

T.C

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**ESANSİYEL TROMBOSİTOZ VE PRİMER
MYELOFİBROZİSLİ HASTALARDA KALRETİKÜLİN VE
JAK-2 MUTASYONU ARAŞTIRILMASI**

**UZMANLIK TEZİ
DR. SERVİHAN ÜNAL**

**TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. A.MÜNCİ YAĞCI**

**ANKARA
Kasım 2016**

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca ilgi ve desteklerini her zaman gördüğüm, bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan saygıdeğer hocam Prof. Dr. Musa Bali başta olmak üzere tüm öğretim üyesi hocalarıma teşekkür ediyorum.

Tez çalışmam boyunca gösterdiği desteklerinden dolayı tez danışmanım Prof. Dr. Münci Yağcı hocama teşekkürlerimi sunuyorum.

Tez çalışmam için geçirdiğim veri toplama ve çalışma sürecinde benimle birlikte yorulan ve desteklerini esirgemeyen uzman biyolog Dr. Handan Kayhan ve Sanem Gökçen'e yardımlarından dolayı teşekkür ediyorum.

Birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum tüm asistan arkadaşlarıma, bugüne kadar verdiğim her kararda ve her zorlukta arkamda olan her zaman güvendiğim ve güveneceğim aileme teşekkür ediyorum.

Dr. Servihan ÜNAL

ANKARA 2016

ÖZET

Bu çalışmada temel olarak ET ve Primer Myelofibrozisli hastalarda JAK-2 ve kalretikülin mutasyon sıklığının araştırılması, JAK2 ve kalretikülin mutasyonu olan ve her ikisinin mutasyonun olmadığı grupların verilerinin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Araştırma grubu Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Hematoloji Kliniği'nde izlenen 80 MPH'li hastadan oluşmaktadır. Araştırmada SPSS 20 istatistik programı kullanılmış,dağılım analizinden sonra parametrik ve/veya parametrik olmayan test yöntemleri uygulanmıştır.

Çalışmaya alınan 80 olgunun % 66,2'sı ET hastası %33,8'i MF hastasıdır. Hastaların %60 'ında JAK2 mutasyonu, %22,5'inde kalretikülin mutasyonu saptanmıştır. ET tanılı hastaların %60,4'ünde, MF'li hastaların %59,3'ünde JAK2 mutasyonu saptanmıştır. JAK2 negatif olan ET tanılı hastalarının 11'inde (%52,38) 'inde, MF tanılı hastaların 7'sinde (%63,63) kalretikülin pozitif olarak saptanmıştır. Hastalar yaşayan hastalardan seçilmiştir Literatürde yer alan çalışmalarda myelofibrozisli hastalarda kalretikülin mutasyon görülme sıklığının %28-%80 aralığında olduğu ve mutasyon çoğunlukla ET hastalarında görülmüştür. Araştırmamız sonucunda kalretikülin mutasyonu pozitif olan hastaların laboratuvar bulgularının literatür ile benzer nitelikte olduğu, kadın hastalarda ve ET hastalarında daha fazla görüldüğü sonucuna ulaşılmıştır.

Anahtar kelimeler; Myelofibrozis, esansiyel trombositoz, JAK2, kalretikülin

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER.....	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	v
TABLolar DİZİNİ	vi
KISALTMALAR	vii
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2.GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Myeloproliferatif Hastalıklar.....	3
2.2. MYELOFİBROZİS	8
2.2.1. Myelofibrosis Epidemiyolojisi	8
2.2.2. Myelofibrosis Patogenezi	8
2.2.3. Myelofibrosis Tanısı ve Laboratuvar Bulguları.....	11
2.2.4. Myelofibrosis Tanı Kriterleri.....	15
2.2.5. Myelofibrosis Prognozu ve Tedavisi	16
2.3. ESANSİYEL TROMBOSİTOZ	19
2.3.1. Esansiyel Trombositoz Epidemiyolojisi	20
2.3.2. Esansiyel Trombositoz Tanı ve Laboratuvar Bulguları	20
2.3.3. Esansiyel Trombositoz Tanı Ölçütleri	23
2.4. JAK2 MUTASYONU	24
2.4.1. JAK2 Mutasyon Tanımı.....	24
2.4.2. JAK2'nin Karakteristik Özellikleri	25
2.4.3. JAK2 Mutasyonlarının Myeloproliferatif Hastalıklardaki Rolü ve Prognosta etkisi	27
2.5. KALRETİKÜLİN MUTASYONU	33
2.5.1. Kalretikülin Mutasyonu Tanımı.....	33
2.5.2. Kalretikülin Mutasyonun Myeloproliferatif Hastalıklardaki Rolü Ve Prognosta Etkisi	36
2.5.3. Kalretikülin Mutasyonunun Esansiyel Trombositoz Ve Myelofibrosisle İlişkisi.....	37
3.MATERYAL VE YÖNTEM	39
3.1. Araştırmanın Amacı.....	39

3.2. Örneklem	39
3.3.Yöntem	39
3.4. Verilerin Analizi	40
4. BULGULAR	41
TARTIŞMA.....	56
SONUÇ	64
KAYNAKLAR.....	67



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. JAK2 homoloji alanlarının şematik gösterimi [100, 101].....	25
Şekil 2. JAK2 STAT sinyal iletimi [103].....	26
Şekil 3. Sitokinlerin hücre içi sinyal iletim yolu ile STAT ve JAK ilişkisi [104, 105].....	26
Şekil 4. Kronik myeloproliferatif hastalık patogenezinde JAK2 mutasyonu ve etkisi [11].....	28
Şekil 5. JAK2 geninde V617F mutasyonu ve klinik yansıması olan diğer genetik kusurlar [100, 111]	28
Şekil 6. MPH'in moleküler patogenezi ve sınıflandırılmasının şekilsel görünümü [113, 100]	29
Şekil 7. Yaş ile Tanı Arasındaki İlişki	42
Şekil 8. ET ve MF'de hastaların yaşlarının karşılaştırması.....	42
Şekil 9. Kalretikülin Sıklığı.....	48
Şekil 10. Pozitif kalretikülin mutasyonu tipleri sıklığı.....	52
Şekil 11. JAK2 negatif olan ET ve MF hastalarında kalretikülin sıklığı	52

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Hastalarda klinik muayene bulguları [47, 48].....	12
Tablo 2. Kemik iliği fibrozisi görülebilen hastalıklar [47]	13
Tablo 3. Uluslararası Prognostik Skorlama Sistemi (IPSS) [50]	16
Tablo 4. 'IPSS', 'DIPSS' ve 'DIPSS-plus' skorlamasına göre PMF'deki ortalama yaşam süreleri [60, 61]	19
Tablo 5. ET için risk faktörleri [93]	24
Tablo 6. Olguların cinsiyetlerine göre dağılımı ve yaş ortalamaları	41
Tablo 7. Hastalık tanısına göre JAK2 mutasyonu dağılımı.....	42
Tablo 8. JAK2 mutasyonlu olguların cinsiyetlerine göre dağılımı ve yaş ortalamaları.....	43
Tablo 9. ET ve MF hastalarının JAK2 mutasyon durumuna göre laboratuvar bulgularının karşılaştırması	44
Tablo 10. ET'li hastaların JAK2 mutasyon durumuna göre laboratuvar bulgularının karşılaştırması	45
Tablo 11. MF hastalarının JAK2 mutasyon durumuna göre laboratuvar bulgularının karşılaştırması	46
Tablo 12. Kalretikülin mutasyon sıklığı.....	47
Tablo 13. Kalretikülin mutasyonu ile cinsiyet karşılaştırması	48
Tablo 14. Kalretikülin mutasyonu olan ve olmayan hastaların yaşa göre karşılaştırması.....	49
Tablo 15. JAK2 ve CALR mutasyonu olan ve olmayan hastaların laboratuvar bulguları.....	49
Tablo 16. JAK2 ve CALR mutasyonu olan ve olmayan hastaların klinik bulguları	50
Tablo 17. Kalretikülin mutasyonu tipleri sıklığı	51
Tablo 18. JAK2 negatif olan ET ve MF hastalarında kalretikülin sıklığı	53
Tablo 19. ET ve MF hastalarında kalretikülin mutasyonu sıklığı.....	54

KISALTMALAR

AMI	: Akut myokard infarktüsü
AML	: Akut myeloid lösemi
ALL	: Akut lenfoid lösemi
Hb	: Hemoglobin
CALR	: Kalretikülin
DIPSS	: Dinamik Uluslararası Prognostik Skorlama Sistemi
DVT	: Derin ven trombozu
ER	: Endoplazmik retikulum
EPO	: Eritropoetin
ET	: Esansiyel trombositemi
JAK2	: Janus Kinaz 2
İMF	: İdiyopatik myelofibroz
IPSS	: Uluslararası Prognostik Skorlama Sistemi
ISVO	: İskemik serebrovasküler olay
KMH	: Kronik myeloproliferatif hastalıklar
KML	: Kronik myeloid lösemi
MDS	: Myelodisplastik sendrom
MPH	: Myeloproliferatif hastalıklar
MPN	: Myeloproliferatif neoplazm
MP	: Myeloproliferatif
PAH	: Periferik arter hastalığı
PMF	: Primer myelofibrozis
PV	: Polisitemia vera
PVT	: Portal ven trombozu
SLE	: Sistemik lupus eritematozus
TPO	: Trombopoetin
Tyk2	: Tirozin kinaz 2
vWH	: von Willebrand hastalığı
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Myeloproliferatif hastalıklar (MPH) bir ya da daha fazla myeloeritroid hücrenin kemik iliğindeki kontrolsüz proliferasyonu, periferik kanda matür ve immatür hücrelerin sayısının artmasıyla hemostaz ve tromboz anomalileri görülen ve akut lösemiye ilerleme gösterebilen klonal hastalıklardır. Myeloproliferatif sendromlardan biri olan esansiyel trombositoz (ET), primitif multipotansiyel hematopoetik hücreden köken alan, reaktif bir neden veya kronik myeloid lösemi (KML), polisitemia vera (PV), primer myelofibrozis (PMF), myelodisplastik sendrom (MDS) gibi tanımlanmış kronik myeloid bir hastalık olmaksızın trombosit sayısında artış ile karakterize klonal bir hastalıktır. Yıllık insidansı 100.000’de 0.2 ile 2.5 arasında tahmin edilmekle beraber ortalama tanı yaşı 55’dir [1].

JAK2 mutasyonunun keşfinden sonra MPH’ların sınıflaması ve tanı kriterleri değişmiş, tedavi algoritmaları yeniden şekillenmiştir. Dünya Sağlık Örgütü’nün (WHO) 2008 yılında değiştirdiği kriterlerinde PV, ET ve PMF’nin (Primer Myelofibroz) tanısında JAK2 V617F mutasyonu varlığı tanı kriterleri kapsamına alınmıştır. JAK2 mutasyonu ile hastalığın şiddeti arasında ilişki olduğu ortaya konulmuştur [2].

Son yıllarda yapılan araştırmalar ile kalretikülin mutasyonu keşfedilmiştir. Kalretikülin hücre çoğalmasında ve farklılaşmasında, kalsiyum dengesinde rolü olan, şaperon aktivitesi içeren endoplazmik retikulum proteinidir. Kalretikülin disfonksiyonu değişik kanserlerle ilişkilendirilmiştir. En son olarak kalretikülin mutasyonları JAK 2 negatif myeloproliferatif neoplazilerle ilişkilendirilmiştir.

Bu çalışmada, kliniğimize başvuran esansiyel trombositoz ve primer myelofibrozisi olan hastalarda JAK2 mutasyonu ve kalretik lin mutasyonunun araştırılması amaçlanmıştır.



2.GENEL BİLGİLER

2.1. Myeloproliferatif Hastalıklar

Myeloproliferatif hastalık (MPH) terimi ilk defa 1951 yılında Damashek tarafından tanımlanmıştır [4]. MPH grubunda 4 hastalık yer alır: Kronik myeloid lösemi(KML), polisitemia vera (PV), primer myelofibrozis (PMF) ve esansiyel trombositemi (ET) [11].

Yapılan araştırmalar sonucunda bu hastalıkların pluripotent kök hücreden gelişen myeloid ve lenfoid öncüllerin klonal çoğalmasıyla gerçekleştiği tespit edilmiştir [3]. Bu hastalıkların klinik ve laboratuvar bulguları birbirine benzer özellikler göstermektedir [4].

Kronik myeloid hastalıklar dismyelopoez sergileme durumlarına göre myelodisplastik sendromlar (MDS) veya myeloproliferatif hastalıklar (MPH) olarak tanımlanmaktadır [5]. Myeloproliferatif hastalıkların (MPH) hematopoietik kök hücre transformasyonu sonucu ortaya çıkan klonal hastalıklar olduğu bilinmektedir [6].

MPH'lar bir ya da daha fazla myeloeritroid hücrenin kemik iliğindeki kontrolsüz proliferasyonu; periferik kanda matür ve immatür hücrelerin sayısının artması, hemostaz ve tromboz anomalilerinin görüldüğü ve akut lösemiye ilerleme gösterebilen klonal hastalıklardır [7]. Myeloproliferatif hastalıkların temel özellikleri;

- PV'da artmış eritrosit hacmi,
- ET'de artmış trombosit sayısı
- PMF'de kemik iliği fibrozisidir [8].

Bu üç durumun da bazı ortak özellikler taşıdığı bildirilmektedir. Bu ortak özellikler: “kemik iliğinin hipersellüler” olması, “tromboz ve kanamaya eğilim” ve “lösemik transformasyon” riskidir [8].

Myeloproliferatif hastalıklar, kronik myeloproliferatif hastalıkları ve myelodisplastik veya myeloproliferatif sendromları içerir. Bunlar klonal neoplazilerdir; kemik iliği selüleritesinde artış, olgunlaşmamış hücre grupları ve organomegali ile karakterizedirler. Myeloproliferatif hastalık tanısı ve sınıflandırması için morfolojinin, klinik, hematolojik ve moleküler genetik bulgularla bağlantısının olması gerektiği bildirilmektedir [9]. Ayrıca myelodisplastik veya myeloproliferatif sendromların MPH’lerden ayrımında, myelodisplazinin tanınması gerekmektedir [10].

Myeloproliferatif hastalıklar (MPH), 2008 yılında Dünya Sağlık Örgütü tarafından ‘klasik’ veya ‘atipik’ MPH olarak da sınıflandırılmaktadır. Bu sınıflandırma şu şekilde özetlenebilir [6];

Myeloproliferatif Hastalıklar;

a.Klasik Myeloproliferatif Hastalıklar

- MPH (Ph pozitif)
 - Kronik myeloid lösemi
- MPH (Ph negatif)
 - Polisitemia vera
 - Esansiyel trombositemi
 - Primer myelofibrozis

b. Atipik Myeloproliferatif Hastalıklar

- Kronik myelomonositik lösemi
- Juvenil myelomonositik lösemi
- Kronik nötrofilik lösemi
- Kronik eozinofilik lösemi
- Hipereozinofilik sendrom
- Kronik bazofilik lösemi
- Sistemik mastositoz
- Myelodisplazi/ myeloproliferatif
- Diğer myeloproliferatif hastalık

Myeloproliferatif Hastalıkların Ortak Özellikleri [4];

I. Benzer klinik bulgular;

- Semptomsuz olmaları veya halsizlik, kanama belirtileri, splenomegali bulunması

II.Çevre kanı

- Genellikle tanı anında lökositoz ile beraber genç miyeloid hücrelerin çevre kanında görülmesi eozinofili, bazofili, trombosit sayısının normal ya da yüksek bulunabilmesi, trombosit işlev bozukluklarının olması

III. Kemik iliği

- Myeloid hiperplazili hipersellüler kemik iliği, değişen derecede myelofibrozis

IV. Dalak

- Ekstramedüller hematopoezin saptanması ve splenomegali

Kronik myeloproliferatif hastalıklar (KMH); bir veya daha fazla myeloid hücre dizisinin proliferasyonu, normal bir olgunlaşmanın varlığı, çeşitli oranlarda akut lösemiye dönüşüm ve kemik iliğinde fibrozis ile karakterize hastalıklardır. [13] [14]. KMH içinde kronik myelositer lösemi (KML), patogenezinde rol oynayan BCR/ABL füzyon gen pozitifliği ile diğerlerinden farklılık göstermektedir. BCR/ABL negatif kronik myeloproliferatif hastalıklardan PV, ET ve PMF’de birkaç farklı genetik mutasyonun etkisi olduğu bilinmektedir [13, 15, 12, 16].

PV, ET, PMF’nin ortak özelliklerinden birisi JAK2 kinazdaki edinsel V617F nokta mutasyonudur. JAK2 V617F mutasyonu, PV’li hastaların %95’inden fazlasında, PMF’li ve ET’li hastaların ise yarısında saptanmıştır. Herhangi bir MPH için özgül olmadığı gibi, yokluğu MPH olmadığı anlamına gelmez. Bu mutasyonun olmadığı az sayıdaki PV hastasında JAK2 ekzon 12 mutasyonu varlığı ile, az sayıdaki PMF ve ET hastasında MPLW515L veya W515K mutasyonu saptanmıştır [11].

Polisitemia Vera ;Eritrositoz ile eş anlamlı olarak kullanılan, kanın şekilli elemanlarının artışı ile karakterize klonal bir hematopoetik kök hücre hastalığıdır [12].PV, eritrosit hücre üretim artışına ikincil eritrosit hücre kütlelerinde artış ile karakterize klonal bir hastalıktır. PV’li hastanın toplam vücut kan hacminde artış, lökositoz, trombositoz ve splenomegali saptanır [13, 14].

Hastalığın sıklığı 100.000’de 1,9-2,6’dır [13, 14]. Erkeklerde 60-80 yaşlarında arasında sık görüldüğü bildirilmiştir [15]. PV’li hastalardan izole edilen eritroid öncülleri kültür ortamında Epo’ya bağımlı olmadan çoğalabilirler [12].

Hastaların %20-43'ünde saptanan sitogenetik anormallikler arasında en sık trizomi 8, trizomi 9, Y, 5q, 6q, 7q, 11q, 13q, 20q delesyonu gözlemlenir [10].

1976 yılında PV'nın kök hücreden köken aldığı ve daha sonra saptanan JAK2 mutasyonunun tirozin kinazı sürekli aktif tuttuğu saptanmıştır [16].

WHO PV tanı kriterlerini majör ve minör olarak sınıflandırmıştır [17];

a) Majör kriterler;

- Erkeklerde Hb > 18.5 g/dl , kadınlarda Hb > 16.5 g/dl (Yaş, cinsiyet ve yaşanan yere göre hesaplanmış referans aralığının %99'undan büyük)
- JAK2 mutasyonu ya da fonksiyonel başka mutasyonların varlığı

b) Minör Kriterler

- Kemik iliği biyopsisinde farklı 3 hücre serisinde (eritrosit, granülosit, megakaryosit) profilerasyon
- Serum Epo düzeyinin düşük olması
- Endojen eritrosit koloni oluşumu

Esansiyel trombositemi; asıl olarak plateletlerde artışın olduğu ve en sık görülen MPH'dır. İnsidansı'nın 0,2 – 2,5/ 100.000 olduğu ancak hastalığı belirtisiz olma özelliğinden dolayı gerçek görülme oranının saptanamadığı da bildirilmektedir. Hastalık genellikle kadınlarda görülür ve tanı anında yaş ortalamasının 57 olduğu saptanmıştır [18].

Primer Myelofibrozis; Primer myelofibrozis, aynı zamanda myeloid metaplazili myelofibrozis, agnojenik myeloid metaplazi ve kronik idiyopatik myelofibrozis olarak da bilinir [14, 15]. Primer myelofibrozis, megakaryositik dizide klonal neoplastik artış, kemik iliğinde fibroz ve ilik dışı hematopoezle kendini gösteren myeloproliferatif bir neoplazidir [19]. Genellikle yaşlılarda görüldüğü, lökoeritroblastik kan tablosu, masif splenomegali ve kemik iliği

fibrozisi ile karakterize olduğu saptanmıştır. Hastalığın görölme oranının, 100.000’de 0,4 – 1,5’dir. Patogenezinde, megakaryosit ağırlıklı klonal proliferasyon, reaktif kemik iliği stromal değişiklikleri ve ekstramedüller hematopoez vardır. Hastaların yaklaşık yarısında edinsel JAK2 V617F mutasyonu saptanmıştır [20, 21].

2.2. MYELOFİBROZİS

2.2.1. Myelofibrozis Epidemiyolojisi

PMF kronik myeloproliferasyon, atipik megakaryositik hiperplazi ve kemik iliği fibrozisi ile karakterli klonal bir kök hücre hastalığıdır. Hastalığı başlatan mutasyon tam olarak bilinmese de yapılan araştırmalar ile hastaların %50-60’ında JAK2 V617F mutasyonu saptanmıştır [22]. JAK2 V617F alel yükü düşük bulunan hastalarda daha düşük hemoglobin düzeyi ve daha az splenomegali bulunduğu ancak sitopeniye bağlı enfeksiyonlar veya lösemik transformasyon nedeni ile daha kötü sağkalım ile birlikte olduğu gösterilmiştir [23]. PMF, primer veya esansiyel trombositoz, polisitemi vera sonrası ikincil gelişen klonal bir myeloproliferatif hastalıktır. Kronik myeloproliferatif hastalıklar arasında en az görülenidir. Hastalığın yıllık görölme oranı, Kuzey Avrupada yıllık 0.5 /100000 Amerika’da ise yıllık 1.5/100000’dir. Tanı anında genellikle hastaların 65-70 yaş aralığında olduğu bildirilmiştir [24].

2.2.2. Myelofibrozis Patogenezi

Myelofibrozis’in klonal bir hastalık olduğu ve malign pluripotent kök hücrelerin proliferasyonu sonucunda ortaya çıktığı bilinmektedir. Bu yöndeki ilk

çalışmada, G-6-PD geni heterozigot olan bireylerde G-6-PD'nin X kromozomuna bağlı inaktivasyon paternleri tespit edilmiştir [25].

Genel popülasyonda G-6-PD heterozigot olguların görülme oranının düşük olduğu ve bunun da X'e bağımlı genlerin, hipoksantin fosforibozil transferaz ve fosfogliserat kinazın analiz edilmesine neden olduğu bildirilmektedir. Bu çalışmalarda erken hücre faz veya daha ileri myelofibrozu fazında olan tüm hastalarda monoklonal hematopoez gösterilmiştir [26, 27]. Bir çalışmada, FISH analizi sonucunda hem B hem T hücrelerinin etkilendiği, karyotip analizinde stromal proliferasyonun poliklonal veya reaktif olduğu ve altta yatan klonal hematopoezin bir parçası olmadığı saptanmıştır. N-Ras gen mutasyon analizi yapılan bir çalışmada B ve T lenfositik dizilerinin etkilenmesi, hastalığın pluripotent kök hücre kaynağını desteklemektedir [28]. CFU-GEMM, BFU-E, CFU-GM ve CFU-MK gibi dolaşan hematopoetik öncüllerin artışı myelofibrozisin bir özelliğidir [29]. Bu öncül hücrelerin kemik iliğindeki kök hücrelerin proteolitik salınımından kaynaklandığı düşünülmektedir. Splenektominin geçici olarak kan değerlerini normale getirmesi nedeniyle dalak ve karaciğerin de dolaşan bu hücre havuzuna destekte bulunduğu düşünülmektedir. Dolaşan öncül hücrelerin seviyesinde yükselme, periferik kanda CD34 hücre sayısına artış olarak yansımaktadır. Periferik kandaki mutlak CD34 sayısının, PMF'i diğer Ph-negatif MPN'den ayırt etmede ve blastik transformasyonu tahmin etmede önemli olduğu düşünülmektedir [30]. Safaştırılmış CD34 hücrelerde yapılan bir çalışmada PMF'de aberan olarak ifade edilen 95 gen tanımlanmış ve kompleks patogeneze dikkat çekilmiştir [31]. Eritroid öncüllerin eritropoetine (EPO) duyarlılığında artış bildirilmiştir. Bu

bulgularından dolayı, otonom megakaryosit proliferasyonunun MPL mutasyonları veya MPL ligandının otokrin stimülasyonu ile ilişkili olduğu bildirilmiştir [32].

Günümüze kadar kromozom anormalliklerinin incelendiği birçok çalışma yapılmıştır [33]. Bu çalışmalardan birinde, toplam 157 kromozomal bozukluğun yer aldığı ve %80'den fazlasını 13q, 20q delesyonları, trizomi 8, 1, 7 ve 9. kromozomdaki anormalliklerin oluşturduğu anlaşılmıştır [34]. Anormal sitogenetik hastaların %25'inde bulunan 13q delesyonu en sık sitogenetik anormalliktir. 20q delesyonu ve birinci kromozomun uzun kolunda olan parsiyel duplikasyon diğer sık anormalliklerdendir. Der(6) t(1;6)(q23-25;p2122), PMF'de olası bir belirteç olmasına rağmen hastaların %3'ünden azında görülmektedir [35]. Myelofibrozisli olguların üçte birinde tanıda anormal karyotip bulunduğu ve akut lösemiye dönüşümünü takiben oranın %90'a kadar yükseldiği bildirilmektedir. Lösemik transformasyona büyük oranda 5q ve 7q delesyonunu içeren yüksek riskli sitogenetik anormallikler eşlik etmektedir. Aynı çalışmada trizomi 8 ve 12p delesyonu gibi klonal anormalliklerin kötü prognozla ilişkisi gösterilirken diğer anormalliklerin de sağkalıma olumsuz etkisi saptanmıştır [36].

Trizomi 13 erken blastik transformasyonla ilişkilidir [37]. +der(1q9p) ve t(6;10) (q27;q11), kompleks karyotip varlığı ya da trizomi 8, 7/7q, i(17q), inv(3), 5/5q, 12p veya 11q23 rearanjmanından herhangi birinin varlığı, PMF'de kötü prognozla ilişkilidir [38, 39].

Dört bağımsız grup tarafından 88 PMF hastasında yapılan çalışmada JAK2 V617F mutasyonu sıklığı %49 olarak bildirilmiştir [40, 7]. PMF'de megakaryositlerde FK506 bağlayıcı protein 51'in (FKBP51) artmış ifadelenmesi, JAK2 /STAT5 yolağının sürekli aktivasyonuna neden olarak apoptozisi engellediği ifade edilmektedir [41]. N-RAS'ın özellikle 12. kodonunu etkileyen

RAS mutasyonları, kronik fazdaki PMF hastalarının yaklaşık %6'sında saptanmıştır [42]. p53 ve p16'yı içeren mutasyonların, hastalığın kronik fazında oldukça nadir görülürken, lösemik dönüşümde rol oynadıkları saptanmıştır [43].

Myelofibrotik stromanın interstisyel doku ve bazal membranda kollagen artışı ile karakterize kompleks bir yapısı olduğu bilinmektedir. Bununla birlikte fibronektin, laminin, tenascin ve vitronektinin depolanmasında artış ile neovaskülarizasyonda belirginleşme ve endotelial hücre proliferasyonu da görülebilmektedir. Bu kompleks stromal özellikler ve stromal proteinlerin artışına, trombosit kökenli büyüme faktörü (PDGF) ve TGF-beta'nın neden olduğu düşünülmektedir [44].

2.2.3. Myelofibrozis Tanısı ve Laboratuvar Bulguları

PMF'de hastaların hemen hemen %25'i asemptomatiktir ve rutin kan tetkiklerini takiben tanı almaktadır. Başlıca semptomlar ise halsizlik, dispne ve taşikardidir. Splenomegali karakteristiktir ve masif olduğu zaman hastalarda karında huzursuzluk ve erken doyma gibi şikayetler söz konusudur. Dalagın büyümesi için yetersiz kalan kan dolaşımı nedeniyle dalak infarktı gelişebilmektedir. Dalak enfarktı genellikle hem geçici rahatsızlığa yol açmakta hem de nadiren akut batını taklit eden ciddi karın ağrısına neden olabilmektedir. Olguların yaklaşık %70'inde hepatomegali görülebilmektedir. Karaciğer kan akımında artış veya intrahepatik obstrüksiyon sonucunda portal hipertansiyon ortaya çıktığı bildirilmektedir [45].

PMF'de yapısal semptomların varlığı kötü prognoz ile ilişkilidir [46]. PMF'de kanama sıklıkla hafiftir. Peteşi, ekimoz gibi hafif belirtiler veya masif gastrointestinal kanama gibi hayatı tehdit edebilir. Hemorajik diyatezin

oluşumuna trombositopeni, edinsel trombosit fonksiyon bozukluğu ve yaygın damar içi pıhtılaşması katkıda bulunur. Hastalarda görülen semptomlar ve bulgular Tablo 1’de özetlenmiştir [47, 48].

Tablo 1. Hastalarda klinik muayene bulguları [47, 48]

Muayene Bulguları	Sıklık (%)
Aseptomatik	16-30
Halsizlik	47-71
Ateş	5-15
Kilo kaybı	7-39
Gece terlemeleri	6-21
Dalakta büyümeye bağlı semptomlar	11-48
Kanama	5-20
Gut veya böbrek taşları	6-13
Solukluk	60
Peteşi veya ekimoz	15-20
Splenomegali	89-99
Hepatomegali	39-70
Periferik ödem	13
Portal hipertansiyon bulguları	2-6
Lenfadenopati	1-10
Sarılık	0-4

PMF’de tanı fizik muayene, periferik kan bulguları, kemik iliği morfolojisi, sitogenetik inceleme, moleküler belirteçler ve diğer hastalıkların ekarte edilmesi ile konulabilmektedir [49]. Hastaların %15-30’u asemptomatiktir

ve splenomegali açısından incelenirken tanı alırlar. Bununla birlikte en sık görülen şikayetler; halsizlik, kilo kaybı, gece terlemesi gibi yapısal semptomlar, splenomegaliye bağlı karında şişkinlik hissi, erken doyma, karın ağrısı ve kemik ağrısıdır. İnefektif eritropoez ve ekstramedüller hematopoez anemi ve organomegalinin başlıca nedenidir. Portal hipertansiyona bağlı komplikasyonlar görülebildiği gibi ekstramedüller hematopoezin gerçekleştiği yere göre pulmoner hipertansiyon, plevral efüzyon, asit, kord kompresyonu gibi komplikasyonlar da gözlemlenmektedir [22].

Tablo 2. Kemik iliği fibrozisi görülebilen hastalıklar [47]

Malign	Malign Olmayan
PMF	Enfeksiyonlar (tüberküloz, visseral leishmanyazis)
Diğer kronik myeloproliferatif hastalıklar (örn. PV, KML, ET)	Renal osteodistrofi
Akut megakaryoblastik lösemi (akut myelofibrozis)	Vitamin D eksikliği
MDS	Hipotiroidi
AML	Hipertiroidi
ALL	Gri trombosit sendromu
Saçlı hücreli lösemi	Sistemik lupus eritematozus (SLE)
Hodgkin lenfoma	Skleroderma
Multipl myelom	Radyasyon maruziyeti
Sistemik mastositoz	Benzen maruziyeti
Metastatik karsinom (örneğin meme, prostat, mide)	Gaucher hastalığı
	Osteopetrozis

Laboratuvar tetkiklerinde genellikle anemi saptanır; bununla birlikte trombositoz, lökositoz veya lökopeni de görülebilir. Trombosit agregasyonunda sıklıkla defekt vardır. Laktat dehidrogenaz düzeyinin hastaların %95’inde yüksek olduğu bildirilmektedir [22].

Hastaların periferik kan yaymasında tipik olarak lökoeritroblastozis ve ‘tear drop’(gözyaşı) eritrositler gözlenir. Tanı genellikle %25 oranında prefibrotik evrede, daha sık olarak da fibrotik evrede konulabilmektedir. Prefibrotik evre, retikülin lif artışı olmadan veya az miktarda retikülin lif artışı ile birlikte granülositik ve megakaryositik proliferasyon ile karakterizedir [22].

Hastalığın tanısı, kemik iliği incelemesinde yoğun kümelenmiş hipolobüle ve hiperkromatik nükleusu içeren morfolojik olarak atipik megakaryositlerin varlığı ile konulmaktadır [50].

Tanı için kemik iliği biyopsisinde retikülin ve trikrom boyası ile saptanan fibrozisle beraber bozulmuş çekirdek/sitoplazma oranına sahip hiperkromatik ve düzensiz katlantılı megakaryositlerin görülmesi beklenir. Retkülin fibrozis yokluğunda megakaryositlerdeki değişikliklere ek olarak granülositik proliferasyon ve eritropoezde azalmaya rastlanabilmektedir [22].

Prefibrotik PMF; trombositoz, hafif anemi, hafif splenomegali varlığı ve lökoeritroblastozisin yokluğu ile yanlışlıkla ET tanısı alabilir. Prefibrotik PMF’de progresyonun, megakaryositik displazinin varlığına bağlı ortaya çıktığı da düşünülmektedir [50].

Ayırıcı tanı yapılırken metastatik kanser, lenfoid veya diğer myeloid malignitelere eşlik eden kemik iliği fibrozisinin akılda tutulması gerektiği vurgulanmaktadır [22].

2.2.4. Myelofibrozis Tanı Ölçütleri

Dünya Sağlık Örgütü tarafından Myelofibrozis tanısında majör ve minör kriterler tanımlanmıştır [51].

a. Major kriterler [51, 47];

- Retikülin//kollajen fibrozis varlığında megakaryosit proliferasyonu ve atipisi veya anlamlı retikülin lif artışı yoksa granülositik proliferasyon ve azalan eritropoez ile birlikte, artmış kemik iliği sellülaritesi.
- PV, kronik myeloid lösemi, myelodisplastik sendrom ve/veya diğer myeloid neoplazilerin tanı ölçütlerinin karşılanmaması.
- JAK2 V617F mutasyonunun veya diğer klonal göstergelerin (MPLW515K/L) varlığı veya klonal gösterge olmadığında kemik iliği fibrozisi yapabilecek altta yatan inflamatuvar veya neoplastik başka bir hastalığın olmaması.

b. Minör Ölçütler [51, 47];

- Lökoeitroblastozis,
- LDH düzeyinde artış,
- Anemi,
- Ele gelen dalak büyümesi.

2.2.5. Myelofibrozis Prognozu ve Tedavisi

Myelofibrozis prognozunu belirlemek amacı ile çeşitli skorlama yöntemleri geliştirilmiştir. Bu skorlamalardan günümüzde yaygın olarak kullanılanları Uluslararası Prognostik Skorlama Sistemi (IPSS) [50] ile DIPSS/plus skorlama yöntemleridir. IPSS skorlama yöntemi aşağıda Tablo'da gösterilmiştir.

Tablo 3. Uluslararası Prognostik Skorlama Sistemi (IPSS) [50]

Yaş>65 Hb<10gr/dl Lökosit sayısı>25x10 ⁹ /l Periferik kanda dolaşan blast yüzdesi>%1 Yapısal semptomlar		
	Risk Faktörü	Sağ Kalım
Düşük Risk	0	11,3 yıl
Orta -1 Risk	1	7,9 yıl
Orta-2 Risk	2	4 yıl
Yüksek Risk	3	2,3 yıl

DIPSS skorunda IPSS ile aynı parametrelerin yer aldığı görülmektedir. Fakat aneminin yaşam ve sağ kalım süresini etkilediği düşünülerek bu parametre 2 puan olarak hesaplanmıştır [52]. DIPSS plus skorlama sisteminde bu risk faktörlerine eritrosit transfüzyon ihtiyacı, trombosit sayısı <100x10⁹/l ve kötü karyotipin saptanması da eklenmiştir [53]. Kötü karyotip +8, -7/7q-, i(17q), inv3, -5/5q, 12p-veya 11q23 yeniden düzenlenmesi olarak tanımlanmıştır. Kötü karyotipli hastaların ortalama sağkalım süreleri 2 yıl iken, normal karyotip veya kötü karyotipler dışındaki anomalilere sahip hastalarda sağkalım süresi ortalaması 5.2 yıl olarak saptanmıştır.

Yapılan bir araştırmada monozomal karyotip, inv./(17q) anomalileri gibi risk faktörlerinin olduğu hastalarda mortalitenin ortalama 2 yılda %80'nin üzerinde olduğu görülmüştür [51]. Bu iki kromozomal anomalisinin varlığı, %9'dan fazla dolaşan blast ve lökosit sayısının $>40 \times 10^9/l$ olmasının kötü prognostik işaret olduğu saptanmıştır [54]. Myelofibrozis hastalarında sağkalım üzerine olumsuz prognostik etkileri saptanan diğer faktörler düşük V617F alel yükü ($<25\%$), JAK2 46/1 nullizigot veya 'GGCC' haplotipi, plazma IL2, IL2R, IL-8, IL-15 yüksekliği ve monozomal karyotiptir [55, 56, 22].

Lösemiye dönüşüm riskinin trombosit sayısı düşük ve kötü karyotipin saptandığı hastalarda daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Mayo kliniğin 1000 hastanın sonuçlarını sunduğu çalışmada, 5 yıllık lösemiye dönüşüm riski Dinamik Uluslararası Prognostik Skorlama Sistemi (DIPPS plus) yöntemine göre düşük riskli grupta %6 iken, yüksek riskli grupta %21 olduğu saptanmıştır [32]. Düşük ve yüksek riskli hastalık durumunun özellikleri şu şekildedir [22, 57].

A. Asemptomatik Düşük veya orta 1 risk grubu hastalar: Bu hastalarda tedavisiz izlem seçilebilmektedir. Anemi, splenomegali, yapısal bulgusu olan hastaların tedavi edilmesi gerekmektedir. Nakile bağlı ölüm ve graft versus host hastalığı oranlarının yüksekliği nedenleri ile bu hasta grubunda konvansiyonel tedavi seçenekleri ve allojeneik kök hücre nakli konusunda her hastanın ayrı olarak değerlendirilmelidir. Özellikle genç hastalarda kök hücre nakli tedavi seçenekleri arasındadır [22, 57].

Yapılan bir araştırma, düşük riskli hastalarda allojeneik nakilden ortalama 5 yıl sonra ortalama yaşam süresine ulaşamadığı saptanmıştır. Hem nakile bağlı ölüm hem de hastalığın tekrarlaması dışındaki nedenlere bağlı ölümün hastalığın ileri evresinde nakil olanlara göre daha düşük olduğu saptanmıştır [22, 57].

B. Orta-2 veya yüksek risk grubu hastalar: Hasta yaşı ve komorbid durumları değerlendirilerek öncelikle allojeneik nakil, uygun değilse konvansiyonel tedavi seçenekleri, splenektomi hastalara önerilebilir. Allojeneik nakil yapılmayacak hastaların klinik çalışmalara girmeleri teşvik edilmelidir [22, 57].

Günümüzde myelofibrozlü hastalarda gösterilebilmiş tek şifa seçeneğinin allojeneik kök hücre nakli olduğu bilinmektedir. Ancak, hazırlık rejimine bağlı olarak %10-30 arasında değişen nakile bağlı ölüm ile %85 oranındaki kronik graft versus host hastalığı ve hastaların genellikle ileri yaşta olmaları bu tedavi seçeneğinin uygulanabilirliğini azaltmaktadır. Ayrıca düşük riskli hastalarda allojeneik nakilin başarısı konusunda bu hastaların tedavisinin risk gruplarına göre belirlenmesi gerektiği dışında görüş birliğinin olmadığı da görülmektedir [22].

PMF’de ortalama yaşam süresinin 4 yıl olduğu ve bununla birlikte PMF’de bireysel yaşamın 1 yıl ile 30 yıl arasında değişebildiği saptanmıştır. Bu hastalarda başlıca ölüm nedenleri enfeksiyon, lösemik dönüşüm, kalp yetmezliği, kanama, karaciğerin ekstrasmedüller hematopoezine bağlı karaciğer yetmezliği, portal hipertansiyon, renal yetersizlik, pulmoner emboli ve nakil ilişkili komplikasyonlardır. Akut lösemiye dönüşüm %5 ile %22 arasında değişmektedir [58]. Akut lösemi gelişen hastaların yaklaşık yarısında alkileyici ajan veya radyoterapi öyküsü olmaması, akut lösemiye dönüşümün PMF’de doğal seyrin bir parçası olduğunu düşündürmektedir. Tanıdan 1 yıl ve 5 yıl sonra akut lösemiden ölüm sıklığı %2 ve %16 olarak bildirilmiştir. Prognozla ilişkili faktörler arasında anemi, tanı yaşı, karyotip anormallliği, dolaşımdaki immatür granülositler ve myeloblast yüzdesi vardır [59]. Ayrıca kollagen fibrozis derecesinden farklı olarak angiogenezin derecesi de önemli ve bağımsız risk faktörüdür [47].

Aşağıdaki Tabloda “IPSS”, “DIPSS” ve “DIPSS-plus” skorlamasına göre PMF'deki ortalama yaşam süreleri özet olarak verilmiştir.

Tablo 4. 'IPSS', 'DIPSS' ve 'DIPSS-plus' skorlamasına göre PMF'deki ortalama yaşam süreleri [60, 61]

	Risk	Risk Faktörü	Sağkalım (yıl)
IPSS	Düşük risk	0	11,3
	Orta-1 risk	1	7,9
	Orta-2 risk	2	4
	Yüksek	≥ 3	2,3
DIPSS	Düşük risk	0	-
	Orta-1 risk	1-2	14,2
	Orta-2 risk	3-4	4
	Yüksek	5-6	1,5
DIPSS-plus	Düşük risk	0	15,4
	Orta-1 risk	1	6,5
	Orta-2 risk	2-3	2,9
	Yüksek	≥ 4	1,3

2.3. ESANSİYEL TROMBOSİTOZ

Kök hücre kaynaklı klonal bir hastalık [62] olan esansiyel trombositoz (ET), klinik olarak normale yakın yaşam beklentisi, baş ağrısı ve akral parestezi gibi mikrovasküler bozuklukların yaşandığı, tromboembolik komplikasyonların arttığı bir hastalıktır [63].

ET’de trombosit sayı artışı ve eşlik eden nitel trombosit bozuklukları tromboz veya kanamaya neden olur [64]. Reaktif veya klonal bir neden bulunamayan persistan trombositoz varlığında da ET düşünülebilmektedir [65]. Hastalıkta serum eritropoetin seviyesi ile megakaryosit / platelet Mpl ekspresyonun azaldığı görülebilmektedir [66]. Trombositlerin anormal agregasyonu ile intraselüler konsantrasyonundaki değişikliklerin de içinde bulunduğu birkaç defekt tanımlanmıştır [67]. Trombositozun derecesi, artmış tromboz veya kanama insidansı ile ilişkilidir [68]. ET hastalarında PV ve PMF

hastalarında olduğu gibi, serum trombopoetin düzeyi çoğunlukla normal ya da megakaryosit artışına karşın yüksek bulunmuştur [69]. Artmış trombosit sayısına bağlı trombotik komplikasyonlar yanında disfonksiyon nedeniyle kanama eğiliminde artış olabilmektedir [70].

2.3.1. Esansiyel Trombositoz Epidemiyolojisi

Esansiyel trombositoz, en sık tanı alan MPH'dir [71]. Kemik iliğinde megakaryosit proliferasyonu ve dolaşımda platelet sayısının artışı ile karakterize olduğu bilinmektedir [72]. Görülme oranı yıllık 0,2 – 2,5/ 100.000'dir [71]. Çoğunlukla hastalar belirtisiz olduğu için gerçek sıklığı olasılıkla daha fazladır. Tanı anında hastaların sıklıkla 50-60 yaş arasında olduğu [73] ortanca yaştan 57 olduğu bildirilmiştir [18]. 20-50 yaş aralığındaki genç kadınlarda insidansın daha yüksek olduğu da bildirilmektedir [18, 74].

2.3.2. Esansiyel Trombositoz Tanı ve Laboratuvar Bulguları

Hastaların %25-33'ü tanı anında asemptomatiktir [75]. Semptomatik olanlarda baş ağrısı, baş dönmesi, dizartri, senkop, nöbet gibi vazomotor semptomlar, nörolojik semptomlar; el ve ayaklarda kızarıklık ve morarmanın eşlik ettiği ağrı ve yanma hissi (eritromelalji); hemoraji, abdominal ven trombozu, splenomegali görülebilmektedir [76, 75].

Eritromelalji, düşük doz aspirine yanıtı akral disestezi ve eritem ile karakterize vazomotor bir semptomdur. Eritromelaljinin mekanizmasında anormal trombosit endotel etkileşiminin rol oynadığına inanılmaktadır. Histopatolojik çalışmalar endotelyal inflamasyon ve intimal proliferasyonla birlikte olan trombositlerden zengin arteriyoller mikrotrombüsü göstermiştir [77].

ET’de fizik incelemede genellikle bir özellik yoktur [78]. Tanı sırasında ET’li olguların %5’inden azında sitogenetik anormallikler görülmekle beraber bu anormallikler özgün değildir [79]. Fizik incelemede genellikle kanama ve tromboza ait belirti ve bulgulara rastlanılmaktadır. ET’li hastaların en sık fizik muayene bulgusu hepatomegali(%20 hastada) ve splenomegalidir (%40–50 hastada) [80]. Parmak uçlarında renk değişikliği veya gangren nadiren görülebilen özelliklerdendir [78].

ET’de hepatomegali ve lenfadenopati de nadir görülen bulgular arasındadır [81]. ET’li hamile kadınların %30-40’ında ilk trimester düşüklere gerçekleştiği de bildirilmektedir [81].

2011 yılında Türkiye’de yapılan bir araştırmada ET tanısı almış 102 hastanın %3,9’unda portal ven trombozu (PVT), %2,9’unda akut myokard infarktüsü (AMI), %2,9’unda iskemik serabrovasküler olay (ISVO), %2’sinde derin ven trombozu (DVT), %1’inde periferik arter hastalığı (PAH) saptanmıştır [82].

ET tanısında, reaktif trombositoz sebepleri ve diğer MPH’ler dışlanmalıdır. Reaktif trombositoz sebepleri, demir eksikliği, splenektomi, cerrahi, inflamasyon, otoimmün hastalıklar, metastatik kanser ve lenfoproliferatif hastalıklardır. JAK2 mutasyonu saptanması reaktif trombositozu dışlatır. Bununla beraber, ET’yi diğer MPH’lerden ayırmak için diğer kriterler de gereklidir. ET tanısı için trombosit sayısı >450.000/ mm³ olması gerekir; ancak genellikle hastalarda trombositler >1.000.000/mm³’dir. Hemoglobin genellikle normaldir, ancak hafif bir anemi görülebilir [78, 73]. Hastaların serum ferritin seviyeleri normaldir [83]. ET’de kanama diatezinin ileri derecede trombositoz varlığında aşık hale gelen edinsel von Willebrand hastalığına (vWH) bağlı

ortaya çıktığı ileri sürülmektedir [84]. Hastaların % 23'ünde pseudohiperkalemi ve pseudohiperfosfatemi saptanır. İleri derecede trombositozu olan hastalarda pseudohipoksemi gözlemlendiği bildirilmektedir [85, 86].

ET'de diğer nitel trombosit kusurları arasında epinefrin ve kollagende trombosit agregasyonundaki kusurlar, tromboksan üretimindeki değişim ve azalmış trombosit membran GP Ib ve GP IIb/IIIa reseptör ifadenmesi sayılabilir. MPH'de, EPO'ne ve TPO reseptörü kodlayan genlerde bozukluk saptanmamıştır. ET'de artmış megakaryosit kitlesine rağmen serum TPO seviyeleri genellikle normal veya artmıştır [69].

ET tanısında tam kan sayımında uzun süreli trombositoz saptanması önemli bir bulgudur. Tanı için KML, PV gibi KMPN'ın ve diğer trombositoz nedenlerinin olmadığına gösterilmesi gerekir. Bu amaçla kan tahlilleri, radyolojik tetkikler, genetik tahliller ve patolojik incelemeler yapılmaktadır [66]. ET'li hastalarda kemik iliğinde belirgin megakaryosit artışı vardır ve kemik iliği hiperselülerdir. Aspiratlarda artmış ploidiye sahip dev megakaryositler kümeleşmiş olarak gözlemlenir. Çoğunlukla eritroid ve granülositer dizi hiperplazisi vardır [78]. Ayrıca hastalarda hafif fibrozis de görülebilir ve fibrozisin belirgin olması ET aleyhine bir bulgudur [73]. Multilobule büyümüş megakaryositler ve sinüsler boyunca uzanan küçük gruplar halinde kümeler oluşturma eğiliminde olan megakaryositler ET'nin temel bulgusudur [87]. ET'de trombositoz tek başına tromboz riski ile ilişkili değildir [88].

2.3.3. Esansiyel Trombositoz Tanı Ölçütleri

Dünya Sağlık Örgütü ET tanı ölçütlerini belirlemiştir. Bu tanı ölçütleri şunlardır [89];

- Platelet sayısının devamlı olarak $\geq 450 \times 10^9/L$ olması,
- Kemik iliği biyopsisinde granülopoez veya eritropoezde belirgin artış olmadan büyük, olgun megakaryosit proliferasyonu,
- PV, PMF, KML, MDS ve diğer myeloid neoplazilerin Dünya Sağlık Örgütü kriterlerine göre dışlanmış olması,
- JAK2 mutasyonunun veya diğer klonal işaretlerin varlığının görülmesi ya da JAK2 V617F yokluğunda reaktif trombositoz işaret eden bulguların olmaması.

Trombositoz anormal, büyük plateletler eşlik edebilir lökositoz çoğunlukla hafif düzeydedir ve belirgin sola kayma ya da KML'deki gibi bazofil artışı eşlik etmez [90]. Megakaryositlerin çekirdekleri hiperlobüle veya yoğun bir şekilde katlanmış, dağılmış veya gevşek olarak küme yapmıştır, retikülün liflerinde artış yoktur. Tekrarlanan biyopsilerde retikülün lif artışı olması, myelofibroze ilerlemeyi düşündürür [91].

Tedavide, mikrovasküler belirtileri ve trombotik komplikasyonları önlemek için aspirin gibi antiplatelet ajanlar ve trombohemorajik komplikasyonları önlemek için de hidroksiüre, interferon- α , anagrelide gibi ilaçlar kullanılır [90]. Akut lösemiye dönüşüm, hastaların $\leq 5\%$ 'inde görülür [18].

ET'de ortalama yaşam süresi 15 yıldan uzundur ve 10 yılda myelofibroze veya AML'ye dönüşüm görece olarak düşük olduğu bilinmektedir (sırasıyla $<4\%$ ve $<2\%$) [92].

ET’de risk kategorileri yüksek, orta ve düşüktür [93] . Hastanın 60 yaş üstünde olması, geçirilmiş kanama veya tromboz öyküsü, trombosit sayısının 1.500.000/mm³ ’den fazla olması yüksek risk faktörleridir. Hastanın düşük riskli olarak tanımlanması için <60 yaş, tromboz öyküsünün olmaması ve platelet sayısının 1.5 milyon/μL’nin altında olması gereklidir [94].

Tablo 5. ET için Risk Faktörleri [93]

Yüksek Risk	Orta Risk	Düşük Risk
–Yaş >60 –Geçirilmiş kanama veya tromboz öyküsü –Trombosit sayısının 1.500.000/mm ³ ’den fazla olması	–Yaş>40-yaş<60 –Kardiyovasküler risk faktörlerinin varlığı (sigara, hipertansiyon, dislipidemi, diabetes mellitus) –Trombosit sayısının 1.500.000/mm ³ ’den az olması	–Yaş<40 –Tromboz öyküsü olmaması –Kardiyovasküler risk faktörlerinin olmaması –Trombosit sayısının 1.500.000/mm ³ ’den az olması

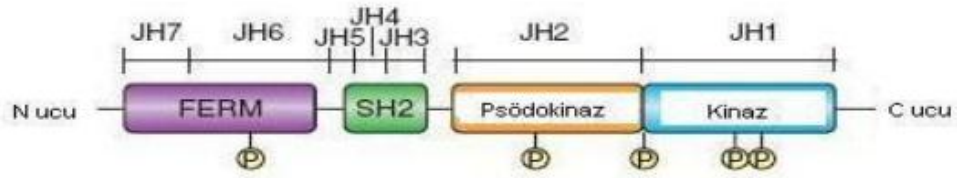
2.4. JAK2 MUTASYONU

2.4.1. JAK2 Mutasyon Tanımı

Janus Kinaz (JAK) tirozin gen ailesinin üyesidir. Memelilerde JAK ailesinin JAK1, JAK2 , JAK3 ve Tirozin kinaz 2 (Tyk2) olmak üzere 4 üyesi bulunmaktadır. İnsanlarda, Tyk2 19p13.1, JAK3 geni 19p13.2, JAK2 ve JAK1 geni ise sırasıyla 9p24 ve 1p31.3 kromozom üzerindedir [95]. JAK’lar sitokin reseptörleri ve diğer kinazlar ile olan ilişkilerde etkilidir [96]. Sitoplazmik tirozin kinaz geni olan JAK2’yi 9. kromozomun kısa kolunda bulunan gen kodlar [2].

2.4.2. JAK2'nin Karakteristik Özellikleri

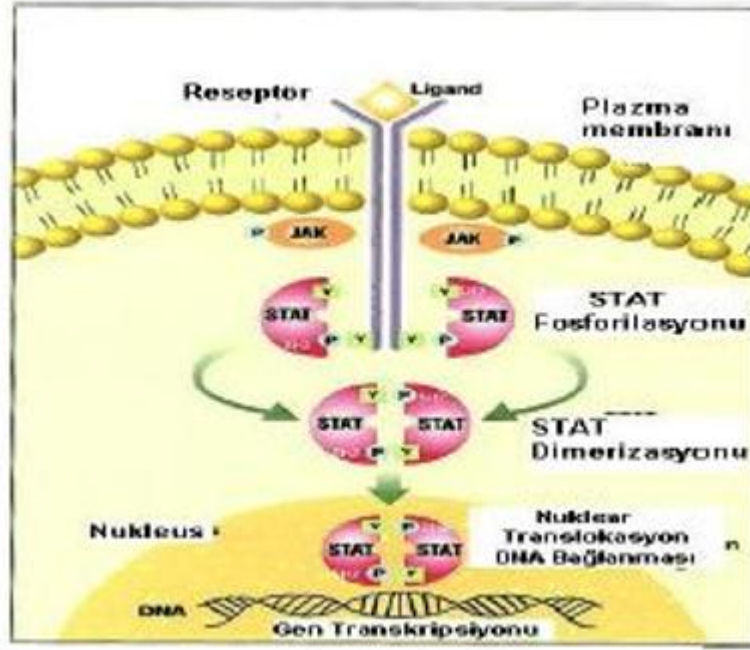
JAK2 GM-CSF, G-CSF, IL-3, Tpo ve Epo reseptörleri (TpoR, EpoR) tarafından intrasellüler sinyallerin iletiminde önemli rol oynamaktadır [97]. JAK2 proteinin 617.pozisyonundaki valinin fenialanine (Ekzon 14) dönüşümü ile oluşan mutasyon sonucu kronik myeloproliferatif hastalıklar ortaya çıkmaktadır. Dönüşüm JH2 ya da psödokinaz domain adı verilen bölgede oluşmaktadır [98]. Şekil 2'de JAK2 homoloji alanları gösterilmiştir [99].



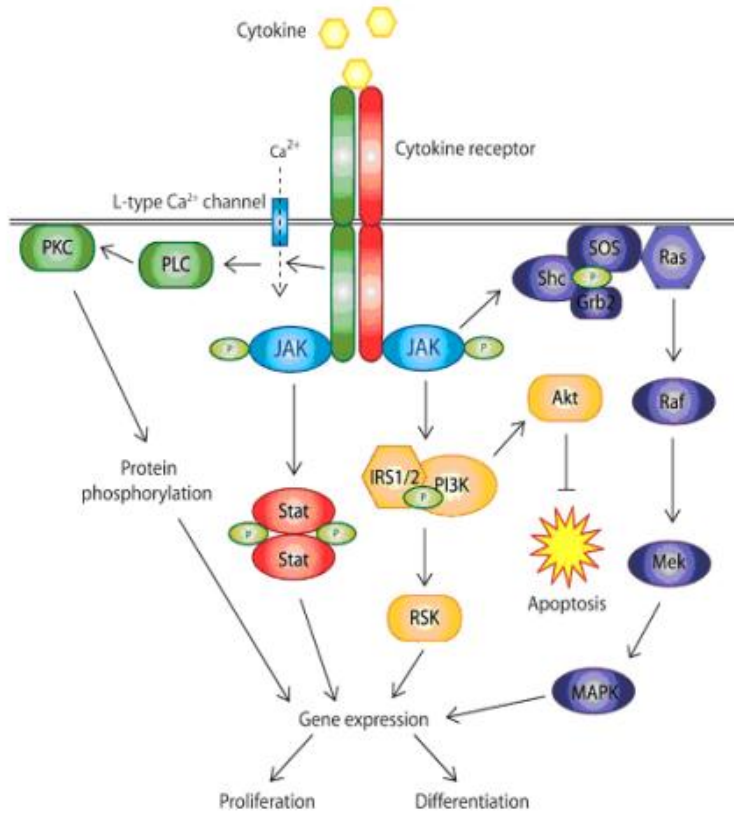
Şekil 1. JAK2 homoloji alanlarının şematik gösterimi [100, 101]

JAK2, büyüme faktörü reseptör sinyaline aracılık eden sitoplazmik bir tirozin kinaz olup hematopoetik büyüme faktörlerinin kan hücreleri üzerindeki etkisini düzenler [102].

JAK2'nin etkili olduğu sinyal yolları arasında STAT5, STAT3, MAP kinaz yolları ve PI3K/Akt yolları bulunmaktadır [12]. Mutasyon fosfoinozitol-3 kinazı, Ras'ı, MAP (mitojen aktive eden protein) kinazı ve transkripsiyonu aktive eden STAT (sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü) proteinlerini aktive ederek hücre proliferasyonu ve apoptozun bozulmasına neden olur [102] (Şekil 2, Şekil 3).



Şekil 2. JAK2 STAT sinyal iletimi [103]



Şekil 3. Sitokinlerin hücre içi sinyal iletim yolu ile STAT ve JAK ilişkisi [104, 105]

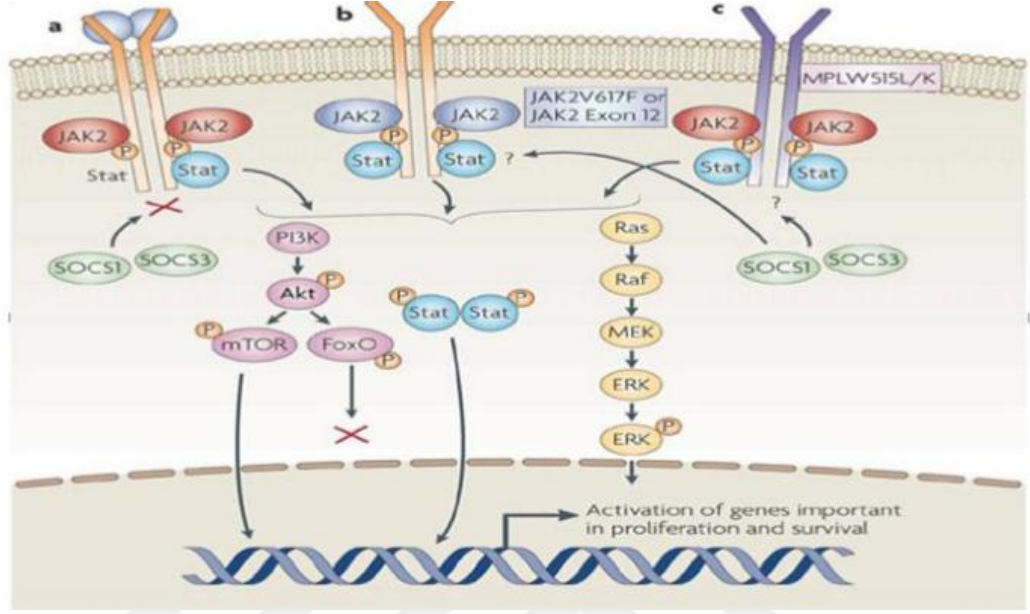
JH2 domaini reseptör inaktivasyonunda rol oynamaktadır. Bu bilgi JAK2 V617F (+) hücrelerin sitokin reseptörlerinin aşırı duyarlılığı ve malignitelere gerçekleştirdiği hasarın çeşitliliği hakkında önemli bilgi vermektedir [106].

Özgün reseptörlere ligand (sitokin) bağlanınca JAK STAT sinyal iletimi aktif hale gelir ve böylece [103] JAK2 eritropoetin reseptörüne bağlanarak fosforillenir ve aktive olur. Aktive olduktan sonra reseptörde yapısal değişiklik meydana gelir. Aktif hale gelmiş olan JAK2 reseptörün sitoplazmik kısmını fosforiller ve intrasellüler sinyal yolağını başlatır [107]. JAK2 V617F EpoR'ünün sitozolik domaini üzerinde yapı oluşturmakta ve Epo bağımlı sinyali uyarmaktadır [106]. JAK STAT sinyal yolağındaki negatif geri bildirim mekanizmasının bozulması ve hematopoetik öncül hücrelerde büyüme faktörlerine karşı aşırı bir sensitizasyonla birlikte kontrolsüz proliferasyona sebep olmaktadır [108]. JAK2 gen bölgesindeki translokasyonlar, delesyonlar, nokta mutasyonları ve insersiyonlar genin aktivitesindeki artışa neden olmaktadır [106].

2.4.3. JAK2 Mutasyonlarının Myeloproliferatif Hastalıklardaki Rolü ve Prognoza etkisi

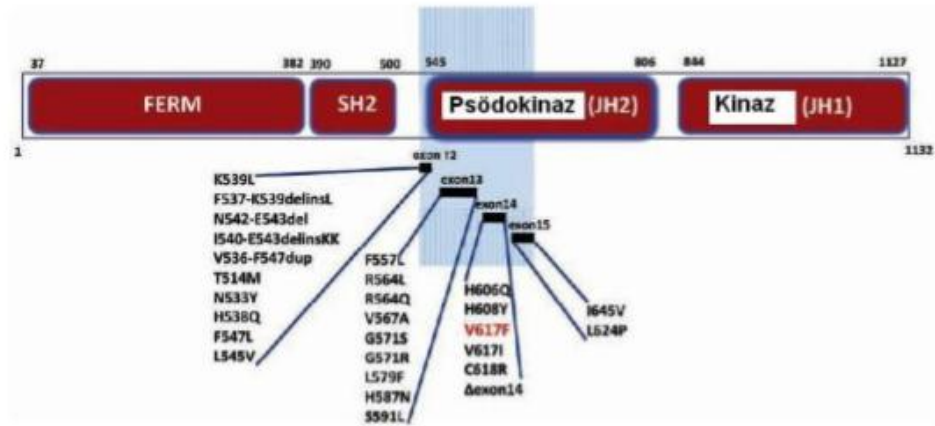
JAK2 geninin JH2 domaininde 617. pozisyonda oluşan ve V617F olarak ifade edilen mutasyon sitokinlere karşı duyarlılığa yol açacak şekilde tirozin fosforilasyonuna yol açmaktadır. Bu mutasyon kan hücrelerinde büyüme faktörlerine etkisine karşı aşırı duyarlılığa yol açmaktadır. Bu etki hastalıklarda ortaya çıkan bir veya birkaç kan hücre serisinde anormal artışını açıklamaktadır. JAK2 V617F mutasyonunun PV tanısı alan tüm olgularda, ET ve primer myelofibrozis tanısı alan olguların ise bazılarında bulunduğu bildirilmektedir.

Bu mutasyon kronik myeloproliferatif hastalıklar için önemli bir tanı aracıdır [109, 110]. Aşağıda Şekil 5’de Kronik myeloproliferatif hastalık patogenezinde JAK2’nin etkisi şematik olarak gösterilmiştir [11].



Şekil 4.Kronik myeloproliferatif hastalık patogenezinde JAK2 mutasyonu ve etkisi [11]

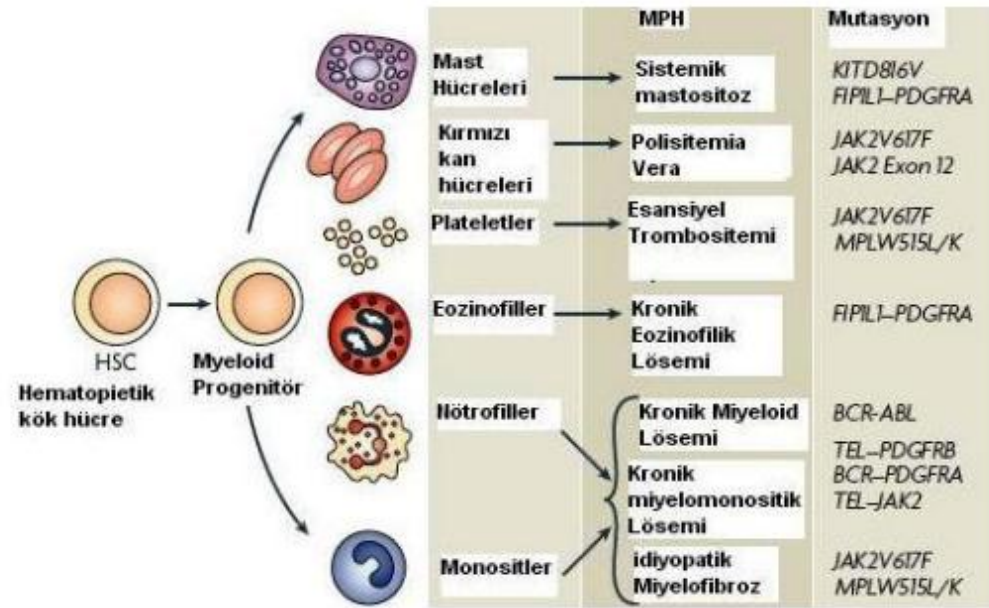
Aşağıdaki şekilde myeloproliferatif hastalıkların kliniğinde JAK2 V617F mutasyonunun haricinde kalan genetik kusurlar gösterilmiştir.



Şekil 5. JAK2 geninde V617F mutasyonu ve klinik yansıması olan diğer genetik kusurlar [100, 111]

2002 yılında PV'da sitogenetik kusurların 9p'de görülmesine 9p kromozomunun mitotik rekombinasyon ve mutasyonunun homozigot olmasının neden olduğu anlaşılmıştır. 2001-2004 yıllarında PV'nin JAK/STAT sinyalizasyonuna bağımlı olduğu ve bunun Epo bağımsız gelişime neden olduğu, mutasyonun STAT proteinlerini aktive ettiği saptanmıştır. 2005 yılında JAK2 V617F mutasyonu tanımlanmıştır [112].

JAK2 V617F mutasyonu ile ilgili eldeki mevcut bilgiler PV, ET, İMF patogenezinin aydınlanması için katkıda bulunmaktadır. Klinik patolojik olarak tespit edilmiş tanımlamalarda V617F mutasyonu haricinde ilişkilendirilen mutasyonlar vardır. Bunlar kalıtsal ve sonradan kazanılan allellerin tespiti için yol gösterici olmaktadır [113, 100] (Şekil 6).



Şekil 6. MPH'nin moleküler patogenezi ve sınıflandırılmasının şekilsel görünümü [113, 100]

FIPIL1: FH etkileşim protein-1; PDGFRα: Platelet büyüme faktörü α polipeptid reseptör; PDGFRβ: Platelet büyüme faktör β polipeptid reseptör; FGFR: Fibroblast büyüme faktör reseptörü; BCL-XL: B hücre lösemi/lenfoma-2; NFE2: Nükleer faktör eritoid -2; PRV1: Polisitemia rubra vera-1; MPL:Trombopoetin reseptör.

JAK2 V617F mutasyonu BCR/ABL negatif KMH olguları farklı bir bakış açısı getirmiş ve tanı kriterleri arasında yer almıştır [114]. Genetik bilgiler, MPH gelişiminin ailesel yatkınlık ile desteklendiğini göstermektedir. Ailesel MPH’da, JAK2 V617F mutasyonunun analizi eşey öncül hücrelerde yapılamamıştır. Ancak bazı akrabalar arasında geçiş gösteren somatik JAK2 V617F mutasyonu tanımlanmıştır. Yatkınlık allelleri JAK2 sinyalinin modüle eder hücrelere seçici avantaj sağlar. Fakat yakınlığa neden olan allelin konumu bilinmemektedir [115]. Allellerin varlığı PV ve ET’nin moleküler mekanizmasının birbirleriyle bağlantılı olduğunu göstermektedir. Allelin varlığı ile kan hücrelerindeki değişimler ile bu bağlantı tespit edilebilmektedir [116].

2.4.3. JAK2 Mutasyonunun Esansiyel Trombositoz İle İlişkisi

JAK2 mutasyonu olmayan klonal hücrelerde DNA hasarı olduğu zaman Bcl-XL proteininde deaminasyon ve hasarlı hücrenin apoptozisle ölümü meydana gelmektedir. Mutant JAK2 varlığında klonal hücrelerde DNA hasarı artmakta bununla birlikte normal Bcl-XL proteininin deaminasyon cevabı inhibe edilmektedir. Sonuçta apoptozis mekanizmasının çalışmamasıyla klonal proliferasyon meydana gelmektedir [117].

Yapılan çalışmalarda JAK 2 V617F mutasyonu ET’lu hastalarda %23-%75 oranında, ortalama %50’sinde pozitif olarak saptanmıştır. Çalışmalarda ET’de MPL mutasyonu %8.5, TET2 mutasyonu %5, ASXL1 mutasyonu %5-10 olarak bildirilmiştir [118, 119]. JAK2 mutasyonlarının PV’li olguların neredeyse tamamında, ET’li ve primer myelofibrozisli olguların ise yaklaşık olarak yarısında mevcut olduğunun bulunması, klasik myeloproliferatif hastalıklar için halen kullanılmakta olan tanısal ölçütlerin dahi yeniden gözden geçirilmesi gerekliliğini

de ortaya koymuştur [91]. JAK2 V617F mutasyonunun keşfi ile birlikte kemik iliği histolojisinin tanısai kullanımındaki artış ET’de trombosit sayısındaki eşik değerin 600.000/mm³’den 450.000/mm³’e çekilmesine neden olmuştur [91]

ET’li hastalarda arteryel, venöz trombozlar ve kanama komplikasyonları sık olarak görölmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda JAK 2 gen mutasyonu pozitif olan hastalarda, tromboz daha sık olmak üzere bu tür komplikasyonların daha fazla saptandığı görölmüştür ve bu hastaların daha fazla risk altında olduğuna dikkat çekilmektedir [120].

Yapılan metaanalizler de JAK2 mutasyonu varlığı ve/veya lökosit sayısının 10.000/mm³’den fazla olması tromboz için yüksek risk faktörleri olduğunu göstermiştir [121].

JAK2 mutasyonun varlığı myeloproliferatif hastalığa bağlı trombositozu reaktif trombositozdan ayırt etmede yararlı iken, ET, PV ve primer myelofibrozis gibi kronik MPH arasında bir ayırım sağlamamaktadır [122]. Kronik MPH’ın çoğu KML, PV, ET veya PMF olarak sınıflandırılabildeği halde, bazen sınıflandırma yapmak mümkün olmamakta ve bu durum sınıflandırılmayan tip kronik MPH olarak ifade edilmektedir [123].

2014 yılında Türkiye’den bir araştırmada baş ağrısı, vertigo, tinnitus, banyo sonrası kaşıntı, görme kaybı, pletore, splenomegali ve tromboz öyküsü gibi MPH bulgusu ile başvuran veya ek hastalığı olmayıp farklı şikayetlerle hastanenin farklı polikliniklerine başvuran ve tesadüfen tam kan sayım parametrelerinde anormallik saptanan MPH tanısı konmamış 201 hasta değerlendirilmiştir. JAK2 V617F mutasyon sıklığı %14.9 olarak saptanmıştır [124].

Duyarlı yöntemler kullanıldığında PV’li olguların tamamında ekzon 14 veya ekzon 12’de JAK2 mutasyonu gözlenir [125]. Birçok çalışmanın ortak

sonucuna göre PV'li olguların %95-97'sinde JAK2 geninin 14. ekzonunda V617F mutasyonu vardır. Bu mutasyon sekonder polisitemili olgularda ve sağlıklı kişilerde bulunmaz. Bu nedenle de bu mutasyonun varlığı PV'li olgular ile sekonder polistemili olguların ayırımı için önemlidir [126].

2008 yılında Taiwan'da yapılan bir araştırmada ET'li hastaların %59 [127], 2008 yılında Çin'de yapılan çalışmada ET'li hastaların %63 [128], 2009 yılında Asya'lı hastalar üzerinde yapılan araştırmada ET'li hastaların %34 [129], 2009 yılında Kore'de yapılan bir araştırmada ET'li hastaların %61 oranında [130], 2011 yılında Türkiye'de yapılan araştırmada ET'li hastaların %61 oranında JAK 2 gen mutasyonu pozitifliği saptanmıştır [120]

Bir başka çalışmada kemik iliği sitogenetik incelemesi ile Philadelphia kromozomu ve/ veya FISH analizi ile bcr-abl tespit edilmeyen, ancak PV, ET veya PMF olarak da tanımlanamayan beş sınıflandırılmayan tip kronik MPH olgusundan birisinde (%20) de JAK2 V617F mutasyonu saptanmıştır. Ancak bu mutasyonun varlığı veya yokluğu da kronik MPH alt tipleri arasında bir ayırım sağlamamaktadır. 101 MDS'li hastada yapılan çalışma hastaların %5'inde JAK2 V617F mutasyonu varlığını göstermiştir [131].

JAK 2 gen mutasyonu olan ET'li hastalarda arteriyel trombozun yüksek sıklıkta olduğunu saptamıştır. JAK 2 mutasyonu ile tromboz riskinin değerlendirildiği bir araştırma ET'li hastalarda tromboz riskinin 2 kat arttığını göstermiştir [6].

2010 yılında 106 ET hastasının retrospektif olarak araştırıldığı bir başka çalışma JAK 2 gen mutasyonu pozitifliğinin tromboz açısından riski artırdığını ayrıca $1022000/\text{mm}^3$ üzerinde trombosit değeri olan hastalarda JAK 2 gen

mutasyonu pozitifliğinin varlığında kanama açısından da risk oluşturduğuna dikkat çekmiştir [120].

ET’de JAK2 V617F ve MPL mutasyonlarının keşfi, klinik pratikte hastalığın sınıflamasına büyük katkıda bulunmuştur. Günümüzde ET teşhisinde JAK2 ve MPH mutasyonlarının rutin taranması önerilmesine rağmen bu mutasyonların prognostik önemleri henüz açık bir biçimde netleştirilmemiştir [93, 108].

2.5. KALRETİKÜLİN MUTASYONU

2.5.1. Kalretikülin mutasyonu tanımı

Kalretikülin mutasyonu hakkında bilgi vermeden önce kalretikülinin keşfi, yapısı ve özellikleri hakkında kısaca bilgi vermek yerinde olacaktır. Kalretikülin (CALR) ökaryotik hücrelerde yaygın olarak bulunan bir proteindir. İlk olarak endoplazmik retikulumda (ER) bulunmuştur. Bulunuşundan bu yana sitoplazma, hücre zarı ve hücre dışı madde gibi pek çok hücresel yapıda yer aldığı saptanmıştır. Başlıca işlevleri arasında organizmaların kalsiyum dengesini korumak ve diğer bazı proteinlerin düzgün bir şekilde katlanmasına aracılık etmek gelir.

CALR ilk olarak iskelet kasında 1974 yılında keşfedilmiştir [132]. Thomas Ostwald ve David MacLennan sarkoplazmik retikulumda kalsiyum bağlayan proteinleri karakterize etmek amacıyla yaptıkları çalışmada, tavşan iskelet kası sarkoplazmik retikulumundan yedi adet protein izole etmişlerdir. Bu proteinlerden yalnız birisinde kalsiyuma karşı yüksek afinite saptadılar ve bu proteine yüksek afiniteli kalsiyum bağlayıcı protein (HABP) adını verdiler.

15 yıl sonra moleküler biyolojideki gelişmeler sayesinde HABP’nin amino

asit dizisi karakterize edildi [133]. Diğer kalsiyum bağlayıcı proteinlerle karşılaştırıldığında, HABP dizisinin calregulin, CRP55, CaBP3, ERp60, ve calsequestrin-benzeri proteinle eşdeğer olduğu görüldü [134]. Araştırmacılar bu proteinin adını CALR olarak belirlediler [135]. Daha önce kalretikülin ER’de saptanmıştı [136] ve CALR de aynı organelin luminal yüzeyinde bulundu [137] . Benzer yapı ve işlevde birçok protein farklı araştırma gruplarınca karaciğer ve beyin gibi kas dokudan farklı dokularda da keşfedildi. Bir isimlendirme karışıklığı olmaması adına tüm laboratuvarlar bu konuda bir görüş birliğine vararak bu protein için CALR adında bir fikir birliği oluştu. Bu isim proteinin kalsiyum bağlama gücünü ve sarkoplazmik/endoplazmik retikulumdaki varlığını işaret etmekteydi. Daha sonraki çalışmalarla CALR’nin amino asit dizisinin diğer canlı türlerinde de korunduğu ve böylece CALR’nin hücre fizyolojisinde çok önemli bir rol oynadığı ileri sürüldü. Sonuç olarak CALR’nin, eritrosit ve mayalar hariç, tüm ökaryotlarda bulunduğu anlaşıldı [138].

CALR’nin amino asit dizisine ilişkin çalışmalar CALR’in üç bölgesi olduğu ortaya çıktı [138]. Birinci bölge amino asit (N terminal) ucu olup yüksek oranda korunmuş bir bölgedir. Bu kısım şaperon işlevi olan diğer proteinlerde ve başka proteinlerle etkileşen proteinlerde de saptanmıştır. CALR bu uçta kesilebilir bir sinyal dizisi taşır ki bu dizi ER’ye yönelen proteinlerde bulunur. Başka bir deyişle söz konusu sinyal dizisinin varlığı CALR’nin sentezlenmesini takiben ER’ye taşındığı anlamına gelir. İkinci bölge merkezi ya da P bölgesidir. Bu kısım prolin amino asitinden zengindir. Bu bölgede yüksek afiniteli bir kalsiyum bağlama kısmı ve lektin benzeri bir şaperon kısmı bulunur. Buna göre ER’deki çok sayıda protein gibi CALR, kalsiyum metabolizmasına katılır ve glikoproteinlerle etkileşir. Üçüncü bölge ise karboksil (C) ucudur ve asidik amino

asitlerden zengin olduğu için CALR'ye yüksek kalsiyum bağlama afinitesi kazandırır. Bu bölge KDEL sinyalini barındırır. Bu sinyal lizin (K), aspartat (D), glutamat (E) ve lösin (L) olmak üzere 4 amino asitlik bir sinyaldir. Bu sinyal ER'deki pek çok çözümlür proteinde bulunur ve bu organeldeki proteinler için bir retansiyon sinyali olarak görev yapar. Bu üç bölgenin tamamı CALR'nin bir ER proteini olduğunu ortaya koyar [139].

Kalsiyum regölasyonu ve diğör mekanizmalar aracılığıyla CALR'nin gen aktivitesi, hücre büyümesi, bölünmesi, göçü, hücre adezyonu ve apoptozis regölasyonu gibi çok sayıda işlevi bulunur. Yara iyileşmesi ve immün sistem için önemli işlevler görür. CALR gen yokluğu embriyonik olarak ölümcüldür [139].

CALR geni 19p13.3'de bulunur ve 9 ekzon içerir. 48-kDa'luk üç bölgesi bulunan CALR proteini kodlar: amino terminal N-bölgesi (1-180. rezidüler), merkezi prolinden zengin P-bölgesi (181-290. rezidüler) ve karboksil uç C-bölgesi (291-400. rezidüler).

CALR mutasyonları yüksek oranda heterojendir ve bugüne değin 50 farklı tipi bildirilmiştir ve bütün mutasyonlar birkaç tekrarsız nokta mutasyonu dışında insersiyon ya da delesyon şeklinde ekzon 9'da görülür [140]. En sık görülen 52-bp delesyonu (p.L367fs*46) ve 5-bp insersiyonu (p.K385fs*47) mutasyonların %80'ini oluşturur. Klampfl bunlardan birincisini tip 1 (CALRdel52), ikincisini ise tip 2 (CALRins5) olarak tanımlamıştır [141]. PMF'de ET'ye göre tip 1 mutasyon sıklığı artmıştır ve bu artış tip 1 mutasyonla myelofibrotik transformasyon arasında bir ilişkiyi düşündürmektedir [142]. Mutasyonların çoğu heterozigottur, homozigot CALR mutasyonu çok nadirdir ve tamamı 5-bp insersiyonudur [141].

Yine de bilinen tüm mutasyonların bir çerçeve kayması (frameshift) sonucu eşsiz bir alternatif okuma çerçevesine neden olarak en az 36 amino asitlik yeni bir C terminal protein oluşumuyla sonuçlandığı tahmin edilmektedir. Bu yeni dizi çok sayıda pozitif yüklü amino asit barındırır. Negatif yüklü doğal tip (wild-type) proteinle uyumsuz ve ER sinyal peptidini bozarak CALR'nin subselüler yerleşimi, kararlılığını ve işlevini bozabilir.

2.5.2. Kalretikülin mutasyonu; Myeloproliferatif hastalıklardaki rolü ve prognoza etkisi

MPN'li hastaların çoğunda kazanılmış JAK2 (JAK2 V617F) mutasyonu bulunur. JAK2'den farklı genlerde de mutasyonlar saptanmıştır. Bunlar arasında epigenetik modifiye edicilerden olan TET2 [143], DNMT3A [144], ASXL1 [145] ve EZH2'de [146] görülen mutasyonlar ve hemopoetik sinyalleşmede görev alan genlerdeki mutasyonlar [147] sayılabilir.

2013 yılında ilk defa JAK2 ve MPL mutasyonu olmayan ET ve PMF hastalarında yeni nesil dizi analizi ile CALR gen mutasyonu bildirilmiştir [141]. Keşfinden bu yana CALR'nin moleküler ve patolojik rolleri ve bunların klinik etkileri hemapatoloji alanında sıcak bir araştırma alanı olmuştur. Bunun sonucunda 2014 yılında BCR-ABL1-negatif MPN'ler için WHO tanı kriterleri arasında CALR mutasyon durumunun da göz önünde bulundurulmasını teklif etmiştir [148].

Yapılan bir çalışmada myeloproliferatif hastalığı olan hastaların %15'inde CALR somatik mutasyonu saptanmıştır [149]. Farklı bir çalışma da benzer oranlar bildirmiştir [150]. MPN'li hastalardaki tip 1 ve 2 CALR mutasyonları sonucunda oluşan mutant CALR proteinleri kalitatif olarak farklı MPN fenotipleriyle ilişkili olabilir [141]. CALR nokta mutasyonları (E381A and D373M) çerçeve içi delesyonlarda (E381_A382>A, D397_D400>D, D400_K401>D ve

E405_V409>V) MPN şüphesi olan ve JAK2 mutasyonlu MPN'lerde saptanmıştır. Bu CALR mutasyonlarının MPN ilişkili diğer genler olan MPL, CSF3R, ASXL1 ve ZRSR2 ile birlikte bulunduğu görülmüştür. Günümüzde, CALR nokta mutasyonları ve çerçeve içi delesyonların MPN moleküler patojenezindeki rolü henüz tam anlaşılmamıştır. Sıklıkla JAK-STAT sinyal yolağı mutasyonlarıyla beraber görülürler ve JAK2 ET hastaların hastalık fenotipini etkilerler. Bu klasik olmayan CALR mutant proteinlerin MPN patojenezinde katkıları olabileceği düşünülmektedir [151]. MPN'lerin yaklaşık %5 ila 10'u ise JAK2 , MPL ve CALR açısından negatiftir [152].

2.5.3. Kalretikülin mutasyonunun esansiyel trombositoz ve myelofibrozele ilişkisi

CALR mutasyonlarından tip 1 ve tip 2 ET ve PMF'li hastalarda en sık görülen mutasyonlardır. PMF'de tip 1 mutasyonun tip 2'ye göre daha sık görüldüğü bildirilmiştir [153].

PMF'li hastalarda CALR, JAK2 ve MPL mutasyon sıklığı ve bu mutasyonların prognoz ve kliniğe etkilerini inceleyen bir çalışmada, 617 hastanın 140'ında (%22,7) CALR mutasyonu saptanmıştır [142]. Çalışmada CALR mutasyonlu hastaların ortalama sağ kalım süreleri diğer mutasyonlara göre belirgin şekilde daha uzun bulunmuştur [141]. Marty ve ark. CALR mutasyonu tiplerinin arasında trombositoz düzeyleri ve myelofibroze transformasyon açısından fark olup olmadığını araştırmışlardır. Sonuçta tip 2 mutasyonun tip 1'e göre daha ılımlı megakaryosit proliferasyonuna neden olduğu, ayrıca tip 2 mutasyonun tip 1'e göre daha yüksek sıklıkla fibroze yol açtığı görülmüştür [154]. Bu bulgu tip 2 için %70, tip 1 için %13'lük bir fibrozis oranı bildiren literatürle de uyumlu bulunmuştur [153, 155]. Öte yandan post-ET myelofibroze sıklığı tip 2 mutasyonlularda tip 1'le karşılaştırıldığında daha yüksek oranda (10

yılda %12) saptanmıştır [155].

Qiao ve ark. ET'li 222 hastanın 69'unda(%31,1) ve PMF'li 33 hastanın 4'ünde(%12.1) oranında CALR mutasyonu saptamıştır [156]. Mutasyon tiplerine göre yapılan değerlendirmede, bu hastalarda en sık görülen mutasyonlar yine tip 1 ve 2 mutasyonlar olarak saptanmıştır. ET hastalarında bu iki mutasyon sıklığı sırasıyla %14 ve %10.4 olarak bulunurken, PMF hastalarında sırasıyla %3.0 ve %6.1 olarak tespit edilmiştir. Bu iki mutasyonun görülme sıklığı arasındaki fark ET ve PMF'li hastalarda istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.



3.MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Araştırmanın Amacı

Çalışmamızın birincil amacı Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Hematoloji Kliniği'nde izlenen ET ve MF hastalarında JAK2 mutasyonu ve kalretikülin mutasyon sıklığının araştırılması amaçlanmıştır. JAK2 veya kalretikülin mutasyonu olan ve olmayan hastaların tromboembolik olaylar başta olmak üzere kanama, akut lösemi ve myelofibroze dönüşümü, yaş, cinsiyet ve laboratuvar bulguları ile olan ilişkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

3.2. Örneklem

Araştırmanın örneklemi Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Hematoloji Kliniği'nde tedavi gören 80 ET ve PMF'li hastadan oluşmaktadır. Hastalar yaşayan hastalar arasından seçilmiştir.

3.3.Yöntem

Bu çalışma ileriye dönük kesitsel bir çalışmadır.Gazi Üniversitesi Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır.(No:13 Gün:11/01/2016)

Kalretikülin mutasyon analizi dışında araştırmada kullanılacak parametrelerin hepsi rutin istenen tahliller dışında JAK2 mutasyon analizi,yaş,cinsiyet,dalak, karaciğer büyüklüğü,tam kan sayımı,biyokimya, kemik iliği incelemeleri,yapısal semptomların olması, ek hastalıkları olması,kanama,tromboz,lösemiye dönüşüm ve kaşıntı olup olmamasıdır.Hastaların periferik kan örnekleri alınmıştır. Buna göre öncelikle hasta örneklerinden DNA izolasyonu yapılmış ve elde edilen DNA'da kalretikülin mutasyonu bakılmıştır.

Kalretikülin mutasyon analizi için yöntem aşağıdaki gibidir:

- DNA izolasyonu
- PZR
- PZR sonrası saflaştırma
- Dizi PZR'ı
- Dizi ürünlerinin temizlenmesi
- DNA dizi analizi cihazında dizi ürünlerinin yürütülmesi
- Analiz
- **Kalretikülin Çalışması Materyal Metod:**
- Periferik kan örneklerinden DNA izolasyonu yapıldı. Qiagen- QIAmp DNA Blood Mini Kit (50) (Referans no:51104) kullanılarak kit talimatına göre izolasyon gerçekleştirilerek,
- DNA örneklerinin kalitesi NanoDrop cihazı kullanılarak kontrol edilip, yaklaşık 100 ng DNA elde edilmiş olduğundan emin olunduktan sonra Real Time PZR miksi hazırlanarak,
- Real Time PZR için Qiagen CALR RGQ PZR Kit (24) kullanılarak kit talimatına göre miks ve DNA örnekleri karıştırılıp Qiagen Rotor Gene Real Time PZR cihazına yükleme yapılmıştır.
- Her bir örnek için 3 kontrol kullanılmış ve iki majör 5 minör olmak üzere 7 mutasyon taranmıştır.
- Analizler kit talimatına göre yapılmış ve sonuçlar kalitatif olarak verilmiştir.

3.4. Verilerin Analizi

Hastaların verileri Microsoft Office Excel programına aktarıldı. Veriler SPSS 22.0 (Statistical Package for Social Science) programı ile analiz edilmiştir. Değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov Smirnov testi ile değerlendirildikten sonra normal dağılım gösteren değişkenler T testi ile, normal dağılıma uymayan değişkenler de Kruskal Wallis testi ile karşılaştırılmıştır.

Kategorik değişkenlerin analizinde Ki-Kare testi uygulanmıştır. Veriler ortalama, standart sapma, standart ortalama hata, minimum ve maksimum değerler ile yüzde olarak tablolar halinde gösterilmiştir. Değişkenlerin karşılaştırmasında sonuçlar %95 güven düzeyinde ele alınarak $P<0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

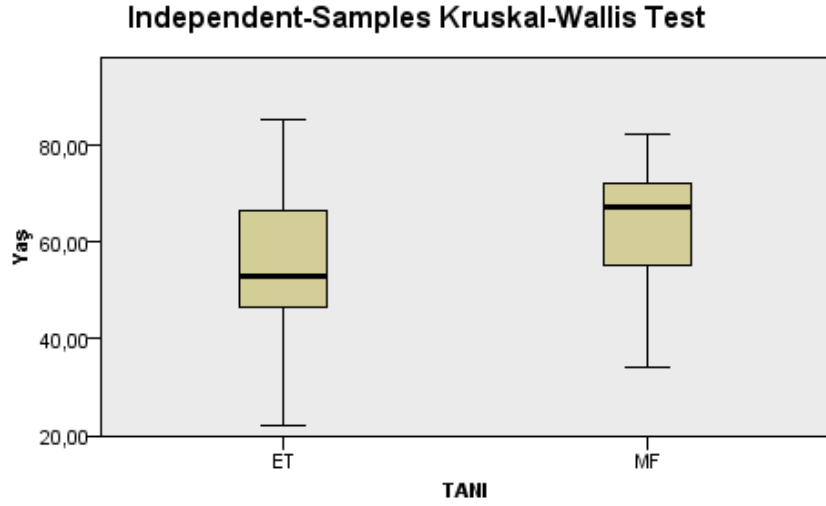
4. BULGULAR

Tablo 6. Olguların Cinsiyetlerine Göre Dağılımı ve Yaş Ortalamaları

Demografik Özellikler		Kişi Sayısı ve Oran	TANI		Toplam
			ET	MF	
Cinsiyet	Kadın	n	35	16	51
		%	%66	%59,3	%63,8
	Erkek	n	18	11	29
		%	%34	%40,7	%36,2
Toplam		n	53	27	80
		%	%66,2	%33,8	%100
Yaş		Ortalama±SS	55,8±15,1	63,9±11,8	58,6±14,5

Tablo 6’da araştırmaya alınan olguların tanılarına göre demografik özelliklerinin dağılımı gösterilmiştir. Tabloda görüldüğü gibi, araştırmaya alınan olguların %63,8’i (n=51) kadın, %36,2’si (n=29) erkektir. ET tanılı olguların %66’sı (n=35) kadın, %34’ (n=18) erkek, MF tanılı olguların %59,3’ kadın (n=16), %40,7’si (n=11) erkektir. Araştırma kapsamındaki olguların(n=80) yaş ortalaması 58,6 $\pm$ 14,5’dir. ET tanılı olguların yaş ortalaması 55,8 $\pm$ 15,1, MF tanılı olguların yaş ortalaması 63,9 $\pm$ 11,8’dir. Olguların cinsiyeti ile tanıları arasında

istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı belirlenmiştir ($P>0,05$), MF’li olguların yaş ortalaması ET tanılı hastalarinkinden daha yüksektir ($P<0,05$), (Şekil 8).



Şekil 8.ET ve MF’de hastaların yaşlarının karşılaştırması

Tablo 7. Hastalık tanısına göre JAK2 mutasyonu dağılımı

JAK2 Mutasyonu		Kişi Sayısı ve Oran	TANI		Toplam
			ET	MF	
JAK2 MUTASYONU	Negatif	n %	21 % 39,6	11 %4,7	32 %40
	Pozitif	n %	32 %60,4	16 %59,3	48 %60
Toplam		n %	53 %66,2	27 %33,8	80 %100

Tablo 7’de araştırmaya alınan tüm olguların tanılarına göre dağılımı gösterilmiştir. Tabloda görüldüğü gibi, araştırma kapsamındaki 80 olgunun %

66,2'si (n=53) ET tanısı almış, %33,8'i (n=27) MF tanısı almıştır. Toplam 80 olgunun %60 'ında (n=48) JAK2 mutasyonu saptanmış, %40'ında (n=32) JAK2 mutasyonu saptanmamıştır. ET tanısı alan olguların %60,4(n=32) JAK2 mutasyonu saptanmış, %39,6'sında (n=21) JAK2 mutasyonu saptanmamıştır. MF tanısı almış olguların %59,3'ünde (n= 16) JAK2 mutasyonu saptanmış, %40,7'sinde (n=11) JAK2 mutasyonu saptanmamıştır. JAK2 mutasyonu olan olguların cinsiyetlerine göre dağılımı ile yaş ortalamaları aşağıda Tablo 8'de gösterilmiştir.

Tablo 8. JAK2 mutasyonlu olguların cinsiyetlerine göre dağılımı ve yaş ortalamaları

Demografik Özellikler		Kişi Sayısı ve Oran	JAK2 Mutasyonu		Toplam
			Negatif	Pozitif	
Cinsiyet	Kadın	n %	21 %41,2	30 %58,8	51 %100
	Erkek	n %	11 %37,9	18 %62,1	29 %100
Toplam		n %	32 %40	48 %60	80 %100
Yaş		Ortalama±SS	56,9±15,2	59,7±14	58,6±14,5

JAK2 mutasyonu olan 51 olgunun %58,8'i (n=30) kadın, %62,1'i (n=18) erkektir. JAK2 mutasyonu olan olguların yaş ortalaması 59,7±14 olup, JAK2 mutasyonu negatif yaş ortalamasından (ort. 56,9±15,2) daha yüksektir. JAK2 mutasyonu olan ve olmayan olgularda cinsiyet ve yaş olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (P=492>0,05; P=777>0,05).

Tablo 9. ETve MF hastalarının JAK2 mutasyon durumuna göre laboratuvar bulgularının karşılaştırması

Değişken	ET N=53				P
	JAK2 mutasyon negatif n= 21		JAK2 mutasyon pozitif n=32		
	Ortalama±Std. Hata	Ortanca	Ortalama	Ortanca	
Platelet	889190,48±84570	8790000	7499608±41307	745800	0,108
Beyaz Küre	9472,43±971	8720	10162±695	9540	0,556
Hemoglobin	12,68±0,40	13	13,6742±0,25	14	0,030*
Hematokrit	38,29±1,1	38,70	41,70±0,70	42,15	0,008*
Laktat dehidrogenaz	289,19±16,23	281	270,16±16,46	255	0,436
Sağ Kalım (ay)	39,81±11,1	21	42,13±6,14	37,50	0,844
Değişken	MF N=27				P
	JAK2 mutasyon negatif n= 11		JAK2 mutasyon negatif n=16		
	Ortalama±Std. Hata	Ortanca	Ortalama	Ortanca	
Platelet	372254,55±74545	301400	346681,25±64665	269000	0,799
Beyaz Küre	8278,18±1311	7670	12264,25±2090	9375	0,208
Hemoglobin	10,9182±0,411	11,3000	11,2625±0,613	11,4000	0,677
Hematokrit	33,11±1,196	33,8000	34,9313±2,035	35,5000	0,499
Laktat dehidrogenaz	478,09±70,989	548	488,1250±51,484	407,500	0,907
Sağ Kalım(ay)	61,363±12,96	54	33,2857±10,23	22,5000	0,098

*P<0,05

Tablo 9’da ET’li hastalarında JAK2 mutasyonu pozitif olanlar ile JAK2 Mutasyonu negatif olanların laboratuvar bulgularına yer verilmiştir. Tabloda görüldüğü gibi, bu hastaların platelet, beyaz küre, laktat dehidrogenaz ve sağ kalım süreleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı ($P>0,05$), hemoglobin ve hematokrit değerleri arasında anlamlı bir farklılık olduğu, JAK2 mutasyonu olan ET hastalarının hemoglobin ve hematokrit değerlerinin daha yüksek olduğu anlaşılmıştır ($P=0,030<0,05$ ve $P=0,008<0,05$). MF’li hastalarda JAK2 mutasyonu pozitif ve negatif olan hastaların laboratuvar değerleri arasındaki istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır ($P>0,05$).

Tablo 10.ET’lı hastaların JAK2 mutasyon durumuna göre laboratuvar bulgularının karşılaştırması

Değişken	ET n=53				P
	JAK2 mutasyon nrgatif n= 21		JAK2 mutasyon pozitif n=32		
	Yok n,%	Var n,%	Yok n,%	Var n,%	
Kİ fibrozisi(grade retikülin)	15 %71,4	6 %28,6 Grade 1/1 Artış: 5(%23,8) Grade 3/3 Artış: 1 (%4,8)	13 %40,6	19 %59,4 Grade 1/3 Artış:15(%47) Grade 2/3 Artış:2(%6,2) Grade 1-2/3 Artış: 2 (%6,2)	0,084
Splenomegali	17 %81	4 %19	25 %78,1	7 %21,9	0,804
Hepatomegali	20 %95,2	1 %4,8	28 %87,5	4 %12,5	0,346
Kanama	20 %95,2	1 %4,8	29 %90,6	3 %9,4	0,475
Tromboz	18, %85,7	3 %,11,3	29 %90,6	3 %9,4	0,482
Yapısal Semptomlar	9 %42,9	12 %57,1	12 %37,5	20 %62,5	0,697
Tedavi	0	21 %100	2 %6,2	19 %93,8	0,244
Kaşıntı	18 %85,7	3 %14,3	25 %78,1	7 %21,9	0,490
Lösemiye Dönüş	20 %95,2	1 %4,8	32 %100	0	0,213
Ek Hastalık	13 %61,9	8 %38,1	19 %59,4	13 %40,6	0,854

Tablo 10’da gösterildiği gibi, ET hastalarında JAK2 mutasyonu olan ve olmayan hastaların, splenomegali, hepatomegali, kanama, tromboz, yapısal semptomlar, aldıkları tedaviler, kaşıntı, ve hastalığın lösemiye dönüş durumlarının arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı belirlenmiştir ($P>0,05$). KI’ndeki fibrozisin anlamlı olarak farklı olduğu saptanmıştır. ($P=0,084$).

Tablo 11. MF hastalarının JAK2 mutasyon durumuna göre laboratuvar bulgularının karşılaştırması

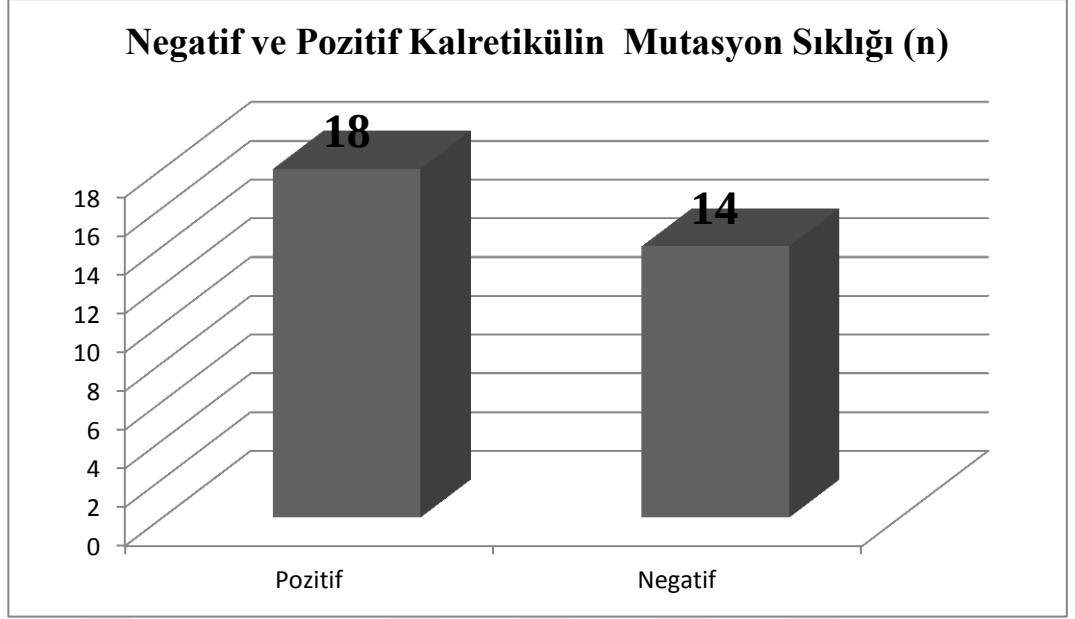
Değişken	MF n=27				P
	JAK2 mutasyon negatif n= 11		JAK2 mutasyon pozitif n=16		
	Yok n,%	Var n,%	Yok n,%	Var n,%	
Kİ fibrozisi(grade retikülin)		Grade 2/3 Artış: 3(%11,1) Grade 3/3 Artış: 8(%29,6)		Grade 2/3 Artış:5(%18,5) Grade 3/3 Artış: 11(%40,7)	0,824
Splenomegali	3 %11,1	8 %29,6	1 %3,7	15 %55,6	0,131
Hepatomegali	7 %25,9	4 %14,8	7 %25,9	9 %33,3	0,310
Kanama	9 %33,3	2 %7,40	15 %55,6	1 %3,7	0,296
Tromboz	10 %37	1 %3,7	15 %55,6	1 %3,7	0,342
Yapısal Semptomlar	2 %7,4	9 %33,3	5 %18,5	11 %40,7	0,446
Tedavi	6 %22,2	5 %18,52	3 %11,1	13 %48,15	0,068
Kaşıntı	11 %40,7		16 %59,3		
Lösemiye Dönüş	10 %37	1 %3,7 AML dönüşümü	14 %55,6	1 %3,7 AML dönüşümü	0,681
Ek Hastalık	9 %33,3	2 %7,4	12 %44,4	4 %14,81	0,695

Tablo 11’de gösterildiği gibi, MF hastalarında JAK2 mutasyonu olan ve olmayan hastaların, kemik iliği fibrozisi, splenomegali, hepatomegali, kanama, tromboz, yapısal semptomlar, aldıkları tedaviler, kaşıntı, ve hastalığın lösemiye dönüş durumlarının arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı belirlenmiştir ($P>0,05$).

Tablo 12. Kalretikülin mutasyon sıklığı

Kalretikülin Mutasyonu	Sıklık ve Oran n/%	Toplam n/%
Kalretikülin Mutasyonu Negatif	14	14
	% 43,8	% 17,5
Kalretikülin Mutasyonu Pozitif	18	18
	% 56,2	% 22,5
Toplam	32	32
	% 100,0	%40

Araştırmaya alınan 80 hastada kalretikülin mutasyonu varlığı araştırılmıştır. Laboratuvar ortamında yapılan araştırma sonucunda Tablo 12’de ve Şekil 9’da gösterildiği gibi, 32 hastanın 18’inde (%56,2) kalretikülin mutasyonu pozitif olarak saptanmış, 14’ünde (%43,8) kalretikülin negatif olarak saptanmıştır. Kalretikülin mutasyonu saptanan hastaların oranı, araştırma kapsamında olan ve JAK2 pozitif ve negatif mutasyon olan toplam 80 hastanın %22,5’ini(n=14), kalretikülin mutasyonu negatif olan hastalar ise toplam hastaların %17,5’ini (n=14) oluşturmaktadır.



Şekil 9. Kalretikülin Sıklığı

Tablo 13. Kalretikülin mutasyonu ile cinsiyet karşılaştırması

MF ve ET, MF, ET			CALR MUTASYONU		Toplam	P
			Negatif	Pozitif		
MF VE ET’li Hastalar	Kadın	n	6	15	21	0,022*
		%	42,9	83,3	65,6	
	Erkek	n	8	3	11	
		%	57,1	16,7	34,4	
Toplam		N	14	18	32	
		%	100	100	100	
MF’li Hastalarda	Kadın	n	2	6	8	0,223
		%	50	85,7	72,7	
	Erkek	n	2	1	3	
		%	50	14	2	
Toplam		n	4	7	11	
		%	100	100	100	
ET’li Hastalarda	Kadın	n	4	9	13	0,080
		%	40	81	61,9	
	Erkek	n	6	2	8	
		%	60	18,2	38,1	
Toplam		n	10	11	21	
		%	100	100	100	

* P<0,05, N:Kişi Sayısı

Tablo 13’de gösterildiği gibi, araştırma kapsamındaki (n=32) kadın hastalarda kalretikülin pozitif mutasyon oranı (15; %83,3) erkeklere göre daha fazladır (3;%16,7). Kalretikülin mutasyonu görülen kadın hasta sayısının erkek hasta sayısına göre daha fazla olduğu belirlenmiş olup bu farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olduğu (P=0,022) saptanmıştır.

Tablo 14. Kalretikülin mutasyonu olan ve olmayan hastaların yaşa göre karşılaştırması

	CALR MUTASYONU	n	Yaş Ort.	SS.	SOH	P
MF ve ET’li Hastalarda	Negatif	14	56,65	17,24	4,61	0,805
	Pozitif	18	57,06	13,99	3,30	
MF’li Hastalarda	Negatif	4	68,75	15	7,50	0,298
	Pozitif	7	60	15,4	5,83	
ET’li Hastalarda	Negatif	10	51,80	16,23	5,13	0,607
	Pozitif	11	55,18	13,41	4,04	

n: Kişi Sayısı, SS: Standart Sapma, SOH: Standart Ortalama Hata, P: Anlamlılık

Tablo 14’deki bulgulardan kalretikülin mutasyonunun negatif veya pozitif olmasının yaşa göre farklılaşmadığı anlaşılmaktadır (P>0,05).

Tablo 15. JAK2 ve CALR mutasyonu olan ve olmayan hastaların laboratuvar bulguları

Değişken	JAK2 Mutant Pozitif n=48 (%60)	CALR Mutant Pozitif n= 18 (%22,50)	JAK2 VE CALR Mutasyonu Negatif n=14(%17,50)	P
Platelet	61530±4430	720517±96744	699893±	0,500
Beyaz Küre (Ortanca)	9540	8265	7685	0,214
Hemoglobin	12,853±0,31	11,6444±0,421	12,62±0,51	0,103
Hematokrit	39,446±0,93	35,300±1,183	38,06±1,41	0,048*
Laktat dehidrogenaz	342,81±25,02	392,333±32,38	305±54,55	0,352
Sağ Kalım (ay)	39,435±5,26	55,50±11,32	36,57±13,15	0,318

Tablo 15’de JAK2 mutasyonu, CALR mutasyonu ve her 2 mutasyonun saptanmadığı hastalarda hastalık için önemli laboratuvar değerlerinin karşılaştırılması gösterilmiştir. JAK2 mutasyonu olan, CALR mutasyonu olan, JAK2 ve CALR mutasyonu olmayan hastaların platelet, beyaz küre, hemoglobin, laktat dehidrogenaz değerleri, aylık sağ kalım süreleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık ($P>0,05$) yok, ancak hematokrit değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olduğu ($P=0,048<0,05$) , JAK2 mutasyonu olan (Ort. $39,446\pm0,93$), JAK2 ve CALR mutasyonu olmayanlarda ($38,06\pm1,41$) hematokrit değerlerinin CALR mutasyonu olanlardan daha yüksek olduğu anlaşılmıştır.

Tablo 16. JAK2 ve CALR mutasyonu olan ve olmayan hastaların klinik bulguları

Değişken		JAK2 Mutant Pozitif n=48 (%60)	CALR Mutant Pozitif n=18 (%22,50)	JAK2 ve CALR Mutasyonu Negatif n=14 (%17,50)	P
Kİ fibrozisi (grade retikülin)	Grade 1/3 Artış	15 %21,2	3 %16,7	2 %14,3	0,386
	Grade 2/3 Artış	11 %22,9	3 %16,7	0	
	Grade 3/3 Artış	11 %22,9	5 %27,8	4 %28,6	
	Grade 1-2/3 Artış	2 %4,2	0	0	
Splenomegali		22 %45,8	8 %44,4	4 %28,6	0,507
Hepatomegali		13 %27,1	4 %22,2	1 %7,1	0,290
Kanama		44 %91,7	0	3 %21,42	0,333
Tromboz		4 %9,10	2 %11,11	2 %14,30	0,192
Yapısal Semptomlar		31 %64,6	12 %66,7	9 %64,3	0,986
Tedavi		43 %97,72	15 %83,33	11 %78,57	0,123
Kaşıntı		7 %14,6	1 %5,6	2 %14,3	0,599
Lösemiye Dönüş		2 %4,16	1 %5,6	1 %7,14	0,599
Ek Hastalık		17 %36,4	5 %27,8	5 %35,7	0,914

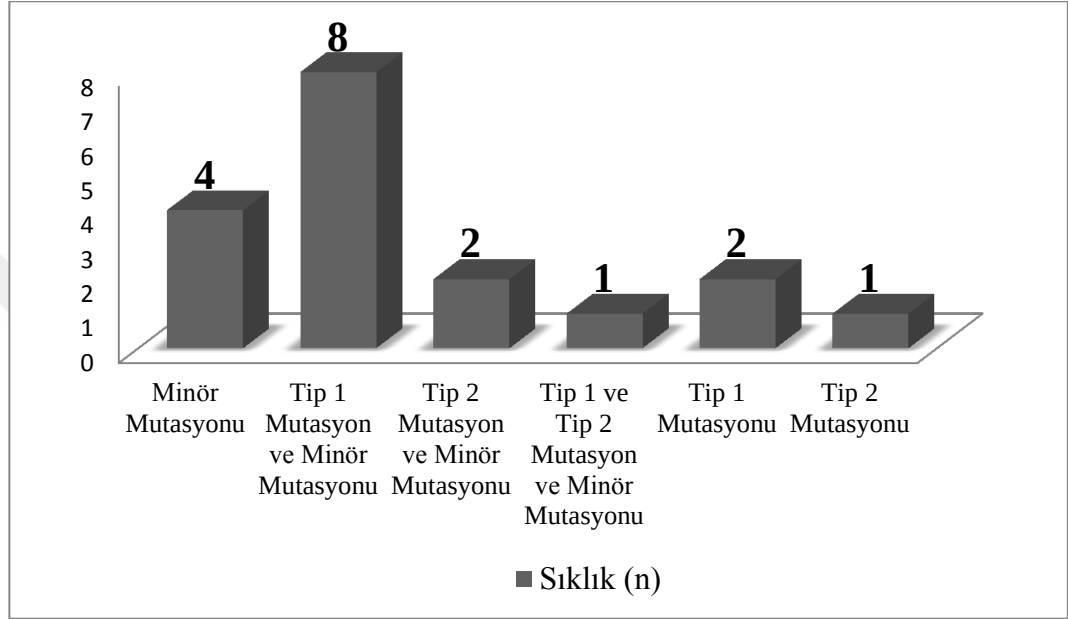
Tablo 16’da JAK2 mutant, CALR mutant ve her 2 mutasyonun saptanamadığı hastalarda hastalık için önemli özellik ve değerlerin karşılaştırılması gösterilmiştir. JAK2 mutasyonu olan, CALR mutasyonu olan, JAK2 ve CALR mutasyonu olmayan hastaların kemik fibrozisi, splenomegali, hepatomegali, kanama, tromboz, yapısal semptomlar, tedavi, kaşıntı, lösemiye dönüş, ek hastalık görülme sıklığı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı belirlenmiştir ($P>0,05$).

Tablo 17.Kalretikülin mutasyonu tipleri sıklığı

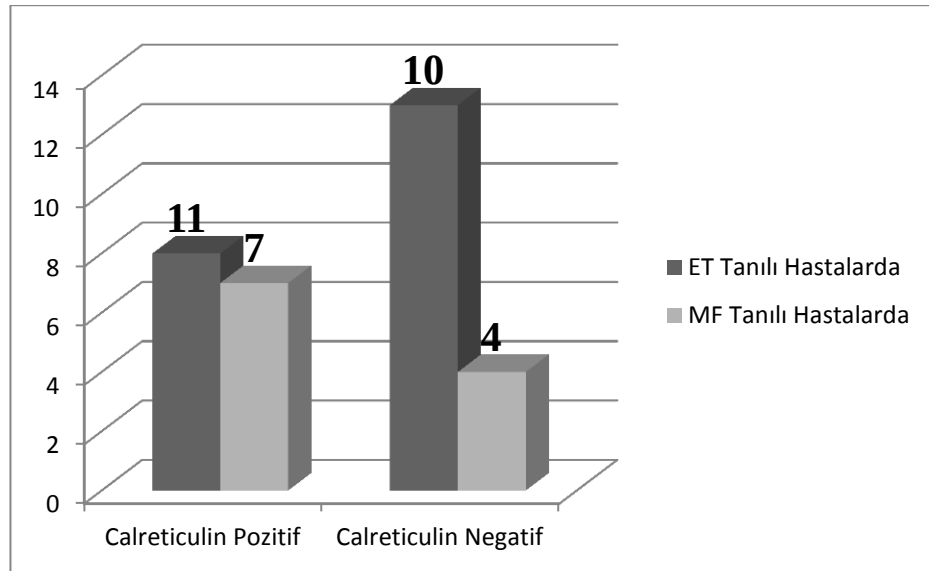
Sonuç	JAK2 Negatif İçinde (n=32) Sıklık ve Oran	Toplamda (n=80) Sıklık ve Oran	CALR Mutasyonu Pozitif (n=18)
CALR Mutasyonu Negatif	14 %43,8	%17,5	
CALR Mutasyonu Pozitif	18 %56,2	%22,5	
Minör Mutasyonu	4 %12,5	%5	%22,2
Tip 1 Mutasyon ve Minör Mutasyonu	8 %25	%10	%44,4
Tip 2 Mutasyon ve Minör Mutasyonu	2 %6,2	%2,5	%11,1
Tip 1 ve Tip 2 Mutasyon ve Minör Mutasyonu	1 %3,1	%1,3	%5,6
Tip 1 Mutasyonu	2 %6,2	%2,5	%11,1
Tip 2 Mutasyonu	1 %3,1	%1,3	%5,6

Tablo 17’de ve aşağıda Şekil 10’da kalretikülin mutasyonu pozitif olanlarda mutasyon tiplerinin sıklığı verilmiştir. Kalretikülin mutasyon pozitif olan 18 (%56,2) hastadan 4’ünde (%12,5) Minör Mutasyonu, 8’inde (%25) Tip 1 Mutasyon ve Minör Mutasyonu, 2’sinde (%6,2) Tip 2 Mutasyon ve Minör Mutasyonu, 1’inde (%3,1) Tip 1 ve Tip 2 Mutasyon ve Minör Mutasyonu , 2’sinde (%6,2) Tip 1 Mutasyonu, 1’inde %3,1 Tip 2 Mutasyonu saptanmıştır.

Minör mutasyon saptanan hastalar JAK2 mutasyonu olmayan hastaların %22,2'sini, Tip 1 Mutasyon ve Minör Mutasyonu olanlar %44,4'ünü, Tip 2 Mutasyon ve Minör Mutasyonu olanlar %11,1'ini, Tip 1 ve Tip 2 Mutasyon ve Minör Mutasyonu olanlar %5,6'sını, Tip 1 Mutasyonu olanlar %11,1'ini, Tip 2 Mutasyonu olanlar %5,6'sını oluşturmaktadır.



Şekil 10. Pozitif kalretikülin mutasyonu tipleri sıklığı



Şekil 11. JAK2 negatif olan ET ve MF hastalarında kalretikülin sıklığı

JAK2 negatif olan ET tanılı hastalarının 11'inde (%52,38) 'inde kalretikülin mutasyonu pozitif, 10'unda (%47,61) kalretikülin negatiftir. MF tanılı hastaların

7'sinde (%63,63) kalretikülin pozitif, 4'ünde (%36,36) kalretikülin negatiftir (Şekil 11).

Tablo 18. JAK2 negatif olan ET ve MF hastalarında kalretikülin sıklığı

Kalretikülin Tipleri ve Sonuç	ET Tanılı Hastalarda (n=21)		MF Tanılı Hastalarda(n=11)		P
	Negatif	Pozitif	Negatif	Pozitif	
	n/ %	n/ %	n/ %	n/%	
Kalretikülin 1 MAJÖR	16 %76,2	5 %23,8	5 %45,5	6 %54,5	0,123
Kalretikülin 2 MAJÖR	18 %85,7	3 %14,28	10 %90,9	1 %9,1	1
Kalretikülin Clamp 1 MİNÖR	16 %76,2	5 %23,8	7 %63,6	4 %36,4	0,681
Kalretikülin Clamp 2 MİNÖR	16 %76,2	5 %23,8	8 %72,7	3 %27,3	1
Kalretikülin Clamp 3 MİNÖR	19 %90,5	2 %9,5	11 %100		0,534
Kalretikülin Clamp 4 MİNÖR	19 %90,5	2 %9,5	10 %90,9	1 %9,1	1
Kalretikülin Clamp 5 MİNÖR	14 %66,7	7 %33,3	10 %90,9	1 %9,1	0,209

JAK2 mutasyonu negatif olan 21 ET hastasında kalretikülin mutasyonu araştırmasında 5 hastada “Kalretikülin 1 MAJÖR”, 3 hastada “Kalretikülin 2 MAJÖR” 5 hastada “Kalretikülin Clamp 1 MİNÖR”, 5 hastada “Kalretikülin Clamp 2 MİNÖR”, 2 hastada “Kalretikülin Clamp 3 MİNÖR” 2 hastada “Kalretikülin Clamp 4 MİNÖR”, 7 hastada “Kalretikülin Clamp 5 MİNÖR” elde edilmiştir (Tablo 18).

JAK2 mutasyonu negatif olan 11 MF hastasında Kalretikülin mutasyon araştırmasında, 6 hastada “Kalretikülin 1 MAJÖR”, 1 hastada “Kalretikülin 2 MAJÖR” 4 hastada “Kalretikülin Clamp 1 MİNÖR”, 3 hastada “Kalretikülin Clamp 2 MİNÖR”, 1 hastada “Kalretikülin Clamp 4 MİNÖR”, 1 hastada “Kalretikülin Clamp 5 MİNÖR” elde edilmiş olup gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır ($P>0,05$) (Tablo 18).

Tablo 19. ET ve MF hastalarında kalretikülin mutasyonu sıklığı

SONUÇ	Kişi Sayısı/ Oran	TANI		Toplam
		ET	MF	
Mutasyon Negatif	n	10	4	14
	% (Grup İçinde)	71,4	28,6	100
	% (ET, MF Hastalarında)	47,6	36,4	43,8
	% (JAK2 Mutasyonu Negatif Olanlarda)	31,2	12,5	43,8
MİNÖR Mutasyon	n	4	0	4
	% (Grup İçinde)	100	0	100
	% (ET, MF Hastalarında)	19,0	0	12,5
	% (JAK2 Mutasyonu Negatif Olanlarda)	12,5	0	12,5
Tip1 Mutasyon, Minör Mutasyon	n	4	4	8
	% (Grup İçinde)	50	50	100
	% (ET, MF Hastalarında)	19	36,4	25
	% (JAK2 Mutasyonu Negatif Olanlarda)	12,5	12,5	25
Tip2 Mutasyon, Minör Mutasyon	n	1	1	2
	% (Grup İçinde)	50	50	100
	% (ET Hastalarında)	4,8	9,1	6,2
	% (JAK2 Mutasyonu Negatif Olanlarda)	3,1	3,1	6,2
Tip1 ve Tip2 Mutasyon, Minör Mutasyon	n	1	0	1
	% (Grup İçinde)	100	0	100
	% (ET, MF Hastalarında)	4,8	0,0	3,1
	% (JAK2 Mutasyonu Negatif Olanlarda)	3,1	0	3,1
Tip1 Mutasyon	n	0	2	2
	% (Grup İçinde)	0	100	100
	% (ET, MF Hastalarında)	0	18,2	6,2
	% (JAK2 Mutasyonu Negatif Olanlarda)	0	6,2	6,2
Tip2 Mutasyon	n	1	0	1
	% (Grup İçinde)	100	0	100
	% (ET, MF Hastalarında)	4,8	0	3,1
	% (JAK2 Mutasyonu Negatif Olanlarda)	3,1	0	3,1
Toplam	n	21	11	32
	% (Grup İçinde)	65,6	34,4	100
	% (ET, MF Hastalarında)	100	100	100
	% (JAK2 Mutasyonu Negatif Olanlarda)	65,6	34,4	100
p=220>0,05				

n: Kişi Sayısı, p: Anlamlılık

Tablo 19’da JAK2 mutasyonu negatif olan 21 ET tanılı ve 11 MF tanılı hastalarında kalretikülin mutasyonunun negatif ve pozitif olanların sıklılığına ilişkin bulgulara yer verilmiştir. ET hastalarından 10’ununda (%47,6) kalretikülin mutasyonu negatif, 4’ünde (%19)” Minör Mutasyon”, 4’ünde (%19) “Tip 1 ve Minör Mutasyon”, 1 (%4,8) hastada “Tip 2 ve Minör Mutasyon”, 1 hastada (%4,8) “Tip1 ve Tip2 Mutasyon, Minör Mutasyon” 1 hastada (%4,8) Tip 2 Mutasyon olduğu saptanmıştır.

MF tanılı hastaların 4’ünde (%36,4) kalretikülin mutasyonu negatif, 4’ünde (%36,4) “Tip 1 ve Minör Mutasyon”, 1 (%9,1) hastada “Tip 2 ve Minör Mutasyon”, 2 hastada (%18,2) Tip 1 Mutasyonu saptanmıştır. Negatif ve pozitif kalretikülin sıklığı açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı ($P=220>0,05$) saptanmıştır.

TARTIŞMA

Kronik myeloproliferatif hastalıklar ilk kez 1951 yılında William Damashek tarafından “multipotent kök hücrede ortaya çıkan genetik mutasyonlar sonucunda hücre yapımının anormal şekilde artması ve çevresel kanda olgun hücre yapımının anormal bir şekilde artması” şeklinde tanımlanmıştır [93]. Son yıllarda JAK2 mutasyonu kronik myeloproliferatif hastalıklar için önemli bir tanı aracı olmaktadır. Bununla birlikte son birkaç yılda kronik myeloproliferatif hastalıkların tanısında JAK2 mutasyon negatif olgularda, kalretikülin mutasyon varlığına dikkat çeken çalışmalar olduğu görülmektedir.

ET genellikle erişkin kadınlarda görüldüğü ve tanı yaşlarının çoğunlukla 50-60 yaş olduğu yaklaşık %20 oranında 30 yaş altı kadınlarda görüldüğü bildirilmektedir [157].

Araştırmamıza alınan hastaların %63,8'i (n=51) kadın, %36,2'si (n=29) erkektir. ET tanılı hastaların %66'sı (n=35) kadın, %34'ü (n=18) erkek, MF tanılı hastaların %59,3'ü kadın, %40,7'si (n=11) erkek hastadır. Hastaların cinsiyeti ile tanıları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı belirlenmiştir ($P>0,05$).

Türkiye’de yapılan bir araştırmada ET hastalarında yaşın 55 olduğu kadınlarda hastalığın daha fazla oranda olduğu görüldüğü saptanmıştır. [110]. ET’li 605 hastanın incelendiği bir araştırmada tanı anındaki ortalama yaş ortalamasının 50 olduğu belirlenmiştir [74]. Araştırmamız kapsamındaki olguların(n=80) yaş ortalaması $58,6\pm14,5$ ’dir. ET tanılı olguların yaş ortalaması $55,8\pm15,1$, MF tanılı olguların yaş ortalaması $63,9\pm11,8$ ’dir. Hastaların yaşları ile tanıları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu ($P=0,013<0,05$)

belirlenmiş olup MF tanılı olguların yaş ortalaması ET tanısı alanlarından daha yüksektir. Bu bulgumuz literatür ile uyumludur.

ET'li hastalarının tanısında JAK2 mutasyonunun varlığı tanı için önemli bir bulgudur [158, 159]. 2005 yılında MF tanılı hastalarda JAK2 mutasyonunun tespit edilmesi bu hastalıkların genetik temellerine ait bilgilerin artmasına neden olmuştur [160]. Kralovics (2005) ve arkadaşları tarafından yapılan bir araştırmada, ET'li hastaların %23'ünde JAK2 mutasyonun pozitif olduğu görülmüştür [7]. 2008'de [135] Taiwan'da yapılan bir araştırmada ET'li hastalarda JAK2 gen mutasyonu sıklığı %59 olarak saptanmıştır [136]. Çin'de yapılan bir araştırmada ET'li hastaların %63'ünde JAK2 gen mutasyonu pozitif olarak saptanmıştır [138]. Çin'de yapılan bir başka araştırmada 68 ET'li hastanın %58,8'inde, 12 MF'li hastanın %37'sinde JAK2 mutasyonunun pozitif olduğu saptanmıştır [170]. Bir başka araştırmada, ET'li ve MF'li hastaların %43'ünde JAK2 mutasyonun pozitif olduğu izlenmiştir [13]. Meta analizi yöntemiyle yapılan bir başka araştırmada 2436 hastanın %56.5'inde (n:1375) JAK2 mutasyonun pozitif olduğu görülmüştür [171]. Xiao Z. ve arkadaşlarının (2008) çalışmasında 153 ET'li hastanın %79,2'unda (n:122), 142 MF'li hastanın %78'inde (n:111) JAK2 mutasyonun pozitif olduğu görülmüştür [172]. İngiltere'de yapılan bir araştırmada 51 ET'li hastanın %57'sinde 16 MF'li hastanın %50'sinde pozitif JAK2 mutasyonu olduğu saptanmıştır [2]. Türkiye'de yapılan bir araştırmada ET'li hastaların %40'ında JAK2 mutasyonun pozitif olduğu [110] bir diğer araştırmada ET'li hastaların %47,6'sında pozitif JAK2 mutasyonu olduğu saptanmıştır [121]. Bizim araştırmamızda ET tanısı alan olguların %60'ında (n=32) JAK2 mutasyonu saptanmış, %39,6'sında (n=21) JAK2 mutasyonu saptanmamıştır. MF tanısı almış olguların %59,3'ünde (n= 16)

JAK2 mutasyonu saptanmış, %40'ında (n=11) JAK2 mutasyonu saptanmamıştır. JAK2 mutasyonu olan 51 olgunun %58,8'i (n=30) kadın, %62,1'i (n=18) erkektir. JAK2 mutasyonu olan olguların cinsiyetleri ve yaşları ile JAK2 mutasyon durumları arasında anlamlı bir ilişki olmadığı saptanmıştır ($P>0,05$).

JAK2 mutasyonu ET ve MF hastalarında yüksek tanı yaşı ile ilişkilendirilmektedir [161]. Araştırmamızdaki JAK2 mutasyonu olan hastaların yaş ortalaması $59,7\pm14,02$ olup, JAK2 mutasyonu olmayanların yaş ortalamasından (ort. $56,9\pm15,2$) daha yüksektir. JAK2 mutasyonu ile hastaların yaşları arasında anlamlı bir ilişki olmadığı anlaşılmıştır ($P>0,05$).

JAK2 mutasyonu ET ve MF hastalarında yüksek tanı yaşı, yüksek hemoglobin düzeyi ve yüksek lökosit sayısı ile, ET hastalarında düşük platelet sayısı ile ilişkili bulunmuştur [162]. Benzer şekilde, mutasyon varlığının PV ve PMF hastalarında kaşıntıya eğilimi artırdığı saptanmıştır [161]. Araştırmamızda hastaların çoğunluğunda JAK2 negatif ve pozitif olan ET ve MF hastalarının çoğunluğunda kaşıntı olmadığı belirlenmiş olup, kaşıntı durumlarına göre gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı anlaşılmış olup bu bulgumuz literatür bulgularından farklılık göstermektedir.

Yapılan çalışmalarda pozitif JAK2 mutasyon ile yüksek hemoglobin düzeyi, artmış lökosit sayısı, tanı anında düşük trombosit sayısı, artmış venöz tromboz riski ve splenomegali varlığı arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki olduğu saptanmıştır [163]. Araştırmamızda JAK2 mutasyonu olan ve olmayan hastaların platelet, beyaz küre, hemoglobin, laktat dehidrojenaz değerlerinde ve ortalama sağ kalım sürelerinde JAK2 mutasyonunun negatif veya pozitif olmasına göre farklılaşmadığı anlaşılmıştır. ($P>0,05$). Ancak hemoglobin ve hematokrit değerleri arasında anlamlı bir farklılık olduğu, JAK2 mutasyonu olan

ET hastalarının hemoglobin ve hematokrit değerlerinin daha yüksek olduğu anlaşılmıştır ($P=0,030<0,05$ ve $P=0,008<0,05$). Bu bulgumuz literatür ile benzerdir.

2008 yılında yapılan bir çalışmada, JAK2 gen mutasyonu olan ET'lilerde arteriyel tromboz sıklığının yüksek olduğunu göstermişlerdir [128]. Demir ve arkadaşlarının 2007 yılında Türkiye'de yaptıkları araştırmada JAK2 mutasyonu varlığına göre hastalar incelendiğinde ET hastalarında JAK2 mutasyon olanlarda daha yüksek lökosit, hemoglobin ve hematokrit değerleri ile tromboz görülme oranı elde edilmiştir [121]. Cheung ve arkadaşları (2006) araştırmalarında ET li hastalarda JAK2 mutasyon varlığı ile yüksek hemoglobin düzeyi arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptamışlar, lökosit sayısı , trombosit düzeyi ve hemotokrit düzeyi arasında ise anlamlı ilişki saptamamışlardır [168]. Demir ve arkadaşları (2007) çalışmalarında JAK2 mutasyonu olan esansiyel trombositoz hastalarında tanı anında trombosit sayısının daha düşük olduğu görülmüştür [121].

2010 yılında 106 ET hastasının retrospektif olarak incelemesi sonucunda JAK2 gen mutasyonu pozitifliğinin tromboz açısından riski artırdığı saptanmış ayrıca $1.000.000/mm^3$ üzeri trombosit değeri olan hastalarda JAK2 gen mutasyonu pozitifliği varlığında kanama açısından da risk teşkil ettiği gösterilmiştir [164]. Bir başka çalışmada tromboz ve kanama komplikasyonlarıyla JAK2 gen mutasyonu arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur [110]. Bizim araştırmamızda ET hastalarında JAK2 mutasyonu pozitif hastaların %91,7'sinde, JAK2 mutasyonu negatif olan hastaların %90,6'sında kanama olmadığı anlaşılmış olup istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı anlaşılmıştır ($P=0,881>0,05$).

Tefferi ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada JAK2 mutasyonunu pozitif olan MF'li hastalarda (n=80) mutasyon varlığı cinsiyet, hemoglobin düzeyi, lökosit sayısı, trombosit düzeyi ve dalak büyüklüğü arasında anlamlı bir ilişki saptamamıştır [23].

Yapılan çalışmalarda ET'li hastalarda JAK2 gen mutasyonu pozitif olanlarda splenomegalinin fazla olduğu tespit edilmiştir [165]. Antolioni'nin(2005) çalışmasında JAK2 ile splenomegali arasında ilişki gösterilememiştir [166]. Lieu ve arkadaşlarının (2005) 108 myeloproliferatif hastalıklı olguda yaptıkları çalışmalarında, JAK2 gen mutasyonu pozitif olan hastalarda belirgin splenomegali olduğu görülmüştür [135]. Demir ve arkadaşlarının (2007) Türkiye'de yaptıkları araştırmada JAK2 mutasyonlu ET ve MF hastalarında hepatomegalinin daha fazla görüldüğünü saptamışlardır (p=0,030).

Araştırmamızda JAK2 mutasyonu olan ve olmayan ET ve MF hastalarında splenomegali görülme sıklığında anlamlı bir farklılık olmadığı (P>0,05) belirlenmiştir.

Sağkalım için risk faktörlerini, yaşlı (≥ 60 yaş), lökositoz ($\geq 11.000/\text{mm}^3$), tromboz (arteriyel veya venöz) olarak belirlemiştir. Benzer biçimde anemi ve aşırı yüksek trombosit sayısının ($1.500.000/\text{mm}^3$) birlikteliği lösemik dönüşüm riskini arttırdığı saptanmıştır [167] Passamonti ve arkadaşlarının(2008) çalışmasında, çalışma süresince 605 ET'li hastanın %10.6'sının yaşamını yitirdiği görülmüş, ortanca sağkalım süresi 22.3 yıl olarak tespit edilmiştir [168]. Araştırmamızda JAK2 mutasyonu negatif olan hastaların çoğunluğunda (n=30;%93,8) lösemiye dönüşün olmadığı, 2 hastada (%6,2) AML'ye dönüş olduğu, JAK2 mutasyonu pozitif olanların da çoğunluğunda (n=46;%95,8) lösemiye dönüş olmadığı, 1

hastada (%4,2) AML'ye dönüş olduğu, mutasyon olan ve olmayanlarda lösemiye dönüş arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olmadığı belirlenmiştir ($P>0,05$).

Son yıllarda yapılan araştırmalardan olan, MF'li hastalarda kalretikülin varlığı Rumi ve arkadaşlarının (2014) araştırmasında MF'li hastalarda CALR, JAK2 sıklığı ve bu mutasyonun prognoz ve klinik duruma etkileri araştırılmış, araştırmada 617 hastanın 140'ında (%22,7) CALR mutasyonu saptanmıştır [150].

2013 yılında ilk defa JAK2 mutasyonu olmayan ET ve PMF hastalarında yeni nesil sekanslama tüm ekzon çalışmalarında CALR gen mutasyonu bildirilmiştir [149]. 2013 yılında gerçekleştirilen iki farklı çalışmada ET ve PMF'li hastalarda %20 ila %25 oranında CALR somatik mutasyonuna rastlanmıştır [149].

Klamptl ve arkadaşlarının (2013) İtalya'da bir klinikte yaptıkları araştırmada, 311 MPL'li hastanın %60'ında CALR mutasyonu, JAK2 negatif olan ET'li hastaların hepsinde (%100), 72 PV'li hastanın hepsinde CALR mutasyonu saptanmıştır [141]. Nangalia ve arkadaşlarının (2013) yaptıkları araştırmada, JAK 2 mutasyonu olmayan ET ve MF li toplam 70 hastada (%84) CALR mutasyonu saptanmıştır [169]. Tefferi ve arkadaşları tarafından (2014) Mayo Klinik ve Verasa Üniversite'sinde yapılan bir başka araştırmada, myelofibrozis hastalığı olan 1027 hastanın 402'sinde ET ve bu ET hastalarının 111'inde (%28) CALR mutasyonu görülmüştür [170].

Çalışmaya alınan 80 hastamızdan 18'inde (%22,5) kalretikülin mutasyonu pozitif olarak saptanmış, 14'ünde (%17,5) kalretikülin negatif olarak saptanmıştır. Kalretikülin mutasyonun görülen kadın hasta sayısının erkek hasta sayısına göre daha fazla olduğu belirlenmiş olup bu farklılığın istatistiksel olarak anlamlı

olduğu ($P=0,022<0,05$) ve kalretikülin mutasyonunun negatif veya pozitif olmasının yaşa göre farklılaşmadığı saptanmıştır ($P>0,05$). JAK2 negatif olan ET tanılı hastalarının %52,38 'inde kalretikülin mutasyonu pozitif, %47,61'inde kalretikülin negatiftir. MF tanılı hastaların %63,63'ünde kalretikülin pozitif, %36,36'sında kalretikülin negatiftir. Negatif ve pozitif kalretikülin sıklığı açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı ($P>0,05$).

Yukarda literatürde yer alan çalışmalarda JAK2 mutasyonunda laktat dehidrogenaz düzeyinin yüksek olduğu bilgisine yer verilmiştir. Çalışmamızda CALR pozitif olanlar ile negatif olanların laktat değerleri arasında anlamlı bir farklılık saptanmamıştır. CALRdel52 (tip 1 mutasyon) ve CALRins5 (tip 2 mutasyon) ET ve PMF hastalarında en sık görülen mutasyonlar olup, tip 1 mutasyonun PMF'de tip 2'ye göre daha sıklıkla görüldüğü bildirilmiştir [153] .

Araştırmamızda MF tanılı hastaların 4'ünde (%36,4) kalretikülin mutasyonu negatif, 4'ünde (%36,4) "Tip 1 ve Minör Mutasyon", 1 (%9,1) hastada "Tip 2 ve Minör Mutasyon", 2 hastada (%18,2) Tip 1 Mutasyonu saptanmıştır. Klamp ve arkadaşlarının (2013) çalışmasında CALR mutasyonlu hastaların ortalama sağ kalım süreleri diğer mutasyonlara göre belirgin şekilde daha uzun bulunmuştur [149]. Araştırmamızda ve CALR mutasyonu olan hastaların ortalama sağ kalım sürelerinin(Ort.55 ay) JAK2 mutasyonu olan hastalarından daha uzun olduğu bulunmuştur (Ort.39 ay) ancak farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptanmamıştır ($P>0,05$). ET ve MF'li hastalardan MF hastalarında kalretikülin mutasyonu olan ve olmayanların sağ kalım süreleri arasında fark olduğu mutasyonu pozitif olanların sağ kalım sürelerinin ortalamasının (Ort. 81,8571±14,6 ay) negatif olanların sağ kalım

sürelerinin ortalamasına göre (Ort.25,50±11ay) göre daha uzun olduğu ve bu farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olduğu ($P=0,023<0,05$) belirlenmiştir.



SONUÇ

Esansiyel trombositoz ve primer myelofibrozisli hastalarda kalretikülin mutasyonu araştırılması amacıyla yapılan bu çalışmaya 80 hasta dahil edilmiştir. Araştırma kapsamındaki 80 olgunun % 66,2'si (n=53) ET tanısı almış, %33,8'i (n=27) MF tanısı almıştır. Toplam 80 hastanın %60 'ında (n=48) JAK2 mutasyonu saptanmış, %40'ında (n=32) JAK2 mutasyonu saptanmamıştır. ET tanısı alan olguların %60,4(n=32) JAK2 mutasyonu saptanmış, %39,6'sında (n=21) JAK2 mutasyonu saptanmamıştır. MF tanısı almış olguların %59,3'ünde (n= 16) JAK2 mutasyonu saptanmış, %40,7'sinde (n=11) JAK2 mutasyonu saptanmamıştır.

Araştırmada elde edilen sonuçlar kısaca maddeler halinde şu şekildedir;

- 18 hastada (%22,50) kalretikülin mutasyonu saptanmış, 14'ünde (%17,50) kalretikülin negatif olarak saptanmıştır.
- Kalretikülin mutasyonu pozitif olanların laktat dehidrogenaz değerlerinin ortalamasının negatif olanların değerlerinden daha yüksek olduğu ve bu farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olduğu ($P<0,05$) belirlenmiştir.
- Kalretikülin pozitif ET 'li hastaların laktat dehidrogenaz değerlerinin negatif olanlardan daha yüksek olduğu ve bu farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olduğu ($P<0,05$) saptanmıştır.
- Kalretikülin mutasyonun görülen kadın hasta sayısının erkek hasta sayısına göre daha fazla olduğu belirlenmiş olup bu farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olduğu ($P=0,022<0,05$) saptanmıştır. Yukarıda ifade edildiği gibi, literatürdeki çalışmalarda JAK2 mutasyonun kadınlarda

görölme sıklığı daha fazladır. Çalışmamızda kalretikölin mutasyonu da çoğunlukla kadın hastalarda görölmüştür.

- Literatür ile uyumlu olarak hematokrit değėrlerinin JAK2 mutasyonu olan (n=48) ve olmayan(n=32) hastalarda (n=80) farklılaştığı, mutasyonun pozitif olduğı hastalarda hematokrit değėrlerinin ortalamasının (ort. $39,446 \pm ,31014$) mutasyonun negatif olduğı hastaların hematokrit değėrlerinin ortalamasına (Ort. $36,509 \pm ,92540$) göre daha yüksek olduğı ve bu farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olduğı saptanmıştır (P=0,035<0,050).
- MF hastalarında kalretikölin mutasyonu negatif olan ve olmayanların ek hastalık olup olmasına göre anlamlı olarak farklılaştığı (P<0,05), mutasyonun pozitif olduğı hastalarda ek hastalığı olanların mutasyonu negatif olanların oranından daha fazla olduğı belirlenmiştir.
- MF hastalarında kalretikölin mutasyonu olan ve olmayanların sağ kalım süreleri arasında fark olduğı ve bu farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olduğı (P<0,05) mutasyonu pozitif olanların sağ kalım sürelerinin ortalamasının negatif olanların sağ kalım sürelerinin ortalamasına göre daha uzun olduğı belirlenmiştir.
- JAK2 mutasyonu olan ve olmayan hastaların cinsiyeti ile tanıları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görölmüştür (P>0,05). Bu bulgunun literatürden farklı olduğı anlaşılmıştır.
- JAK2 mutasyonu olan ve olmayan hastaların yaşları ile tanıları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğı (P<0,05) belirlenmiş olup MF tanılı olguların yaş ortalaması ET tanısı alanlarından daha yüksektir.

- MF'li hastalarda hepatomegali görülme sıklığının daha fazla olduğu ve bu farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olduğu ($P<0,05$) saptanmıştır. Bu bulgu literatürü destekler niteliktedir.
- MF'li hastalarda splenomegali görülme sıklığının daha fazla olduğu ve bu farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olduğu ($P<0,05$) anlaşılmıştır. Bu bulgu literatürü destekler niteliktedir.
- Literatür ile uyumlu olarak JAK-2 mutasyonu pozitif hastalarda, mutasyonu negatif hastalara göre hematokrit değerlerinin daha yüksek olduğu ve bu farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır ($P<0,050$).

Sonuç olarak araştırmamızda kalretikülin mutasyonuna ilişkin bulguların literatürde yer aldığı gibi JAK2 mutasyonu pozitif olan hastalara ilişkin bulgulara benzer özellikte bulgular olduğu ve JAK2 negatif mutasyonu olan hastalarda kalretikülin mutasyonu varlığının tanıya destek olacağını düşünmekteyiz.

Bu çalışmanın esansiyel trombositoz ve myelofibroziste kalretikülin mutasyonu varlığını araştırması açısından ülkemizde ilk çalışma olma niteliğindedir. Bu nedenle bu araştırmanın esansiyel trombositoz ve myelofibroziste hastalarının JAK2 ve kalretikülin mutasyonu araştırılmasında tanı amaçlı olarak yararlanılması açısından diğer araştırmalara örnek olacağını düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

- [1] Passamonti F, Cervantes F, Vannucchi AM, Morra E, Rumi E, Pereira A, Guglielmelli P, Pungolino E, Caramella M, Maffioli M, Pascutto C, Lazzarino M, Cazzola M, Tefferi A. A dynamic prognostic model to predict survival in primary myelofibrosis: a study by the IWG-MRT (International Working Group for Myeloproliferative Neoplasms Research and Treatment). *Blood*. 2010;115(9):1703-8.
- [2] Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, et al. Cancer Genome Project. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet* 2005; 365: 1054-1061.
- [3] Kern WF. PDQ Hematoloji (çeviri: B. Ferhanoğlu). İstanbul Medikal Yayıncılık; 2004:255–78.
- [4] Dinçol G, Pekçelen Y, Atamer T, Sargın D, Nalçacı M, Aktan M, ve ark. Klinik Hematoloji. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2003. S.238-53.
- [5] Tefferi, A., Chronic myeloid disorders: Classification and treatment overview. *Semin Hematol*, 2001;8(2):1-4.
- [6] Vardiman J. W, Thiele J, Arber D. 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), 937-951.
- [7] Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, Teo SS, Tiedt R, Passweg JR, Tichelli A, Cazzola M, Skoda RC. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med*. 2005;352(17):1779-90.
- [8] Pierre R, Imbert M, Thiele J, Vardiman JW, Brunning RD, Flandrin G. Chronic myeloproliferative diseases. IARC Press 2001;61-73.
- [9] George TI, Arber DA. Pathology of the myeloproliferative diseases. *Hematol Oncol Clin North Am* 2003;17:1101–27..
- [10] Westwood NB, Gruszka-Westwood AM, Pearson CE, et al. The incidences of tri-somy 8, trisomy 9 and D20S108 deletion in polycythaemia vera: an analysis of blood granulocytes using interphase fluorescence in situ hybridization. *Br J Haematol* 2000;110:839–46.
- [11] Levine RL, Pardanani A, Tefferi A, Gilliland DG. Role of JAK2 in the pathogenesis and therapy of myeloproliferative disorders. *Nat Rev Cancer*

2007;7(9):673–83.

- [12] Levine RL, Wadleigh M, Cools J, ve ark. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell*. 2005;7:387–397.
- [13] James C, Ugo V, Le Couédic JP, Staerk J, Delhommeau F, Lacout C ve ark. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature* 2005. 434(7037):1144–1148.
- [14] Kralovics R ve ark. A gain of function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med* 2005;352:1779–1790.
- [15] Berlin NI. Diagnosis and classification of the polycythemias. *Semin Hematol* 1975;12:339–51.
- [16] Rodrigues GA, Park M. Oncogenic activation of tyrosine kinases. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 1994;4:15–24.
- [17] Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, et al. WHO Classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. *Blood* 2011;12:117(19):5019–32.
- [18] Gangat N, Wolanskyj AP, McClure RF, et al. Risk stratification for survival and leukemic transformation in essential thrombocythemia: A single institutional study of 605 patients. *Leukemia* 2007;21:270–76.
- [19] MESA, Ruben A, et al. Primary myelofibrosis (PMF), post polycythemia vera myelofibrosis (post-PV MF), post essential thrombocythemia myelofibrosis (post-ET MF), blast phase PMF (PMF-BP): Consensus on terminology by the international working group for myelofibrosis research and treatment (IWGMRT). *Leukemia research* 2007; 31.6: 737-740
- [20] Lasho TL, Pardanani A, McClure RF, et al. Concurrent MPL515 and JAK2V617F mutations in myelofibrosis: chronology of clonal emergence and changes in mutant allele burden over time. *Br J Haematol* 2006;135:683–87.
- [21] Michiels JJ, Thiele J. Clinical and pathological criteria for the diagnosis of essential thrombocythemia, polycythemia vera, and idiopathic myelofibrosis (agnogenic myeloid metaplasia). *Int J Hematol* 2002;76:133–45.
- [22] Bozdağ CS, Özcan M. Miyelofibrozu, Türk Hematoloji Derneği, Hematolog 2012;2(1):55-62.

- [23] Tefferi A, Lasho TL, Huang J, Finke C, Mesa RA, Li CY, Wu W, Hanson CA, Pardanani A. Low JAK2V617F allele burden in primary myelofibrosis, compared to either a higher allele burden or unmutated status, is associated with inferior overall and leukemia-free survival. *Leukemia*. 2008 Apr;22(4):756-61.
- [24] Mesa A, Silverstein MN, Jacobsen SJ, Wollan PC, Tefferi A Population-based incidence and survival figures in essential thrombocythemia and agnogenic myeloid metaplasia: an Olmsted County Study, 1976-1995. *Am J Hematol*. 1999;61(1):10.
- [25] Kahn A, Bernard JF, Cottreau D, Marie J, Boivin P. Gd(--) Abrami: a deficient G-6PD variant with hemizygous expression in blood cells of a woman with primary myelofibrosis. *Humangenetik*. 1975;30(1):41-6.
- [26] Kreipe H, Jaquet K, Felgner J, Radzun HJ, Parwaresch MR. Clonal granulocytes and bone marrow cells in the cellular phase of agnogenic myeloid metaplasia. *Blood*. 1991;78(7):1814-7.
- [27] Tsukamoto N, Morita K, Maehara T, Okamoto K, Sakai H, Karasawa M, Naruse T, Omine M. Clonality in chronic myeloproliferative disorders defined by X-chromosome linked probes: demonstration of heterogeneity in lineage involvement. *Br J Haematol*. 1994;86(2):
- [28] Buschle M, Janssen JW, Drexler H, Lyons J, Anger B, Bartram CR. Evidence for pluripotent stem cell origin of idiopathic myelofibrosis: clonal analysis of a case characterized by a N-ras gene mutation. *Leukemia*. 1988;2(10):658-60.
- [29] Carlo-Stella C, Cazzola M, Gasner A, Barosi G, Dezza L, Meloni F, Pedrazzoli P, Hoelzer D, Ascari E. Effects of recombinant alpha and gamma interferons on the in vitro growth of circulating hematopoietic progenitor cells (CFU-GEMM, CFUMk, BFU-E, and CFU-GM) from patients with myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Blood*. 1987;70(4):1014-9.
- [30] Barosi G, Viarengo G, Pecci A, Rosti V, Piaggio G, Marchetti M, Frassoni F. Diagnostic and clinical relevance of the number of circulating CD34(+) cells in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Blood*. 2001;98(12):3249-55.
- [31] Jones LC, Tefferi A, Vuong PT, Desmond JC, Hofmann WK, Koeffler HP. Detection of aberrant gene expression in CD34+ hematopoietic stem cells from patients with agnogenic myeloid metaplasia using oligonucleotide microarrays. *Stem Cells*. 2005;23(5):631-7.

- [32] Taksin AL, Couedic JP, Dusanter-Fourt I, Massé A, Giraudier S, Katz A, Wendling F, Vainchenker W, Casadevall N, Debili N. Autonomous megakaryocyte growth in essential thrombocythemia and idiopathic myelofibrosis is not related to a c-mpl mutation or to an autocrine stimulation by Mpl-L. *Blood*. 1999;93(1):125-39.
- [33] Reilly JT, Snowden JA, Spearing RL, Fitzgerald PM, Jones N, Watmore A, Potter A. Cytogenetic abnormalities and their prognostic significance in idiopathic myelofibrosis: a study of 106 cases. *Br J Haematol*. 1997;98(1):96-102.
- [34] Bench AJ, Nacheva EP, Champion KM, Green AR. Molecular genetics and cytogenetics of myeloproliferative disorders. *Baillieres Clin Haematol*. 1998;11(4):819-48.
- [35] Dingli D, Grand FH, Mahaffey V, Spurbeck J, Ross FM, Watmore AE, Reilly JT, Cross NC, Dewald GW, Tefferi A. Der(6)t(1;6)(q21-23;p21.3): a specific cytogenetic abnormality in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Br J Haematol*. 2005;130(2):229-32.
- [36] Mesa RA, Li CY, Ketterling RP, Schroeder GS, Knudson RA, Tefferi A. Leukemic transformation in myelofibrosis with myeloid metaplasia: a single institution experience with 91 cases. *Blood*. 2005;105(3):973-7.
- [37] Zojer N, Meran JG, Vesely M, Grüner H, Ackermann J, Dellinger C, Zimmer-Roth I, Heinz R, Drach J, Ludwig H. Trisomy 13 is associated with poor prognosis in idiopathic myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Leuk Lymphoma*. 1999;35(34):415-21.
- [38] Cox MC, Panetta P, Venditti A, Abruzzese E, Del Poeta G, Cantonetti M, Amadori S. New reciprocal translocation t(6;10) (q27;q11) associated with idiopathic myelofibrosis and eosinophilia. *Leuk Res*. 2001;25(4):349-51.
- [39] Caramazza D, Begna KH, Gangat N, Vaidya R, Siragusa S, Van Dyke DL, Hanson C, Pardanani A, Tefferi A. Refined cytogenetic-risk categorization for overall and leukemia-free survival in primary myelofibrosis: a single center study of 433 patients. *Leukemia*. 2011;25(1):82-8.
- [40] James C, Ugo V, Le Couédic JP, Staerk J, Delhommeau F, Lacout C, Garçon L, Raslova H, Berger R, Bennaceur-Griscelli A, Villeval JL, Constantinescu SN, Casadevall N, Vainchenker W. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature*. 2005;434(7037):1144-8.
- [41] Giraudier S, Chagraoui H, Komura E, Barnache S, Blanchet B, LeCouedic

- JP, Smith DF, Larbret F, Taksin AL, Moreau-Gachelin F, Casadevall N, Tulliez M, Hulin A, Debili N, Vainchenker W. Overexpression of FKBP51 in idiopathic myelofibrosis regulates the growth factor independence of megakaryocyte progenitors. *Blood*. 2002;100(8):2932-40.
- [42] Reilly JT, Wilson G, Barnett D, Watmore A, Potter A. Karyotypic and ras gene mutational analysis in idiopathic myelofibrosis. *Br J Haematol*. 1994;88(3):575-81.
- [43] Wang JC, Chen C. P16 gene deletions and point mutations in patients with agnogenic myeloid metaplasia (AMM). *Leuk Res*. 1999;23(7):631-5.
- [44] Castro-Malaspina H, Rabellino EM, Yen A, Nachman RL, Moore MA. Human megakaryocyte stimulation of proliferation of bone marrow fibroblasts. *Blood*. 1981;57(4):781-7.
- [45] Wanless IR, Peterson P, Das A, Boitnott JK, Moore GW, Bernier V. Hepatic vascular disease and portal hypertension in polycythemia vera and agnogenic myeloid metaplasia: a clinicopathological study of 145 patients examined at autopsy. *Hepatology*. 1990;12(5).
- [46] Cervantes F, Barosi G, Demory JL, Reilly J, Guarnone R, Dupriez B, Pereira A, Montserrat E. Myelofibrosis with myeloid metaplasia in young individuals: disease characteristics, prognostic factors and identification of risk groups. *Br J Haematol*. 1998;102.
- [47] Yönel İ, Sargın DF. Primer miyelofibrozis: patogenez, teşhis ve tedavide güncel bilgiler İstanbul Tıp Fakültesi Dergisi. 2014;77(4):67-77.
- [48] Ronald Hoffman, Edward J. Benz, Jr., Leslie E. Silberstein, Helen E. Heslop, Jeffrey I. Weitz, John Anastasi. *Hematology Basic Principles and Practice*. 6th Edition.
- [49] Tefferi A, Verstovsek S, Barosi G, Passamonti F, Roboz GJ, Gisslinger H, Paquette RL, Cervantes F, Rivera CE, Deeg HJ, Thiele J, Kvasnicka HM, Vardiman JW, Zhang Y, Bekele BN, Mesa RA, Gale RP, Kantarjian HM. Pomalidomide is active in the treatment of anemia associated with myelofibrosis. *J Clin Oncol*. 2009;27(27):4563-9.
- [50] Buhr T, Büsche G, Choritz H, Länger F, Kreipe H. Evolution of myelofibrosis in chronic idiopathic myelofibrosis as evidenced in sequential bone marrow biopsy specimens. *Am J Clin Pathol*. 2003;119(1):152-8.
- [51] T Tefferi A, Thiele J, Orazi A, Kvasnicka HM, Barbui T, Hanson CA, Barosi G, Verstovsek S, Birgegard G, Mesa R, Reilly JT, Gisslinger H,

- Vannucchi AM, Cervantes F, Finazzi G, Hoffman R, Gilliland DG, Bloomfield CD, Vardiman JW. 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 Aug 15;110(4):1092-7.
- [52] Pasamonti F, Cervantes F, Vanucchi AM. A dynamic prognostic model to predict survival in primary myelofibrosis. *Blood* 2010;115(9):1703-1708.
- [53] Gangat N, Caramazza D, Vaidya R, George G, Begna K, Schwager S, Van Dyke D, Hanson C, Wu W, Pardanani A, Cervantes F, Passamonti F, Tefferi A. DIPSS plus: a refined Dynamic International Prognostic Scoring System for primary myelofibrosis that incorporates prognostic information from karyotype, platelet count, and transfusion status. *J Clin Oncol*. 2011 Feb 1;29(4):392-7.
- [54] Tefferi A, Jimma T, Gangat N, Vaidya R, Begna KH, Hanson CA, Van Dyke DL, Caramazza D, Pardanani A. Predictors of greater than 80% two-year mortality in primary myelofibrosis: A Mayo Clinic study of 884 karyotypically annotated patients. *Blood* 2011 Oct 27.
- [55] Vaidya R, Carmazza D, Begna KH, Gangat N, Van Dyke DL, Hanson CA, Pardanani A, Tefferi A. Monosomal karyotype in primary myelofibrosis is detrimental to both overall and leukemia free survival. *Blood* 2011;117(21):5612-5615.
- [56] . Gugliemelli P, Barosi G, Specchia G. Identification of patients with poorer survival in primary myelofibrosis based on the burden of JAK2V617F mutated allele. *Blood* 2009;114(8):1477-1483.
- [57] Scott BL, Gooley TA, Sorrow ML, Rezvani AR, Linenberger ML, Grim J, Sandmaier BM, Myerson D, Chauncey TR, Storb R, Buxhofer-Ausch V, Radich JP, Appelbaum FR, Deeg HJ. The dynamic International prognostic scoring system for myelofibrosis predicts outcomes after hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 2012 Jan 10.
- [58] Rupoli S, Da Lio L, Sisti S, Campanati G, Salvi A, Brianzoni MF, D'Amico S, Cinciripini A, Leoni P. Primary myelofibrosis: a detailed statistical analysis of the clinicopathological variables influencing survival. *Ann Hematol*. 1994;68(4):205-12.
- [59] Tefferi A, Mesa RA, Schroeder G, Hanson CA, Li CY, Dewald GW. Cytogenetic findings and their clinical relevance in myelofibrosis with

myeloid metaplasia. *Br J Haematol.* 2001 Jun;113(3):763-71.

- [60] Cervantes F, Dupriez B, Pereira A, 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;113:2895–2901.
- [61] Passamonti F, Rumi E, Pungolino E, Malabarba L, Bertazzoni P, Valentini M, Orlandi E, Arcaini L, Brusamolino E, Pascutto C, Cazzola M, Morra E, Lazzarino M. Life expectancy and prognostic factors for survival in patients with polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Am J Med.* 2004;117(10):755-61.
- [62] Hirayama, Y., et al., Concentrations of thrombopoietin in bone marrow in normal subjects and in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura, aplastic anemia, and essential thrombocythemia correlate with its mRNA expression of bone marrow stromal cells. *Blood*, 1998. 92(1): 46-52
- [63] Cortelazzo S, Viero P, Finazzi G, D'Emilio A, Rodeghiero F, Barbui T. Incidence and risk factors for thrombotic complications in a historical cohort of 100 patients with essential thrombocythemia. *J Clin Oncol.* 1990;8(3):556-62.
- [64] Schafer AI. Molecular basis of the diagnosis and treatment of polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Blood* 2006; 107: 4214-4222.
- [65] Harrison CN, Gale RE, Machin SJ, Linch DC. A large proportion of patients with a diagnosis of essential thrombocythemia do not have a clonal disorder and may be at lower risk of thrombotic complications. *Blood.* 1999;93(2):417-24.
- [66] . Pardanani AD, Levine RL, Lasho T, et al. MPL515 mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: A study of 1182 patients. *Blood* 2006;108:3472–3476.
- [67] Copland M. Chronic myelogenous leukemia stem cells: What's new *Curr Hematol Malig Rep* 2009;4: 66-73.
- [68] Kesler CM, Klein HG, Haulik RJ. Uncontrolled thrombocythemia in chronic myeloproliferative disorders. *Br J Haematol* 1982; 50: 157.
- [69] Wang JC, Chen C, Novetsky AD, et al. Blood thrombopoietin levels in clonal thrombocytosis and reactive thrombocytosis. *Am J Med* 1998;104:451–55.
- [70] Ohto T, Shihara H, Miyauchi Y et al. A case of coronary artery bypass

surgery using LITA ve RGEA for a patient with essential thrombocythemia. Jpn J Thorac Cardiovasc Surg 1998;46: 767-71.

- [71] Jensen MK, de Nully Brown P, Nielsen OJ, Hasselbalch HC. Incidence, clinical features and outcome of essential thrombocythaemia in a well defined geo-graphical area. Eur J Haematol 2000;65:132–39.
- [72] Gunz FW. Hemorrhagic thrombocythemia: A critical review. Blood 1960; 15: 706-723.
- [73] Fruchtman S, Hoffman R. Essential Thrombocythemia. In Hoffman R, Benz E, Shattil S (Eds) Hematology Basic Principles and Practice. Fourth edition. Elsevier 2005, 1277-1296.
- [74] Rozman C, Giralto M, Feliu E, Rubio D, Cortes MT. Life expectancy of patients with chronic nonleukemic myeloproliferative disorders. Cancer 1991;67: 2658-63.
- [75] Cortelazzo S, Finazzi G, Ruggeri M, et al. Hydroxyurea for patients with essential thrombocythemia and a high risk of thrombosis. N Engl J Med 1995;332:1132-6.
- [76] Fenaux P, Simon M, Caulier MT, et al. Clinical course of essential thrombocythemia in 147 cases. Cancer 1990;66:549–56.
- [77] Michiels JJ, van Genderen PJ, Lindemans J, van Vliet HH. Erythromelalgic, thrombotic and hemorrhagic manifestations in 50 cases of thrombocythemia. Leuk Lymphoma. 1996 Sep;22 Suppl 1:47-56.
- [78] Schafer AI. Thrombocytosis and Essential Thrombocythemia. In Beutler E, Lichtman MA, Coller BS (Eds) Williams Hematology. Sixth Edition. McGraw-Hill. 2001, 1541-154.
- [79] Steensma DP, Tefferi A. Cytogenetic and molecular genetic aspects of essential thrombocythemia. Acta Haematol. 2002;108(2):55-65.
- [80] Tefferi A, Fonseca R, Pereira DL, Hoagland HC. A long-term retrospective study of young women with essential thrombocythemia. Mayo Clin Proc 2001;76: 22-8.
- [81] Harrison C. Pregnancy and its management in the Philadelphia negative myeloproliferative diseases. Br J Haematol. 2005;129(3):293-306.
- [82] sağır H. Esansiyel trombositozda kanama ve tromboz ile ortalama trombosit hacmi ve JAK2V617F gen mutasyonu arasındaki ilişki. İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, Malatya, 2011:

18-23.

- [83] Buhr GT, Buesche G, Kreft A, Choritz H. Classification of Ph-negative Myeloproliferative disorders by histopathology and staging from bone marrow biopsies. *Leuk Lymphoma* 1996; 22(suppl):15-29.
- [84] Budde U, van Genderen PJ. Acquired von Willebrand disease in patients with high platelet counts. *Semin Thromb Hemost.* 1997;23(5):425-31.
- [85] Lutomski DM, Bower RH. The effect of thrombocytosis on serum potassium and phosphorous concentrations. *Am J Med Sci* 1994; 307:255-258.
- [86] Reisner SA, Rinkevich D, Markiewicz W, ve ark. Cardiac involvement in patients with myeloproliferative disorders. *Am J Med.* 1992; 93(5):498-504.
- [87] Imbert M, Pierre R, Thiele J, ve ark. Essential thrombocythaemi. In Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW (eds): *Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. IARC Press, 2001; 39.
- [88] Landolfi R, Marchioli R, Kutti J, Gisslinger H, Tognoni G, Patrono C, Barbui T; European Collaboration on Low-Dose Aspirin in Polycythemia Vera Investigators. Efficacy and safety of low-dose aspirin in polycythemia vera. *N Engl J Med.* 2004;350(2):114-24.
- [89] Tombak A. Primer miyelofibrozis, polisitemia vera esansiyel trombositemi hastalarında mikroRNA ekspresyon analizi. Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, Mersin, 2013:15-17.
- [90] Harrison CN. Essential thrombocythaemia: Challenges and evidencebasedmanagement. *Br J Haematol* 2005;130:153–65.
- [91] Tefferi A, Vardiman JW. Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: The 2008 World Health Organization criteria and pointof-care diagnostic algorithms. *Leukemia.* 2008; 22(1):14-22. Comment in: *Leukemia.* 2008;22(11):2118-9.
- [92] Wolanskyj AP, Schwager SM, McClure RF, Larson DR, Tefferi A. Essential thrombocythemia beyond the first decade: Life expectancy, long-term complication rates, and prognostic factors. *Mayo Clin Proc* 2006;81:159–166.
- [93] Yönel İ, Sargın DF. Esansiyel trombositemi: patogenezi, teşhis ve tedavinin güncellenmesi. *İst Tıp Fak Derg* 2014; 77(1):14-20.

- [94] Michiels JJ, Koudstaal PJ, Mulder AH, Van Vliet HDM. Transient neurologic and ocular manifestations in primary thrombocythemia. *Neurol* 1993; 43(6):1107-1110.
- [95] Sushil G, Rane and E Premkumar. Janus kinases: components of multiple signaling pathways. *Reddy Oncogene* 2000;19:5662–79.
- [96] Zhou YJ, Chen M, Cusack NA, Kimmel LH, Magnuson KS, Boyd JG, et al. Unexpected effects Of FERM domain mutations on catalytic activity of Jak3: structural implication for Janus kinases. *Mol Cell* 2001;8:959–69.
- [97] Sandberg EM, Wallace TA, Godeny MD, Vonderlinden D, Sayeski PP. Jak2 tyrosine kinase: a true jak of all trades? *Cell Biochem Biophys* 2004;41:207–32.
- [98] Saharinen P, Takaluoma K, Silvennoinen O. Regulation of the Jak2 tyrosine kinase by its pseudokinase domain. *Mol Cell Biol* 2000;20:3387–95.
- [99] Candotti F, et al. Structural and functional basis for JAK3-deficient severe combined immunodeficiency. *Blood* 1997;90:3996–4003.
- [100] Çetinkaya S. Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi hematoloji Bilim Dalı'na başvuran Hastalarda JAK 2 geni nokta mutasyonu hastalık ilişkisinin değerlendirilerek fenotip-genotip ilişkisinin kurulması. Trakya Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı. 2012, Edirne.
- [101] Yamaoka K, Saharinen P, Pesu M, ET Holt V, Silvennoinen O, O'Shea JJ. The Janus kinases (Jaks). *Genome Biology* 2004;5:253.
- [102] Alvarez-Larran, A., et al., Increased platelet, leukocyte, and coagulation activation in primary myelofibrosis. *Ann Hematol*, 2008; 87(4):269-76.
- [103] Benekli M, Baer MR, Baumann H, Wetzler M. Signal transducer and activator of transcription proteins in leukemias. *Blood* 2003; 101: 2940–54.
- [104] Irmak G. Esansiyel Trombositemi tanısıyla izlenen olgularda JAK2 gen mutasyonu, komplikasyonlar ve tedavi ilişkisinin değerlendirimi. Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Hematoloji Bilim Dalı. Uzmanlık Tezi. Bursa, 2013:39-41.
- [105] Kristensen DM, Kalisz M, Nielsen JH. Cytokine signalling in embryonic stem cells. *APMIS*. 2005;113(11-12):756-72.
- [106] Levine RL, Loriaux M, Huntly BJ, et al. The JAK2V617F activating mutation occurs in chronic myelomonocytic leukemia and acute myeloid leukemia, but not in acute lymphoblastic leukemia or chronic lymphocytic

leukemia. *Blood* 2005;106:3377–79.

- [107] Frohling S, Lipka DB, Kayser S, et al. Rare occurrence of the JAK2 V617F mutation in AML subtypes M5, M6, and M7. *Blood* 2006;107:1242–3.
- [108] Cortelazzo S, Viero P, Finazzi G, D'Emilio A, Rodeghiero F, Barbui T. Incidence and risk factors for thrombotic complications in a historical cohort of 100 patients with essential thrombocythemia. *J Clin Oncol*. 1990;8(3):556-62.
- [109] Kaushansky K. The chronic myeloproliferative disorders and mutation of JAK2: Dameshek's 54 year old speculation comes of age. *Best Pract Res Clin Haematol* 2007; 20: 5-12.
- [110] 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;111:1686–9.
- [111] Jatiani S.S, Baker S.J, Silverman L.R and E. Reddy P. JAK/STAT Pathways in cytokine signaling and myeloproliferative disorders: Approaches for Targeted Therapies. *Genes & Cancer* 2011;1(10) 979-993.
- [112] Campbell PJ, Green AR. The myeloproliferative disorders. *N Engl J Med*. 2006;355(23):2452–66.
- [113] Krebs DL, Hilton D.J. SOCS Proteins: Negative regulators of cytokine signaling. *Stem Cells* 2001;19:378-387.
- [114] Demir AK, Atay MH, Kelkitli E, Kurt YT, Özatlı D, Turgut M. Kronik Miyeloproliferatif Hastalıklarda JAK2V617F Mutasyon Sıklığı. *Çağdaş Tıp Dergisi* 2013; 3(2):101-107.
- [115] Cario H, et al. The JAK2V617F mutation is acquired secondary to the predisposing alteration in familial polycythaemia vera. *Br. J. Haematol*. 2005;130:800–1.
- [116] Carbuccia N, Murati A, Trouplin V, et al. Mutations of ASXL1 gene in myeloproliferative neoplasms. *Leukemia* 2009;23:2183-6.
- [117] Beer AP, Green AR. Pathogenesis and management of essential thrombocythemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2009; 621-628.
- [118] Abdel-Wahab O, Tefferi A, Levine RL. Role of TET2 and ASXL1 mutations in the pathogenesis of myeloproliferative neoplasms. *Hematol*

Oncol Clin North Am. 2012;26(5):1053-64.

- [119] Abdel-Wahab O, Manshouri T, Patel J, Harris K, Yao J, Hedvat C, Heguy A, Bueso-Ramos C, Kantarjian H, Levine RL, Verstovsek S. Genetic analysis of transforming events that convert chronic myeloproliferative neoplasms to leukemias. *Cancer Res.* 2010;70(2):447.
- [120] Bayram M, Özkocaman V, Özkalemkaş F, Ali R, Karkucak M, Özçelik T, Irmak G, Yakut T, Ocakoğlu G, Aydın T, Tunalı A. Esansiyel trombositoz tanısıyla izlenen olgularda JAK2 gen mutasyonu ve komplikasyonlarla ilişkisi. *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi.* 2011;37(1):13-16.
- [121] Lussana F, Caberlon S, Pagani C, Kamphuisen PW, Buller HR, Cattaneo M. Association of V617F Jak2 mutation with the risk of thrombosis among patients with essential thrombocythaemia or idiopathic myelofibrosis: a systematic review. *Thromb Res.* 2009; 124(4).
- [122] Levine RL, Belisle C, Wadleigh M, et al. X-inactivationbased clonality analysis and quantitative JAK2 V617F assessment reveal a strong association between clonality and JAK2 V617F in PV but not ET/MMM, and identifies a subset of JAK2 V617F-negative ET and MMM patients with clonal hematopoiesis. *Blood* 2006; 107: 4139-4141.
- [123] Neuwirthova R, Mocikova K, Musilova J, et al. Mixed myelodysplastic and myeloproliferative syndromes. *Leuk Res* 1996; 20: 717-726.
- [124] Ünal K, Erdoğan S, Yılmaz MF. JAK 2 V617F gen mutasyon sıklığı ve tam kan sayımı parametreleri ile ilişkisi. *Türk Biyokimya Dergisi.* 2014;39(1):93-98.
- [125] Wang YL, Vandris K, Jones A, et al. JAK2 mutations are present in all cases of polycythemia vera. *Leukemia* 2008; 22: 1289.
- [126] Tefferi A, Sirhan S, Lasho TL, et al. Concomitant neutrophil JAK2 mutation screening and PRV-1 expression analysis in myeloproliferative disorders and secondary polycythemia. *Br J Haematol* 2005; 131: 166-171.
- [127] Lieu CH, Wu HS, Hon YC et al. Prevalence of the JAK2- V617F mutation in Taiwanese patients with chronic myeloproliferative disorders. *Intern Med J.* 2008;38(6):422-6.
- [128] Wong RS, Cheng CK, Chan NP et al. JAK2 V617F mutation is associated with increased risk of thrombosis in Chinese patients with essential thrombocythaemia. *Br J Haematol.* 2008;141(6):902-4.

- [129] Wong GC, Kam GL, Koay ES. JAK 2 mutations in Asian patients with essential thrombocythaemia. *Intern Med J.* 2010 Feb 26.
- [130] Bang SM, Lee JS, Ahn JY et al. Vascular events in Korean patients with myeloproliferative neoplasms and their relationship to JAK2 mutation. *Thromb Haemost.* 2009;101(3):547-51.
- [131] Steensma DP, Dewald GW, Lasho TL, et al. The JAK2 V617F activating tyrosine kinase mutation is an infrequent event in both “atypical” myeloproliferative disorders and myelodysplastic syndromes. *Blood* 2005; 106: 1207-1209.
- [132] Ostwald, T. J. & MacLennan, D. H. Isolation of a high affinity calcium-binding protein for sarcoplasmic reticulum. *Journal of Biological Chemistry* 249, 974–979 (1974)..
- [133] Fliegel, L., Burns, K., et al. Molecular cloning of the high affinity calcium-binding protein (Kalretikulin) of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *Journal of Biological Chemistry* 264, 1989:21522–21528
- [134] Michalak, M., Milner, R. E., et al. Kalretikulin. *Biochemical Journal*;1992;285, 681–692
- [135] Smith, M. J. & Koch, G.L. Multiple zones in the sequence of Kalretikulin (CRP55, calregulin, HACBP), a major calcium binding ER/SR protein. *EMBO Journal* 1989;8: 3581–3586 (1989)
- [136] Waisman, D.M., Salimath, B.P., et al. Isolation and characterization of CAB-63, a novel calcium-binding protein. *The Journal of Biological Chemistry* 260,1985; 1652–1660
- [137] Macer, D. R. & Koch, G. L. Identification of a set of calcium-binding proteins in reticuloplasm, the luminal content of the endoplasmic reticulum. *Journal of Cell Science* 91,1989: 61–70
- [138] Michalak, M., Corbett, E. F., et al. Kalretikulin: one protein, one gene, many functions. *Biochemical Journal* 344, 199: 281–292
- [139] Mesaeli N, Nakamura K, Zvaritch E, Dickie P, Dziak E, Krause K H, Opas M, MacLennan D H, Michalak M. Kalretikulin is essential for cardiac development. *J Cell Biol.* 1999;144:857–868.
- [140] 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 2013; e-pub ahead of print 23 December.

- [141] Klampfl T, Gisslinger H, Harutyunyan AS, et al. Somatic mutations of Kalretikülin in myeloproliferative neoplasms. *N Engl J Med* 2013;369:2379-90.
- [142] Rumi E, Pietra D, Pascutto C, et al. Clinical effect of driver mutations of JAK2 , CALR, or MPL in primary myelofibrosis. *Blood* 2014;124:1062-9.
- [143] Delhommeau F, Dupont S, Della Valle V, et al. Mutation in TET2 in myeloid cancers. *N Engl J Med*. 2009;360(22):2289-2301.
- [144] Abdel-Wahab O, Pardanani A, Rampal R, Lasho TL, Levine RL, Tefferi A. DNMT3A mutational analysis in primary myelofibrosis, chronic myelomonocytic leukemia and advanced phases of myeloproliferative neoplasms. *Leukemia*. 2011; 25(7):1219-1220.
- [145] Carbuccia N, Murati A, Trouplin V, et al. Mutations of ASXL1 gene in myeloproliferative neoplasms. *Leukemia*. 2009;23(11):2183-2186.
- [146] Ernst T, Chase AJ, Score J, et al. Inactivating mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myeloid disorders. *Nat Genet*. 2010.
- [147] Vainchenker W, Delhommeau F, Constantinescu SN, Bernard OA. New mutations and pathogenesis of myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2011;118(7):1723-1735.
- [148] Tefferi A, Thiele J, Vannucchi AM, et al. An overview on CALR and CSF3R mutations and a proposal for revision of WHO diagnostic criteria for myeloproliferative neoplasms. *Leukemia* 2014;28:1407-13.
- [149] Lundberg P, Nienhold R, Ambrosetti A, et al. Somatic mutations in Kalretikülin can be found in pedigrees with familial predisposition to myeloproliferative neoplasms. *Blood* 2014;123:2744-5.
- [150] Nangalia J, Massie CE, Baxter EJ, et al. Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2 . *N Engl J Med* 2013;369:2391-405.
- [151] Lim KH, Chang YC, Gon-Shen Chen C, et al. Frequent CALR exon 9 alterations in JAK2 V617F-mutated essential thrombocythemia detected by high-resolution melting analysis. *Blood Cancer J* 2015;5:e295.
- [152] Malcovati L, Rumi E, Cazzola M. Somatic mutations of Kalretikülin in myeloproliferative neoplasms and myelodysplastic/myeloproliferative

neoplasms. *Haematologica* 2014;99:1650-2.

- [153] Cabagnols X, Defour JP, Ugo V, et al. Differential association of Kalretikulin type 1 and type 2 mutations with myelofibrosis and essential thrombocythemia: relevance for disease evolution. *Leukemia*. 2015;29(1):249-252.
- [154] Marty C, Pecquet C, Nivarthi H, El-Khoury M, Chachoua I, Tulliez M, et al. Kalretikulin mutants in mice induce an MPL-dependent thrombocytosis with frequent progression to myelofibrosis. *Blood*. 2016;127:1317–24. doi: 10.1182/blood-2015-11-679571.
- [155] Tefferi A, Wassie EA, Guglielmelli P, et al. Type 1 versus type 2 Kalretikulin mutations in essential thrombocythemia: a collaborative study of 1027 patients. *Am J Hematol*. 2014;89(8):E121-E124.
- [156] Qiao C, Sun C, Ouyang Y, Wang JJ, Qian SX, Li JY, et al. Clinical importance of different Kalretikulin gene mutation types in wild-type JAK2 essential thrombocythemia and myelofibrosis patients. *Haematologica*. 2014;99:e182–e184.
- [158] Kittur J, Knudson RA, Lasho TL, et al. Clinical correlates of JAK2 V617F allele burden in essential thrombocythemia. *Cancer*. 2007;109(11):2279-84.
- [159] Cheung B, Radia D, Pantelidis P, Yadegarfar G, Harrison C: The presence of the JAK2 V617F mutation is associated with a higher hemoglobin and increased risk of thrombosis in essential thrombocythemia. *Br J Haematol* 2006;132:244-5.
- [160] Hsu HC. Pathogenetic role of JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders. *J Chin Med Assoc*. 2007;70:89–93.
- [161] Vannucchi AM, Antonioli E, Guglielmelli P, et al. Prospective identification of high-risk polycythemia vera patients based on JAK2 V617F allele burden. *Leukemia*. 2007;21(9):1952-9.
- [162] Vannucchi AM, Antonioli E, Guglielmelli P, Pardanani A, Tefferi A. Clinical correlates of JAK2 V617F presence or allele burden in myeloproliferative neoplasms: a critical reappraisal. *Leukemia*. 2008;22(7):1299-307.
- [163] Panani A.D. Janus kinase 2 mutations in Philadelphia negative chronic myeloproliferative disorders: Clinical implications. *Cancer Letters* 284(2009)7 14.

- [164] Patriarca A, Pompetti F, Malizia R, et al. Is the absence of JAK2 mutation a risk factor for bleeding in essential thrombocythemia? An analysis of 106 patients. *Blood Transfus.* 2010;8(1):21-7.
- [165] Palandri F, Ottaviani E, Salmi F, et al. JAK2 V617F mutation in essential thrombocythemia: correlation with clinical characteristics, response to therapy and long-term outcome in a cohort of 275 patients. *Leuk Lymphoma.* 2009;50(2):247-53.
- [166] Antonioli E, Guglielmelli P, Pancrazzi A, et al. Clinical implications of the JAK2 V617F mutation in essential thrombocythemia. *Leukemia.* 2005;19(10):1847-9
- [167] Tefferi A. Polycythemia vera and essential thrombocythemia: 2012 update on diagnosis, risk stratification, and management. *Am J Hematol.* 2012;87(3):285-93
- [168] JPassamonti F, Rumi E, Arcaini L, et al. Prognostic factors for thrombosis, myelofibrosis, and leukemia in essential thrombocythemia: a study of 605 patients. *Haematologica.* 2008;93(11):1645-51
- 169 Nangalia, J., Massie, C. E., Baxter, E. J., Nice, F. L., Gundem, G., Wedge, D. C., ... & Aziz, A. Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2. *New England Journal of Medicine*, 2013;369(25):2391-2405.
- 170 Tefferi, A., Wassie, E. A., Guglielmelli, P., Gangat, N., Belachew, A. A., Lasho, T. L., ... & Wolanskyj, A. P. Type 1 versus Type 2 calreticulin mutations in essential thrombocythemia: a collaborative study of 1027 patients. *American journal of hematology*, 2014;89(8);E121-E124.