	2	2	3	1	0	1

**Tablo 26. ASXL1 gen mutasyonları olan hastaların genel özellikleri**

	HASTA1 Ö.C.	HASTA2 K.D.	HASTA3 M.K.	HASTA4 M.Y.	HASTA5 N.A.	HASTA6 F.T.
YAŞ	60	28	78	36	48	63
TANI YAŞI	56	21	76	27	44	61
CİNSİYET	ERKEK	KADIN	KADIN	ERKEK	KADIN	ERKEK
ET	+	+	+	-	-	-
PV	-	-	-	+	+	-
PMF	-	-	-	-	-	+
c.1934 dupG (p.g646Trpfs X12)	+	+	+	+	-	-
c.1954g.a (p.G652S)	-	-	-	-	+	+
BMI	26	20	29	26		24
JAK-2V617F	-	-	+	+	-	+
SEMPATOM	-	KAŞINTI	-	TERLEME	-	PLETORE
KANAMA	-	-	-	-	-	-
TROMBOZ	-	+	-	+	-	+
MALİGNİTE	-	-	-	-	+	+
SPLENOME GALİ	+	-	-	+	-	-
BAŞLANGIÇ HEMOGLOBİN (g/dl)	14	11	16	16	11	17
BAŞLANGIÇ TROMBOSİT (mm <sup>3</sup> )	1800000	659000	597000	150000	479000	718000
BAŞLANGIÇ LÖKOSİT (mm <sup>3</sup> )	8900	11000	7920	3110	12700	13290
TEDAVİ	ASPIRİN	COUMADİN IFN HYDREA	ASPIRİN HYDREA	COUMADİN HYDREA	ASPIRİN	ASPIRİN HYDREA COUMADİN RUXOLİTİNİ B
COUMADİN	-	+	-	+	-	+

ASXL1 gen mutasyonları olan 6 hastayı kısaca özetleyecek olursak;

1. Ö.C; 60 yaşında erkek hasta, BMI 26, 56 yaşında ET tanısı almış, JAK-2 V617F (-),c.1934 dupG (p.g646TrpfsX12 (+)). Tanı anında asemptomatik olan hastanın başlangıç hemoglobin

değeri 14g/dl, trombosit değeri 1800000/mm<sup>3</sup>, lökosit değeri 8900/mm<sup>3</sup>tür. Tanı anında splenomegali saptanmıştır. Kanama ve tromboz gelişmemiştir. Sadece aspirin tedavisi almıştır.

2. K.D; 28 yaşında kadın hasta, BMI 20, 21 yaşında ET tanısı almış. JAK-2 V617F (-), c.1934 dupG (p.g646TrpfsX12 (+)). Tanı anında kaşıntı şikayeti olan hastanın başlangıç hemoglobin değeri 11g/dl, başlangıç trombosit değeri 659000/mm<sup>3</sup>, başlangıç lökosit değeri 11000/mm<sup>3</sup>tür. Tanı anında splenomegalisi yoktur. Tromboz gelişmiş olup kanama gelişmemiştir. Hydrea, aspirin, coumadin, IFN, PEG IFN tedavileri almıştır.

3.M.K; 78 yaşında kadın hasta, BMI 29, 76 yaşında ET tanısı almış. JAK-2 V617F (+) ve c.1934 dupG (p.g646TrpfsX12) (+). Tanı anında asemptomatik olan hastanın başlangıç hemoglobin değeri 16 g/dl, başlangıç trombosit değeri 597000/mm<sup>3</sup>, başlangıç lökosit değeri 7900/mm<sup>3</sup>tür. Tanı anında splenomegalisi yoktur. Kanama ve tromboz gelişmemiştir. Aspirin ve hydrea tedavileri almıştır.

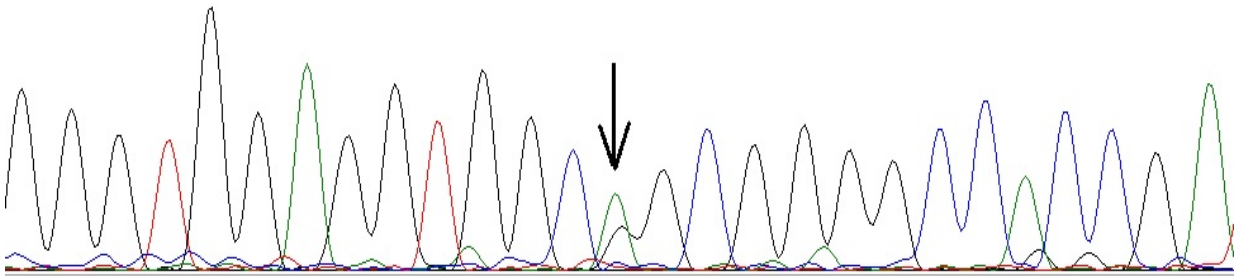
4.M.Y; 36 yaşında erkek hasta, BMI 26, 27 yaşında PV tanısı almış. JAK-2 V617F (+) ve c.1934 dupG (p.g646TrpfsX12) (+). Tanı anında terleme semptomu olan hastanın başlangıç hemoglobin değeri 16 g/dl, başlangıç trombosit değeri 150000/mm<sup>3</sup>, başlangıç lökosit değeri 3100/mm<sup>3</sup>tür. Tanı anında splenomegalisi vardır. Tromboz gelişmiş olup kanama gelişmemiştir. Hydrea ve coumadin tedavileri almıştır.

5.N.A; 48 yaşında kadın hasta, 44 yaşında PV tanısı almış. JAK-2 V617F mutasyonu bilinmiyor. c.1954g.a (p.G652S)(+). Tanı anında asemptomatik olan hastanın başlangıç hemoglobin değeri 11 g/dl, başlangıç trombosit değeri 479000 /mm<sup>3</sup>, başlangıç lökosit değeri 12700/mm<sup>3</sup>tür. Tanı anında splenomegalisi yoktur. Tromboz ve kanama gelişmemiştir. Aspirin tedavisi almıştır.

6.F.T; 63 yaşında erkek hasta, BMI 24, 61 yaşında PMF tanısı almış. JAK-2 V617F(+),c.1954g.a (p.G652S)(+). Tanı anında pletoresi olan hastanın başlangıç hemoglobin değeri 17 g/dl, başlangıç trombosit değeri 718000 /mm<sup>3</sup>, başlangıç lökosit değeri 13200/mm<sup>3</sup>tür. Tanı anında splenomegalisi yoktur. Tromboz gelişmiş olup kanama gelişmemiştir. Hydrea, aspirin, coumadin, ruxolitinib tedavileri almıştır.

G G G<sup>170</sup> T G G A G G T G G C<sup>180</sup> R G C G G G G C C A<sup>190</sup> C C G A

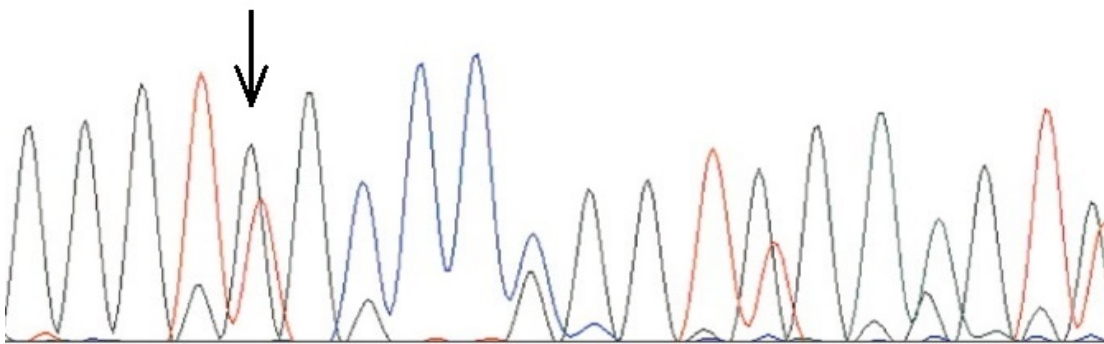
c.1954 G>A, p.G652S



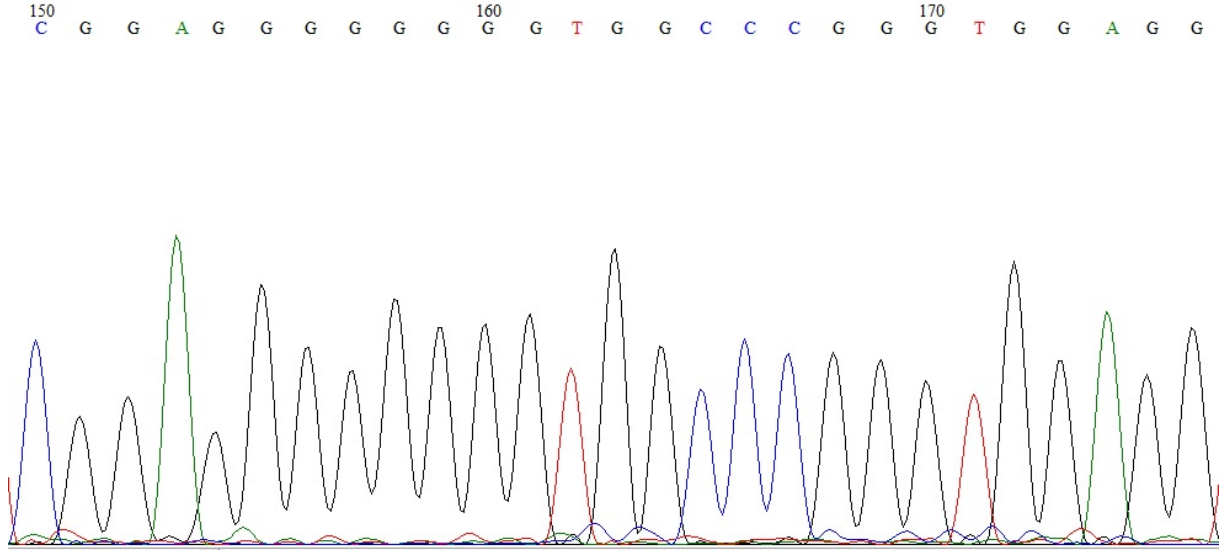
a) c.1954g.a (p.G652S) mutasyonu pozitifliği

G G G K R G R C C S G G T K G R R G K

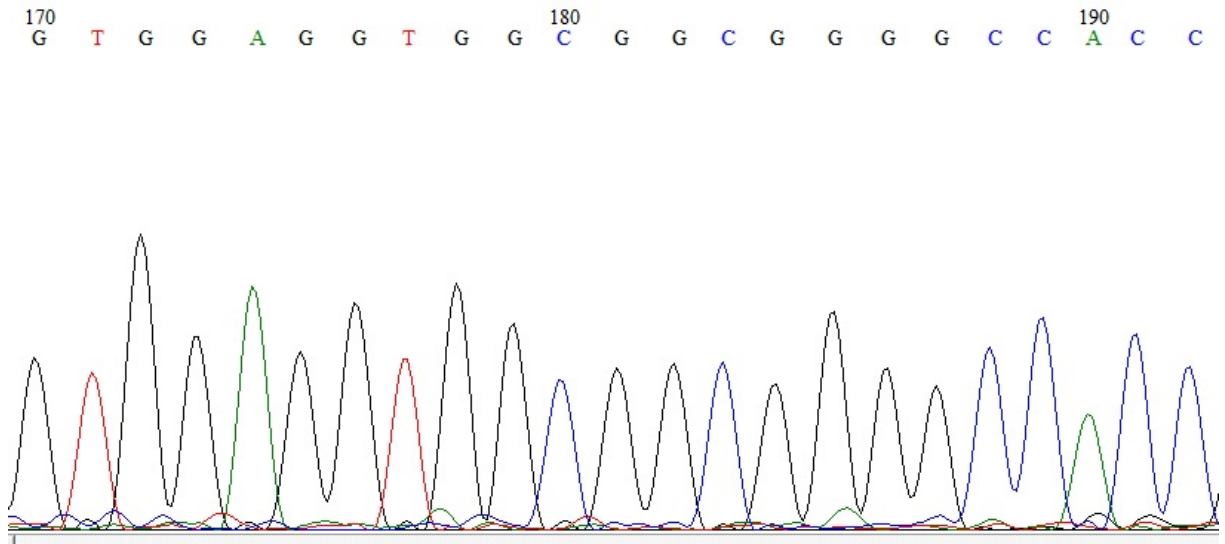
c.1934dupG, p.Gly646TrpfsX12



b) c.1934 dupG (p.g646TrpfsX12) mutasyonu pozitifliği



c) c.1934 dupG (p.g646TrpfsX12) mutasyonu negatifliği



d) c.1954g.a (p.G652S) mutasyonu negatifliği

**NOT:** DNA dizisi kromatogramı, çalışma grubumuzda en sık rastlanan ASXL1 mutasyonlarını göstermektedir. Bizim çalışmamızda en sık olarak c.1934 dupG (p.g646TrpfsX12) mutasyonu saptanmıştır. c.1934 dupG (p.g646TrpfsX12) mutasyonu; nükleotid 1934 üzerinde yer alır ve 8 baz çiftli guanin aminoasiti içerir. c.1934 dupG

(p.g646TrpfsX12) mutasyonu tekrar eden çerçeve kayması ve translasyonu duduran bir anlamsız (nonsense) mutasyondur. Çalışmamızda ikinci sıklıkta c.1954g.a (p.G652S) mutasyonu saptanmıştır. c.1954g.a (p.G652S) mutasyonu ise; nükleotid 1954 üzerinde yer alan guaninden adenin oluşumuna sebep olan bir kayıp (missense) mutasyondur (79).

Ph(-) MPN tanısı ile birlikte hematolojik olmayan kanser tanısı almış 15 hastayı kısaca özetleyecek olursak;

1.hasta E.B. 56 yaşında erkek hasta 1 yıldır PMF tanısı ile takip edilmektedir. JAK-2 V617F ve ASXL1 gen mutasyonları negatiftir, CALR mutasyonu pozitifdir. Tanı anında asemptomatik olan hastanın bilinen tromboz öyküsü yoktur. Malignite tanısı MPN tanısından önce konmuş, squamoz hücreli kanser mevcut olup hydrea kullanım öyküsü yoktur.

2.hasta S.T. 77 yaşında kadın hasta 2 yıldır ET tanısı ile takip edilmektedir. JAK-2 V617F mutasyonu pozitif olup ASXL1 gen mutasyonları negatiftir, tanı anında kaşıntı ve ateş şikayetleri olan hastanın bilinen tromboz öyküsü yoktur. Renal hücreli kanser ve mesane kanserleri mevcut. Malignite tanısı MPN tanısından önce konmuş olup hydrea kullanım öyküsü vardır.

3.hasta F.T. 63 yaşında erkek hasta 2 yıldır PMF tanısı ile takip edilmektedir. JAK-2 V617F ve ASXL1 gen mutasyonları pozitifdir, tanı anında pletoresi olan hastanın tromboz öyküsü bulunmaktadır. Coumadin kullanmaktadır. Bazal hücreli kanser ve parotis squamoz kanseri mevcut. Malignite tanısı MPN tanısından sonra konmuş olup hydrea kullanım öyküsü vardır.

4. hasta N.A. 48 yaşında kadın hasta 4 yıldır PV tanısı ile takip edilmektedir. JAK-2 V617F ve ASXL1 gen mutasyonları pozitifdir, tanı anında asemptomatik olan hastanın bilinen tromboz öyküsü yoktur. Meme kanseri mevcut. Malignite tanısı MPN tanısından önce konmuş olup hydrea kullanım öyküsü yoktur.

5. hasta Y.G. 35 yaşında kadın hasta 4 yıldır ET tanısı ile takip edilmektedir. JAK-2 V617F mutasyonu pozitif olup ASXL1 gen mutasyonları negatiftir, tanı anında asemptomatik olan hastanın bilinen tromboz öyküsü yoktur. Serviks kanseri mevcut. Malignite tanısı MPN tanısından sonra konulmuştur, hydrea kullanım öyküsü yoktur

6. hasta E.G. 66 yaşında kadın hasta 4 yıldır PV tanısı ile takip edilmektedir. JAK-2 V617F mutasyonu pozitif olup ASXL1 gen mutasyonları negatiftir, tanı anında terlemesi olan hastanın bilinen tromboz öyküsü yoktur. Bazal hücreli kanser tanısı mevcuttur. Malignite tanısı MPN tanısından önce konmuş olup hydrea kullanım öyküsü vardır.

7. hasta T.E. 80 yaşında kadın hasta 20 yıldır ET tanısı ile takip edilmektedir. JAK-2 V617F mutasyonu pozitif olup ASXL1 gen mutasyonları negatiftir, tanı anında terleme şikayeti olan hastanın bilinen tromboz öyküsü yoktur. Meme kanseri mevcut. Malignite tanısı MPN tanısından önce konulmuştur, hydrea kullanım öyküsü vardır.

8. hasta Ş.A.82 yaşında kadın hasta 1 yıldır PMF tanısı ile takip edilmektedir. JAK-2V617F mutasyonu pozitif olup ASXL1 gen mutasyonları negatiftir, tanı anında kaşıntı, kilo kaybı, pletore şikayetleri olan hastanın bilinen tromboz öyküsü yoktur. Mesane kanseri mevcut. Malignite tanısı MPN tanısı ile aynı yıl konulmuştur, hydrea kullanım öyküsü yoktur.

9. hasta T.A. 77 yaşında erkek hasta 11 yıldır ET tanısı ile takip edilmektedir. JAK-2V617F mutasyonu ve ASXL1 gen mutasyonları negatiftir, tanı anında terleme, kilo kaybı, kaşıntı şikayetleri olan hastanın bilinen tromboz öyküsü vardır. Coumadin kullanmaktadır. Meme kanseri mevcut. Malignite tanısı MPN tanısından sonra konulmuştur, hydrea kullanım öyküsü vardır.

10. hasta M.S. 68 yaşında kadın hasta 5 yıldır PV tanısı ile takip edilmektedir. JAK-2 V617F mutasyonu pozitif olup ASXL1 gen mutasyonları negatiftir, tanı anında kaşıntı şikayeti olan hastanın bilinen tromboz öyküsü yoktur. Meme kanseri mevcut. Malignite tanısı MPN tanısından önce konulmuştur, hydrea kullanım öyküsü vardır.

11. hasta M.Ü.U. 60 yaşında erkek hasta 20 yıldır PV tanısı ile takip edilmektedir. JAK-2 V617F mutasyonu pozitif olup ASXL1 gen mutasyonları negatiftir, tanı anında terleme şikayeti olan hastanın bilinen tromboz öyküsü yoktur. Prostat kanseri mevcut. Malignite tanısı MPN tanısından sonra konulmuştur, hydrea kullanım öyküsü yoktur

12. hasta S.M. 56 yaşında erkek hasta 20 yıldır PV tanısı ile takip edilmektedir. JAK-2 V617F mutasyonu pozitif olup ASXL1 gen mutasyonları negatiftir, tanı anında asemptomatik olan hastanın bilinen tromboz öyküsü yoktur. Prostat kanseri mevcut. Malignite tanısı MPN tanısından sonra konulmuştur, hydrea kullanım öyküsü yoktur

13. hasta A.K. 74 yaşında erkek hasta 3 yıldır ET tanısı ile takip edilmektedir. JAK-2 V617F mutasyonu pozitif olup ASXL1 gen mutasyonları negatiftir, tanı anında kaşıntı, pletore şikayeti olan hastanın bilinen tromboz öyküsü yoktur. Pankreas kanseri mevcut. Malignite tanısı MPN tanısından sonra konulmuştur, hydrea kullanım öyküsü vardır.

14. hasta S.K. 51 yaşında kadın hasta 4 yıldır PV tanısı ile takip edilmektedir. JAK-2 V617F mutasyonu pozitif olup ASXL1 gen mutasyonları negatiftir, tanı anında kaşıntı, pletore şikayeti olan hastanın bilinen tromboz öyküsü yoktur. Kolon kanseri mevcut. Malignite tanısı MPN tanısından önce konulmuştur, hydrea kullanım öyküsü vardır.

15. hasta H.B. 68 yaşında kadın hasta 8 yıldır PV tanısı ile takip edilmektedir. JAK-2 V617F mutasyonu pozitif olup ASXL1 gen mutasyonları negatiftir, tanı anında kaşıntı, terleme şikayeti olan hastanın bilinen tromboz öyküsü yoktur. Akciğer kanseri mevcut. Malignite tanısı MPN tanısından sonra konulmuştur, hydrea kullanım öyküsü vardır.

Çalışma grubumuzu değerlendirirken hastalarımızda hematolojik olmayan (solid) kanserlerin beklenenden daha fazla olduğu dikkatimizi çekti. Yüz üç hastalık kohortumuzda 15 hastada (% 14,5) toplam 17 hematolojik olmayan kanser tespit edilmiştir. Hastaların 7'sinde kanser, MPN tanısından önce bilinmektedir (1 inde sarkom, 1'inde mesane kanseri ve renal hücreli kanser, 1'inde bazal hücreli kanser, 1'inde kolon kanseri, 3'ünde meme kanseri), 7 hastada önce MPN tanısı, takipte hematolojik olmayan kanser saptanmıştır (1'inde bazal hücreli kanser ve parotis squamoz hücreli kanser, 1'inde meme kanseri, 1'inde pankreas kanseri, 1'inde serviks kanseri, 1'inde akciğer kanseri, 2'sinde prostat kanseri). Bir hastada ise MPN ve hematolojik olmayan kanser tanısı aynı süreçte konulmuştur (**Tablo 27**).



Hematolojik olmayan kanser saptanan hastaların moleküler özellikleri incelendiğinde 12 hastada JAK-2 V617F mutasyonu (12/15 % 80), 1 hastada CALR mutasyonları saptanmıştır. İki hastada JAK-2 V617F ile ASXL1 c.1954g.a (p.G652S) mutasyonu birlikte görülmüştür. İki hastada tüm mutasyonlar negatif bulunmuş ve Ph(-) MPN tanısı kemik iliği biyopsisi ile konulmuştur.

Hastalarımızda MPN tedavisinde hidroksiüre ve IFN kullanılmıştır. On hasta daha önce herhangi bir tedavi almadığı halde hematolojik olmayan kanser tanısı almıştır. Beş hastanın özgeçmişinde ise uzun süreli hidrokisüre kullanımı mevcuttur.

Hematolojik olmayan kanserli Ph(-) MPN hastalarında yaş ortalaması 64,06, tanı yaşı ortalaması 58,5 olarak saptandı.

**Tablo 27. Malignitesi bulunan hastaların genel özellikleri**

HASTA	TANI	YAŞ	CİNSİYET	TAKİP SÜRESİ/YIL	MUTASYON	ASXL1 MUT.	SEMPTOM	TROMBOZ	MALİGNİTE ZAMANI(MPN ÖNCESİ/SONRASI)	MALİGNİTE	HYDREA
1.E.B	PMF	56	ERKEK	1	CALR	-	-	-	ÖNCE	Sarkom	-
2.S.T.	ET	77	KADIN	2	JAK	-	KAŞINTI, ATEŞ	-	ÖNCE	Renal hücreli kanser, mesane kanseri	+
3.F.T	PMF	63	ERKEK	2	JAK	+	PLETOR E	+	SONRA	Bazal hücreli kanser, parotis squamoz kanseri	+
4.N.A	PV	48	KADIN	4	JAK	+	-	-	ÖNCE	Meme kanseri	-
5.Y.G	ET	35	KADIN	4	JAK	-	-	-	SONRA	Serviks kanseri	-
6.E.G	PV	66	KADIN	4	JAK	-	TERLEM	-	ÖNCE	Bazal hücreli	+

.							E			kanser	
7.T.E	ET	80	KADIN	20	JAK	-	TERLEM E	-	ÖNCE	Meme kanseri	+
8.Ş.A.	PMF	82	ERKEK	1	JAK	-	KAŞINTI, PLETORE ,KİLO KAYBI	-	BİRLİK TE	Mesane kanseri	-
9.T.A	ET	77	ERKEK	11	-	-	TERLEM E,KİLO KAYBI, KAŞINTI	+	SONR A	Meme kanseri	+
10.M. S.	PV	68	KADIN	5	JAK	-	KAŞINTI	-	ÖNCE	Meme kanseri	+
11.M. Ü.U.	PV	60	ERKEK	4	-	-	TERLEM E	-	SONR A	Prostat kanseri	-
12.S. M	PV	56	ERKEK	14	JAK	-	-	-	SONR A	Prostat kanseri	-
13.A. K.	ET	74	ERKEK	3	JAK	-	KAŞINTI ,PLETOR E	-	SONR A	Pankreas kanseri	+
14.S. K	PV	51	KADIN	4	+	-	ATEŞ, PLETOR E	-	ÖNCE	Kolon kanseri	+
15.H. B.	PV	68	KADIN	8	+	-	KAŞINTI ,TERLE ME	-	SONR A	Akciğer kanseri	+

## 5. TARTIŞMA

Bu çalışmaya İstanbul Bilim Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Hematoloji Bilim Dalı Polikliniği'nde Ph (-) MPN tanısı ile izlenen ve Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) MPN tanı kriterlerini karşılayan 103 hasta (48 ET, 46 PV, 9 PMF) dahil edilmiştir. Ph(-

) MPN hastalarında ASXL1 gen mutasyonlarının bulunma sıklığı; bu mutasyonların hastaların klinik özellikleri ile olan ilişkileri ve prognoza olan etkileri incelenmiştir. Bu çalışma, bu konuda ülkemizde yapılmış olan ikinci büyük çalışmadır.

Çalışmamıza dahil edilen 103 Ph (-) MPN hastasının cinsiyete göre dağılımına bakıldığında 58'inin kadın, 45'inin erkek olduğu görüldü. Tanılara göre cinsiyet dağılımı incelendiğinde ise 48 ET hastasının 16'sının erkek (33,33%), 32'sinin kadın (66,67%); 46 PV hastasının 20'sinin erkek (43,48%), 26'sının kadın (56,52%) olduğu görüldü. PMF grubunda ise 9 hastanın tamamının erkek olduğu dikkati çekti. Literatürde Türkiye'den bildirilen ve 184Ph (-) MPN hastasını içeren en büyük çalışmada kadın-erkek oranı ET olguları için %54,3'ü kadın, %45,7'si erkek (58/49); PMF için %55,84'ü kadın, %44,16'sı erkek (43/34) olarak bildirilmiştir(81). Bizim çalışmamızda PMF grubundaki hasta sayısının az olması nedeni ile cinsiyet dağılımındaki farklılık hakkında bir yorum yapılamamaktadır.

ET hastalarımızın ortalama tanı yaşı 48,52±19,06, PV hastalarımızın ortalama tanı yaşı 50,5±16,15, PMF hastalarımızın ortalama tanı yaşı 55,33±19,22 olarak bulunmuştur. Her ne kadar başlangıç yaş ortalaması karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadıysa da; bulgularımız ET'nin nispeten daha genç olgularda, PMF'nin ise daha yaşlı hasta grubunda görüldüğünü işaret etmektedir. Literatürde ET için ortalama yaş 50-57, PV için 60, PMF için 65 olarak bildirilmektedir (90). Bizim kohortumuzda Ph(-) MPN alt gruplarının ortalama tanı yaşları belirgin olarak düşük bulunmuştur. Bu durum, Ph(-) MPN tanısında önemli belirteç olarak kabul edilen 3 mutasyonun (JAK-2 V617F, CALR, MPL W515L/K) laboratuvarımızda tüm hastalarda taranabilmesi ile açıklanabilir. Molaküler tanı yöntemlerinin rutin kullanılması hastaların daha erken tanı almasını kolaylaştıran bir faktör olarak kabul edilebilir.

Başlangıç hematolojik parametreler ele alındığında beklendiği üzere ET'de trombosit sayısı, PV'de eritrosit sayısı ve PMF'de lökosit ve nötrofil sayısı yüksek bulunmuştur. ET, PV ve PMF gruplarının splenomegali varlığı dağılımları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmiş olup; ET grubunda splenomegali varlığı daha düşük iken PMF grubunda splenomegali varlığının yüksek olma eğiliminde olduğu saptanmıştır.

Ph(-) MPN hastaları, sık rastlanan klonal mutasyonlar açısından değerlendirildiğinde; hastaların %71,3'ünde (72/103 hasta) JAK-2 V617F mutasyonu saptanmıştır. Alt gruplara

göre dağılımlara bakıldığında PV’de bu oran %84,78 (39/46 hasta), ET’de %60,42 (29/48 hasta), PMF’de %50 (4/8 hasta) bulunmuştur. Bir PV hastamızda JAK-2 ekson 12 mutasyonu bulunmuştur. Bu durumda PV hastalarında mutant JAK-2 molekülü saptama oranımız %87 olmaktadır. Litaretüre kıyasla PV hasta grubumuzda JAK-2 mutasyon oranı düşük bulunmuştur. Bunun nedeni hakkında değişik yorumlar yapılabilir. Olgularımızın bir kısmında JAK-2 V617F mutasyonu periferik kan hücrelerinde gösterilememiş iken kemik iliğinden yapılan genetik incelemede pozitif sonuçlanmıştır. Maalesef JAK-2 mutasyonları negatif olan hastaların hepsine kemik iliğinden genetik inceleme yapma şansı olmamıştır, zira olguların bir kısmı dış merkezde kemik iliği biyopsisi yapılarak tanı konulmuş olgulardır ve ikinci kemik iliği işlemini kabul etmemiştir.

CALR mutasyonları toplam 7 hastada bulunmuştur, 6 tanesi ET ve bir tanesi PMF grubundadır. MPL W515L/K mutasyonu ise sadece bir PMF hastasında gösterilmiştir.

Çalışma grubumuzda ASXL1 gen mutasyonları 6 hastada saptanmıştır (%5,8). Bu mutasyonlar ET hastalarının %6,25’inde (3/48), PV hastalarının %4,35’inde (2/46) ve PMF hastalarının %11,11’inde (1/9) gösterilmiştir. Litaretürde ASXL1 gen mutasyonları ile ilgili çalışmalarda farklı sonuçlar gösterilmekle birlikte, sıklık genel olarak Ph(-) MPN hastalarında yaklaşık %10 olarak verilmektedir (82). Litaretürde bu mutasyonların tanılara göre dağılımı incelendiğinde PV’de %2-7, ET’de %0-10, PMF’de % 13-32 sıklıkları verilmektedir (53, 81-85). 2011 yılında yayınlanmış olan, Stein ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada 166 MPN hastası ASXL1 gen mutasyonları açısından değerlendirilmiştir. PV hastalarının %2’sinde, PMF hastalarının %32’sinde ASXL1 gen mutasyonlarına rastlanmış olup ET hastalarının hiçbirinde ASXL1 gen mutasyonları saptanmamıştır (84). 2012 yılında Brecqueville ve arkadaşlarının yapmış olduğu başka bir çalışmada ASXL1 gen mutasyonları 149 MPN hastasında araştırılmıştır: 30 PV hastasının 2’sinde (%7), 53 ET hastasının 2’sinde (%4), 30 PMF hastasının 6’sında (%20), 4 PV sonrası PMF hastasının 2’sinde (%50), 10 ET sonrası PMF hastasının 1’inde (%10) ASXL1 gen mutasyonları saptanmıştır (53). Gelsi Boyer ve arkadaşlarının 2009 yılında yapmış olduğu başka bir çalışmada PV’de %2-5, ET’de %5-10, PMF’de %13-26 olarak saptanmıştır(85). Yönel ve arkadaşlarının ülkemizde yaptıkları çalışmada 184 MPN hastasında ASXL1 gen mutasyonlarının sıklığı araştırılmış, ET’de % 8.4 (9/107), PMF’de %24.7 (19/77) olarak bulunmuştur(81) (**Tablo 28**).

**Tablo 28. ET, PV ve PMF hastalarında ASXL1 gen mutasyonlarının litaretürlerde görülme oranları (81,84,85,53)**

	<b>ET%</b>	<b>PV%</b>	<b>PMF%</b>
<b>Stein ve ark.2011 (84)</b>	0	2	32
<b>Gelsi Boyer ve ark.2009 (85)</b>	5-10	2-5	13-26
<b>Brecqueville ve ark. 2012 (53)</b>	4	7	20
<b>Yönel ve ark.2015 (81)</b>	8,4	-	24,7
<b>Bizim çalışmamız</b>	6.25	4.35	11.11
<b>Abdel-Wahab ve ark.</b>	-	-	13(n=6/46)

Bizim Ph(-) MPN kohortumuzda ASXL1 geninin 12. eksonu tarandığında en sık c.1934dupG (p.g646TrpfsX12) mutasyonuna (4 hasta), ikinci sıklıkta ise c.1954G.a (p.G652S) mutasyonuna (2 hasta) rastlanmıştır. Bunun dışında başka mutasyon gösterilememiştir. Ülkemizde yapılan diğer çalışmada da ASXL1 geninin sadece ekson 12 bölgesi taranmıştır. Bu çalışmada da en sık c.1934dupG (p.g646TrpfsX12) mutasyonu ve ikinci sıklıkta c.1954G.a (p.G652S) mutasyonu ve 1900\_1922 del varlığı saptanmıştır (81).

Yurt dışında yapılan çalışmalarda da en sık görülen mutasyon c.1934dupG (p.g646TrpfsX12) mutasyonudur. Gelsi-Boyer ve arkadaşlarının 2012 yılında yapmış olduğu çalışmada ASXL1 gen mutasyonları olan hastaların %50'sinden fazlasında c.1934dupG (p.g646TrpfsX12) mutasyonu saptanmıştır (79). Stein ve arkadaşlarının yapmış olduğu kohort çalışmasında ASXL1 gen mutasyonları saptanan hastalarda ilk sırada c.1934dupG (p.g646TrpfsX12) mutasyonuna rastlanmaktadır, ikinci sırada c.1900\_1922del ve ardından en sık c.1954G.a (p.G652S) mutasyonu görülmektedir (84). Tefferi ve arkadaşlarının 2011 yılında yapmış olduğu çalışmada da, diğer birçok çalışmada olduğu gibi en sık c.1934dupG (p.g646TrpfsX12) varyantı gösterilmiştir (51).

Hasta grubumuzda ASXL1 gen mutasyonları (c.1934dupG p.g646TrpfsX12, c.1954G.a

p.G652S) sayısı az olduğu için saptanan iki farklı ASXL1 varyantı ayrı ayrı değerlendirilememiştir. İstatistiksel analiz ASXL1 gen mutasyonları taşıma ve taşımama açısından gruplanarak yapılmıştır. ASXL1 gen mutasyonlarının epidemiyolojik ve klinik bulgularla ilişkisi konusunda literatürdeki bilgiler henüz tam netlik kazanmamıştır, çelişkili yorumlar mevcuttur. Yaş ve cinsiyet ele alındığında bizim hastalık grubumuzda ASXL1 gen mutasyonları saptanan 6 hastanın kadın erkek dağılımı eşit bulunmuştur (3/3). Hastalarımızın ortalama yaşı  $54,51 \pm 17,82$ , ortalama tanı yaşı  $50,13 \pm 17,74$  olarak belirlenmiştir. Her ne kadar ASXL1 gen mutasyonları olan ve olmayan hastalar kıyaslandığında yaş ve tanı yaşı ortalamaları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadıysa da (**Tablo 19**); ASXL1 gen mutasyonları olanların ortalama yaş ve tanı yaşlarının daha yüksek olduğu dikkati çekmektedir. Stein ve arkadaşlarının yapmış olduğu kohort çalışmasında 83 hastada ASXL1 gen mutasyonları bakılmıştır. Bu mutasyonları taşıyanlarda gerek başlangıç yaşı, gerekse ortalama yaş daha düşük bulunmuştur. Ancak aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir (sırasıyla  $p=0,14$  ve  $0,67$ )(84). Yine Vannuchi ve arkadaşlarının yapmış olduğu 879 Ph (-) MPN hastasını kapsayan çalışmada ASXL1 gen mutasyonları ileri yaştaki hastalarda daha sık saptanmıştır (86). Breckeville ve arkadaşlarının 2012 yılında yapmış olduğu ve 127 Ph(-) MPN hastasını içeren çalışmada ASXL1 gen mutasyonları olan hastaların ortalama yaşı 74, bu mutasyonları taşımayanların ortalama yaşı 63 bulunmuştur, aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı saptanmıştır ( $p=0,008$ )(53). Türkiye’den yapılan 184 Ph(-) MPN ‘nin dahil edildiği çalışmada ASXL1 gen mutasyonları olanlarda tanı yaşı ve ortalama yaşı bu mutasyonu taşımayanlara kıyasla daha yüksek bulunmuştur (81).

ASXL1 gen mutasyonlarının PV, ET ve PMF’deki dağılımları ve demografik özellikleri ile ilgili literatürdeki bulgular çelişkilidir. Bizim çalışmamızda ASXL1 gen mutasyonları; ET’de erkeklere oranla kadınlarda daha fazla (% 66,7), PV’de kadın ve erkek hastalarda eşit oranda, PMF’de ise sadece erkek hastalarda bulunmaktadır. Bizim çalışmamızda hasta sayısının azlığı ve PMF grubunda sadece erkek hastaların bulunması nedeni ile bu konuda bir yorum yapmak mümkün görülmemektedir.

Çalışmamızda Ph(-) MPN hastalarında ASXL1 gen mutasyonlarının başlangıç trombosit ve hemoglobin ortalamalarına etkisi araştırılmıştır. ASXL1 gen mutasyonları olanlarda olmayanlara kıyasla başlangıç hemoglobin ve trombosit ortalamalarının daha

yüksek, başlangıç lökosit ve nötrofil ortalamalarının ise daha düşük olduğu saptanmıştır (**Tablo 20**). Ancak hasta sayısının azlığı nedeni ile bu değerler istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır. Bu konuda ülkemizde yapılan diğer çalışmada sonuçlar farklı bulunmuştur. Yönel ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ASXL1 gen mutasyonları olan Ph(-) MPN hastalarında başlangıç lökosit değerleri ASXL1 gen mutasyonları olmayan gruba kıyasla daha yüksek olup, iki grubun başlangıç trombosit ve hemoglobin değerleri benzer oranda bulunmuştur (81). Stein ve arkadaşlarının yapmış olduğu kohort çalışmasında ASXL1 gen mutasyonları olan ve olmayan PMF hastalarında başlangıç lökosit, hemoglobin ve trombosit değerleri benzer oranda saptanmıştır(84). Başka bir çalışmada Brecqueville ve arkadaşları başlangıç lökosit ve trombosit sayıları arasında ASXL1 gen mutasyonları olan ve olmayan grupta farklılık saptamamakla beraber hemoglobin seviyelerinin ASXL1 gen mutasyonları olanlarda daha düşük olduğunu göstermiştir(53). Sonuç olarak literatürdeki tüm çalışmalarda oldukça farklı sonuçlar bildirilmektedir.

Bizim çalışmamızda ASXL1 gen mutasyonları olan hastalarda splenomegali oranı daha düşük bulunmuştur (%33,33 versus %55,67). ASXL1 gen mutasyonları ve splenomegali ilişkisi az sayıda çalışmada vurgulanmıştır. Stein ve arkadaşlarının yapmış olduğu kohort çalışmasında ASXL1 gen mutasyonları olan ve olmayan PMF hastalarında dalak boyutları kıyaslanmış ancak anlamlı farklılık saptanmamıştır (84). Yönel ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada ET ve PMF hastalarında splenomegali varlığı ve dalak boyutları değerlendirildiğinde ASXL1 gen mutasyonları taşıyan ve taşımayan hastalarda anlamlı farklılık bulunmamıştır. Bizim çalışmamızda maalesef bütün hastaların USG ile dalak boyutu verileri mevcut değildir, bu nedenle dalak boyutları açısından bir yorumda bulunulamamıştır.

Çalışmamızda ASXL1 gen mutasyonları olan hastalarda ASXL1 gen mutasyonları olmayanlara kıyasla tromboz gelişimi 1.66 kat fazla saptanmıştır. ASXL1 gen mutasyonları olan hastalarda arter trombozu oranı %66,7, ven trombozu oranı %33,3 olarak bulunmuştur. ASXL1 gen mutasyonları negatif grupta ise arter trombozu oranı % 14,4 ve ven trombozu oranı % 20,6 dir. Literatürde ASXL1 gen mutasyonları ile tromboz ilişkisini araştıran az sayıda çalışma mevcuttur. 2012 yılında Brecqueville ve arkadaşlarının yapmış olduğu bu çalışmada ASXL1 mutasyonları olan ve olmayan hasta grupları arasında tromboz gelişimi

arasında anlamlı farklılık saptanmamıştır (53). Ayrıca Yönel ve arkadaşlarının yapmış olduğu son çalışmada da ASXL1 mutasyonları olan ve olmayan hasta grupları arasında tromboz gelişimi oranları benzer saptanmıştır (81). Bizim çalışmamızda ise ASXL1 gen mutasyonları bulunan grupta arter trombozu oranlarının daha yüksek olduğu gösterilmiştir.

ASXL1 gen mutasyonları ile sağkalım arasındaki ilişki çok sayıda çalışmaya konu olmuştur. Brecqueville ve arkadaşlarının 2012 yılında yapmış olduğu çalışmada 44 PMF hastasında ASXL1 gen mutasyonları olan grubun 5 yıllık yaşam süresinin ASXL1 gen mutasyonları olmayanlara kıyasla daha kısa olduğu görülmüştür (%56 ya karşılık %87) (53). Mayo kliniğın yapmış olduğu kohort çalışmasında 279 PMF hastasında 5 yıllık yaşam süresi ASXL1 gen mutasyonları olan ve olmayan grupta benzer olarak saptanmıştır (86). Gelsi-Boyer Veronique ve arkadaşlarının 2012 yılında yapmış olduğu çalışmada ASXL1 gen mutasyonları olan hastalarda prognozun daha kötü olduğu gösterilmiştir (79). Tefferi ve arkadaşlarının 2014 yılında yayınladıkları 570 PMF hastasını içeren uluslararası bir çalışmada ASXL1 gen mutasyonlarının varlığı kötü prognostik kriter olarak tanımlanmıştır. Bu mutasyonu taşıyanlarda yaşın daha ileri olduğu, DIPSS-Plus skorlarının daha yüksek olduğu ve sağkalımın belirgin olarak azaldığı gösterilmiştir(160). Aynı çalışmada CALR tip1 mutasyonlarının iyi prognostik özellik taşıdığı gösterilmiştir. Bu bulgulara dayanarak Tefferi ve arkadaşları ASXL1 ve CALR gen mutasyonlarının bütün PMF hastalarında bakılmasını ve DIPSS-Plus skorlamasına ilave edilmesini önermektedirler. Bizim çalışmamızda ise PMF hastalarının ortalama takip süresi 5 yıldan kısadır. PMF grubumuzdaki 9 hastanın da takibi devam etmektedir, eksitus olan veya lösemik dönüşüm saptanan hastamız yoktur. Bu nedenle sağkalım açısından yorum yapmak mümkün değildir.

ASXL1 gen mutasyonlarının MPN dışı hematolojik malignitelerle ilişkisi literatürde ilk tanımlandığı zamandan beri bilinmektedir. Gelsi-Boyer Veronique ve arkadaşları tarafından MDS/AML tanılı 40 hastalık bir çalışmada genetik araştırma yapılması sırasında saptanmıştır. 2009 yılında yapılmış bu çalışmada 35 MDS tanılı hastanın 4'ünde (%11) ve 39 kronik myelomonositik lösemi tanılı hastanın 17'sinde (%43) ASXL1 gen mutasyonlarına rastlanmıştır (85). Ardından Carbuccia tarafından yapılmış olan başka bir çalışmada 64 MPN tanılı hastanın 5'inde (%8), 63 AML tanılı hastanın 11'inde (%17) olarak ASXL1 gen mutasyonlarına rastlanmıştır(82),(87). Boulwood ve arkadaşlarının 2010 yılında yapmış



olduğu çalışmada; 79 MDS hastasının 5'inde (%6), 55 refrakter anemi artmış blastlı (RAEB1) hastasının 17'sinde (%31), 67 AML hastasının 17'sinde (%25) ASXL1 gen mutasyonları saptanmıştır (88).

Ph(-) MPN'lerde hastaların %1-5'inde takip sırasında akut lösemiye dönüşüm görülebileceği bilinmektedir. Ancak MPN'lerin hematolojik olmayan kanserler (solid tümör) ile ilişkisi konusunda literatürde bilgi bulunmamaktadır. Bizim kohortumuzda hastalarımızın hiçbirinde akut lösemiye dönüşüm gerçekleşmemiştir, bu durum ortalama takip süresinin kısa olması (4.66 yıl) ile açıklanabilir. Öte yandan kohortumuzda 15 hastada 17 hematolojik olmayan kanser (solid tümör) görülmüştür (%14,5) (15/103). Bu durum aynı yaştaki normal popülasyonla kıyaslandığında oldukça fazladır. Hematolojik olmayan kanser sıklığının artmış olması değişik hipotezlerle açıklanabilir. Öncelikle MPN mutasyonlarının başka malignitelerin gelişimini de kolaylaştırabileceği düşünülebilir. Hematolojik olmayan kanser gelişen hastalarımızın moleküler özellikleri incelendiğinde 2 hasta hariç hepsinde MPN mutasyonları gösterilmiştir (12 hastada JAK-2 V617F mutasyonu, 1 hastada CALR mutasyonu). İki hastada ayrıca JAK-2 V617F ile birlikte c.1954G.a (p.G652S) mutasyonu saptanmıştır. Bu mutasyonların hücre proliferasyon yollarını aktive ettiği bilinmektedir, ancak şu anki bilgilerimiz bu mutasyonların sadece hematopoietik kök hücrelerde gelişen bir somatik mutasyon olduğunu desteklemektedir. Bu durumda diğer hücre dizilerinde malign transformasyonu indüklemesi mümkün görünmemektedir. JAK-2 V617F ve CALR mutasyonlarının non-hematolojik hücre dizilerinde bulunduğu dair literatürde bulgu yoktur. Lee ve arkadaşlarının bir çalışmasında JAK-STAT yolağının aktivasyonu ile seyreden mide kanserlerinde JAK-2 V617F mutasyonu taranmış, ancak hiçbir hastada pozitif bulunamamıştır (89). İkinci olasılık MPN tedavisinde kullanılan ilaçların (özellikle hidroksiüre) sekonder kanser geliştirme riskidir. Hidroksiürenin sekonder kanser geliştirme riski konusunda çok sayıda yayın bulunmaktadır. Bunlardan en önemlisi Kıssova ve arkadaşlarının yapmış çalışmadır. Kıssova bu çalışmada 172 Ph (-) MPN hastasında sekonder kanser gelişimini araştırmış; hidroksiürea kullanan 66 hastanın 13'ünde (19,7), hidroksiürea kullanmayıp başka sitordüktif tedavi kullanan 2 hastaya göre %2 (166 ) daha yüksek oranda sekonder kanser gelişmiştir. Bu kanserlerin çoğunu cilt kanserleri (özellikle squamoz hücreli kanser) oluşturmuştur(90). Bizim hasta grubumuzda ise hematolojik olmayan kanser saptanan

hastaların 7'sinde MPN tanısından önce malignite öyküsü mevcuttur (1 inde sarkom, 1'inde mesane kanseri ve renal hücreli kanser, 1'inde bazal hücreli kanser, 1'de kolon kanseri, 3'ünde meme kanseri). Beş hastada önce MPN tanısıyla hidroksiürea kullanımı ve takipte hematolojik olmayan kanser tanısı mevcuttur İki hasta MPN tanısı aldıktan sonra hidroksiürea veya bir başka sitoredüktif ilaç/IFN kullanmadığı halde sekonder kanser geliştirmiştir. Bu bulgular hematolojik olmayan kanser saptanan hastalarımızda hidroksiürea dışında başka faktörlerin de etkili olabileceğini düşündürmektedir. Bu konu ile ilgili daha fazla hasta içeren hasta gruplarıyla çalışmaya devam edilmesi planlanmıştır.

## 6. SONUÇLAR

Bu çalışmada Ph (-) MPN'da ASXL1 gen mutasyonları taranmıştır. Sonuç olarak;

1. ASXL1 gen mutasyonları ET hastalarının %6,25'inde (3/48), PV hastalarının %4,35'inde (2/46) ve PMF hastalarının %11,11'inde (1/9) saptanmıştır.
2. ASXL1 gen mutasyonları olanlarda kadın-erkek oranı eşit bulunmuştur.
3. ASXL1 gen mutasyonları olanlarda olmayanlara kıyasla yaş ortalaması daha yüksek bulunmuştur.
4. ASXL1 gen mutasyonları olanlarda olmayanlara kıyasla ortalama başlangıç hemoglobin ve trombosit değerleri yüksek iken, ortalama başlangıç lökosit ve nötrofil değerleri daha düşük saptanmıştır.
5. ASXL1 gen mutasyonları olanlarda olmayanlara kıyasla splenomegali oranları daha düşüktür.
6. ASXL1 geninin en sık mutasyonları olan c.1934dupG (p.g646TrpfsX12) (4/6) ve c.1954G.a (p.G652S) (2/6) mutasyonları yüksek oranda tespit edilmiştir.
7. ASXL1 gen mutasyonları bulunan grupta tromboz (özellikle arter trombozu) oranlarının daha yüksek olduğu anlaşılmaktadır.

8. MPN grubumuzda hematolojik olmayan kanser oranları (solid tümör) oldukça yüksek bulunmuştur (%14,5). Hastaların % 80'inde JAK-2 V617F mutasyonu mevcuttur. JAK-2 V617F pozitif hastaların 2 tanesinde de ayrıca ASXL1 gen mutasyonları bulunmuştur. Her iki hastada da ASXL1 c.1954G.a (p.G652S) mutasyonu olması dikkat çekici bulunmuştur.
9. Kohortumuzda beş hastada önce MPN tanısıyla hidroksiürea kullanımı ve takibinde hematolojik olmayan kanser tanısı bulunması hidroksiürea kullanımının hematolojik olmayan kanser gelişimine sebep olabileceğini düşündürmektedir. Yine kohortumuzda iki hastada ise MPN tanısı aldıktan sonra hidroksiürea kullanmadığı halde hematolojik olmayan kanser gelişmiştir. Bu durum hidroksiürea dışında başka faktörlerin de hematolojik olmayan kanser gelişiminde etkili olabileceğini düşündürmektedir.

## **7. KAYNAKLAR**

1. Vainchenker W, Delhommeau F, Constantinescu SN, Bernard OA. New mutations and pathogenesis of myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2011;118(7):1723-35.
2. Dameshek W. Some speculations on the myeloproliferative syndromes. *Blood*. 1951;6(4):372-5.
3. Tefferi A, Thiele J, Orazi A, Kvasnicka HM, Barbui T, Hanson CA, 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(4):1092-7.
4. de Klein A, van Kessel AG, Grosveld G, Bartram CR, Hagemeijer A, Bootsma D. A cellular oncogene is translocated to the Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia. *THE ROLE OF THE PHILADELPHIA TRANSLOCATION IN CHRONIC MYELOID LEUKEMIA*. 1982:107.

5. Lugo TG, Pendergast A-M, Muller AJ, Witte ON. Tyrosine kinase activity and transformation potency of bcr-abl oncogene products. *Science*. 1990;247(4946):1079-82.
6. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*. 2009;114(5):937-51.
7. Ungureanu D, Wu J, Pekkala T, Niranjana Y, Young C, Jensen ON, et al. The pseudokinase domain of JAK2 is a dual-specificity protein kinase that negatively regulates cytokine signaling. *Nature structural & molecular biology*. 2011;18(9):971-6.
8. Holmfeldt L, Mullighan CG. The role of TET2 in hematologic neoplasms. *Cancer cell*. 2011;20(1):1-2.
9. Lasho TL, Pardanani A, Tefferi A. LNK mutations in JAK2 mutation–negative erythrocytosis. *New England Journal of Medicine*. 2010;363(12):1189-90.
10. Tefferi A. Mutations galore in myeloproliferative neoplasms: Would the real Spartacus please stand up? *Leukemia*. 2011;25(7):1059-63.
11. Landgren O, Goldin LR, Kristinsson SY, Helgadóttir EA, Samuelsson J, Björkholm M. Increased risks of polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myelofibrosis among 24 577 first-degree relatives of 11 039 patients with myeloproliferative neoplasms in Sweden. *Blood*. 2008;112(6):2199-204.
12. James C, Ugo V, Le Couédic J-P, Staerk J, Delhommeau F, Lacout C, et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature*. 2005;434(7037):1144-8.
13. Passamonti F, Rumi E, Pietra D, Della Porta MG, Boveri E, Pascutto C, et al. Relation between JAK2 (V617F) mutation status, granulocyte activation, and constitutive mobilization of CD34+ cells into peripheral blood in myeloproliferative disorders. *Blood*. 2006;107(9):3676-82.
14. Vannucchi A, Antonioli E, Guglielmelli P, Longo G, Pancrazzi A, Ponziani V, et al. Prospective identification of high-risk polycythemia vera patients based on JAK2V617F allele burden. *Leukemia*. 2007;21(9):1952-9.

15. Antonioli E, Guglielmelli P, Pancrazzi A, Bogani C, Verrucci M, Ponziani V, et al. Clinical implications of the JAK2 V617F mutation in essential thrombocythemia. *Leukemia*. 2005;19(10):1847-9.
16. Tefferi A, Pardanani A. Mutation screening for JAK2 V617F: when to order the test and how to interpret the results. *Leukemia research*. 2006;30(6):739-44.
17. Tefferi A, Vardiman J. Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: the 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms. *Leukemia*. 2008;22(1):14-22.
18. McMullin MF, Bareford D, Campbell P, Green A, Harrison C, Hunt B, et al. Guidelines for the diagnosis, investigation and management of polycythaemia/erythrocytosis. *British journal of haematology*. 2005;130(2):174-95.
19. Gangat N, Strand JJ, Lasho TL, Li CY, Pardanani A, Tefferi A. Pruritus in polycythemia vera is associated with a lower risk of arterial thrombosis. *American journal of hematology*. 2008;83(6):451-3.
20. Abdel-Naser M, Gollnick H, Orfanos C. Aquagenic pruritus as a presenting symptom of polycythemia vera. *Dermatology*. 1993;187(2):130-3.
21. Passamonti F, Rumi E, Pietra D, Elena C, Boveri E, Arcaini L, et al. A prospective study of 338 patients with polycythemia vera: the impact of JAK2 (V617F) allele burden and leukocytosis on fibrotic or leukemic disease transformation and vascular complications. *Leukemia*. 2010;24(9):1574-9.
22. Michiels JJ, editor *Erythromelalgia and vascular complications in polycythemia vera*. *Seminars in thrombosis and hemostasis*; 1996.
23. Falanga A, Marchetti M, Evangelista V, Vignoli A, Licini M, Balicco M, et al. Polymorphonuclear leukocyte activation and hemostasis in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Blood*. 2000;96(13):4261-6.
24. Vianello F, Battisti A, Cella G, Marchetti M, Falanga A. Defining the thrombotic risk in patients with myeloproliferative neoplasms. *The Scientific World Journal*. 2011;11:1131-7.
25. Prchal J, Beutler E. *Primary and secondary polycythemias (erythrocytosis)*. *Williams hematology* New York: McGraw-Hill Medical. 2005:779-803.

26. Landolfi R, Di Gennaro L, Barbui T, De Stefano V, Finazzi G, Marfisi R, et al. Leukocytosis as a major thrombotic risk factor in patients with polycythemia vera. *Blood*. 2007;109(6):2446-52.
27. Mossuz P, Girodon F, Donnard M, Latger-Cannard V, Dobo I, Boiret N, et al. Diagnostic value of serum erythropoietin level in patients with absolute erythrocytosis. *haematologica*. 2004;89(10):1194-8.
28. Tefferi A, Sirhan S, Lasho TL, Schwager SM, Li CY, Dingli D, et al. Concomitant neutrophil JAK2V617F mutation screening and PRV-1 expression analysis in myeloproliferative disorders and secondary polycythaemia. *British journal of haematology*. 2005;131(2):166-71.
29. Abdulkarim K, Ridell B, Johansson P, Kutti J, Safai-Kutti S, Andréasson B. The impact of peripheral blood values and bone marrow findings on prognosis for patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. *European journal of haematology*. 2011;86(2):148-55.
30. Vaidya R, Gangat N, Jimma T, Finke CM, Lasho TL, Pardanani A, et al. Plasma cytokines in polycythemia vera: phenotypic correlates, prognostic relevance, and comparison with myelofibrosis. *American journal of hematology*. 2012;87(11):1003-5.
31. Thiele J, Kvasnicka H. Diagnosis of polycythemia vera based on bone marrow pathology. *Current hematology reports*. 2005;4(3):218-23.
32. Prchal J, Adamson J, Murphy S, Steinmann L, Fialkow P. Polycythemia vera. The in vitro response of normal and abnormal stem cell lines to erythropoietin. *Journal of Clinical Investigation*. 1978;61(4):1044.
33. Tefferi A, Guglielmelli P, Larson DR, Finke C, Wassie EA, Pieri L, et al. Long-term survival and blast transformation in molecularly annotated essential thrombocythemia, polycythemia vera, and myelofibrosis. *Blood*. 2014;124(16):2507.
34. Tefferi A, Barbui T. Polycythemia vera and essential thrombocythemia: 2015 update on diagnosis, risk-stratification and management. *American journal of hematology*. 2015;90(2):162-73.
35. Beutler E. Polycythemia. *Williams Haematology 6th ed* New York: Mc GrawHill. 2001:689-701.

36. Turan C. Esansiyel Trombositemi Ve Primer Miyelofibroz Olgularında TET2 Mutasyonu. 2012.
37. El-Kassar N, Hetet G, Briere J, Grandchamp B. Clonality analysis of hematopoiesis and thrombopoietin levels in patients with essential thrombocythemia. *Leukemia & lymphoma*. 1998;30(1-2):181-8.
38. Tefferi A, Fonseca R, Pereira DL, Hoagland HC, editors. A long-term retrospective study of young women with essential thrombocythemia. *Mayo Clinic Proceedings*; 2001: Elsevier.
39. Policitemia GIS. Polycythemia vera: the natural history of 1213 patients followed for 20 years. *Annals of Internal Medicine*. 1995;123(9):656-64.
40. Elliott MA, Tefferi A, editors. Interferon-alpha therapy in polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Seminars in thrombosis and hemostasis*; 1996.
41. Schafer A. Essential thrombocythemia and thrombocytosis. *Williams Hematology*, New York: McGraw-Hill. 2006:1785-94.
42. Finazzi G, Budde U, Michiels JJ. Bleeding time and platelet function in essential thrombocythemia and other myeloproliferative syndromes. *Leukemia & lymphoma*. 1996;22(S1):71-8.
43. Wolanskyj AP, Lasho TL, Schwager SM, McClure RF, Wadleigh M, Lee SJ, et al. JAK2V617F mutation in essential thrombocythaemia: clinical associations and long-term prognostic relevance. *British journal of haematology*. 2005;131(2):208-13.
44. Rumi E, Pietra D, Ferretti V, Klampfl T, Harutyunyan AS, Milosevic JD, et al. JAK2 or CALR mutation status defines subtypes of essential thrombocythemia with substantially different clinical course and outcomes. *Blood*. 2014;123(10):1544-51.
45. Barbui T, Thiele J, Passamonti F, Rumi E, Boveri E, Ruggeri M, et al., editors. Survival and risk of leukemic transformation in essential thrombocythemia are significantly influenced by accurate morphologic diagnosis: an international study on 1,104 patients. *ASH Annual Meeting Abstracts*; 2010.
46. Visani G, Finelli C, Castelli U, Petti M, Ricci P, Vianelli N, et al. Myelofibrosis with myeloid metaplasia: clinical and haematological parameters predicting survival in a series of 133 patients. *British journal of haematology*. 1990;75(1):4-9.

47. Finazzi G, Rambaldi A, Guerini V, Carobbo A, Barbui T. Risk of thrombosis in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera according to JAK2 V617F mutation status. *Haematologica*. 2007;92(1):135-6.
48. Tefferi A. Myelofibrosis with myeloid metaplasia. *New England Journal of Medicine*. 2000;342(17):1255-65.
49. Pardanani AD, Levine RL, Lasho T, Pikman Y, Mesa RA, Wadleigh M, et al. MPL515 mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: a study of 1182 patients. *Blood*. 2006;108(10):3472-6.
50. Dingli D, Grand FH, Mahaffey V, Spurbeck J, Ross FM, Watmore AE, et al. Der (6) t (1; 6)(q21-23; p21. 3): a specific cytogenetic abnormality in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *British journal of haematology*. 2005;130(2):229-32.
51. Tefferi A, Abdel-Wahab O, Cervantes F, Crispino J, Finazzi G, Girodon F, et al. Mutations with epigenetic effects in myeloproliferative neoplasms and recent progress in treatment: Proceedings from the 5th International Post-ASH Symposium. *Blood cancer journal*. 2011;1(3):e7.
52. Tefferi A. Primary myelofibrosis: 2014 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *American journal of hematology*. 2014;89(9):915-25.
53. Brecqueville M, Rey J, Bertucci F, Coppin E, Finetti P, Carbuccia N, et al. Mutation analysis of ASXL1, CBL, DNMT3A, IDH1, IDH2, JAK2, MPL, NF1, SF3B1, SUZ12, and TET2 in myeloproliferative neoplasms. *Genes, Chromosomes and Cancer*. 2012;51(8):743-55.
54. Tefferi A, Jimma T, Gangat N, Vaidya R, Begna KH, Hanson CA, et al. Predictors of greater than 80% 2-year mortality in primary myelofibrosis: a Mayo Clinic study of 884 karyotypically annotated patients. *Blood*. 2011;118(17):4595-8.
55. Ciurea SO, Merchant D, Mahmud N, Ishii T, Zhao Y, Hu W, et al. Pivotal contributions of megakaryocytes to the biology of idiopathic myelofibrosis. *Blood*. 2007;110(3):986-93.
56. Tefferi A. Pathogenesis of myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Journal of Clinical Oncology*. 2005;23(33):8520-30.



57. Smith RE, Chelmoski MK, Szabo EJ. Myelofibrosis: a review of clinical and pathologic features and treatment. *Critical reviews in oncology/hematology*. 1990;10(4):305-14.
58. Bartlett RP, Greipp PR, Tefferi A, Cupps RE, Mullan BP, Trastek VF, editors. Extramedullary hematopoiesis manifesting as a symptomatic pleural effusion. *Mayo Clinic Proceedings*; 1995: Elsevier.
59. Thiele J, Kvasnicka HM, editors. Hematopathologic findings in chronic idiopathic myelofibrosis. *Seminars in oncology*; 2005: Elsevier.
60. Cervantes F, Dupriez B, Pereira A, Passamonti F, Reilly JT, Morra E, et al. New prognostic scoring system for primary myelofibrosis based on a study of the International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment. *Blood*. 2009;113(13):2895-901.
61. Passamonti F, Rumi E, Elena C. Incidence of leukaemia in patients with primary myelofibrosis and RBC-transfusion-dependence [published online ahead of print June 15, 2010]. *Br J Haematol*.
62. Gangat N, Caramazza D, Vaidya R, George G, Begna K, Schwager S, et al. DIPSS plus: a refined Dynamic International Prognostic Scoring System for primary myelofibrosis that incorporates prognostic information from karyotype, platelet count, and transfusion status. *Journal of Clinical Oncology*. 2011;29(4):392-7.
63. Eriksson A, Lennartsson A, Lehmann S. Epigenetic aberrations in acute myeloid leukemia: early key events during leukemogenesis. *Experimental hematology*. 2015;43(8):609-24.
64. Kisseleva T, Bhattacharya S, Braunstein J, Schindler C. Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges. *Gene*. 2002;285(1):1-24.
65. Rodig SJ, Meraz MA, White JM, Lampe PA, Riley JK, Arthur CD, et al. Disruption of the Jak1 gene demonstrates obligatory and nonredundant roles of the Jaks in cytokine-induced biologic responses. *Cell*. 1998;93(3):373-83.
66. Wilks AF. Two putative protein-tyrosine kinases identified by application of the polymerase chain reaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1989;86(5):1603-7.

67. Skoda RC, Duek A, Grisouard J. Pathogenesis of myeloproliferative neoplasms. *Experimental hematology*. 2015;43(8):599-608.
68. Pietra D, Li S, Brisci A, Passamonti F, Rumi E, Theoharides A, et al. Somatic mutations of JAK2 exon 12 in patients with JAK2 (V617F)-negative myeloproliferative disorders. *Blood*. 2008;111(3):1686-9.
69. Passamonti F, Elena C, Schnittger S, Skoda RC, Green AR, Girodon F, et al. Molecular and clinical features of the myeloproliferative neoplasm associated with JAK2 exon 12 mutations. *Blood*. 2011;117(10):2813-6.
70. Colaizzo D, Amitrano L, Tiscia GL, Grandone E, Guardascione MA, Margaglione M. A new JAK2 gene mutation in patients with polycythemia vera and splanchnic vein thrombosis. *Blood*. 2007;110(7):2768-.
71. Pikman Y, Lee BH, Mercher T, McDowell E, Ebert BL, Gozo M, et al. MPLW515L is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *PLoS Med*. 2006;3(7):e270.
72. Vannucchi AM, Antonioli E, Guglielmelli P, Pancrazzi A, Guerini V, Barosi G, et al. Characteristics and clinical correlates of MPL 515W> L/K mutation in essential thrombocythemia. *Blood*. 2008;112(3):844-7.
73. Beer PA, Campbell PJ, Scott LM, Bench AJ, Erber WN, Bareford D, et al. MPL mutations in myeloproliferative disorders: analysis of the PT-1 cohort. *Blood*. 2008;112(1):141-9.
74. Klampfl T, Gisslinger H, Harutyunyan AS, Nivarthi H, Rumi E, Milosevic JD, et al. Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. *New England Journal of Medicine*. 2013;369(25):2379-90.
75. Shivarov V, Ivanova M, Tiu R. Mutated calreticulin retains structurally disordered C terminus that cannot bind Ca<sup>2+</sup>; some mechanistic and therapeutic implications. *Blood cancer journal*. 2014;4(2):e185.
76. Fisher C, Lee I, Bloyer S, Bozza S, Chevalier J, Dahl A, et al. Additional sex combs-like 1 belongs to the enhancer of trithorax and polycomb group and genetically interacts with Cbx2 in mice. *Developmental biology*. 2010;337(1):9-15.

77. Scheuermann JC, de Ayala Alonso AG, Oktaba K, Ly-Hartig N, McGinty RK, Fraterman S, et al. Histone H2A deubiquitinase activity of the Polycomb repressive complex PR-DUB. *Nature*. 2010;465(7295):243-7.
78. Sauvageau M, Sauvageau G. Polycomb group proteins: multi-faceted regulators of somatic stem cells and cancer. *Cell stem cell*. 2010;7(3):299-313.
79. Gelsi-Boyer V, Brecqueville M, Devillier R, Murati A, Mozziconacci M-J, Birnbaum D. Mutations in ASXL1 are associated with poor prognosis across the spectrum of malignant myeloid diseases. *J Hematol Oncol*. 2012;5(1):12.
80. Abdel-Wahab O, Tefferi A, Levine RL. Role of TET2 and ASXL1 mutations in the pathogenesis of myeloproliferative neoplasms. *Hematology/oncology clinics of North America*. 2012;26(5):1053-64.
81. Yonal-Hindilerden I, Daglar-Aday A, Akadam-Teker B, Yilmaz C, Nalcaci M, Yavuz AS, et al. Prognostic significance of ASXL1, JAK2V617F mutations and JAK2V617F allele burden in Philadelphia-negative myeloproliferative neoplasms. *Journal of blood medicine*. 2015;6:157.
82. Carbuccia N, Murati A, Trouplin V, Brecqueville M, Adelaide J, Rey J, et al. Mutations of ASXL1 gene in myeloproliferative neoplasms. *Leukemia*. 2009;23(11):2183-6.
83. Abdel-Wahab O, Pardanani A, Patel J, Wadleigh M, Lasho T, Heguy A, et al. Concomitant analysis of EZH2 and ASXL1 mutations in myelofibrosis, chronic myelomonocytic leukemia and blast-phase myeloproliferative neoplasms. *Leukemia*. 2011;25(7):1200-2.
84. Stein BL, Williams DM, O'Keefe C, Rogers O, Ingersoll RG, Spivak JL, et al. Disruption of the ASXL1 gene is frequent in primary, post-essential thrombocytosis and post-polycythemia vera myelofibrosis, but not essential thrombocytosis or polycythemia vera: analysis of molecular genetics and clinical phenotypes. *Haematologica*. 2011;96(10):1462-9.
85. Gelsi-Boyer V, Trouplin V, Adélaïde J, Bonansea J, Cervera N, Carbuccia N, et al. Mutations of polycomb-associated gene ASXL1 in myelodysplastic syndromes and chronic myelomonocytic leukaemia. *British journal of haematology*. 2009;145(6):788-800.
86. Vannucchi AM, Lasho TL, Guglielmelli P, Biamonte F, Pardanani A, Pereira A, et al. Mutations and prognosis in primary myelofibrosis. *Leukemia*. 2013;27(9):1861-9.

87. Carbuccia N, Trouplin V, Gelsi-Boyer V, Murati A, Rocquain J, Adélaïde J, et al. Mutual exclusion of ASXL1 and NPM1 mutations in a series of acute myeloid leukemias. *Leukemia*. 2010;24(2):469-73.
88. Boulwood J, Perry J, Pellagatti A, Fernandez-Mercado M, Fernandez-Santamaria C, Calasanz M, et al. Frequent mutation of the polycomb-associated gene ASXL1 in the myelodysplastic syndromes and in acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2010;24(5):1062.
89. Lee IO, Kim JH, Choi YJ, Pillinger MH, Kim S-Y, Blaser MJ, et al. Helicobacter pylori CagA phosphorylation status determines the gp130-activated SHP2/ERK and JAK/STAT signal transduction pathways in gastric epithelial cells. *Journal of Biological Chemistry*. 2010;285(21):16042-50.
90. KISSOVA, Jarmila, et al. Second Malignancies in Philadelphia-negative Myeloproliferative Neoplasms—Single-center Experience. *Anticancer research*, 2014, 34.5: 2489-2496

## 8.EKLER

### 8.1 EK 1 ETİK KURUL



T. C.  
İSTANBUL BİLİM ÜNİVERSİTESİ  
KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU


Sayı : 44140529 / 2015-30  
Konu : Tez çalışması

27.02.2015

Sayın Prof. Dr. Reyhan DİZ KÜÇÜKKAYA  
Hematoloji Bilim Dalı Başkanı

Aşağıda belirtilen çalışmamız 17.02.2015 tarihli Üniversitemiz Klinik Araştırmaları Etik Kurulu toplantısında incelenmiş, çalışmanın yapılmasında etik ve bilimsel açıdan bir sakınca olmadığına oy birliği ile karar verilmiştir. Kurul kararı ilişikte sunulmuştur.

Gereğini bilgilerinize saygılarımla rica ederim.

  
Prof. Dr. Numan ERMUTLU  
Klinik Araştırmalar Etik Kurul Başkan Yardımcısı

**Çalışmanın Adı:** “Myeloproliferatif Neoplazilerde ASXL-1 Mutasyonlarının Klinik Seyir ve Prognosa Etkisi” başlıklı tez çalışması.

**Sorumlu Araştırmacı:** Prof. Dr. Reyhan DİZ KÜÇÜKKAYA, İstanbul Bilim Üniversitesi Tıp Fakültesi Dahili Tıp Bilimleri Bölümü İç Hastalıkları Anabilim Dalı Hematoloji Bilim Dalı Başkanı

**Diğer Araştırmacılar :** Uzm. Öğr. Dr. Neslihan DEMİRÇİLER, İstanbul Bilim Üniversitesi Tıp Fakültesi Dahili Tıp Bilimleri Bölümü İç Hastalıkları Anabilim Dalı

**Proje İle İlgili Temas Kurulacak Kişi:** Prof. Dr. Reyhan DİZ KÜÇÜKKAYA, İstanbul Bilim Üniversitesi Tıp Fakültesi Dahili Tıp Bilimleri Bölümü İç Hastalıkları Anabilim Dalı Hematoloji Bilim Dalı Başkanı

**Merkez sayısı:** Tek merkez

## 8.2 EK 2 ETİK KURUL



T. C.  
İSTANBUL BİLİM ÜNİVERSİTESİ  
KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU

İstanbul Bilim Üniversitesi Klinik Araştırmaları Etik Kurulu

Karar No : 17.02.2015/28-207

**Çalışmanın Adı:** "Myeloproliferatif Neoplazilerde ASXL-1 Mutasyonlarının Klinik Seyir ve Prognoza Etkisi" başlıklı tez çalışması.

**Sorumlu Araştırmacı:** Prof. Dr. Reyhan DİZ KÜÇÜKKAYA, İstanbul Bilim Üniversitesi Tıp Fakültesi Dahili Tıp Bilimleri Bölümü İç Hastalıkları Anabilim Dalı Hematoloji Bilim Dalı Başkanı

Başkan Yardımcısı  
Prof. Dr. Numan ERMUTLU

Raportör  
Doç. Dr. Berrin TELATAR

Üye  
Prof. Dr. Ali Seyfi Yalın YALÇIN

Üye  
Doç. Dr. Demet AKIN

Üye  
Ecz. Pınar DEMİR ÖZKER

Üye  
Prof. Dr. Tufan PAKER

Üye  
Prof. Dr. Işın BARAL KULAKSIZOĞLU

Üye  
Av. Özlem ÖZTÜRK

Üye  
Yard. Doç. Dr. Suzan BOZKURT

Üye  
Cafer KILIÇ

## 9. ÖZGEÇMİŞ

<b>Adı-Soyadı</b>	: Neslihan Demirçiler Uslu
<b>Doğum Tarihi ve Yeri</b>	: 11.01.1985-Mersin
<b>Medeni Durumu</b>	: Evli
<b>Adres</b>	:Acıbadem mahallesi Yurtseven sokak Alsancak Sit. E blok D:9 Üsküdar /İSTANBUL
<b>Telefon</b>	: 05327947109
<b>e-mail</b>	: neslihan.uslu@hotmail.com
<b>Mezun Olduğu Tıp Fakiltesi</b>	: Erciyes Üniversitesi
<b>Görev Yerleri</b>	: İstanbul Bilim Üniversitesi Tıp Fakültesi
<b>Yabancı Diller</b>	: İngilizce