

T.C.
Kocaeli Üniversitesi
Tıp Fakültesi
İç Hastalıkları Anabilim Dalı
Hematoloji Bilim Dalı

Bcr-Abl Negatif Kronik Miyeloproliferatif Neoplazilerde
Mast Hücre Triptaz Aktivitesi ve CD34+ Hücre Ekspresyonunun
Araştırılması

(Hematoloji Yan Dal Uzmanlık Tezi)

Dr. Hakan KESKİ

Kocaeli, 2013

TEŞEKKÜR

Yan dal uzmanlık eğitimim süresince engin deneyim ve bilgilerini benimle paylaşan, yakın ilgi ve desteklerini her zaman hissettiğim başta tez danışmanı hocam Prof. Dr. Abdullah Hacıhanıfioğlu olmak üzere, ana bilim dalı başkanımız Prof. Dr. Ahmet Yılmaz'a, şükranlarımı sunarım.

Değerli katkılarından dolayı Patoloji Ana Bilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr.Cengiz Erçin'e, Yrd. Doç. Dr. Elif Birtaş Ateşoğlu'na ve Yrd. Doç Dr. Pınar Tarkun'a teşekkür ederim.

Bana her zaman destek olan eşim Deniz'e, hematoloji eğitimim esnasında aileme katılan değerli oğullarım Mehmet Ertuğrul ve Ali Çağrı'ya, destekleriyle bana devamlı güç veren anneme ve babama en içten teşekkürlerimi sunarım.

Uzm. Dr. Hakan Keski

İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1.KRONİK MİYELOPROLİFERATİF NEOPLAZİLER.....	4
2.1.1.Polisitemia Vera	7
2.1.2.Esansiyel Trombositemi.....	11
2.1.3.Primer Miyelofibroz	14
2.2. KRONİK MPN'LERDE GÖRÜLEBİLEN MUTASYONLAR.....	18
2.2.1. JAK-2 Mutasyonu	18
2.2.2. MPLW515L/K Mutasyonu	20
2.2.3.TET-2 Mutasyonu	21
2.2.4.CBL Mutasyonu	21
2.3. MAST HÜCRESİ.....	22
2.3.1. Mast hücrelerinin genel özellikleri	22
2.3.2.Mast hücrelerinin histokimyasal özellikleri.....	23
2.3.3.Mast hücrelerinin fibrozis ile ilişkisi	24
2.4. CD34+ HÜCRE EKSPRESYONU.....	25
2.4.1. Genel bakış.....	25
2.4.2. Miyelofibrozda CD34+ hücreler	26
3. GEREÇ VE YÖNTEM	27
3.1. Hasta ve Kontrol Grubu	27
3.2. Kemik iliği biyopsisi.....	27
3.3. Patoloji preparatlarının rutin tanı için hazırlanması.....	28
3.4. CD34 ve mast hücre triptaz boyaması	28
3.5. Preparatların değerlendirilmesi	29
3.6.Etik kurul onayı ve gönüllülerin bilgilendirilmiş onamı.....	29
3.7. İstatistiksel Analiz.....	29
4. BULGULAR.....	32
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	51
6. ÖZET.....	55
7. ABSTRACT.....	57
8. KAYNAKLAR	59-72

TABLO DİZİNİ

Tablo 1 DSÖ 2008 Miyeloid neoplazi sınıflandırması	5
Tablo 2 JAK2 mutasyonu görülme sıklıkları	6
Tablo 3 Kronik miyeloproliferatif neoplazilerde miyelofibrozisin derecelendirilmesi.....	7
Tablo 4 DSÖ 2008 Polisitemia vera tanı ölçütleri	9
Tablo 5 DSÖ 2008 Esansiyel trombositemi tanı ölçütleri.....	12
Tablo 6 Esansiyel trombositemi için ELN yanıt ölçütleri	13
Tablo 7 Miyelofibroz tanısı için gerekli DSÖ 2008 tanı ölçütleri	15
Tablo 8 Miyelofibroza Uluslararası Prognostik Skorlama Sistemi.....	16
Tablo 9 Tanımlayıcı özelliklerin dağılımı	30
Tablo 10 Gruplara göre hemogram bulgularının değerlendirilmesi.....	30
Tablo 11 Gruplara göre laboratuvar bulgularının değerlendirmeleri	33
Tablo 12 Gruplara göre JAK 2, retikülin lif ve splenomegali değerlendirmeleri ...	35
Tablo 13 Tanılara göre mast hücre ve CD34+ hücre değerlendirmeleri	37
Tablo 14 Tüm olgularda; mast hücre ve CD34+ hücre ile hemogram ve laboratuvar bulgularının ilişkisi	38
Tablo 15 Hasta olgularda; mast hücre ve CD34+ hücre ile hemogram ve laboratuvar bulgularının ilişkisi	40
Tablo 16 Kontrol grubunda; mast hücre ve CD34+ hücre ile hemogram ve laboratuvar bulgularının ilişkisi	43
Tablo 17 JAK 2 durumuna göre mast hücre ve CD34+ hücre değerlendirmeleri...	45
Tablo 18 Retikülin lif düzeylerine göre mast hücre ve CD34+ hücre değerlendirmeleri	46
Tablo 19 Splenomegali düzeylerine göre mast hücre ve CD34+ hücre değerlendirmeleri	47

ŞEKİL VE RESİM DİZİNİ

Resim 1: Mast hücre triptaz boyası ile boyanmış kemik iliği biyopsi örneği	28
Resim 2: Mast hücre triptaz boyasıyla boyanmamış kemik iliği biyopsi örneği ...	28
Resim 3: CD34 boyasıyla boyanmış kemik iliği biyopsi örneği	29
Resim 4: CD34 boyasıyla boyanmamış kemik iliği biyopsi örneği	29
Şekil 1: Gruplara göre lökosit sayısı değişimi	31
Şekil 2: Gruplara göre nötrofil sayısı değişimi	31
Şekil 3: Gruplara göre eozinofil sayısı değişimi	32
Şekil 4: Gruplara göre trombosit sayısı değişimi	32
Şekil 5: Gruplara göre ürik asit düzeyi değişimi	33
Şekil 6: Gruplara göre miyeloid/eritroid oranı değişimi	34
Şekil 7: Gruplara göre mast hücre değişimi	34
Şekil 8: Gruplara göre JAK 2 mutasyonu görülme oranları değişimi	35
Şekil 9: Gruplara göre retikülin lif düzeyleri değişimi	36
Şekil 10: Gruplara göre splenomegali düzeyleri değişimi	36
Şekil 11: Tanılara göre CD34+lığının değişimi	37
Şekil 12: Tüm olgularda; mast hücre ile trombosit sayısı ilişkisi	39
Şekil 13: Tüm olgularda; CD34+ liği ile ürik asit düzeyi ilişkisi	40
Şekil 14: Hasta olgularda; CD34+ liği ile LDH düzeyi ilişkisi	41
Şekil 15: Hasta olgularda; CD34+lıği ile ürik asit düzeyi ilişkisi	42
Şekil 16: Kontrol grubu olgularda; mast hücre ile hematokrit ilişkisi	44
Şekil 17: JAK 2 mutasyonu görülme durumuna göre mast hücre değişimi	45
Şekil 18: Retikülin lif düzeylerine göre mast hücre değişimi	46
Şekil 19: Retikülin lif düzeylerine göre CD34+lığının değişimi	47
Şekil 20: Splenomegali düzeylerine göre mast hücre değişimi	48

KISALTMALAR LİSTESİ

BCR: “Breakpoint cluster region” geni 22.kromozomdadır.

BCR-ABL: Bcr ve Abl genleri arasında oluşan resiprokal translokasyon

CBL: “ Casitas B-lineage Lymphoma” proteini, hücre sinyalleri ve protein “ubuqitin”leşmeye iştirak eden proteinler

MPL: Miyeloproliferative Leukemia Virüs oncogene, trombopoetin reseptörü

DSÖ: Dünya Sağlık Örgütü

PMF: Primer Miyelofibroz

KML: Kronik Miyeloid Lösemi

PV: Polisitemia Vera

ET: Esansiyel Trombositemi

AML: Akut Miyeloid Lösemi

TNF α : Tümör Nekroz Faktörü Alfa

TGF β : Trombosit Büyüme Faktörü Beta

MDS: Miyelodisplastik Sendrom

PDGFRA: Alfa tip trombosit kaynaklı büyüme faktörü reseptörü, 4. kromozomda bulunur.

PDGFRB: Beta tip trombosit kaynaklı büyüme faktörü reseptörü, 5. kromozomda bulunur.

TET2: “Ten-eleven- translocation” geni türünden bir gendir. Metilsitozin hidroksimetilsitozine dönüştürür. Myelopoezde görev alır. 4. kromozomda bulunur.

KİT: “Proto-oncogene c-Kit “ mast/kök hücre büyüme faktörü reseptörü (CD117) olarak da bilinen protein ve buna ait gen,4. kromozomda bulunur.

FGFR1: “Fibroblast growth factor receptor1”, CD331 olarak da bilinir. Fibroblast büyüme faktörü reseptörü ve buna ait en, 8. kromozomda bulunur.

LNK: SH2B3 olarak da bilinen JAK-STAT sinyallerini inhibe eden protein ve buna ait gen

SOCS1,SOCS2,SOCS3:” Suppressor of cytokine signalling protein” olarak bilinirler.

JAK-STAT sinyal yolağını inhibe eden protein ailesinin1, 2, 3 nolu üyeleri

IDH1,IDH2: İzositrat dehidogenaz 1, 2 enzimi

IKZF1: “Ikaros family zincfinger protein 1” proteini ve buna ait gen, kromatin düzenlenmesi ile genlerin ekspresyonunu düzenler, tümör süpresör gendir.

NRAS: “Neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog” proteini ve buna ait gen, sitoplazma ve golgi arasında mekik işlevi gören proteini kodlayan gendir.

TP53: “Tumor protein 53” geni, p53 tümör supresör proteinini kodlar. Hücre siklusunu kontrol eder ve 17. kromozomda bulunur.

RUNX1: “Runt-related transcription factor 1” proteini ve buna ait gen. Diğer isimleri AML1 ve CBFA2’dir Hematopoetik kök hücrelerin farklılaşmalarını kontrol eden transkripsiyon faktörüdür. 21.kromozomda bulunur.

ASXL1: “Additional sex combs” proteini ve buna ait gen, embriyonun gelişmesi için gerekli epigenetik değişikliklerde rol alan proteindir. 20. kromozomda bulunur.

EZH2: “Histone-lysine N- Methyltransferase “ enzimi ve bunu kodlayan gen, ASLX1 geni gibi poli-comb proteini kodlar, epigenetik ve gen susturucu etkisi vardır. Hematopoiezis ve merkezi sinir sisteminde rol alır.7. kromozomda bulunur.

BFU-E: Burst forming unit- erythroid

LDH: Laktat Dehidrogenaz enzimi

PAR-2: Proteaz aktive edici faktör-2

bFGF: Temel fibroblast büyüme faktörü

VEGF: Vasküler endotelial büyüme faktörü

CMPD-U: Sınıflandırılmayan kronik miyeloproliferatif neoplazi

1- GİRİŞ VE AMAÇ

Kronik miyeloproliferatif hastalıklar (KMH) başlığı altında toplanan polisitemia vera (PV), esansiyel trombositemi (ET), primer miyelofibroz (PMF) ve kronik miyeloid lösemi (KML) herhangi bir farklılaşma ve olgunlaşma kusuru göstermeksizin proliferasyonla giden miyeloid kök hücre hastalıklarıdır. Daha ender olarak görülen kronik nötrofilik lösemi, kronik eosinofilik lösemi, sistemik mastositoz ve atipik KML gibi hastalıklar daha sonradan KMH kapsamına alınmıştır.

Bunlardan KML kendine özgü bir klonal genetik bozukluk olan Philadelphia (Ph) kromozomu varlığı ile diğer üç hastalıktan ayrılır. Tanım gereği PV, ET ve PMF’de Ph kromozomu bulunmaz ve bu nedenle Ph-negatif kronik miyeloproliferatif hastalıklar olarak adlandırılırlar.

Miyeloproliferatif hastalıkların klonal hastalıklar olduğu 1978-1985 yıllarında kanıtlanmıştı (1). Miyeloproliferatif neoplazilerde, tirozin kinazlar ve bunlarla ilişkili genlerde mutasyonlar vardır. Bu mutasyonlar sinyal yollarını sürekli aktif tutarak anormal proliferasyona yol açarlar. Örneğin PV’da dominant ve spesifik bir eritrositoz, ET’de nonspesifik izole trombositoz görülmesine neden olur.

2005 senesinde, dört farklı çalışma grubu birbirinden bağımsız olarak Ph kromozomu negatif miyeloproliferatif neoplazili hastalarda Janus Kinaz 2 (JAK2) geninde 617. pozisyonda valin-fenilalanin (JAK2V617F) somatik tek nokta mutasyonunu göstermişlerdir (2,3,4,5). Mutasyon JAK2 proteininde konstitütif fosforilasyona yol açarak hücreyi sitokinlere karşı aşırı duyarlı yapmaktadır. JAK2V617F mutasyonu PV hastalarının büyük çoğunluğunda (%95), ET ve PMF’li hastaların yaklaşık %50-60’ında görülmektedir.

Polisitemia vera düşünülen olgularda JAK2V617F negatif ise, JAK2 ekson 12 mutasyonu %3 oranında görülebilir. Bunların PV alt tipleri olduğu düşünülmektedir. Bu hastalar daha genç ve kadın ağırlıklı hastalardır (6). MPLW515L/K mutasyonu ET hastalarının %1’inde, PMF hastalarının ise %5’inde bulunmaktadır (7). Bu mutasyonlar hem periferik kanda nötrofillerde hem de kemik iliği hücrelerinde DNA veya RNA düzeyinde araştırılabilir.

Miyeloproliferatif hastalıkların hepsinde JAK2 mutasyonu bulunmayabilir ve aynı mutasyon farklı fenotipik özellikte hastalıklara sebep olabilir. JAK2 mutasyonu Ph kromozomu negatif miyeloproliferatif hastalıklar dışında miyelodisplastik

sendromda (MDS), akut miyeloid lösemide (AML) ve diğer atipik miyeloproliferatif neoplazilerde de görülebilmektedir (8). Özellikle de halka sideroblastlı refrakter anemide (RARS) sık görülmektedir.

Kronik miyeloproliferatif neoplazili hastaların kemik iliği biyopsilerinde, değişik oranlarda olmak üzere miyelofibroz ve retikülin lif artışı görülmektedir. Erken evre kronik miyeloproliferatif hastalıklarda en sık PMF'de %40 olmak üzere, KML'de %20, PV'da %11,2 ve ET'da %2,9 miyelofibroz görülmüştür (9).

Mast hücreleri ilk defa 1878 senesinde Ehrlich tarafından tanımlanan bağ dokusu hücreleridir. Periferik kandaki bazofillere benzer yapısal özellikler göstermesinden dolayı mast hücrelerinin dokudaki bazofiller olduğu düşünülmüştür. Lakin her iki hücre kemik iliğindeki farklı kök hücrelerinden köken alırlar. Yapılan araştırmalar her iki hücrenin de CD34 molekülünü sentezlediğini ve IgE reseptör pozitif kemik iliği öncül hücrelerinden kaynağını aldığını göstermiştir (10,11).

Yapılan son çalışmalarda mast hücrelerinin fibrozis ve diğer inflamatuvar süreçlerde önemli bir rol üstlendiği gösterilmiştir (12). Mast hücrelerinden üretilen histamin, heparin, triptaz, kimaz, IL-4, TNF α , TGF β gibi sitokinler ve matriks metalloproteinaz içeren birçok madde fibrojenize iştirak edebilir. İlave olarak mast hücreleri muhtemelen fibroze direkt olarak katkıda bulunan ekstrasellüler matriks glikoproteinlerini de üretebilir (13).

CD34, hematopoetik kök hücrelerde baskın olarak bulunur ve 90-110 kDa'luk glikoprotein yapısındadır. Hücrenin adezyonu ve/veya hücre siklusunu durdurmada aracıdır. Ancak kök hücreler için spesifik değildir. CD34+ hematopoetik hücrelerin sadece %1'i pluripotent kök hücrelerdir.

Primer miyelofibrozu hastalarda periferik kana mobilize olan tek veya çok dizili hematopoetik progenitör hücrelerin sayısı dikkat çekici şekilde artmıştır.

Bir çalışmada primer miyelofibrozluların periferik kanında mevcut bulunan CD34+ hücre sayısı normal kontrol grubuna göre 360 kat, polisitemia vera veya esansiyel trombositemilere göre 18 ile 30 kat daha fazla bulunmuştur (14).

Bir başka çalışmada primer miyelofibrozu hastalarda artmış CD34+ kök hücre sayısı erken hiperselüler evrelerde (prefibrotik veya hafif fibrotik) görülmekte ve muhtemelen prekürsör hücre havuzunun daha yüksek proliferatif aktivitesine işaret etmektedir (15).

Diğer yandan PV ve PMF’da düşük sayıda progenitör hücre varlığı azalmış proliferasyon hızından kaynaklanmakta ve bu yüzden hematopoezin rejeneratif kapasitesindeki azalmayı yansıtmaktadır. Allojeneik kök hücre nakli yapılan, primer miyelofibrozu 4 hastanın kemik iliği biyopsilerinin incelendiği bir diğer çalışmada ise nakil sonrasında retikülin lif kantitatif ölçümünde progresif azalma görülmüştür. Nakil sonrası 4 hastanın kemik iliği normal sayıda CD34+ hücre içeren normoselüler yapıdaydı. Bu bulgular PMF’li hastalarda kemik iliği fibrozisi ve anormal hematopoetik kök hücre dağılımının malign hematopoetik kök hücre klonunun sonucu olduğunu göstermektedir (16).

Kronik miyeloproliferatif neoplazili olgularda dolaşan mutlak CD34+ hücre sayısının arttığı ve tanısal değeri olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmamızda dolaşan CD34+ hücre miktarının kronik miyeloproliferatif hastalıkların ayırıcı tanısı ve klinik takiplerinde yararlı bir parametre olup olamayacağını araştırmayı amaçladık. Çalışmamızın amaçlarından birisi de Ph kromozomu negatif kronik miyeloproliferatif hastalıklarda değişik oranlarda bulunan retikülin lif artışının, mast hücre proliferasyonu ile ilişkisinin gösterilmesidir. Bir diğer amacımız ise bu hastalıkların patogenezinde önemli rolü bulunan JAK2 pozitifliği ile mast hücre artışı arasındaki bağlantı olup olmadığının ortaya konulmasıdır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1.KRONİK MİYELOPROLİFERATİF NEOPLAZİLER

Kronik miyeloproliferatif hastalıklar, farklılaşma ve olgunlaşma kusuru olmaksızın, proliferasyon kusuru gösteren, hematopoetik hücrenin klonal hastalıklarıdır. Birbirleriyle moleküler ve fenotipik benzerlik gösteren bu hastalıklar 2008’de yeniden gözden geçirilen Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) sınıflandırmasına göre, kronik miyeloproliferatif hastalıklar yerine kronik miyeloproliferatif neoplaziler olarak isimlendirildi (17). Fenotipik çeşitlilik; farklı sinyal transdüksiyon anormalliklerine neden olan, protein kinazlarını ya da ilgili molekülleri etkileyen farklı mutasyonların bir sonucudur (18). Bu hastalıkların tümünde ya tirozin kinaz sinyal yolağında regülasyonunun bozulması (JAK2, MPL veya KİT mutasyonu) ya da kromozomal yeniden düzenlenme (ABL1, PDGFRA/B veya FGFR1’in yeniden düzenlenmesi) vardır. Miyeloproliferatif neoplazilerde eritroid, miyeloid ve megakaryositik dizilerin bir veya daha fazlasında aşırı proliferasyon söz konusudur ve nispeten normal olgunlaşmanın sonucu olarak, periferik kanda eritrositlerin, trombositlerin ve/veya granulositlerin sayısı artmıştır. Bunu takiben aşırı artmış hücrelerin sekestrasyonu, neoplastik hücrelerin infiltrasyonu veya ekstramedüller hematopoez nedeniyle hepatomegali ve splenomegali yaygındır.

MPN’ler diseritropoez, granulositik displazi veya monositoz olmaksızın efektif hematopoez ile karakterizedir. MPN’ler miyelofibroza ilerleme, inefektif hematopoez ve blastik transformasyon potansiyeline sahiptir.

2008 DSÖ sınıflamasına göre miyeloid neoplazilerin sınıflandırılması Tablo 1’de verilmiştir (19).

Tablo 1: DSÖ 2008 MİYELOİD NEOPLAZİ SINIFLANDIRMASI

A. Miyeloproliferatif Neoplaziler
Kronik miyeloid lösemi (Bcr-Abl pozitif)
Kronik nötrofilik lösemi
Polisitemia vera
Primer miyelofibrozis
Esansiyel trombositemi
Kronik eozinofilik lösemi, başka yerde sınıflanamayan
Mastositozis
Sınıflanamayan miyeloproliferatif neoplaziler
B. Eozinofiliyle Birlikte Olan Lenfoid ve Miyeloid Neoplaziler ve PDGFRA, PDGFRB ya da FGFR1'nin Anomalileri
C. Miyelodisplastik/miyeloproliferatif Neoplaziler
Kronik miyelomonositik lösemi
Juvenil kronik miyelomonositik lösemi
Atipik kronik miyeloid lösemi (Bcr-Abl negatif)
Sınıflandırılmayan MDS/MPN
D. Miyelodisplastik Sendrom
E. Akut Miyeloid Lösemi

Kronik miyeloid lösemi, miyeloid seri hücrelerinin aşırı ve kontrolsüz çoğalmasına yol açan bir hematopoetik pluripotent kök hücre hastalığıdır. 9. kromozomdaki Abelson (ABL) ptotoonkogeni ile 22. kromozomdaki breakpoint cluster region (BCR) geninin 22. kromozom üzerinde füzyonuna yol açan resiprokal bir translokasyon [t(9;22)q4;q11] sonucu ortaya çıkmış anormal 22. kromozom olan Philadelphia (Ph) kromozomu KML hastalarının %95'inde bulunur, bulunmayan olgular atipik KML olarak değerlendirilir (20,21).

Ph(-) miyeloproliferatif neoplazilerin çoğunda JAK2617F mutasyonu tanımlanmıştır. Bir sitoplazmik tirozin kinaz inhibitörü olan JAK2, Tip1 sitokin reseptörlerinden gelen (EpoR, TpoR veya G-CSFR) sinyallerin hücre içine iletiminden sorumludur; bu iletiler ön planda hücre içi proliferasyon mekanizmasında önemli rol oynarlar.

JAK2 mutasyonunun çeşitli miyeloid neoplazmlarda bulunma sıklıkları Tablo 2’de verilmiştir:

Tablo:2 JAK2 MUTASYONU GÖRÜLME SIKLIKLARI

Hastalık	Sıklık
Polisitemia vera	%81-99
Esansiyel trombositemi	%41-72
Primer miyelofibrozis	%39-57
Kronik miyelomonositik lösemi	%3-9
Miyelodisplazi	%3-5
Akut miyeloid lösemi	<%5

Bazı PV hastalarında JAK2 ekzon 12 mutasyonu, bazı ET ve PMF hastalarında da MPL mutasyonu tanımlanmıştır. Bu mutasyonlar farklı fenotipte hastalıklar oluşturabilmektedirler.

MPN’lerde hastalığın klinik, etyolojik ve patogenetik olarak belirlenmesi için diğer tirozin kinazlarda ve tümör supresif genlerde araştırmalar yapılmış ve farklı mutasyonlar ve sitogenetik anomaliler saptanmıştır (22). MPN patogenezinde iştirak eden mutasyonlar aşağıdadır:

- A. Temel mutasyonlar olan JAK2V617F ve MPL mutasyonları
- B. Hücre içi sinyal yolağındaki LNK, CBL, SOCS1, SOCS2, SOCS3 gen mutasyonları
- C. Lösemik progresyona katılan IDH1, IDH2, IKZF1, NRAS, TP53 ve RUNX1
- D. Epigenetik modülasyonla ilişkili TET2, ASXL1, EZH2 genlerindeki mutasyonlar

Ph(-) kronik miyeloproliferatif neoplazilerin patogenezinde hiç şüphesiz ki çok önemli rol oynayan sinyal ileti yolaklarından biri JAK/STAT sinyal yolağıdır; çünkü sıklıkla mutasyonları saptanan genlerin hepsi bu yolakta görev alan proteinleri kodlamaktadır. MPL geni özgül ligandı varlığında yolağın aktivasyonunu başlatan ve plazma membranında yerleşim gösteren trombopoetin reseptörünü kodlarken, JAK2 geni reseptörden aldığı sinyali hücre içi ileten ve bunun için hedef proteinleri fosforilleyen kinazı, TET2 ve CBL genleri de yolağı düzenleyen proteinleri kodlamaktadır. Genellikle MPL ve JAK2 genlerindeki mutasyonlar proteine

fonksiyon kazandırıcı yani onları aktive edici özellikte iken, TET2 ve CBL genlerindeki mutasyonlar proteininin fonksiyon kaybıyla sonuçlanmaktadır (22).

JAK2 mutasyonu taşımayan PMF'li olguların %10'unda ve ET'li olguların %3'ünde MPL geninde mutasyonlar saptanmıştır (23). TET2 genindeki mutasyonlar ET'de %5, PV'li olgularda %16 ve PMF'de %17 oranında saptanmaktadır.

Görüldüğü gibi bcr-abl negatif kronik MPN'in etyopatogenezinde tek bir geni suçlamak mümkün değildir. Pek çok sinyal ileti yolağını etkileyen değişik gen ya da genlerin etkilendiği, hastalıkta tetikleyici rol oynadığı aşikârdır. Bu yüzden KML'de olduğu gibi hedefe yönelik seçici bir ilaç henüz kullanıma girmemiş olup, bu konuda çalışmalar devam etmektedir.

Kronik miyeloproliferatif neoplazili hastaların kemik iliği biyopsilerinde, değişik oranlarda olmak üzere miyelofibroz ve retikülin lif artışı görülmektedir. DSÖ sınıflandırmasına göre bcr-abl negatif kronik miyeloproliferatif neoplazi 1300 hastanın başlangıç kemik iliği biyopsilerinde retikülin ve/veya kollagen fibrozisin derecelerinin rölatif insidansları % olarak aşağıdaki Tablo 3'de verilmiştir (24).

Tablo 3: Kronik miyeloproliferatif neoplazilerde miyelofibrozisin derecelendirilmesi

Miyelofibrozisin Derecesi				
	0	1	2	3
Polisitemia Vera	84	15	1	0
Primer Miyelofibrozis	27	17	18	38
Esansiyel Trombositemi	99	1	0	0

Burada sadece bcr-abl negatif klasik miyeloproliferatif hastalıklar olarak bilinen polisitemia vera, esansiyel trombositemi ve primer miyelofibroz hakkında genel bilgiler verilecektir.

2.1.1. POLİSTEMİA VERA

Polisitemia vera (PV) ön planda eritroid seride artışla birlikte, genellikle lökositoz, trombositoz, splenomegali ile karakterize kronik, klonal ve progresif bir miyeloproliferatif neoplazidir (25). Kemik iliğinde eritroid, miyeloid ve megakaryositik seride proliferasyon olur.

2.1.1.1.Epidemiyoloji:

Gerçek insidansı tanı konmamış asemptomatik hastalar nedeniyle bilinenden daha yüksek kabul edilebilir. Erkeklerde 100.000’de 2,8 oranında, kadınlarda ise 100.000’de 1.3 oranında görülür (26). Yahudilerde daha yüksek sıklık oranına sahiptir (27).

2.1.1.2.Patogenez:

PV hastalarının kemik iliği ve periferik kanından elde edilen eritroid koloniler, BFU-E (burst forming unit erythroid) öncüllerinden köken alırlar ve in vitro ortamda eritropoetin olmaksızın endojen eritroid koloniler oluşturabilirler (28). Kromozom 9p üzerinde bulunan JAK2V617F mutasyonunun keşfi hastalık patogenezinin anlaşılmasında ve tanı koymada oldukça önemli bir gelişmedir (29). 617.aminoasit bölgesinde valin ve fenilalaninin yer değiştirmesi ile meydana gelen kazanılmış nokta mutasyonu sonucunda JAK2 otoregülasyonun etkisinden kurtulup fizyolojik sinyal olmaksızın aktive olur (30).

JAK2 ekson 12 pozitif olan hastalarda genellikle eritroid seri artışı diğer serilere göre daha baskın olup, eritropoetin düzeyi daha düşük bulunmuştur.

PV hastalarında trombositlerdeki TPO reseptör düzeylerinde azalma (31), apoptoz inhibitörü olan BCL-X regülasyonunda bozulma, granülositlerde PRV-1 (polisitemia rubra vera-1) geni m RNA düzeylerinde artma da saptanmıştır (32,33).

2.1.1.3.Klinik:

Hastaların %80’inde tanı esnasında bir şikâyeti yoktur. Kalan hastaların yarısında halsizlik, baş ağrısı, kaşıntı izlenebilir. Olguların %30’unda eritromelalji, terleme, kilo kaybı dispne, baş dönmesi, görme bozuklukları, epigastrik ağrı gibi belirtiler görülebilmektedir (34). PV hastaları için sıklıkla arteriyel daha az oranda da venöz tromboembolik komplikasyonlar önemli morbidite ve mortalite nedeni olabilmektedir (35).

Trombozun nötrofil aktivasyonu, nötrofil-trombosit kompleksleriyle ilişkili olduğu gösterilmiştir (36,37,38). JAK2 mutasyonunun trombosit-nötrofil agregatlarının oluşumu için uygun protrombotik bir durum oluşturduğunu destekleyen çalışmalar bildirilmiştir (39).

Pulmoner hipertansiyon, epistaksis, GİS kanamaları, plethoreik yüz görünümü ve hipertansiyon PV’da görülebilmektedir. Hastaların %70’inde splenomegali, %45’inde hepatomegali görülmektedir.

2.1.1.4.Laboratuvar Bulguları:

JAK2 V617F mutasyonu PV hastalarının %95’inden fazlasında gösterilmiştir (4). Serum eritropoetin düzeyi PV’da sıklıkla düşük bulunurken, az bir hasta grubunda terapötik flebotomi sonrası, Budd Chiari sendromu varlığı ve demir eksikliği durumunda normal saptanabilir (40). PV’da kemik iliğinde sıklıkla eritroid ve megakaryositik seride hiperplazi kümeleri izlenir. İleri evre retikülin fibrozis tanısında hastaların %5’inden azında görülürken, 20 yıldan sonra bu oran %50’ye ulaşır (41).

PV’da artmış lökosit alkalen fosfataz (LAP) skoru ve LDH düzeyleri, hiperürisemi, trombosit agregasyon bozukluğu izlenebilir. Tanı esnasında %15 olguda trizomi 8, trizomi 9, 13q delesyonu ve 20q delesyonu gibi sitogenetik anomaliler görülebilir (41). Trombosit fonksiyon bozuklukları ve edinsel von Willebrand hastalığı görülebilir.

2.1.1.5.Tanı:

PV tanısı morfolojik ve laboratuvar ile ilgili verilere dayanır. DSÖ’nün 2008’de PV tanısı koymak için oluşturduğu ölçütler Tablo 4’de gösterilmektedir (19).

Tablo 4: DSÖ 2008 POLİSİTEMİA VERA TANI ÖLÇÜTLERİ

Major Kriterler:
A1: Hemogloblin düzeyinin erkeklerde 18,5 g/dl, kadınlarda > 16,5 g/dl olması veya eritrosit kitle artışının diğer bulguları *
A2: JAK2 V617F veya JAK2 Ekson 12 gibi fonksiyonel olarak benzer mutasyonların varlığı
Minor Kriterler:
1. Yaşa göre hipersellüler kemik iliği biyopsisi, belirgin eritroid, granülositik ve megakaryositik proliferasyon ile karakterize panmiyelozis
2. Serum eritropoetin düzeyinde düşüklük
3. İn vitro endojen eritroid koloni formasyonu
Tanı için 2 major ve 1 minör kriter veya 1. major kriterle birlikte 2 minör kriter varlığı gereklidir.
*Demir eksikliğinin düzeltilmesi ile ilişkisiz olarak en az 2 g/dl seviyesinde dökümente edilmiş ve devamlılık gösteren bir artışın varlığında erkekte 17 g/dl'nin kadında 15 g/dl'nin üzerinde hemogloblin değeri veya eritrosit kitlesinin normal öngörülen ortalama değerinden %25 daha fazla artması veya cinsiyet, yaş, yaşanan yerin rakımına göre belirlenen referans aralığının 99 persentil üzerindeki hemogloblin veya hematokrit düzeyi

2.1.1.6.Tedavi:

PV'da tedavi planı yaparken trombotik komplikasyonların gelişimi açısından hastanın risk grubu belirlenir. 60 yaşın üstünde olmak veya daha önce arteriyel/venöz tromboz öyküsü varlığı yüksek risk faktörleri olarak kabul edilir ve sitoredüktif ilaçlarla tedavi endikasyonu vardır (42). Hipertansiyon, hiperlipidemi, diyabet, sigara içimi gibi kardiyovasküler risk faktörleri varlığında ise diğer yüksek risk faktörleri olmadan da hasta orta dereceli risk grubunda yer almaktadır.

Komplike olmamış PV hastalarının başlangıç tedavisi genellikle flebotomidir (43). Hematokrit artışıyla orantılı olarak tromboz riski de artmaktadır (44). Hedeflenen hematokrit değeri erkeklerde %45, kadınlarda %42'nin altında tutmaktır.

Sitoredüktif ajan olarak günümüzde hidroksiürea kullanılmaktadır. Tromboz riskini, lökosit ve trombosit sayısını azaltır, dalak boyutlarını küçültür, metabolik semptomları düzeltir.

Mutajenik ve lökomojenik etkisi hala tartışmalı bir konu olması nedeniyle genç erişkinlerde tercih edilmemektedir. Uzun süreli hidroksiürea alan hastalarda AML/MDS riski düşük olarak gözükmemektedir (45). Gebelikte ve gebelik planlayan kadın hastalarda teratojenik potansiyeli olmaması nedeniyle ilk tercih edilmesi gereken ajan interferon alfa'(IFN- α)dır (46). Pegile IFN- α ile hematolojik ve hastalıkla ilgili semptomların kontrolü yanı sıra bir kısım hastada moleküler düzeyde de yanıt sağlandığı görülmüştür (47).

Yan etki nedeniyle hidroksiürea kullanılamıyor veya hidroksiüreanın maksimum dozuna rağmen trombosit sayısında azalma yoksa anagrelid kullanılabilir (25). Yüksek riskli hastalarda tromboz riskini azalttığı gösterilemediği için ilk seçenek olarak önerilmez. Kalp yetmezliği ve baş ağrısı gibi yan etkileri vardır.

JAK-2 inhibitörleri klasik tedaviye yanıtız hastalarda deneme amaçlı kullanılmaktadır (48). Son olarak genç, miyelofibrozu veya lösemi gelişmiş veya agresif seyirli hastalarda allojeneik kök hücre nakli denenebilir

2.1.2. ESANSİYEL TROMBOSİTEMİ

ET en sık görülen miyeloproliferatif neoplazi hastalığıdır. KML, PV ve PMF gibi klonal kök hücre bozukluklarından biridir ve kendini izole trombositoz ve trombohemorajik komplikasyonlarla gösterir. Onlardan farklı olarak ET, sitogenetik ve morfolojik olarak çok iyi tanımlanamaz ve günlük pratikte tanısı halen önemli ölçüde diğer hastalıkların dışlanması dayanır (49,50).

2.1.2.1.Epidemiyoloji:

ET'nin yıllık insidansı 100.000 kişide 1-2.5 kadardır, 50-70 yaş arası zirve yapar ve her iki cinste eşit görülmektedir (51,52).

2.1.2.2.Patogenezi:

ET'de trombosit ömürleri normal veya normale yakındır, megakaryositler sayıca artmıştır, nüveleri hiperlobüledir. Sonuçta trombositoz normalin on katına yakın trombosit üretiminden kaynaklanır (53). Patogenezi TPO'nun ya da

reseptörünün (c-MPL) bir rolü yoktur. Endojen megakaryosit koloni gelişimi TPO'yu ilgilendiren otokrin bir uyarana bağlı değildir.

ET'nin etyopatogeneziindeki çevresel faktörler arasında uzun süreli saç boyalarına, gama ışınına ve radona maruz kalma potansiyel risk faktörleri olarak bildirilmiştir (54).

ET'nin moleküler patogenezi JAK2 genindeki akkiz mutasyonun (JAK2V617F) ortaya konması ile daha iyi anlaşılmıştır. JAK2V617F pozitif ve negatif ET'nin klinik fenotipleri farklıdır. JAK2 pozitif olanların daha yaşlı, hemoglobin ve lökositleri daha yüksek, trombosit sayıları daha düşük olma eğilimindedir (55). JAK 2 bakımından homozigot olma PV gelişimine zemin hazırlarken, homozigot klon ET hastalarında nadirdir. İnsan CD34+ hücrelerinde JAK2 STAT5 aktivasyonu arttığında eritrositoz, azaldığında ise trombositoz eğilimi ortaya çıkar (56).

ET hastalarının küçük bir kısmında AML dönüşümü ortaya çıkmaktadır. Klonal proliferasyona ek olarak ET, eritromelalji gibi mikrovasküler semptomlar ve artmış trombohemorajik olay riski ile karakterlidir (57). Mikrovasküler semptomların patogeneziinde artmış tromboksan A2 sentezi suçlanır, bunun klinik kanıtı bu semptomların aspirin ile dramatik olarak düzelmesidir (58).

2.1.2.3. Klinik:

ET olgularının yarısı tanı anında asemptomatiktir. Semptomatik olgular en sık mikrovasküler ve vazomotor belirtilerle gelirler. Bunlar baş ağrısı, baş dönmesi, senkop, atipik göğüs ağrısı, akral parestezi, livedo retikularis, eritromelalji ve geçici görme bozukluklarını kapsar. Tromboz sıklıkla arteryeldir, tanı anında olguların %11-25'inde gözlenir. Hemorajik komplikasyonlar daha nadirdir, %2-5 oranında saptanır. Hemorajik komplikasyonlar edinsel von Willebrand hastalığına bağlanmıştır. Bu durum trombosit sayısının artması ve yüksek molekül ağırlıklı vWF'nin trombositlerle etkileşmesi ve proteolizisine bağlıdır (59). Asemptomatik pulmoner hipertansiyon görülebilir. Hafif ve orta düzeyde splenomegali olguların %25-48'inde bulunur. Hepatomegali ve lenfadenomegali sık değildir (60,61).

2.1.2.4. Tanı:

İlk kez trombositoz saptanan hastalarda testin tekrarı ve periferik yayma ile doğrulanması uygundur. Daha sonra ayrıntılı öykü, fizik muayene ile CRP ve serum

ferritin gibi laboratuvar tetkikleri istenebilir. Reaktif trombositoz nedenleri olan demir eksikliği, splenektomi, enfeksiyon, enflamasyon, konnektif doku hastalığı, metastatik kanser ve lenfoproliferatif bozukluklar dışlanmalıdır. Bundan sonraki aşamada ET şüphelenilen olgularda JAK2 V617F mutasyonu aranması ilk test olarak önerilmektedir. DSÖ tarafından 2008’de yeniden gözden geçirilen ET tanı kriterleri Tablo 5’te belirtilmiştir.

Tablo 5: DSÖ 2008 ESANSİYEL TROMBOSİTEMİ TANI ÖLÇÜTLERİ

1. Trombosit sayısının devamlı olarak 450.000/ μ L’nin üzerinde olması
 2. Büyük, olgun megakaryositlerde sayıca artışla temel olarak megakaryositik proliferasyon gösteren kemik iliği örneği olmalı, nötrofil granülopoezinde veya eritropoezde belirgin artış veya sola kayma olmamalıdır.
 3. PV, PMF, KML, MDS veya diğer miyeloid neoplaziler yönünden DSÖ ölçütlerini karşılamamalıdır.
 4. JAK2 V617F veya diğer klonal belirteçlerin ortaya konması; belirteç yokluğunda reaktif trombositoz belirtisi bulunmamalıdır.
- Tanı için 4 kriterin birlikte bulunması gerekmektedir.

2.1.2.5. Laboratuvar:

Trombosit sayısı genelde 600.000/ μ L’ten fazla olup bazen 1.000.000/ μ L’nin üstüne çıkar. Lökosit sayısı normal veya hafifçe artmıştır. Periferik yaymada trombosit kümeleşmesi, mikrotrombositler veya dev trombositler görülebilir. Hemoglobinin düzeyi genelde normaldir. Kemik iliği aspirasyonu ve biyopsisinde megakaryositoz belirgindir. Kemik iliği normo veya hipersellülerdir. Serum potasyum düzeyinde yalancı yükseklik görülebilir. Bunun nedeni in vitro pıhtı oluşumu sırasında potasyumun trombositlerden dışarı sızmasıdır. Ayrıca serum ürik asit, laktik dehidrogenaz düzeylerinde vakaların yarısında artış bulunabilir.

2.1.2.6. Prognoz ve Risk Faktörleri:

Düşük hemoglobin düzeyi (kadınlarda 12 g/dl’nin erkeklerde 13,5 g/dl’nin altı), yaşı 60’tan büyük olması, lökosit sayısının 15.000/ μ L nin üzerinde olması, sigara, venöz tromboz ve diyabetes mellitus öyküsü sağkalım üzerinde olumsuz

faktörlerdir (62). Risk değerlendirmesi hemorajiden çok trombozu etkileyen faktörler üzerinden yapılmaktadır. Trombozu öngörmede herkesin uzlaştığı iki faktör; yaşı 60'ın üzerinde olması ve önceki tromboz öyküsüdür (63,64). Tanıdaki trombosit sayısının tromboz için bağımsız bir risk faktörü olduğu ortaya konmuştur (65,66).

Günümüzde genel olarak 60 yaşı üzerinde olanlarda veya daha önce tromboz öyküsü bulunanlarda sitoredüktif tedavi gerekli bulunmaktadır.

2.1.2.7. Tedavi:

Kontrendikasyon olmadıkça tüm ET'li olgularda düşük doz aspirin tedavisi önerilmektedir. Düşük riskli olmakla birlikte trombosit sayısı 1.000.000/ μ L'nin üzerinde olan olgularda, kazanılmış von Willebrand hastalığı nedeniyle aspirin kanama riskini arttırabileceğinden, aspirin başlanmadan ristosetin kofaktör aktivitesinin bakılması, aktivitenin %30'dan az olması durumunda aspirin verilmemesi önerilmektedir (67).

Yüksek riskli olgularda sitoredüktif tedavi endikasyonu vardır. Hidroksiürea ve anagrelidin karşılaştırıldığı bir çalışmada, hidroksiürea arteriyel tromboz, major kanama ve fibroze ilerleme riskini azaltma bakımından anagrelide üstün bulunmuştur. Buna karşın venöz koruma anagrelid kolunda daha iyidir (68). Sitoredüksiyon için diğer alternatif trombosit sayısını kontrolde etkinliği bilinen interferon α 'dır ancak trombozu önlemede kanıtları çok değildir (69).

Tablo 6'te ET için European Leukemia Net (ELN) yanıt ölçütleri verilmiştir.

Tablo 6: Esansiyel Trombositoz için ELN yanıt ölçütleri

Tam yanıt: Trombosit sayısı 400.000/ μ L'den az, hastalıkla ilişkili semptom yok, dalak boyutu normal, lökosit sayısı 10.000/ μ L'den az
Kısmi yanıt: Tam yanıt ölçütlerini karşılamıyor fakat trombosit sayısı 600.000/ μ L'den az veya başlangıca göre %50'den fazla azalmış.
Yanıtsız: Kısmi yanıt ölçütlerini karşılamayan herhangi bir yanıt

2.1.3. PRİMER MİYELOFİBROZ

Miyelofibroz, primer ya da esansiyel trombositemi, polisitemia vera sonrası gelişen klonal bir miyeloproliferatif hastalıktır. KMPH'lar içinde en az görülendir.

2.1.3.1.Epidemiyoloji:

Hastalığın yıllık görülme oranı Kuzey Avrupa'da 100.000' de 0,5 iken Amerika'da ise 100.000'de 1,5 olarak tahmin edilmektedir. Tanı anında ortalama yaş 65-70 civarındadır (70).

2.1.3.2.Laboratuvar:

En sık anemiye rastlanır. Ayrıca trombositoz, lökositoz veya lökopeni de gözlenebilir. Trombosit agregasyon defekti sıklıkla mevcuttur. LDH düzeyi hastaların %95'inde yükselmiştir. Periferik yaymada tipik lökoeritroblastik tablo bulguları olan çekirdekli eritrositler, granülosit öncülleri ve gözyaşı hücreleri izlenebilir.

Kanda CD34+ hücrelerindeki bir artış PMF için çok karakteristiktir ve bu hücrelerin yoğunluğu tanı koymada önemlidir. CD34+ hücre sayısının yüksekliği hastalığın yaygınlığı ve hastalık progresyonu ile koreledir. Kanda CD34+ hücreler $15 \times 10^6/l$ 'den fazlaysa adeta primer miyelofibroz için tanısaldır. CD34+ hücresi $300 \times 10^6/l$ 'dan fazla olan hastalar, daha az CD34+ hücreli hastalara göre, hastalığın daha hızlı progresyonuna sahiptir.

2.1.3.3.Kemik İliği:

Fibrotik fazda kemik iliği aspirasyonu, fibrozis yüzünden sıklıkla başarısızdır. Kemik iliği biyopsi örnekleri genellikle sellülerdir ve granülositik ve megakaryositik hiperplazi gösterir. Eritroid hücreler azalmış, normal veya artmış sayıda olabilir.

Gümüş boyama retikülin liflerdeki artışı gösterir ve hastaların yarısında retikülin liflerde göze çarpan artış gözlenmektedir. Dev megakaryositler ve mikromegakaryositler, anormal nükleer lobulasyon ve çıplak megakaryosit çekirdekleri mevcuttur. Trombopoetin reseptörleri megakaryosit ve trombositlerde azalmıştır. Granülositler nükleer hiperlobulasyonu ve hipolobulasyonu, edinsel Pelger Huet anomalisi ve nükleer-sitoplazmik olgunlaşma asenkronisi gösterebilir. Blast kümeleri ve CD34+ hücreler sıklıkla mevcuttur. Dilate kemik iliği sinüsleri yaygındır.

Prefibrotik evrede kemik iliğinde genelde hafif retiküler fibrozis vardır ya da fibrozis bulunmaz. Kemik iliği hiperselülerdir ve metamiyelosit ve miyelosit gibi nötrofil prekürsörlerinin oranı artmıştır. Miyeloblastlar ve CD34+ hücreler farkedilmezler. Eritropoez hafifçe azalmıştır. Artmış ve anormal megakaryopoez bu faza damgasını basar. Megakaryosit kümeleri mevcuttur. Çıplak megakaryosit çekirdekleri bulunur. Megakaryositler kemik iliğinin CD61 gibi megakaryosit belirteçleri ile boyanmasıyla gösterilirler.

Kemik iliği biyopsisinde retikülin ve trikrom boyası ile saptanan fibrozise ek olarak bozulmuş çekirdek/sitoplazma oranına sahip hiperkromatik, düzensiz katlantılı megakaryositlerin görülmesi beklenir.

2.1.3.4. Klinik:

Hastaların %15-30'u asemptomatiktir ve genellikle splenomegali açısından tetkik edilirken tanı alırlar. Ayrıca en sık görülen yakınmalar halsizlik, kilo kaybı, gece terlemesi, karında şişkinlik hissi, erken doyma, karın ağrısı ve kemik ağrısıdır. İnfektif eritropoez ve ekstramedüller hematopoez, anemi ve organomegalinin ana sebebidir. Portal ve pulmoner hipertansiyon, plevral efüzyon, asit, kord kompresyonu gibi komplikasyonlara rastlanabilir.

2.1.3.5. Tanı:

Miyelofibroz tanısı için Tablo 7'da verilen 3 major kriter yanında, 2 minör kriter gereklidir.

Tablo: 7 Miyelofibrozu Tanısı İçin Gerekli DSÖ 2008 Sınıflaması Ölçütleri

Major ölçütler:
1. Retikülin/kollajen varlığında megakaryosit proliferasyonu ve atipisi veya anlamlı retikülin olmadığında artan granülositik proliferasyon ve azalan eritropoez ile birlikte artmış kemik iliği sellülaritesi
2. DSÖ ölçütlerine göre polisitemia vera, kronik miyeloid lösemi, miyelodisplastik sendrom ve/veya diğer miyeloid neoplazilerin tanı ölçütlerinin karşılanmaması
3. JAK2V617F mutasyonunun veya diğer klonal göstergelerin (MPLW515K/L) varlığı veya klonal gösterge olmadığında kemik iliği fibrozisi yapabilecek altta yatan inflamatuvar veya neoplastik başka bir hastalığın olmadığının gösterilmesi
Minör ölçütler:
1. Lökoeritroblastozis
2. LDH düzeyinde artış
3. Anemi
4. Palpabl splenomegali

Hastalığı başlatan mutasyon halen bilinmemekte olup hastaların %50-60'ında JAK2V617F mutasyonu saptanmaktadır. Bir çalışmada JAK2V617F düşük allel yükü bulunduranların daha düşük hemoglobin düzeyi ve daha az splenomegali ile seyrettiği fakat sitopeniye bağlı enfeksiyonlar veya lösemik transformasyon nedeniyle daha kötü sağkalım ile beraber olduğu gösterilmiştir (71). Hastaların %5-10'unda MPL mutasyonu pozitif bulunmaktadır.

2.1.3.6. Prognoz:

Hastalığın prognozunu belirlemek için en sık kullanılan skortlama sistemi Uluslararası Prognostik Skortlama Sistemi (IPSS)'dir (72). Risk faktörleri yaşı 65'ten büyük olması, hemoglobinin 10 g/dl'nin altında olması, lökosit sayısının 25.000'in üzerinde olması, periferik kanda dolaşan blastların %1'den fazla olması ve konstitusyonel semptomların bulunmasıdır.

Tablo 8: Miyelofibroзда Uluslararası Prognostik Skorlama Sistemi

	Risk Faktörü	Sağkalım
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

Lösemiye dönüşüm riskinin trombosit sayısı düşük olan ve +8, -7q, inv13, -5q, 12p- veya 11q23 gibi kötü karyotipe sahip hastalarda daha yüksek olduğu gösterilmiştir.

2.1.3.7.Tedavi:

Konvansiyonel tedavi seçenekleri sadece palyatiftir. Şifa sağladığı gösterilmiş tek tedavi seçeneği allojeneik kök hücre naklidir. Asemptomatik düşük ve orta-1 risk faktörü olan hastalarda tedavisiz izlem yapılabilir. Anemi, splenomegali, konstitüsyonel semptomların varlığında bu hastaların tedavi edilmesi gerekir. Orta-2 ve yüksek riskli hastalara, yaşları ve komorbid durumları değerlendirilerek öncelikle allojeneik nakil, uygun değilse konvansiyonel tedavi seçenekleri veya splenektomi seçenekleri önerilebilir.

Konvansiyonel tedavi seçeneklerinden eritropoetin, anemisi olup splenomegalisi olmayan hasta grubuna fayda sağlayabilir. Androjenler yine anemisi olan hastalarda yararlı olabilir. Kortikosteroidler tek başlarına ya da kombine kullanılabilir. Splenektomi endikasyonları arasında ilaçlara dirençi splenomegali ve transfüzyon bağımlı anemi sayılabilir.

Hidroksiürenin dalak boyutlarında küçülme, lökositöz, trombositöz gibi kan parametrelerinde düzelme sağladığı gibi kemik iliği fibrozisinde de gerileme yaptığı gösterilmiştir (73).

Talidomid, dalak boyutlarında küçülme, hematolojik parametrelerde düzelme ve konstitüsyonel semptomlarda gerileme sağlar. Lenalidomid ve pomalidomid ile de çalışmalar sürmektedir.

Ruxolitinib, hem JAK1 hemde JAK2 inhibisyonu yapan potent, oral bir ajandır. Miyelofibroзда FDA (Food and Drug Administration) onayı almıştır. Bu ilaç splenomegalide hızlı ve kalıcı bir yanıt, konstitüsyonel semptomlarda, egzersiz kapasitesinde ve performans durumunda düzelme sağlamaktadır. Doz kısıtlayıcı

etkisi anemi ve trombositopenidir. İlaç kesildiğinde gelişebilecek sitokin boşalması nedeniyle doz azaltılarak kesilmesi önerilmektedir.

Miyelofibroz hastalarında kök hücre nakli kararı hasta için kar-zarar oranı tartılarak verilmelidir. Kronik graft versus host hastalığı önemli bir morbidite ve mortalite nedenidir. %30–49 arasında değişen oranlarda gözlenebilmektedir. 45 yaş altı genç hastalarda, orta-2 ve yüksek riskli hasta grubunda miyeloablatif; 45 yaş üstü veya komorbiditesi olan hasta grubunda ise HLA tam uyumlu akraba verici bulunduğu indirgenmiş yoğunlukta rejim ile allojeneik kök hücre nakli önerilebilir.

2.2. KRONİK MİYELOPOLİFERATİF NEOPLAZİLERDE GÖRÜLEN MUTASYONLAR

2.2.1. JAK 2 MUTASYONU

Janus Kinaz (JAK) ailesi, JAK/STAT yolağı ile sitokin aracılı sinyallerin dönüşümünü sağlayan bir grup tirozin kinaza verilen isimdir. Bu yolaktaki transkripsiyon faktörleri ise STAT'lar (Signal Transducers and Activators of Transcription) olarak bilinir. JAK'ların yapısında birbiri ile neredeyse aynı, iki adet fosfat transfer edici bölge (domain) vardır. Bu iki domainden bir tanesi kinaz aktivitesi sergilerken ikincisi ise bu kinaz aktivitesini negatif yönde regüle eder (74).

JAK/STAT sinyal yolağında görev alan bir protein tirozin kinazı kodlayan Janus Kinaz 2 geni için tanımlanan ilk mutasyon 14. ekzonunda ve 1849. pozisyonunda yer alan guanin nükleotidinin timine (G1849T) değişmesiyle, sentezlenen proteinin 617. pozisyonundaki valin aminoasidinin yerine fenilalanin kodlanmasına yol açan V617F mutasyonudur (1,3,4,5,75).

Bu mutasyon bcr-abl negatif kronik miyeloproliferatif hastalıklarda görülen en yaygın değişikliktir ve PV, ET, PMF'da sırasıyla %96, %55 ve %65 oranında gözlenir (23).

JAK2 V617F mutasyonunun toplumdaki sıklığını araştıran en kapsamlı çalışma Xu ve arkadaşları tarafından Çin'de 4000'e yakın sağlıklı hastane çalışanına ait kan örnekleri üzerinde yapılmış ve JAK2 sıklığı %1 bulunmuştur (76).

JAK'lar 120-140 kDa arasında değişen büyüklükte olup Janus homoloji domain 1-7 olarak adlandırılan (JH 1-7) yedi bölge ihtiva ederler. JH1, JAK'ın

enzimatik aktivitesi için önemli olan kinaz domaini olup, JAK aktivasyonu için gerekli tirozinleri içerir. JH2 tirozin kinaza benzer yapıdaki psödokinaz domainidir. JH2, JH1'in aktivitesini düzenlemede görev alan, normal bir kinaz aktivitesi için gerekli olan, fakat enzimatik aktivitesi olmayan kısımdır. V617F, JH2'de yer alır.

JAK/STAT sinyal ileti yolağı, sitokinelere ve büyüme faktörlerine hücrel yanıtın regülasyonunda görev alarak, gen ekspresyonunu modifiye eder. Diğer bir deyişle, aktive STAT proteinleri, ekstraselüler polipeptidlerde taşınan sinyallerin dönüşümü ve hücre çekirdeğine iletilmesine olanak tanır. JAK/STAT yolağı hematopoez için özellikle önemlidir. Hücrelerdeki proliferasyon, diferansiyasyon ve apoptozun düzenlenmesini sağlar (77).

Koloni stimüle eden faktörler, prolaktin, büyüme hormonu ve birçok sitokin JAK/STAT sinyal ileti yollarını kullanan moleküllere örnek olarak verilebilir.

JAK2 V617F mutasyonu taşıyan olgular incelendiğinde hepsinin ilgili mutasyonu sonradan somatik olarak kazanmış oldukları ve bunun miyeloid soy içindeki hücrelerde sınırlı kaldığı göze çarpmıştır ki bu da JAK2 V617F mutasyonunun önce miyeloid soydan bir progenitör kök hücrede meydana geldiği ve aktarıldığı hipotezini desteklemektedir. Hatta olguların çoğunda 9.kromozomun p kolundaki telomerik bölgenin mitotik rekombinasyonu sonucu oluşan JAK2 gen lokusunun uniparental dizomisi nedeniyle, hücreler JAK2 mutasyonunu homozigot şekilde taşımaktaydılar. Bu durum özellikle PV hastalarında gözleendiğinden, JAK2 V617F dozajının kısmen hastalığın fenotipik belirtilerini etkilediği ve yüksek dozda eritroid farklılaşmayı teşvik ettiğini düşündürmüştür (78).

Yapısal olarak incelendiğinde ise V617F mutasyonu JAK2 proteinin katalitik olmayan psödokinaz bölgesi içine düşmektedir. Bölgenin normalde görevi olan otoinhibitör baskılama olayı mutasyon nedeniyle ortadan kalktığından, ligand yokluğunda bile devamlı bir kinaz aktivasyonu gözlenmektedir (79).

Ancak JAK2 V617F mutasyonunun büyüme faktörlerinden bağımsız proliferasyona yol açabilmesi için mutlaka eritropoetin, trombopoetin veya granülosit stimüle edici faktör gibi homodimerik Tip 1 sitokin reseptörlerinin oluşturduğu yapı iskelesine ihtiyaç duyduğu gösterilmiştir. Adı geçen reseptörlerin hematopoetik gelişimin farklı aşamalarında ifade edilmeleri, aynı JAK2 V617F mutasyonunun neden bazen eritroid, megakaryositik veya granülositik kökenli neoplazmlar geliştirdiği sorusuna da bu şekilde açıklık getirebilmektedir (80). JAK2'nin 14.

ekzonunu etkileyen mutasyonların daha çok PV'nin moleküler patogenezi ile ilişkili olabileceği üzerinde durulmuştur (81,82,83).

JAK2 V617F'nin trombopoietin reseptörü olan MPL'nin hücre yüzeyindeki yerleşimi ve stabilitesini değiştirerek trombosit aktivasyonuna etki edebileceği ileri sürülmüştür (84). JAK2 V617F mutasyonu neticesinde aktive olan JAK2/STAT ileti yolunun bazı apoptoz ve transkripsiyon faktörlerinin ekspresyon düzeylerinde değişikliklere yol açarak koagülasyon mekanizmasını dolaylı olarak etkileyebileceği bildirilmiştir (85).

Robertson ve arkadaşları, trombositlerin lökositlere bağlanmasını sağlayarak yüksek trombojenik potansiyele sahip trombosit-lökosit agregatları oluşmasına yol açan solübl p-selektinin JAK2 pozitif kronik miyeloproliferatif neoplazilerde yüksek düzeylerde bulunduğunu göstermişlerdir (86).

Falanga ve arkadaşları da JAK2 V617F hastalarından elde edilen trombositlerde trombosit p-selektin (CD62p) ekspresyonunun artmış olduğunu ve benzer şekilde doku faktörüne bağlı trombosit miktarının da JAK2 V617F hastalarda daha yüksek bulunduğunu bildirmişlerdir (87).

2.2.2. Miyeloproliferatif Lösemi Virüs:

JAK2 V617F mutasyonunu taşımayan PMF'li olguların %10'unda ve ET'li olguların %3'ünde trombopoietin reseptörünü kodlayan miyeloproliferatif lösemi virüs (MPL) genindeki mutasyonlar gözlenmiştir (23). Bu mutasyonun ilk defa MPL'nın 10. ekzonu içine düşen W515L mutasyonu belirlenmiş ve farelerde PMF benzeri trombositozlu bir hastalık tablosu geliştirebildiği gösterilmiştir (88). Yapılan deneylerde MPLW515L/K mutasyonunun hematopoietik hücrelerin büyüme faktöründen bağımsız proliferasyonuna yol açtığı ve JAK/STAT, MAPK ve PI3K-AKT gibi sinyal ileti yollarını aktive ettiği ortaya konulmuştur (89).

2.2.3. TET Onkogen Aile Üyesi 2:

TET onkogen aile üyesi 2 (TET2) önceleri bir tümör baskılayıcı gen adayı olarak tanımlanmış ve sonrasında, TET ailesine üye diğer enzimler gibi, DNA demetilasyonunda önemli bir görev üstlendiği düşünülmüştür (90). TET2 genindeki mutasyonlar, JAK2 V617F mutasyonunu taşıyan ve taşımayan bcr-abl negatif KMPH'li olgularda saptanabilmektedir ve görülme sıklıkları PV'li olgularda %16, ET'de %5 ve PMF'de %17'dir. TET2 gen mutasyonları büyük bir heterojenite

sergilemektedir ve daha çok 3. ve 11. ekzonlarda görülmekle birlikte, diğer ekzonlarını da etkileyebilmektedir.

Mutasyonlar çoğunlukla proteinin okuma çerçevesinin kaymasına ve erken bir stop kodunun oluşmasıyla sonuçladıkları için, etkilenmiş gen üzerinden genellikle kısa bir protein ürünü sentezlenmektedir (91). TET2 mutasyonlarının hematopoietik kök hücre fonksiyonlarını değiştirdiği ve miyeloid gelişime epigenetik modifikasyonlar üzerinden yol açtığı varsayılmaktadır (92).

2.2.4. Casitas B-soyu Lenfoma:

Casitas B-soyu Lenfoma (CBL) geni multifonksiyonel bir proteini kodlamaktadır. Miyeloid malignitelerde sıklıkla CBL gen lokusunun uniparental dizomisi görülmekle birlikte, çeşitli gen mutasyonları da tanımlanmıştır. Yapılan bir çalışmada PV ve ET'li olgularda herhangi bir CBL mutasyonuna rastlanılmaz iken; PMF'li olguların %6'sında ubiquitin ligaz işlevini yerine getiren bölgesini kodlayan 8. ve 9. ekzonlarındaki mutasyonlar saptanmıştır (93).

2.3. MAST HÜCRELERİ

2.3.1. Genel Özellikler:

Mast hücreleri sitoplazmasında çok sayıda büyük metakromatik granüller içeren, ilk kez Ehrlich tarafından 1878 yılında tanımlanmış hücrelerdir. Eskiden beri alerjinin anahtar hücreleri olarak bilinen mast hücreleri bağ dokularında yerleşim gösteren multifonksiyonel hücrelerdir. Bunlar kemik iliğindeki CD34+ multipotent progenitör hücrelerden köken alır ve kanda prekürsör hücreler olarak dolaşırlar. Derinin dermisi, akciğerler, bağırsakların mukoza ve submukozası gibi bölgelere göç ederek, buralarda çeşitli faktörlerin etkisiyle farklılaşıp olgunlaşırlar (94,95). Dolaşım kanındaki bazofillerle benzer yapısal özellikler göstermesinden dolayı mast hücrelerinin dokudaki bazofiller olduğu düşünülmüştür.

Ancak her iki hücre kemik iliğindeki farklı kök hücrelerinden köken alırlar. Yapılan çalışmalar her iki hücrenin CD34 molekülünü sentezlediğini ve IgE reseptör pozitif kemik iliği hücrelerinden köken aldığını göstermiştir (96,97). Mast hücrelerinin gelişimini, farklılaşmasını, çoğalmasını, adezyonunu, dokulara göçünü,

aktivasyonunu ve canlılığını sürdürmesinde en etkili olan kemotaktik faktör, kök hücre faktörüdür (stem cell factor=SCF)(98).

Mast hücreleri histolojik olarak toluidin mavisi gibi metakromatik boyalarla, kloroasetat esteraz aktivitesiyle, alsiyan mavisi-safranin ikili boyaması ile ve anti-triptaz ve anti-kimaz immunohistokimya teknikleri ile gösterilebilirler.

Mast hücreleri histamin, heparin, triptaz, kimaz, karboksipeptidaz, katepsin C ve G gibi nötral proteazlar, IL-4, TNF α , TGF β ve matriks metalloproteazı içeren birçok sitokin ve mediatör üretirler.

Mast hücreler histokimyasal özellikleri, histamin depolarının durumu, proteoglikan ve nötral proteazları içeren granül durumu ile tetikleyici ve inhibe edici ilaçlara karşı verdikleri yanıtlara göre alt tiplere ayrılırlar (99). Bu hücreler özellikle dış ortamla dolaylı ilişkide olan mukozalarda bulunan triptazdan zengin Mast Cell Triptaz ile dış ortamdan izole olan vücut bölgelerinde bulunan ve sinir sonlarıyla kan damarlarının yakınında yerleşip her iki proteaz türünü de granüllerine taşıyan Mast Cell Triptaz/Kimaz alt sınıflarına ayrılır (100,101). Mast Cell Triptaz daha çok akut yangısal olaylarda yer alırken, Mast Cell Triptaz/Kimaz kronik olaylarda ve bağ dokunun yenilenme sürecinde rol oynar (102).

Mast hücrelerindeki tüm proteazların 1/3'ünü serin proteazlar oluşturur. Bunların en önemlileri triptaz ve kimazlardır. Bir diğeri ise katepsin G'dir.

2.3.2. Mast hücrelerinin histokimyasal özellikleri:

2.3.2.1.Triptaz:

Seçici olarak mast hücreleri ve bazofillerde bulunan tripsin benzeri substrat spesifik özelliğe sahip serin proteaz ailesidir (95,103,104). Bunlardan β Triptaz mast hücre granüllerinde depolanırken, α protriptazlar sağlıklı bireylerde ve akut seyirli olmayan sistemik mastositoz durumunda mast hücrelerinden salgılanan kandaki en önemli inaktif proenzim özelliğindeki triptaz formudur (95). β Triptaz mast hücre granüllerinde en çok depolanan mediatördür. Kronik yangılarda, doku yenilenmesinde ve çeşitli biyolojik süreçlerde önemli rol oynar. Aktif mast hücrelerinden triptazın salınımı, komşu mast hücrelerinde de salgılanmayı arttırarak yangı sırasında tepkinin genişlemesine hizmet eder.

Mast hücre triptazı prokoagulan, matriks, büyüme ve farklılaştırıcı faktörleri ortadan kaldırıp, proteinaz ile aktive olan reseptörler, ürokinaz, metalloproteinaz ve anjiyotensini aktive ederek çeşitli mekanizmalarla enflamasyon, matriks harabiyeti ve dokuda yeniden şekillenme oluştururlar. Yine kemokin ve sitokinleri hidrolize ederek immün yanıtları da modifiye ederler. Triptazlar allerjen ve nöropeptidleri inaktive ederek enflamasyonu da azaltabilirler. Böylece, tıpkı mast hücrelerinin kendileri gibi Mast Cell Triptaz da konakçı doku hasarı ve savunmasında çoklu rollere sahiptir (105).

Triptaz bağ dokusunda fibrin birikimine neden olan prokoagulan proteinlerin aktivasyonunu engelleyerek ve ürokinazları aktive ederek lökositlerin yangı bölgesine göçünü kolaylaştırır (106).

Triptaz kininojenlerden bradikinin oluşmasına, bradikinin ise kallikrein aktivasyonuna neden olur. Kallikrein fibrinojeni yıkarak ve hücre yüzey integrinlerinin arasındaki bağları kopararak damar geçirgenliğinde artışa yol açar (107,108,109). Mast hücre triptazı, muhtemelen proteaz aktive edici reseptör-2 (PAR-2) aracılığıyla havayollarında eozinofil infiltrasyonu ve hem siklooksijenaz hem de prostaglandin bağımlı fibroblast proliferasyonunda rol oynamaktadır. Bu durumda mast hücre triptazı, eozinofil, mast hücresi ve fibroblast arasında bir köprü görevi görebilir (110). β triptaz özellikle PAR-2 içeren keratinositler, fibroblastlar, enterositler, endotel hücreleri, düz kas hücreleri, spermium ve bazı tümör hücrelerinin fonksiyonlarının düzenlenmesinde rol oynar (109). PAR-2 aktivasyonu hücre içi Ca^{+2} depolarından Ca^{+2} 'un mobilizasyonuna neden olur ve insan akciğerinde fibroblast proliferasyonunu uyarak astım, KOAH ve pulmoner fibrozis gibi fibro-proliferatif hastalıkların gelişiminde önemli rol oynar (111).

2.3.2.2. Kimaz:

Bunlar kimotripsin benzeri substrat spesifitesine sahiptirler (95). Kimazlar inaktif prekürsörler olarak sentezlenirler ancak mast hücre granüllerinde heparin ve kondroitin sülfata bağlanarak aktif enzimler olarak depolanırlar (112). Mast hücre kimazının heparinle olan ilişkisi enzimin hem katalitik aktivitesini güçlendirir, hem de degranulasyon sonrasında enzimleri inhibe olmaktan koruyarak yaşam sürelerini uzatır (113). Kimazın, triptazdan farklı olarak histaminden bağımsız şekilde damar geçirgenliğini arttırdığı gösterilmiştir (108).

2.3.2.3. Katepsin G:

Nötrofillerde bulunan triptik ve kimotriptik özelliklere sahip serin proteazdır. İnsanlarda Mast Hücre Triptaz/Kimazda bulunurken Mast Hücre Triptazda olmadığı belirlenmiştir (103). Enfeksiyonlara karşı konağın doğal savunma sisteminde önemli rol oynadığı düşünülmektedir (95).

2.3.3. Mast Hücrelerinin Fibrozis ile İlişkisi:

Son çalışmalarda mast hücrelerinin fibrozis ve diğer inflamatuvar süreçlerde önemli bir rolü olduğu tespit edilmiştir (114). Mast hücrelerinden üretilen histamin, heparin, triptaz, kimaz, IL-4, TNF α , TGF β gibi sitokinler ve matriks metalloproteinaz içeren birçok madde fibrogenezise iştirak edebilirler. Ek olarak mast hücreleri muhtemelen fibrozise direkt olarak katkıda bulunan ekstraselüler matriks glikoproteinlerini de üretebilir (115).

Aktive mast hücre hiperplazisi miyokard fibrozisi, idiopatik akciğer fibrotik hastalığı, peritoneal yapışıklıklar, sistemik mastositoz, skleroderma ve karaciğer sirozunu da içeren fibrozisle giden birçok klinik durumla ilişkilidir (116,117,118,119,120).

Hodgkin ve non-Hodgkin lenfomada, özellikle de Hodgkin lenfomanın noduler sklerozan varyantında mast hücre miktarı ile fibrozisin fraksiyonel alanı arasında korelasyon saptanmıştır (121).

Mast hücre hastalığı bulunan hastalar sıklıkla hematolojik malignitelerle birlikte. Çok sayıda çalışma göstermektedir ki mast hücre hastalığı bulunanların %30'u miyeloproliferatif neoplazi ile ilişkilidir ve anormal mast hücre ile bu hastalıklar arasında bir bağlantı olduğu ileri sürülmektedir (122-131). İlave olarak miyeloproliferatif neoplazili kemik iliği örneklerinin geniş fraksiyonunda artmış mast hücreler gösterilmiştir (132).

Son zamanlarda sistemik mastositoz ve primer miyelo fibrozlu hastaların her ikisinde de hem JAK-2'yi hem de c-kit'i aktive edecek mast hücre ve miyeloid hücre dizilerini gösteren mutasyonların varlığı birçok hastada bildirilmiştir. Böylece mast hücresi, fibrozis ve miyeloproliferatif hastalıklar arasında ilişki kurulabilir (133).

2.4. CD34+ HÜCRE EKSPRESYONU

2.4.1.Genel Bakış:

CD34 hematopoetik kök hücrelerde baskın olarak bulunur ve 90–110 kDa’luk molekül ağırlığında tip 1 integral membran proteinidir. Glikoprotein yapısındadır. Hematopoetik hücrenin, hücre membranına bağlı küçük bir peptittir. Hematopoetik progenitör hücrelerin ve endotelial hücrelerin belirleyicisidir. Hücrenin adezyonu ve/veya hücre siklusunu durdurmada aracıdır. Ancak kök hücreler için spesifik değildir. CD34+ hematopoetik hücrelerin sadece %1’i pluripotent kök hücrelerdir.

Terminal deoksinükleotidil transferaz pozitif (TdT +) olgunlaşmamış lenfoid hücrelerin ve olgunlaşmamış miyeloid hücreleri belirleyen erken hematopoietik kök hücrelerin (eritroid, miyeloid ve megakaryositik prekürsörler) işaretleyicisidir. Dolaşan miyeloid progenitör hücreler akım sitometrisi ile kolayca tespit edilebilir. CD34 AML, B-ALL ve T-ALL dışında hematopoetik olmayan tümörler içinde gastrointestinal stromal tümörler (GİST), Kaposi sarkomu, dermatofibrosarkoma protuberans, iğsi hücreli lipom, miyofibroblastomlar, epitelioid sarkomlar, nöral ve vasküler tümörler tarafından da eksprese edilirler. Çok nadiren melanomlar, bazı karsinomlar ve Hodgkin dışı lenfomalarda CD34 eksprese edebilir.

Kemik iliği ve mobilizasyondan sonra periferik kanda bulunan CD34+ hücrelerde transkripsiyon faktörlerinin tanımlanması, CD34+ hücrelerin kendi kendini yenileme, diferansiyasyon, mobilizasyon ve migrasyon özelliklerini de ortaya çıkarır.

Moleküler anti-CD34 antikorları MY10 ve QBEND10 pratikte yaygın olarak kullanılanlardır. CD34’e karşı oluşmuş antikorlar arter ve venlerdeki endoteliumla reaksiyon verir.

2.4.2.Miyelofibroziste CD34+ Hücreler:

Ekstamedüller hematopoezde dolaşımdaki tek veya çok dizili hematopoetik progenitör hücrelerde artış vardır ve CD34+ hücre sayısı normalden 300 kat fazla olabilir. Dolaşımdaki CD34+ hücrelerdeki artış PMF’yi diğer MPN’lerden ayırır ve akut lösemiye dönüşüm riskini ve dalak tutulumunun derecesini öngörür.

PMF’lu hastalarda kanda CD34+ hücre sayısının yüksekliği hastalığın yaygınlığı ve progresyonu ile ilişkilidir. Kanda $15 \times 10^6/l$ den fazla CD34+ hücre sayısı neredeyse PMF için tanısaldır. Kemik iliği fibrozisinin daha güçlü derecelerde

olduğu hastaların kemik iliklerinde CD34+ hücrelerin sayısında azalma gözlemlenmiştir. Kemik iliği içindeki artmış CD34+ hücre sayısı artmış kemik iliği sellüleritesi ile ilişkilidir. Oysaki kemik iliğinde CD34+ hücrelerin azalmış sayısı yoğun fibrozis ile ilişkilidir.

PMF’li hastalarda dolaşımdaki CD34+ hücrelerin sayısı diğer Ph kromozomu negatif miyeloproliferatif hastalık alt gruplarından daha yüksektir.

Primer miyelofibrozis periferik kanda artmış sayıda CD34+ hematopoetik progenitör hücrelerle karakterizedir. PMF’li hastaların periferik kanında dolaşan hematopoetik kök hücre/hematopoetik progenitör hücre oranının, sağlıklı kontrol gruplarına göre birkaç misli yüksek olduğu bildirilmiştir (134,135).

PMF, kemik iliği retikülin lifinde fokal artışlı ve az sayıda yağ hücreli hiperselüler formdan, yoğun retikülin ve kollagen fibrozisli hiposelüler forma kadar değişir (135). Hiperselüler kemik ilikli miyelofibroz hastaları, derin fibrotik kemik ilikli hastalarla karşılaştırıldığında, kemik iliğinde CD34+ hücrelerin sayılarında anlamlı farklılık gözlenmiştir (136,137). Hafifçe fibrotik kemik ilikli predominant hiperselüler hastalarda, kemik iliği CD34+ hücre sayısında artış gözlenmiştir. Kemik iliği fibrozisinin daha güçlü derecelerde olduğu hastaların kemik iliklerinde CD34+ hücrelerin sayısında azalma gözlemlenmiştir (136,137).

3- GEREÇ VE YÖNTEM

3.1.Hasta ve kontrol grubu:

Çalışmaya 2011–2012 yılları arasında Kocaeli Üniversitesi Hematoloji Bilim Dalı polikliniğinde yeni tanı konan 47 bcr-abl negatif KMPN hastası (25 kadın, 22 erkek, ortalama yaş 54.71 yıl) dahil edilmiştir. 34 hasta ET, 8 hasta PMF, 5 hasta PV tanısıyla çalışmaya alınmıştır. PV tanısı DSÖ 2008 sınıflaması kriterlerine göre (Tablo 4), ET tanısı DSÖ 2008 sınıflaması ölçütlerine göre (Tablo 5), PV tanısı da DSÖ 2008 sınıflaması ölçütlerine göre (Tablo 7) konulmuştur. Çalışmaya sadece bcr-abl füzyon geni negatif olan hastalar alınmıştır. Bcr-Abl füzyon geni tayini için periferik kandan alınan örneklerden DNA izole edilerek gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (GZ-PZR) yöntemiyle (9,22) translokasyonu miktarına kantitatif olarak bakılmıştır. Her hastadan tanı koyma aşamasında yapılan kemik iliği biyopsi preparatları incelemeye alınmıştır.

Her hasta için klinik, demografik ve laboratuvar verilerini içeren standart bir form doldurulmuştur.

2011–2012 yılları arasında lenfoma tanısı konmuş ve evreleme amacıyla yapılan kemik iliği biyopsisi normal bulunmuş 30 lenfoma hastasına ait kemik iliği biyopsi preparatı kontrol grubu olarak çalışmaya dâhil edildi. Kontrol grubu hastalarının 18'i kadın, 12'si erkekti ve ortalama yaşları 52.63 yıldır. Lenfoma tanısı DSÖ 2008 tanı kriterlerine göre konulmuştur.

Çalışmaya dahil edilen tüm hastaların periferik kanlarından izole edilen DNA örneklerinde kantitatif GZ-PZR yöntemiyle JAK2V617F mutasyonuna KOÜ Tıbbi Genetik ABD Genetik laboratuvarında bakılmıştır.

Kemik iliği biyopsi preparatlarında mast hücre ve CD34+ hücre sayısı tayin edilmiş ve retikülin lif düzeyi değişimi derecelendirilmiştir.

3.2. Kemik iliği biyopsisi

Hastalara standart olarak, steril koşullarda spina iliaca posterior superiorundan 11 gauge kalınlıkta, 15 cm uzunlukta Bon-Core marka kemik iliği biyopsi iğneleri ile biyopsi yapılmış ve yaklaşık 1,5 cm.lik kemik iliği materyali Holland solüsyonu içinde patoloji Ana Bilim Dalı'na nakledilmiştir.

3.3 Patoloji preparatlarının rutin tanı için hazırlanması

Kemik iliği biyopsi örneklerinin Holland solüsyonu ile 2-4 saat fiksasyonu gerçekleştirildi. Doku takibi yapıldıktan sonra parafinle bloklama işlemine geçildi. Kesitler 5µ kalınlığında hazırlandı.

Retikülin lif boyanması için gümüş boyama yöntemi tercih edildi. Önce distile su ile patoloji preparatları yıkandı. 5 dakika süreyle potasyum permanganat solüsyonu ve asit aktivasyon tamponu damlatıldı. Distile su ile yıkandıktan sonra 3 dakika süreyle oksalik asit solüsyonu damlatıldı. Distile su ile tekrar yıkandı, 3 dakika süreyle kalacak şekilde ferrik amonyum sülfat solüsyonu damlatıldı. Yeniden distile su ile yıkandı ve 3 dakika amonyaklı gümüş solüsyonu damlatıldı. Distile su ile yıkandı, 5 dakika süreyle nötral formalin solüsyonu damlatıldı. Distile su ile yıkandı, sodyum hiposülfid fiksasyon solüsyonu 5 dakika süreyle kalacak şekilde damlatıldı. Sonra preparat xyleniden geçirildi ve lamelle kapatıldı.

3.4. CD34 ve mast hücre triptaz boyaması

Daha önceden hazırlanmış patoloji preparatlarının kesitleri 1 gece etüvde 56 C'de bekletildi. Ksilol ile 15'er dakikadan 2 kez yıkandı. %99.5'luk etil alkol ile 15 dakika, sonra % 96'luk alkol ile 15 dakika geçirildi. Musluk suyu ve distile su ile yıkandı. Mikrodalga fırında 5'er dakikadan toplam 4 kez EDTA solüsyonunda bekletildi. Distile sudan geçirildi. Hidrojen peroksitte 5 dakika bekletildi. PBS (Fosfat Buffer Salin) ile 5 dakika bekletildi. Süperblok ile 10 dakika blokaj yapıldı.

Mast cell tryptase 0.1 ml Cons.MS-1216-PO ve CD34 0.5 ml Cons. MS-363-P1 Thermo/Labvision antikor boyaları ile 1 gece süreyle inkübe edildi. PBS solüsyonu ile 10 dakika bekletildi. 15 dakika bekleyecek şekilde polivalan damlatıldı. Tekrar PBS solüsyonundan geçirildi. 15 dakika bekleyecek şekilde peroksidaz damlatıldı. Yine PBS solüsyonundan geçirildikten sonra 10 dakika kalacak şekilde kromojen damlatıldı. Musluk suyundan geçirildikten sonra 5 dakika hemotoksilende bekletildi. Musluk suyu ve distile su ile yıkandıktan sonra preparatlar lamelle kapatıldı.

3.5. Preparatların değerlendirilmesi:

Örnekler hematolojik hastalıklar açısından deneyimli bir patolog tarafından Olympus Bx 51 marka ışık mikroskobu ile 40 büyütmede değerlendirilmiş ve 20

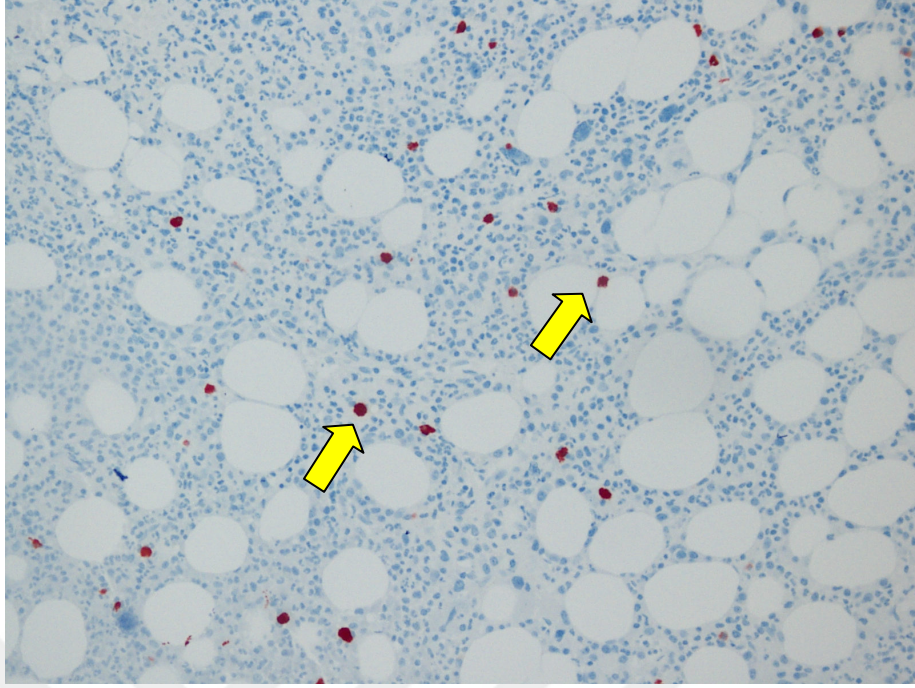
farklı alanda sayılan mast hücre ve CD34+ hücre sayılarının ortalaması alınmıştır (Resim 1,2,3,4).

3.6.Etik kurul onayı ve gönüllülerin bilgilendirilmiş onamı

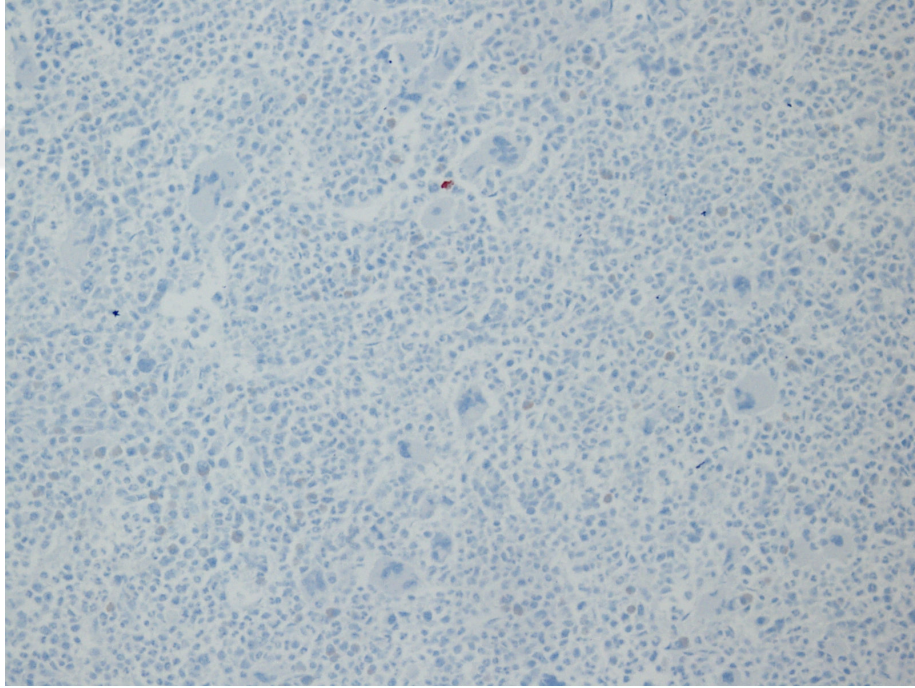
Çalışmaya Kocaeli Üniversitesi Etik Kurul Başkanlığı tarafından, 2011/152 proje numarası, 16/5 onay numarası ile onay verilmiştir. Her hastadan çalışmaya gönüllü olarak katıldıklarını gösteren bilgilendirilmiş onam formu alınmıştır.

3.7.İstatistiksel değerlendirme:

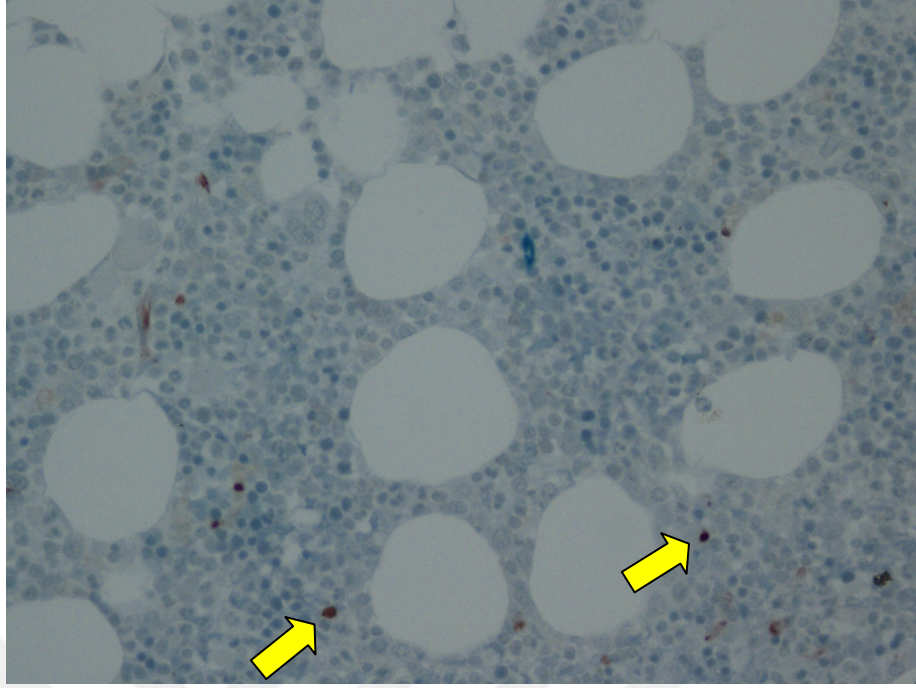
İstatistiksel analizler için NCSS (Number Cruncher Statistical System) 2007&PASS (Power Analysis and Sample Size) 2008 Statistical Software (Utah, USA) programı kullanıldı. Çalışma verileri değerlendirilirken tanımlayıcı istatistiksel metodların (Ortalama, Standart Sapma, Medyan, Frekans, Oran) yanısıra niceliksel verilerin karşılaştırılmasında normal dağılım gösteren parametrelerin iki grup karşılaştırmalarında Student t Test kullanıldı. Normal dağılım göstermeyen parametrelerin iki grup karşılaştırmalarında Mann Whitney U test; üç ve üzeri olan grupların karşılaştırmalarında Kruskal Wallis test ve farklılığa neden çıkan grubun tespitinde Mann Whitney U test kullanıldı. Niteliksel verilerin karşılaştırılmasında ise Pearson Ki-Kare testi ve Yates Continuity Correctin test kullanıldı. Parametreler arası ilişkilerin değerlendirilmesinde de Spearman's Korelasyon analizi kullanılmıştır. Anlamlılık $p<0,01$ ve $p<0.05$ düzeylerinde değerlendirildi.



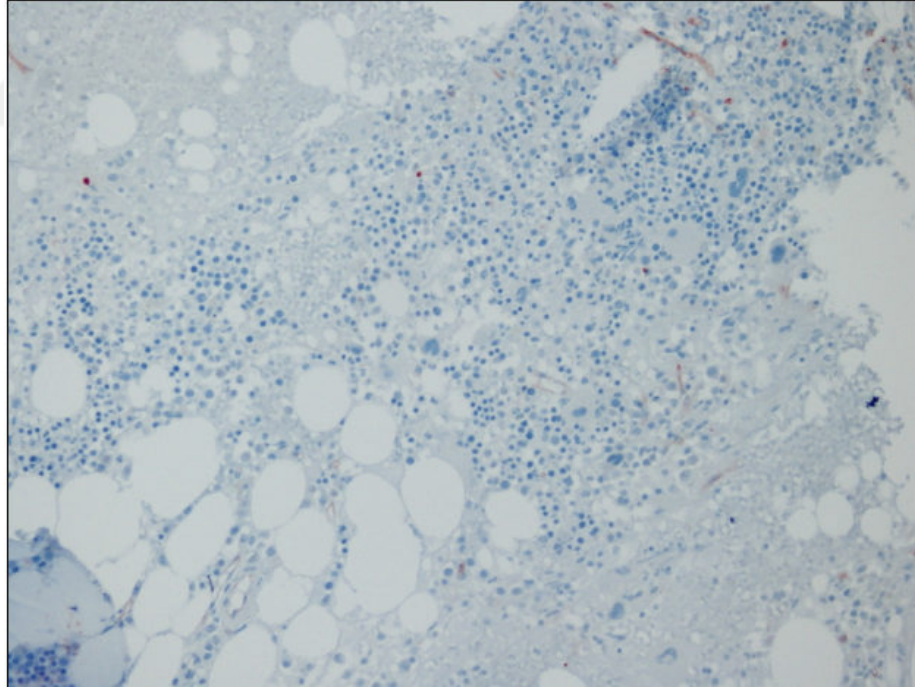
Resim 1: Mast hücre triptaz boyası ile boyanmış kemik iliği biyopsi örneği



Resim 2: Mast hücre triptaz boyasıyla boyanmamış kemik iliği biyopsi örneği



Resim 3: CD34 boyasıyla boyanmış kemik iliği biyopsi örneği



Resim 4: CD34 boyasıyla boyanmamış kemik iliği biyopsi örneği

4- BULGULAR

Çalışma Nisan 2011-Mayıs 2012 tarihleri arasında Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Hematoloji Kliniği'nde %54,5'i (n=42) kadın ve %45,5'i (n=35) erkek olmak üzere toplam 77 olgu ile yapılmıştır. Olguların %61'i (n=47) hasta, %39'u (n=30) kontrol grubundadır.

Tablo 9: Tanımlayıcı Özelliklerin Dağılımı

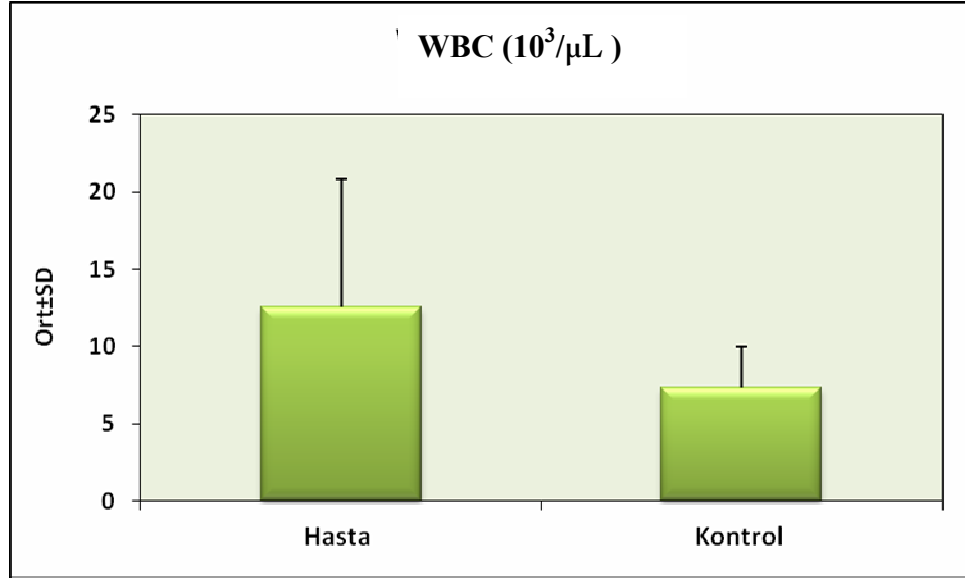
		N	%
Cinsiyet	Kadın	42	54,5
	Erkek	35	45,5
KONTROL		30	39,0
HASTA		47	61,0
	ET	34	72,4
	PMF	8	17,0
	PV	5	10,6

Tablo 10: Gruplara Göre Kan Bulgularının Değerlendirilmesi

	Hasta (n=47)	Kontrol (n=30)	⁺⁺ p
	Ort±SD (Medyan)	Ort±SD (Medyan)	
⁺⁺ WBC (10 ³ /μL)	12,52±8,32 (10,2)	7,34±2,63 (6,65)	0,001**
⁺⁺ NEU (10 ³ /μL)	8,86±6,74 (6,88)	4,70±2,16 (4,33)	0,001**
⁺ EOS (μL)	141,45±3,54	70,13±3,53	0,022*
⁺⁺ PLT (10 ³ /μL)	711,21±340,39 (706)	306,50±75,66 (304)	0,001**
⁺ HGB (gr/dL)	13,35±3,10 (12,9)	12,85±1,28 (12,5)	0,330
⁺ HTC (%)	40,44±9,47 (38,6)	38,24±3,43 (37,15)	0,152

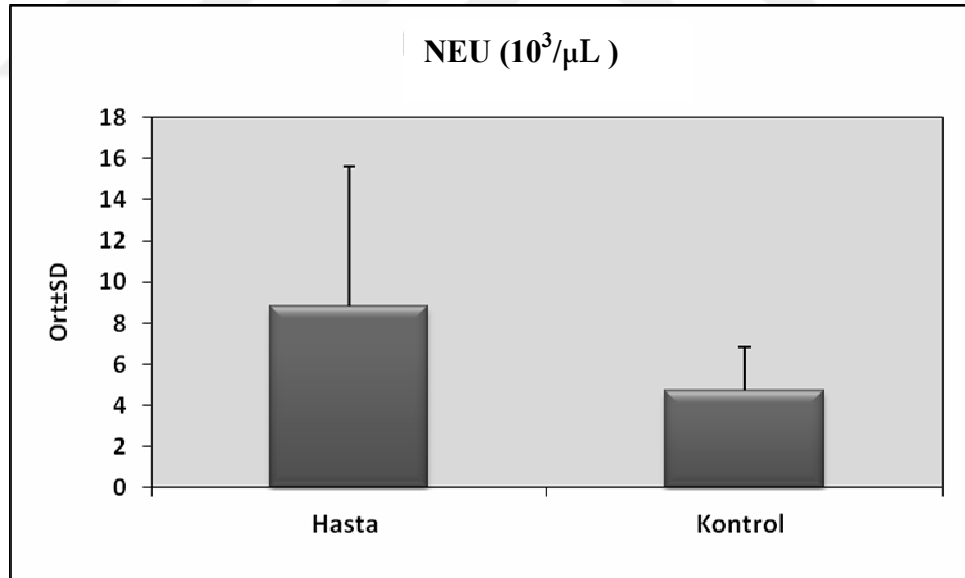
⁺Student t Test ⁺⁺Mann Whitney U Test *p<0,05 **p<0,01

Gruplara göre olguların lökosit sayısı ölçümleri arasında istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı farklılık saptanmıştır (p<0,01). Hasta olguların lökosit sayısı ölçümleri ortalaması anlamlı düzeyde yüksektir.



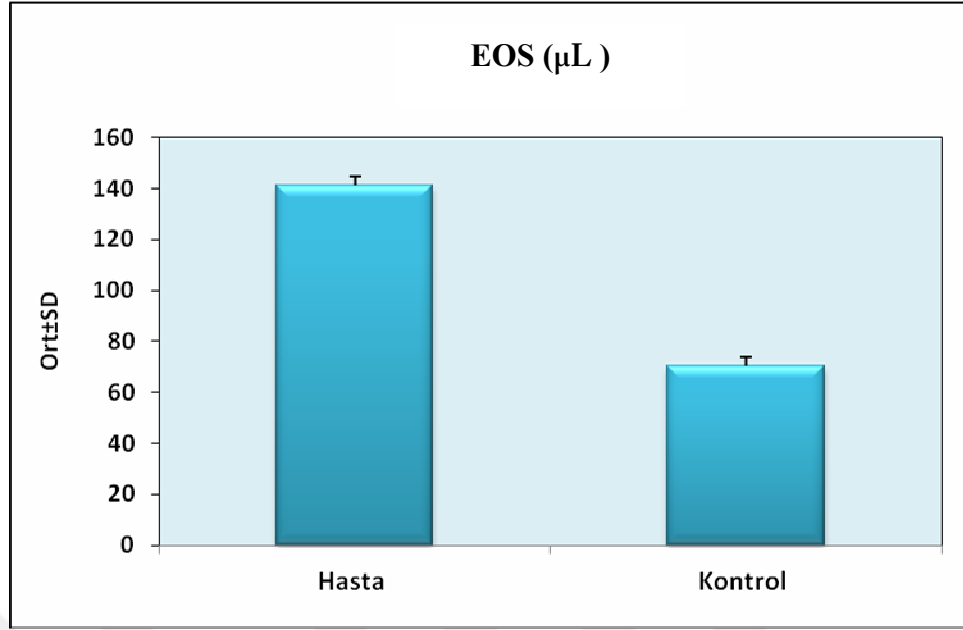
Şekil 1: Gruplara göre lökosit sayısı değişimi

Gruplara göre olguların nötrofil sayısı ölçümleri arasında istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı farklılık saptanmıştır ($p<0,01$). Hasta olguların nötrofil sayısı ölçümleri ortalaması anlamlı düzeyde yüksektir.



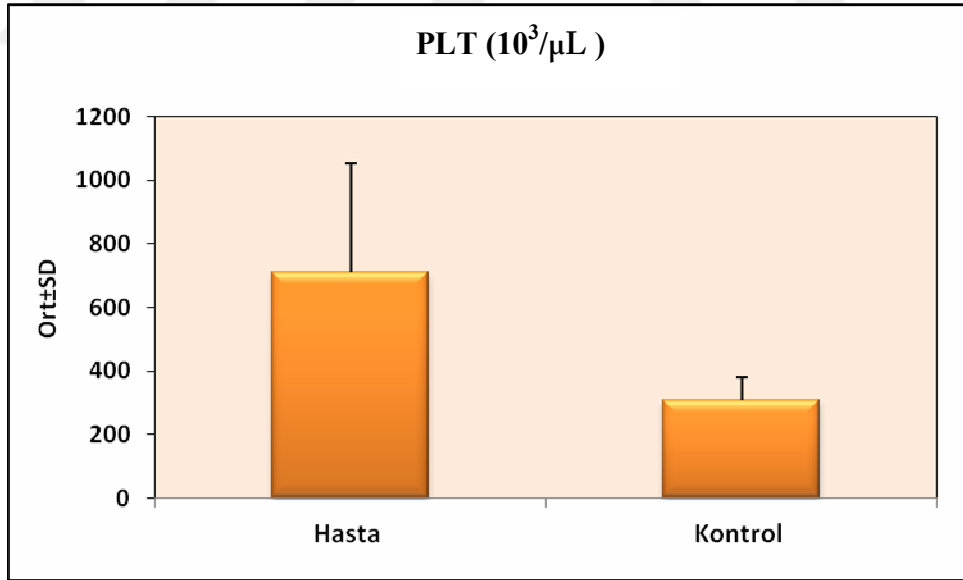
Şekil 2: Gruplara göre nötrofil sayısı değişimi

Gruplara göre olguların eosinofil sayısı ölçümleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmıştır ($p<0,05$). Hasta olguların eosinofil sayısı ölçümleri ortalaması anlamlı düzeyde yüksektir.



Şekil 3: Gruplara göre eozinofil sayısı değişimi

Gruplara göre olguların trombosit sayısı ölçümleri arasında istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı farklılık saptanmıştır ($p<0,01$). Hasta olguların trombosit sayısı ölçümleri ortalaması anlamlı düzeyde yüksektir.



Şekil 4: Gruplara göre trombosit sayısı değişimi

Gruplara göre olguların hemoglobin ve hematokrit ölçümlerinin ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır ($p>0,05$).

Tablo 11:Gruplara Göre Laboratuvar Bulgularının Değerlendirmeleri

	Hasta (n=47)	Kontrol (n=30)	⁺⁺ p
	Ort±SD (Medyan)	Ort±SD (Medyan)	
⁺⁺ LDH (IU/L)	362,04±244,08 (294)	290,23±149,08 (264)	0,129
⁺ Ürik Asit (mg/dL)	5,73±2,11 (5,3)	4,64±1,77 (4,6)	0,021*
⁺ M/E (Miyeloid /eritroid)	5,06±2,34 (5)	3,60±1,16 (3)	0,001**
⁺⁺ Mast Hücre Sayısı	30,82±20,92 (26,4)	6,34±7,09 (3,4)	0,001**
⁺⁺ CD34 (+)Hücre Sayısı	2,39±1,91 (1,8)	2,57±2,14 (1,8)	0,699

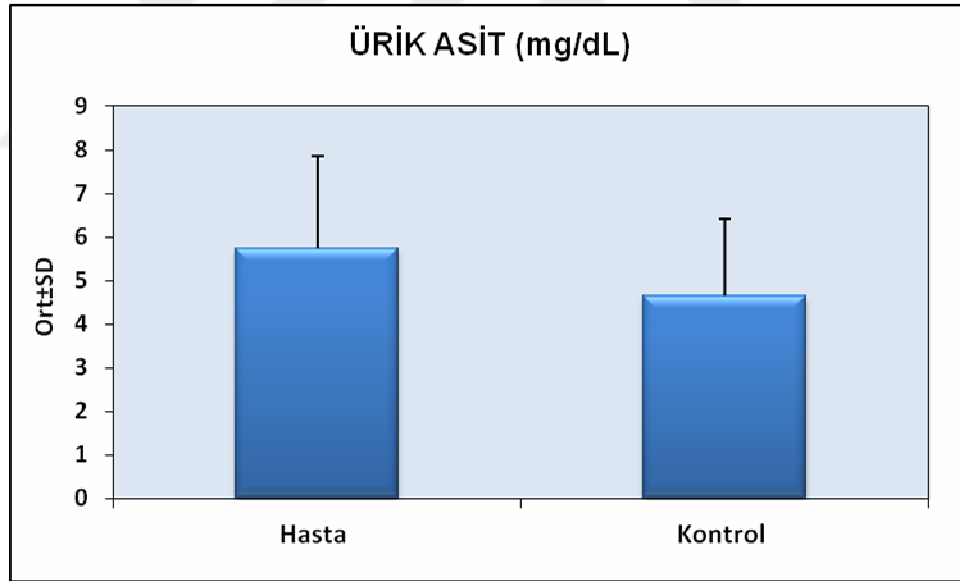
⁺Student t Test⁺⁺Mann Whitney U Test

*p<0,05

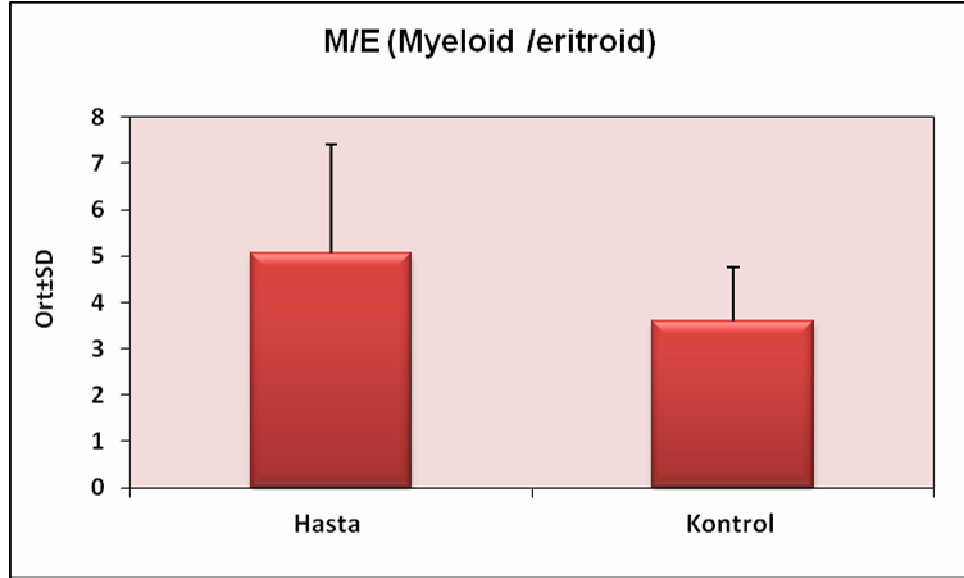
**p<0,01

Hasta olguların LDH (laktat dehidrogenaz) ölçümleri ortalamasının kontrol grubundan daha yüksek olmasına rağmen, istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p>0,05).

Gruplara göre olguların ürik asit ölçümleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmıştır (p<0,05). Hasta olguların ürik asit ölçümleri ortalaması anlamlı düzeyde yüksektir.

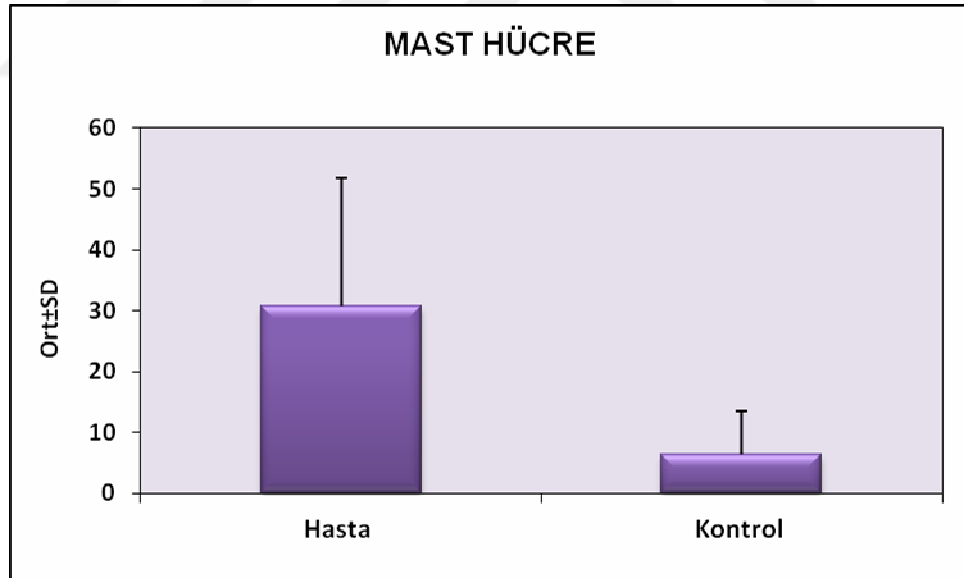
**Şekil 5: Gruplara göre ürik asit değişimi**

Gruplara göre olguların M/E (Miyeloid/Eritroid) ölçümleri arasında istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı farklılık saptanmıştır (p<0,01). Hasta olguların M/E ölçümleri ortalaması anlamlı düzeyde yüksektir.



Şekil 6: Gruplara göre miyeloid/eritroid oranı değişimi

Gruplara göre olguların mast hücreleri arasında istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı farklılık saptanmıştır ($p<0,01$). Hasta olguların mast hücreleri ortalaması anlamlı düzeyde yüksektir.



Şekil 7: Gruplara göre mast hücre değişimi

Hasta olguların CD34+ hücreleri ortalaması $2,39\pm1,91$ ve kontrol grubundaki olguların CD34+ hücreleri ortalaması $2,57\pm2,14$ dür. Buna göre gruplara göre CD34+ hücreleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır ($p>0,05$).

Tablo 12:Gruplara Göre JAK 2, Retikülin Lif ve Splenomegali Değerlendirmeleri

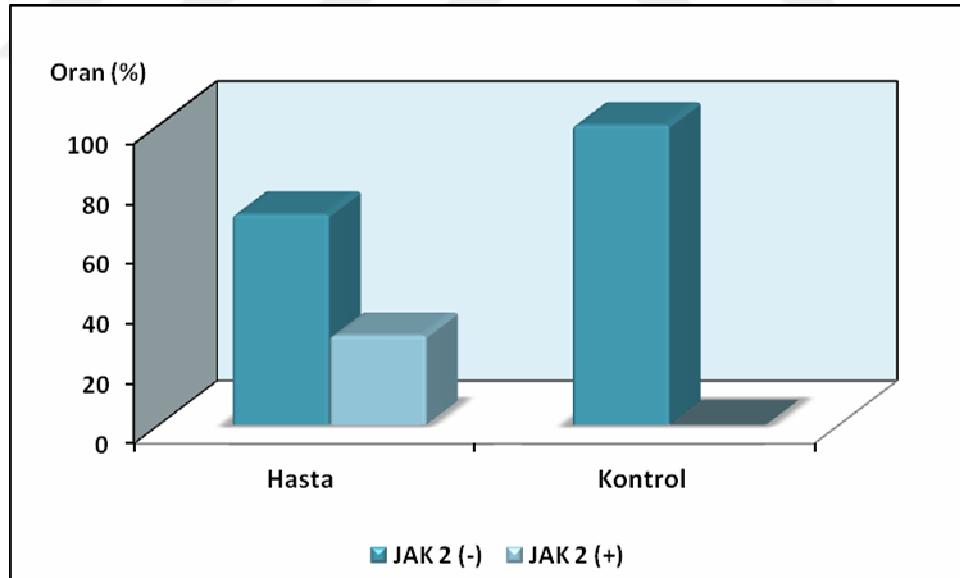
		Hasta (n=47)	Kontrol (n=30)	+++ p
		n (%)	n (%)	
+JAK 2	(-)	33 (%70,2)	30 (%100)	0,003**
	(+)	14 (%29,8)	0 (%0)	
Retikülin Lif	(-)	20 (%42,6)	30 (%100)	0,001**
	Hafif	15 (%31,9)	0 (%0)	
	Orta	5 (%10,6)	0 (%0)	
	Ağır	7 (%14,9)	0 (%0)	
Splenomegali	(-)	21 (%44,7)	26 (%86,7)	0,003**
	Hafif	19 (%40,4)	4 (%13,3)	
	Orta	5 (%10,6)	0 (%0)	
	Ağır	2 (%4,3)	0 (%0)	

⁺Yates Continuity Correction

⁺⁺Pearson Ki_kare Test

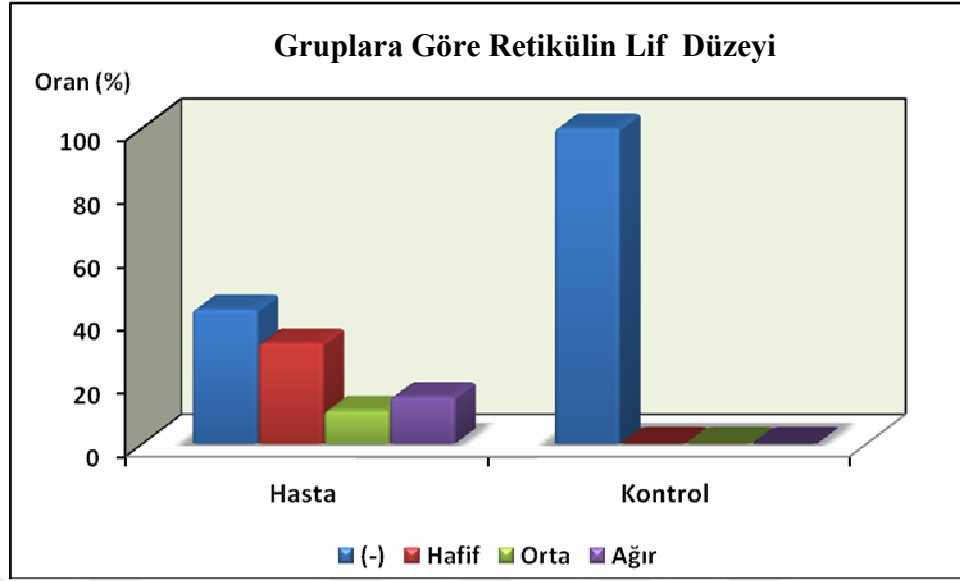
^{***}p<0,01

Gruplara göre olgularda pozitif ve negatif JAK 2 görülme oranları arasında istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı farklılık saptanmıştır (p<0,01). Kontrol grubundaki olguların tamamında (n=30) JAK 2 negatifken; hasta olguların %70,2'sinde (n=33) JAK 2 negatif ve %29,8'inde (n=14) pozitiftir.



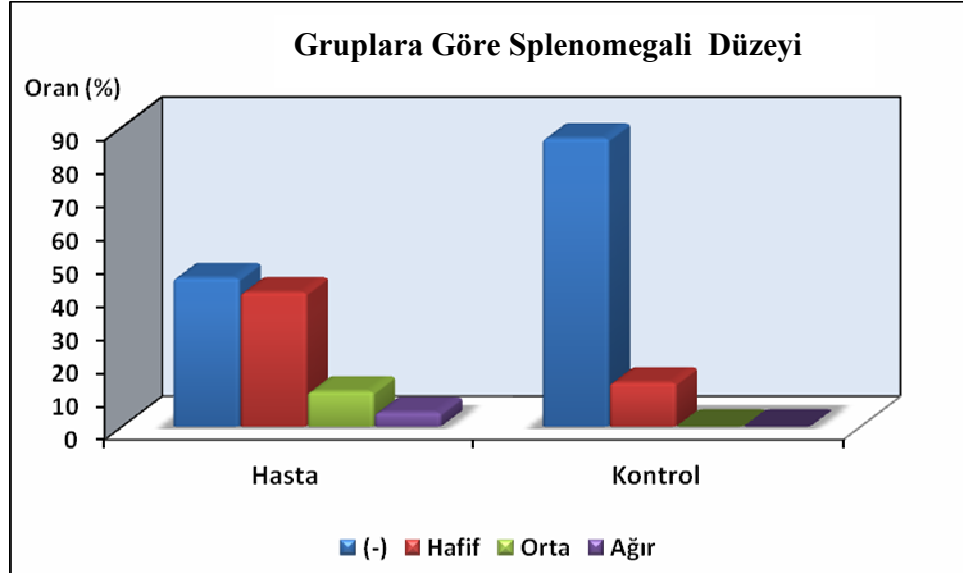
Şekil 8: Gruplara göre JAK 2 görülme oranları değişimi

Gruplara göre olgularda retikülin lif görülme oranları arasında istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı farklılık saptanmıştır (p<0,01). Kontrol grubundaki olguların tamamında (n=30) retikülin lif negatifken; hasta olguların %42,6'sında (n=20) negatif, %31,9'unda (n=15) hafif düzeyde, %10,6'sında (n=5) orta düzeyde ve %14,9'unda (n=7) ağır düzeyde görülmektedir.



Şekil 9: Gruplara göre retikülin lif düzeyleri değişimi

Gruplara göre olgularda splenomegali görülme oranları arasında istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı farklılık saptanmıştır ($p<0,01$). Kontrol grubundaki olguların % 86,7'sinde ($n=26$) splenomegali negatif, %13,3'ünde ($n=4$) hafif düzeydeyken; hasta olguların %44,7'sinde ($n=21$) negatif, %40,4'ünde ($n=19$) hafif düzeyde, %10,6'sında ($n=5$) orta düzeyde ve %4,3'ünde ($n=2$) ağır düzeyde görülmektedir.



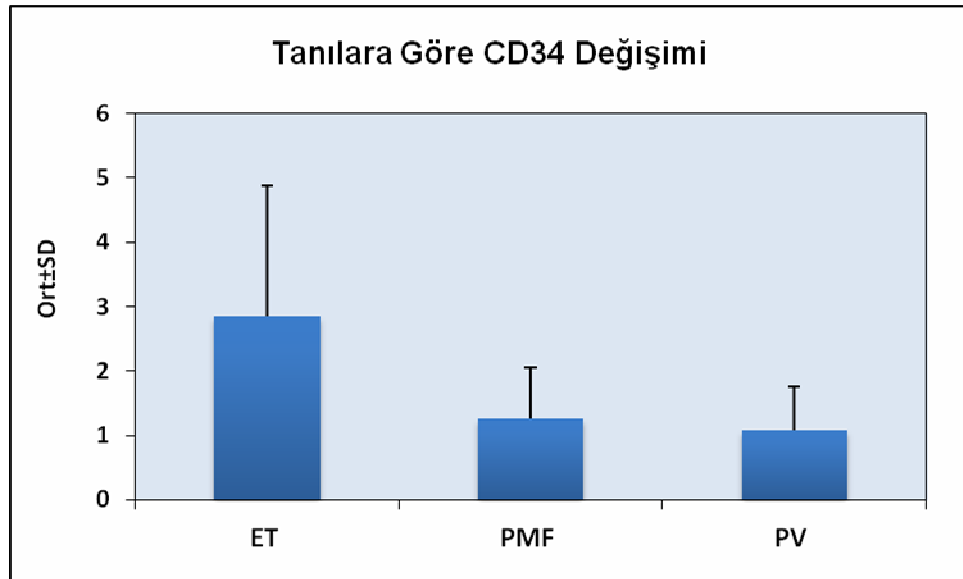
Şekil 10: Gruplara göre splenomegali düzeyleri değişimi

Tablo 13: Tanılara Göre Mast Hücre ve CD34+ Hücre Sayısı Değerlendirmeleri

		TANILAR			P
		ET (n=34)	PMF (n=8)	PV (n=5)	
Mast Hücre	Ort±SD	29,69±19,78	42,40±27,59	19,96±6,61	0,227
	Medyan	26,1	48,6	18,8	
CD34(+) Hücre	Ort±SD	2,85±2,02	1,25±0,80	1,08±0,67	0,015*
	Medyan	2,3	1,1	0,8	
Kruskal Wallis Test		*p<0,05			

Tanılara göre olguların mast hücre ortalamaları arasında istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı farklılık saptanmamıştır ($p>0,05$).

Tanılara göre olguların CD34 ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmıştır ($p<0,05$). Farklılığı yaratan tanıyı bulmak amacıyla yapılan ikili karşılaştırmalara göre; ET grubundaki olguların CD34 ortalaması PMF ve PV tanılarına göre anlamlı düzeyde yüksek saptanırken ($p=0,022$; $p=0,035$; $p<0,05$), PMF grubu ile PV gruplarının CD34 ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır ($p=0,768$; $p>0,05$).

**Şekil 11: Tanılara göre CD34+ hücre sayısı değişimi**

Mast Hücre ve CD34+ Hücre Sayısı İle Kan ve Laboratuvar Bulgularının Değerlendirmeleri

Tablo 14:Tüm olgularda; Mast Hücre ve CD34(+) Hücre İle Kan ve Laboratuvar Bulgularının İlişkisi

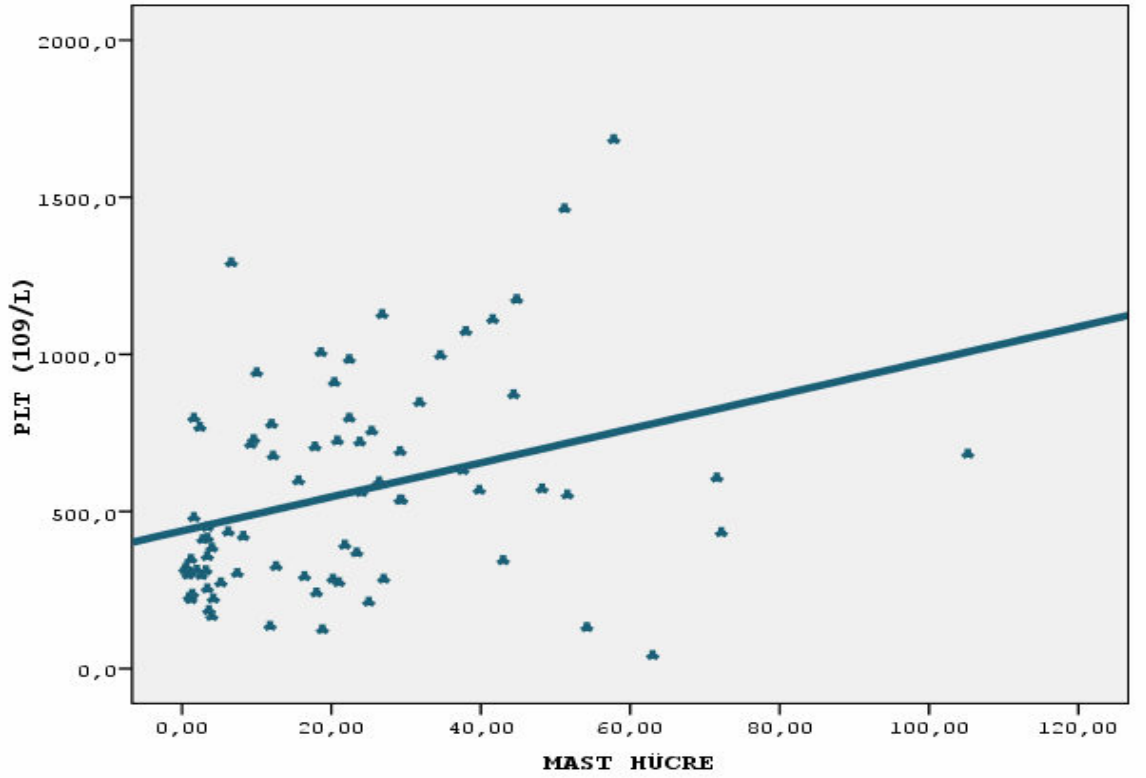
	MAST HÜCRE		CD34	
	R	p	r	P
WBC (10 ³ µ/L)	0,208	0,069	-0,080	0,490
NEU (10 ³ µ/L)	0,211	0,066	-0,072	0,536
EOS (µL)	0,137	0,243	-0,177	0,129
PLT (10 ³ µ/L)	0,387	0,001**	0,063	0,584
Hgb (gr/dL)	-0,084	0,468	0,211	0,065
Htc (%)	-0,083	0,473	0,167	0,147
LDH (IU/L)	0,154	0,180	-0,157	0,172
Ürik Asit (mg/dL)	0,079	0,493	-0,269	0,018*
M/E (Miyeloid /eritroid)	0,129	0,263	-0,103	0,373
<i>r</i> :Spearman's Korelasyon Katsayısı		<i>*p</i> <0,05	<i>**p</i> <0,01	

Mast hücreleri ile lökosit sayısı ölçümleri arasında pozitif yönlü %20,8 düzeyinde zayıf ilişki görülmesine rağmen, istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (r:0,208; p>0,05).

Mast hücreleri ile nötrofil sayısı ölçümleri arasında pozitif yönlü %21,1 düzeyinde zayıf ilişki görülmesine rağmen, istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (r:0,211; p>0,05).

Mast hücreleri ile eosinofil sayısı, hemoglobin, hematokrit, LDH, ürik asit ve M/E ölçümleri arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmamıştır (p>0,05).

Mast hücreleri ile trombosit sayısı ölçümleri arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif yönlü %38,7 oranında orta düzeyde ilişki saptanmıştır (r:0,387; p<0,01) (Mast hücreleri arttıkça trombosit sayısı ölçümü artan ya da mast hücreleri azaldıkça trombosit sayısı ölçümü azalan).

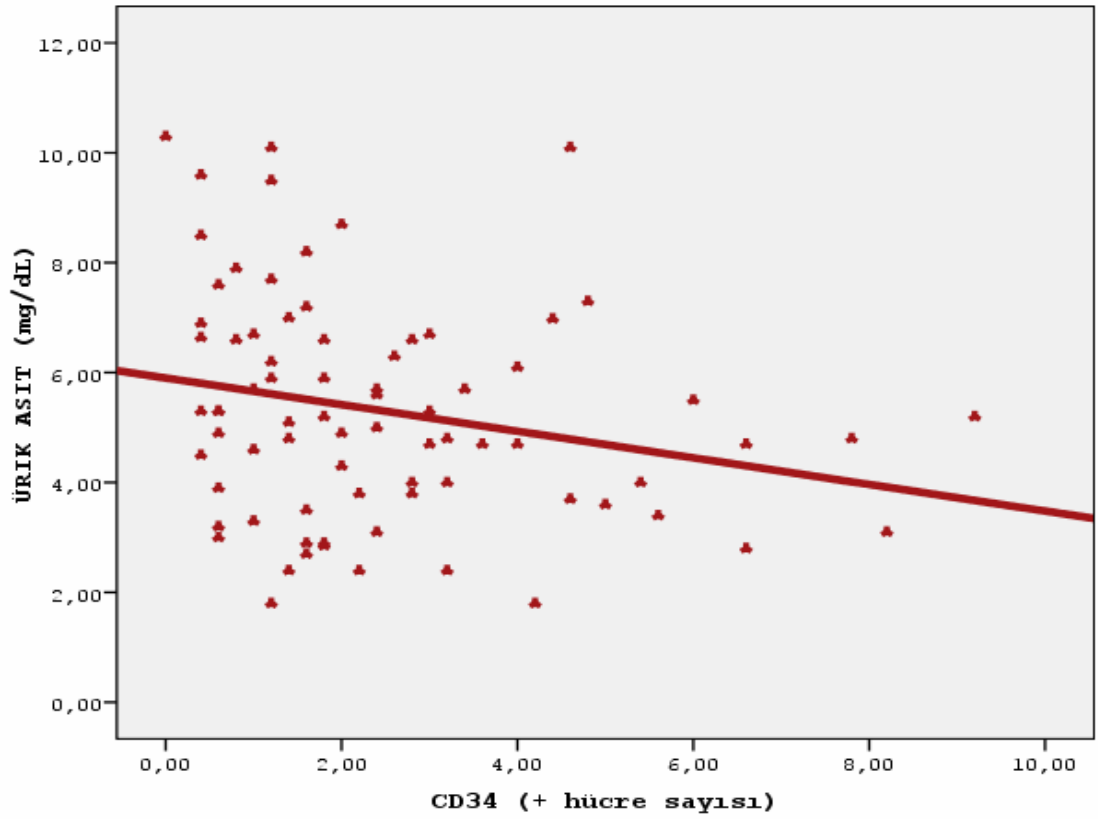


Şekil 12:Tüm olgularda; mast hücre sayısı ile trombosit sayısı ilişkisi

CD34+ hücre sayısı ile lökosit sayısı, nötrofil sayısı, eosinofil sayısı, trombosit sayısı, hematokrit, LDH ve M/E ölçümleri arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmamıştır ($p>0,05$).

CD34+ hücre sayısı ile hemoglobin ölçümleri arasında pozitif yönlü %21,1 düzeyinde zayıf ilişki görülmesine rağmen, istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($r:0,211$; $p>0,05$).

CD34+ hücre sayısı ile ürik asit ölçümleri arasında istatistiksel olarak negatif yönlü %26,9 oranında orta düzeyde anlamlı ilişki saptanmıştır ($r:0,269$; $p<0,05$) (CD34 arttıkça ürik asit ölçümü azalan).



Şekil 13: Tüm olgularda; CD34+ liği ile ürik asit düzeyi ilişkisi

Tablo 15: Hasta olgularda; Mast Hücre ve CD34+ Hücre Sayısı İle Kan ve Laboratuvar Bulgularının İlişkisi

	MAST HÜCRE		CD34	
	r	p	r	P
WBC ($10^3 \mu/L$)	-0,151	0,311	-0,162	0,277
NEU($10^3/ \mu L$)	-0,097	0,517	-0,148	0,321
EOS (μL)	-0,187	0,213	-0,160	0,287
PLT ($10^3 \mu/L$)	-0,081	0,587	0,147	0,325
Hgb (gr/dL)	0,144	0,336	0,243	0,099
Htc (%)	-0,149	0,319	0,182	0,220
LDH (IU/L)	0,004	0,980	-0,385	0,008**
Ürik Asit (mg/dL)	-0,153	0,304	-0,425	0,003**
M/E (Miyeloid /eritroid)	-0,155	0,298	-0,127	0,395

r:Spearman's Korelasyon Katsayısı

****p<0,01**

Hasta olgularında;

Mast hücreleri ile lökosit sayısı, nötrofil sayısı, eosinofil sayısı, trombosit sayısı, hemoglobin ve hematokrit kan ölçümleri arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmamıştır ($p>0,05$).

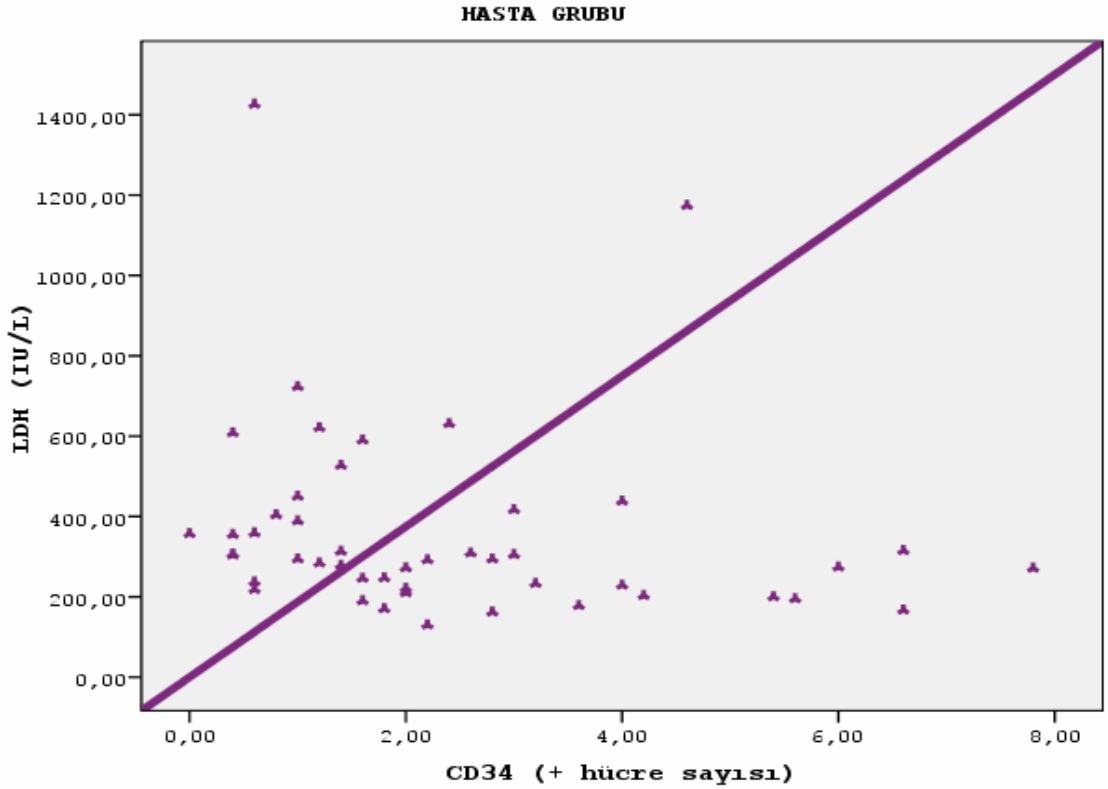
Mast hücreleri ile LDH, ürik asit ve M/E ölçümleri arasında da istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmamıştır ($p>0,05$).

Hasta olgularında;

CD34+ hücre sayısı ile lökosit, nötrofil, eosinofil ve trombosit sayısı ile hematokrit ölçümleri arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmamıştır ($p>0,05$).

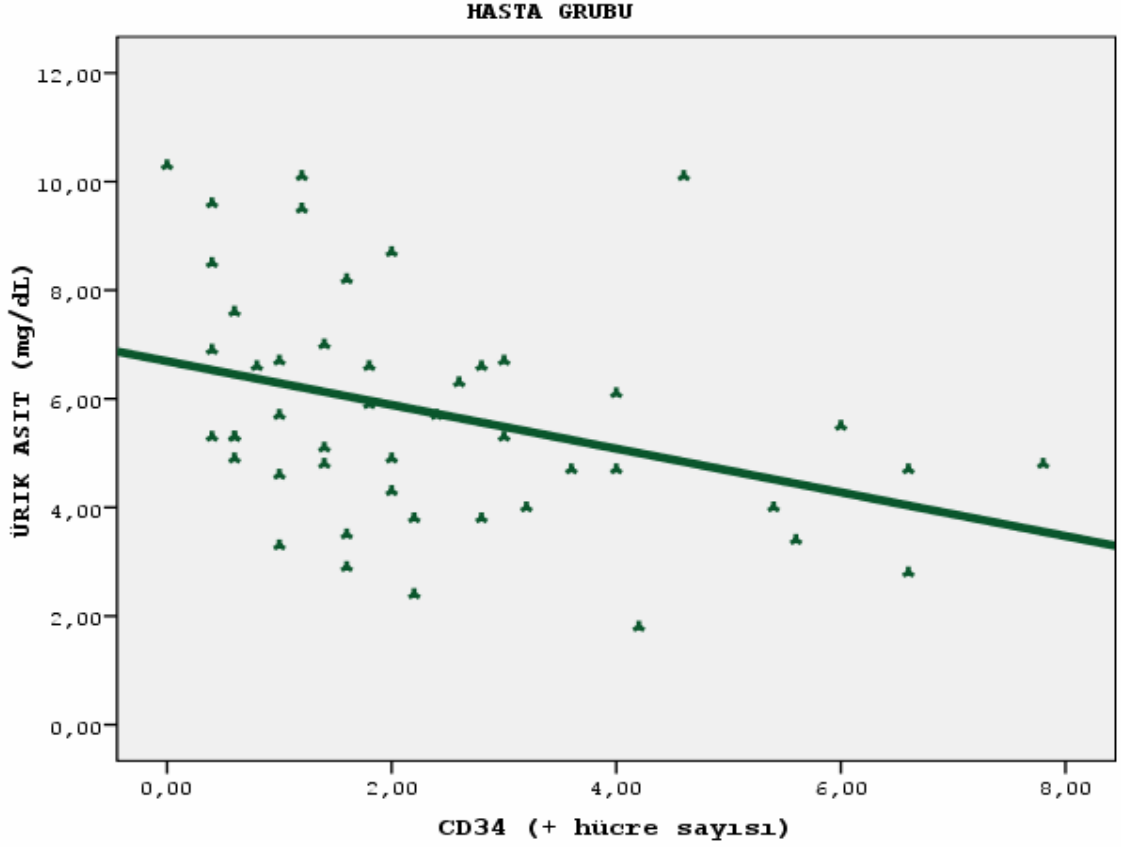
CD34+ hücre sayısı ile hemoglobin ölçümleri arasında pozitif yönlü %24,3 düzeyinde zayıf ilişki görülmesine rağmen, istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($r:0,243$; $p>0,05$).

CD34+ hücre sayısı ile LDH ölçümleri arasında istatistiksel olarak anlamlı negatif yönlü %38,5 oranında orta düzeyde ilişki saptanmıştır ($r:-0,385$; $p<0,01$) (LDH arttıkça CD34 azalmakta).



Şekil 14:Hasta olgularında; CD34+ liği ile LDH düzeyi ilişkisi

CD34 ile ürik asit ölçümleri arasında istatistiksel olarak anlamlı negatif yönlü %42,5 oranında orta düzeyde ilişki saptanmıştır ($r:-0,425$; $p<0,01$).



Şekil 15:Hasta olgularda; CD34+liği ile ürik asit düzeyi ilişkisi

CD34 ile M/E ölçümleri arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmamıştır ($p>0,05$).

Tablo 16: Kontrol Grubu olgularında; Mast Hücre ve CD34+ Hücre Sayısı İle Kan ve Laboratuvar Bulgularının İlişkisi

	MAST HÜCRE		CD34	
	r	p	r	P
WBC (10 ³ µ/L)	0,007	0,969	0,096	0,613
NEU (10 ³ µ/L)	-0,089	0,639	0,123	0,518
EOS (µ/L)	0,164	0,395	-0,279	0,143
PLT (10 ³ µ/L)	-0,037	0,846	0,048	0,801
Hgb (gr/dL)	-0,191	0,313	0,064	0,737
Htc (%)	-0,394	0,031*	0,068	0,719
LDH (IU/L)	0,307	0,099	0,233	0,215
Ürik Asit (mg/dL)	0,036	0,852	-0,011	0,953
M/E (Miyeloid /eritroid)	-0,157	0,407	-0,104	0,586

r:Spearman's Korelasyon Katsayısı

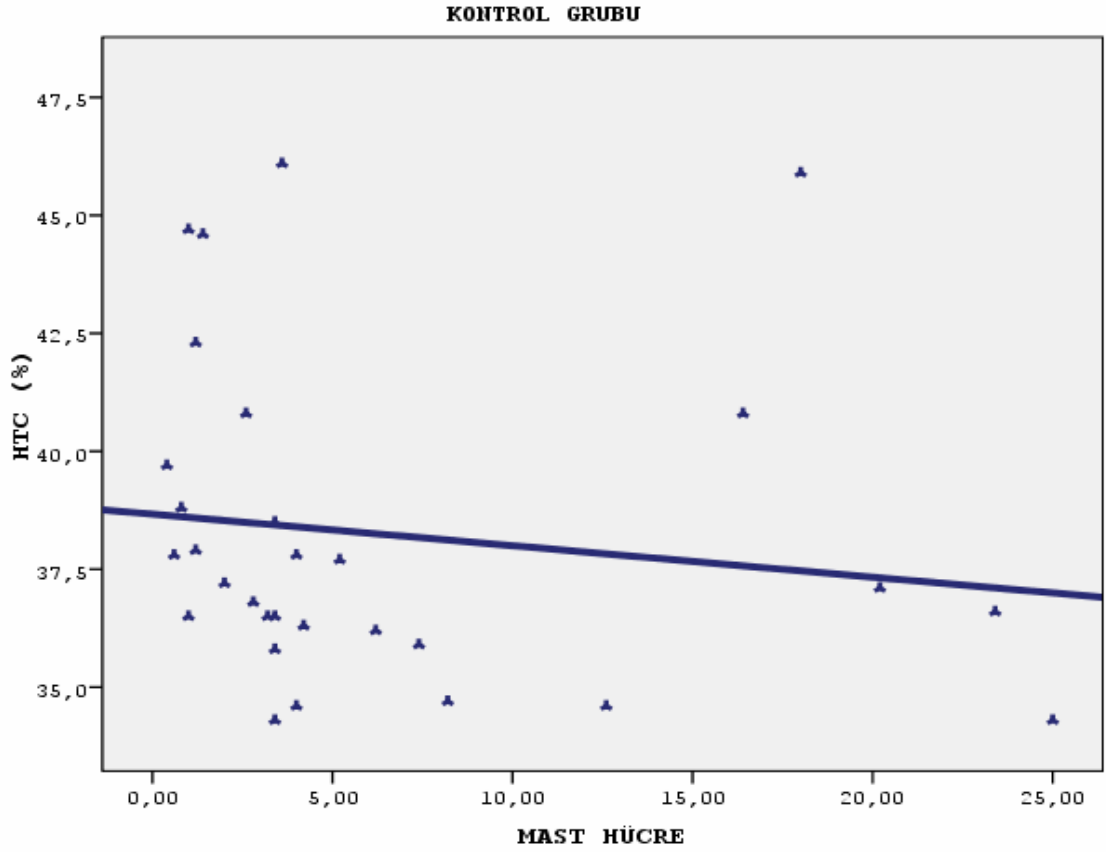
*p<0,05

Kontrol Grubu olgularda;

Mast hücreleri ile lökosit, nötrofil ve trombosit sayısı ile hemoglobin ölçümleri arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmamıştır (p>0,05).

Mast hücreleri ile eosinofil ölçümleri arasında negatif yönlü %27,9 düzeyinde zayıf ilişki görülmesine rağmen, istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (r:-0,279; p>0,05).

Mast hücreleri ile hematokrit ölçümleri arasında istatistiksel olarak anlamlı negatif yönlü %39,4 oranında orta düzeyde ilişki saptanmıştır (r:-0,394; p<0,05).



Şekil 16: Kontrol grubu olgularda; mast hücre ile hematokrit ilişkisi

Mast hücreleri ile LDH ölçümleri arasında pozitif yönlü %30,7 oranında orta düzeyde ilişki görülmesine rağmen, istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($r:0,307$; $p>0,05$).

Mast hücreleri ile ürik asit ve M/E ölçümleri arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmamıştır ($p>0,05$).

Kontrol Grubu olgularda;

CD34+ hücre sayısı ile lökosit, nötrofil, eosinofil ve trombosit sayısı ile hemoglobin ve hematokrit ölçümleri arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmamıştır ($p>0,05$).

CD34+ hücre sayısı ile LDH ölçümleri arasında pozitif yönlü %23,3 düzeyinde zayıf ilişki görülmesine rağmen, istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($r:0,233$; $p>0,05$).

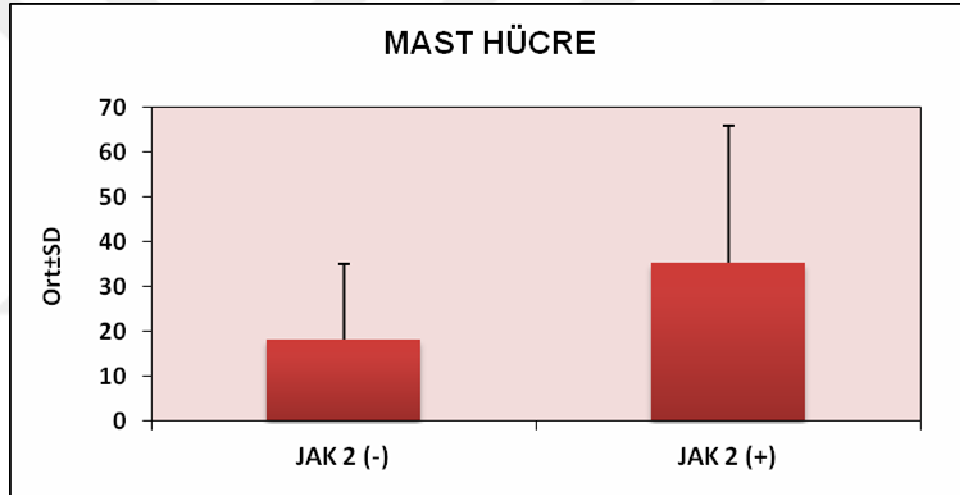
CD34+ hücre sayısı ile ürik asit ve M/E ölçümleri arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmamıştır ($p>0,05$).

Tablo 17: JAK 2 Durumuna Göre Mast Hücre ve CD34 Değerlendirmeleri

		MAST HÜCRE	CD34
		Ort±SD (Medyan)	Ort±SD (Medyan)
JAK 2	(-)	18,23±16,72 (16,4)	2,55±1,92 (2)
	(+)	35,35±30,38 (26,6)	2,07±2,32 (1,3)
p		0,048*	0,108

*Kruskal Wallis Test***p<0,05*

JAK 2 görülme durumuna göre olguların mast hücre ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmıştır ($p<0,05$). Pozitif JAK 2 görülen olguların mast hücreleri ortalaması negatif olgulara göre anlamlı düzeyde yüksektir.

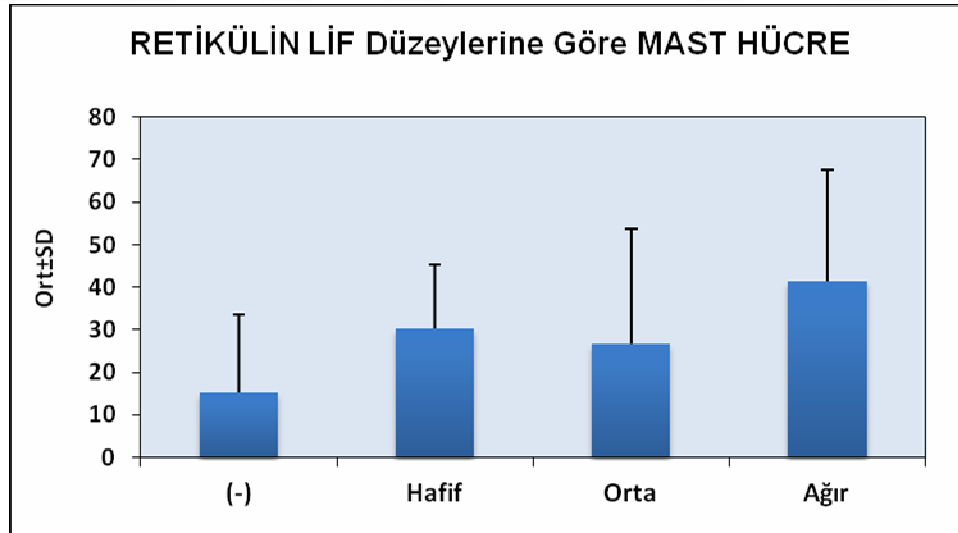
**Şekil 17: JAK 2 mutasyonu görülme durumuna göre mast hücre değişimi**

JAK 2 durumuna göre olguların CD34+ hücre sayısı ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır ($p>0,05$).

Tablo 18: Retikülin Lif Düzeylerine Göre Mast Hücre ve CD34+ Hücre Değerlendirmeleri

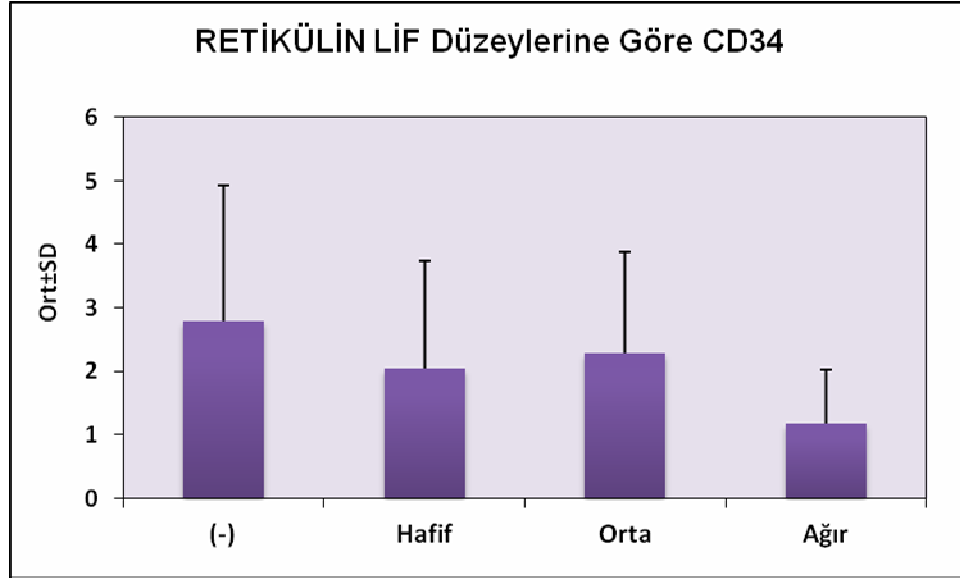
		MAST HÜCRE	CD 34
		Ort±SD (Medyan)	Ort±SD (Medyan)
RETİKÜLİN LİF	(-)	15,22±18,24 (7,8)	2,79±2,14 (2,2)
	Hafif	30,24±15,18 (31,8)	2,04±1,70 (1,4)
	Orta	26,76±27,07 (20,4)	2,28±1,60 (1,6)
	Ağır	41,46±25,98 (44,4)	1,17±0,85 (1)
p		0,001**	0,080
<i>Kruskal Wallis Test</i>		<i>**p<0,01</i>	

Retikülin lif düzeylerine göre olguların mast hücre sayısı ortalamaları arasında istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı farklılık saptanmıştır ($p<0,01$). Yapılan ikili karşılaştırmalara göre; retikülin lif görülmeyen olguların mast hücre ortalaması hafif ve ağır düzeyde görülen retikülin lif olgulardan anlamlı düzeyde düşükken ($p=0,001$; $p=0,014$; $p<0,05$); diğer düzeyler arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır ($p>0,05$).



Şekil 18: Retikülin lif düzeylerine göre mast hücre değişimi

Retikülin lif düzeylerine göre olguların CD34+ hücre sayısı ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmazken ($p>0,05$); ağır düzeyde retikülin lif görülen olguların CD34+ hücre sayısı ortalamasının retikülin lif görülmeyen olgulardan düşük olması dikkat çekicidir.



Şekil 19: Retikülin lif düzeylerine göre CD34+ lifin değişimi

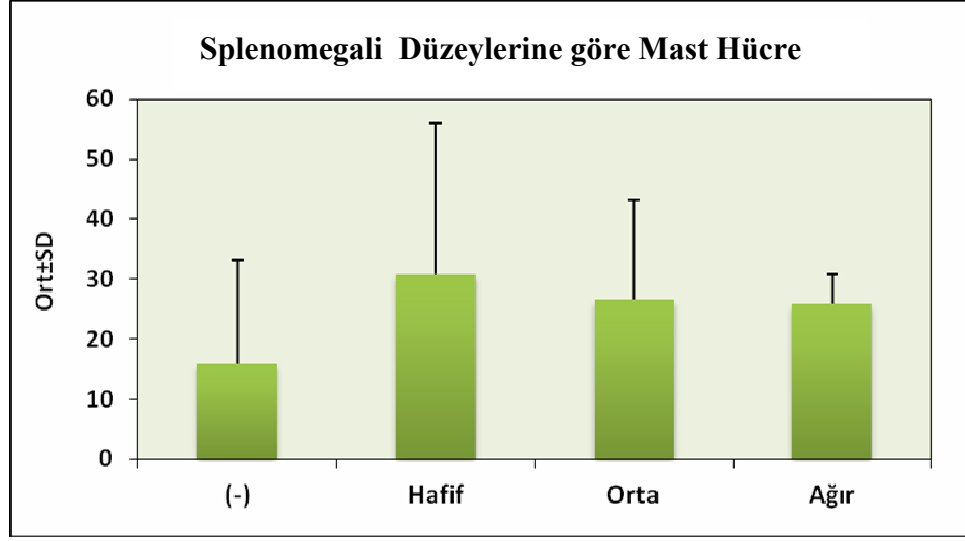
Tablo 19: Splenomegali Düzeylerine Göre Mast Hücre ve CD34 Değerlendirmeleri

		MAST HÜCRE	CD 34
		Ort±SD (Medyan)	Ort±SD (Medyan)
SMG	(-)	15,83±17,29 (9,2)	2,70±2,13 (2,2)
	Hafif	30,87±25,20 (26,8)	2,23±1,83 (1,6)
	Orta	26,52±16,65 (26,4)	1,56±1,44 (1,2)
	Ağır	25,9±4,95 (25,9)	1,70±0,42 (1,7)
p		0,031*	0,482

Kruskal Wallis Test

**p<0,05*

Splenomegali düzeylerine göre olguların mast hücre ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmıştır ($p<0,05$). Yapılan ikili karşılaştırmalara göre; splenomegali görülmeyen olguların mast hücre ortalaması, hafif düzeyde splenomegali görülen olgulardan anlamlı düzeyde düşükken ($p=0,001$; $p<0,01$); diğer düzeyler arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır ($p>0,05$).



Şekil 20: Splenomegali düzeylerine göre mast hücre değişimi

Splenomegali düzeylerine göre de olguların CD34+ hücre sayısı ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır ($p>0,05$).

5- TARTIŞMA ve SONUÇ

Kronik MPN'ler değişik oranlarda lösemik dönüşüm potansiyeli taşıdıkları için önem taşımaktadırlar. Bu yüzden bu hastaların progresyon, transformasyon ve tedaviye yanıt açısından yakın takip edilmeleri kaçınılmazdır. PV hastalarında tedavisiz izlenen olgularda yaklaşık olarak %2, miyelosupresif tedavi alanlarda %14 oranında AML gelişebilmektedir. ET'da ise lösemik transformasyon oranı çok düşüktür.

Intramedüller fibrozis artmış retiküler kollagen, osteoskleroz ve artmış vaskülarite (anjiogenezis) ile karakterizedir. Buna sebep olan mekanizmalar sitokin stimülasyonu ve TGF β , PDGF (platelet derived growth factor), bFGF (basic fibroblast growth factor), VEGF (vascular endothelial growth factor) ve metalloproteazların doku inhibitörlerini içeren fibrojenik moleküllerin eylemleriyle bağlantılıdır.(138) Mast hücreleri çok sayıda sitokin, büyüme faktörleri, proteazlar ve biyojenik aminler (TGF β , PDGF, bFGF, VEGF...) aracılığı ile fibrozis ve anjiogenez oluşumu ile ilişkilidir. Bu ilişkinin kalp, periton ve diğer bölgelerde oluşan fibrozise de katkıda bulunduğu gösterilmiştir (116, 117, 118, 119, 120).

Son yıllarda sistemik mastositozlu ve PMF'lu hastaların her ikisinde de hem JAK2'yi hem de c-kit'i aktive edebilen, mast hücre ve miyeloid hücre dizilerini ilgilendiren mutasyonların varlığı birçok hastada bildirilmiştir (133). Böylece mast hücresi, fibrozis ve kronik MPN'ler arasında ilişki kurulabilir.

Arsalan ve arkadaşlarının, 12'si KML, 6'sı PMF, 4'ü ET, 4'ü PV ve 5'i CMPD-U olmak üzere toplam 31 kronik MPN hastası ve 12 kontrol grubu hastası ile yaptıkları bir çalışmada, mast hücrelerinin fibrozis ile uyumlu olup olmadığını tanımlamak için, tüm kemik iliklerinde hem fibrozis seviyesi, hem de fibrozisin varlığı ya da yokluğu ile mast hücre sayıları karşılaştırılmıştır. Tüm kronik MPN hastalarında grade1 ya da 2 fibrozisi olan hastalardaki mast hücre sayıları, fibrozisi olmayan (grade 0) hastalardaki mast hücre sayılarına göre anlamlı olarak daha yüksek saptanmıştır (p=0.04, Mann Whitney test). Buna karşın kontrol örneklerinde mast hücre sayısı ve fibrozis arasında anlamlı korelasyon saptanmamıştır (139). Çalışmanın verileri miyeloproliferatif neoplazideki total mast hücre sayısının, kemik iliği fibrozisi gelişimi ile korele olduğunu göstermiştir.

Bizim çalışmamız da benzer sonuçları göstermektedir. Retikülin lif düzeylerine göre mast hücre sayısı ortalamaları arasında istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı farklılık saptanmıştır ($p<0.01$). Yapılan ikili karşılaştırmalara göre retikülin lif görülmeyen olguların mast hücre sayısı ortalaması, hafif veya ağır derecede retikülin lif görülen olgulardan anlamlı olarak düşük saptanmıştır ($p=0,001$; $p=0,014$; $p<0,05$, Kruskal Wallis). Orta düzeyde retikülin lif gözlenen olgularda ise mast hücre sayısında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır ($p>0,05$).

Barosi ve arkadaşlarının geniş ve iyi tanımlanmış bir populasyonda yapılan çalışmasında, PMF'li hastaların periferik kandaki hematopoetik kök hücre/hematopoetik progenitör hücre oranları, CD34+ hücrelerinin mutlak sayılarıyla hesaplanmıştır. Bu araştırmacılar, PMF'li hastaların periferik kandaki CD34+ hücrelerinin ortalama mutlak sayılarının, sağlıklı kontrol gruplarının ortalama sayılarından 60 kat fazla, diğer Ph kromozomu negatif miyeloproliferatif hastaların ortalama sayılarından 18-30 kat fazla olduğunu bildirmişlerdir (140).

Bu çalışmada, ayrıca periferik kandaki CD34+ hücre sayısı, $300 \times 10^6/L$ 'den fazla olan hastaların çok daha kötü prognoza sahip olduğu ve bu hastaların akut lösemiye transformasyon riskinde artış gözlemlendiği saptanmıştır (140).

Hongyu Ni ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada PMF'li hastaların kemik iliğindeki CD34+ hücrelerin sıklığı ve dağılımına bakılmış ve kemik iliğindeki CD34+ hücrelerin sayısı ile dolaşımdaki CD34+ hücrelerin sayısı arasında bir bağlantı olup olmadığı araştırılmıştır. Ortalama yaşları 57 olan toplam 31 PMF hastası çalışmaya dahil edilmiştir. Kontrol grubuna hematolojik parametreleri normal, kemik iliği infiltrasyonu olmayan 20 tane solid tümörlü hasta alınmıştır. Bu çalışmada kemik iliği içindeki artmış CD34+ hücre sayısı, artmış kemik iliği sellüleritesi ile ilişkili bulunmuşken, azalmış kemik iliği CD34+ hücre sayısı yoğun fibrozis ile ilişkili bulunmuştur (141).

Hafifçe fibrotik kemik ilikli predominant hiperselüler hastalarda kemik iliği CD34+ hücre sayısında artış gözlenmiştir. Kemik iliği fibrozisinin daha yüksek derecelerde olduğu hastaların kemik iliklerinde CD34+ hücrelerin sayısında azalma gözlemlenmiştir.

Periferik kandaki CD34+ hücrelerin artmış sayısının nedeninin, dalak ve karaciğer gibi kemik iliği dışındaki organlarda uyuyan kök hücrelerin aktivasyonu nedeniyle olabileceği öne sürülmektedir (142). Buna rağmen CD34+ hücrelerin

fibrotik kemik iliğinden dolaşıma geçişinin periferik kanda CD34+ hücre artışına neden olacağını destekleyen ek bilgiler mevcuttur (143).

Buna rağmen PMF'li hastalarda dolaşımda daha fazla CD34+ hücre bulunmasında, kemik iliği mikroçevresindeki fiziksel bozulma ve fibrozisin tek başına yeterli olmadığı ileri sürülmüştür (145). Kemik iliği yapısındaki dilate sinosoidal damarlar ve intraluminal hematopoezi içeren değişiklikler HSC/HPC'nin dolaşıma girmesini kolaylaştırabilir (144).

Bir çalışmada CD34+ hücrelerin kemik iliği mikroçevresiyle etkileşim yeteneğini anlamlı şekilde bozan neoplastik HSC/HPC'nin intristik defektinden olabileceği ileri sürülmüştür (146).

Çalışmamızda kemik iliği biyopsi örneklerinde retikülin lif düzeylerine göre olguların CD34+ hücre sayısı ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı ($p>0,05$). Ancak ağır düzeyde retikülin lif görülen olguların CD34+ hücre sayısı ortalamasının retikülin lif görülmeyen olgulardan düşük olması dikkat çekici bulundu.

PMF hastalarında kemik iliği fibrozisindeki progresyon hakkında halen tartışmalı bir durum söz konusudur. Wolf ve Neiman miyelofibrozisli 35 vakayı çalışmalarına almışlardır. 21 vakanın takip eden biyopsileri 2 yıldan 10 yıla varan aralıklarla yapılmıştır. Hastalık süresi ve kemik iliği fibrozisi derecesi arasında bir korelasyon gösterememişlerdir (147).

Diğer yandan Thiele ve arkadaşları PMF'li prefibrotik dönemdeki bir grup hasta ile çalışma yapmışlardır. 80 hastanın 22'sinin takip eden kemik iliği biyopsi örnekleri; klasik PMF'da hematolojik parametrelerle ilişkili olarak değişen, progresif kemik iliği fibrozisini göstermektedir. (148).

Son zamanlarda Buhr ve arkadaşları PMF'li hastaların kemik iliği biyopsi örneklerinden çalışma yapmışlar. 41 hastanın 13'ünde klasik PMF'nin morfolojik özelliklerinin adım adım geliştiğini bulmuşlar. Başlangıç tanısında fibrozisi olmayan 41 hastanın 16'sında minimal retikülin fibrozis bulmuşlardır (149). PMF'nin adım adım gelişimini daha iyi dökümanete etmek için kemik iliğinin değerlendirildiği geniş çaplı prospektif çalışmalara ihtiyaç vardır.

Sonuç olarak; çalışmamızda kemik iliği fibrozisi ile mast hücre sayısı arasında anlamlı ilişki saptanmıştır. Ayrıca kemik iliğinde fibrozis derecesinde artmaya zıt olarak CD34+ hücre sayısında azalma tespit ettik. Bu sonuçlar

gösteriyor ki, dolaşımdaki mutlak CD34+ hücre sayısı muhtemelen kemik iliği içinde hastalığın progresyonunu değerlendirmede bilgi verici biomarker olarak işe yarayabilir

Ayrıca kronik MPN’lerde mast hücrelerinin değerlendirilmesinin daha sonra gelişebilecek fibrozis için bir öngörü kanıtı olabileceği ileri sürülebilir. Mast hücrelerinin intramedüller fibrozis patogenezindeki muhtemel rolüne bakılarak, fibrozisin PMF veya diğer miyeloproliferatif hastalıklarda mast hücrelerini inhibe eden ilaçlarla azaltılıp azaltılamayacağının belirlenmesi ilginç olabilir. Homojen hasta gruplarıyla yapılabilecek daha geniş ve ileri araştırmalar kronik MPN hastalarının tedavisi ile ilgili yeni ufuklar açacaktır.



6- ÖZET

AMAÇ: Bu çalışmada amacımız, takip ve tedavi ettiğimiz Bcr-Abl negatif MPN hastalarının kemik iliği biyopsilerinde belirli düzeyde bulunabilen retikülin lif artışının mast hücre proliferasyonu ve CD34+ hücre ekspresyonu ile ilişkili olup olmadığının gösterilmesidir.

YÖNTEM: Çalışmaya 47'si hasta grubu, 30'u kontrol grubu olmak üzere 77 kişi alınmıştır. Hastalıkların tanısı 2008'de yeniden gözden geçirilen DSÖ tanı kriterlerine göre konuldu. Her hastadan kemik iliği biyopsisi alınmıştır. Biyopsi preparatları Patoloji A.B.D'da incelenmiştir. Her bir preparat retikülin boyasıyla boyanıp, retikülin lif derecelendirmesi yapıldı. Preparatlar daha sonra mast hücre triptaz ve CD34 boya ile boyandı. Örnekler ışık mikroskobu ile 40 büyütmede değerlendirilip ve 20 farklı alanda sayılan mast hücre ve CD34+ hücre sayılarının ortalaması alınmıştır. Kruskal Wallis testi ile olguların retikülin lif düzeylerine göre mast hücre sayısı ortalamaları ve CD34+ hücre sayısı ortalamaları karşılaştırıldı. P değeri <0,05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

BULGULAR: Hasta grubunun yaş ortalaması 54,71 yıl, kontrol grubunun yaş ortalaması ise 52,63 yıldır. Bcr-Abl negatif kronik MPN'li hastalarda, retikülin lif düzeylerine göre olguların mast hücre sayısı ortalamaları arasında istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı farklılık saptanmıştır ($p < 0,01$). Oysaki retikülin lif düzeylerine göre olguların CD34+ hücre sayısı ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmazken ($p > 0,05$); ağır düzeyde retikülin lif görülen olguların CD34+ hücre sayısı ortalamasının retikülin lif görülmeyen olgulardan daha düşük saptanmıştır. JAK2 pozitif olan olguların mast hücreleri ortalaması negatif olgulara göre anlamlı düzeyde yüksek bulundu ($p < 0,05$). JAK 2 durumuna göre olguların CD34+ hücre sayısı ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır ($p > 0,05$).

SONUÇ: Mast hücrelerinde üretilen birçok madde ve sitokinin fibrojenize katkıda bulunduğu gösterilmiştir. Bu çalışmamızda MPN'lerin alt tiplerinde çeşitli derecelerde bulunabilen retikülin lif artışıyla mast hücre artışının korele olduğunu gösterdik. Ayrıca retikülin lif şiddeti arttıkça kemik iliğinde CD34+ boyanan hücre sayısında azalma tespit ettik. Hafifçe fibrotik ve hiperselüler kemik iliği olan hastalarda ise kemik iliği CD34+ hücre sayısında artış gözlenmiştir. Bu sonuçlara

göre MPN’lerde mast hücrelerini inhibe edebilen ilaçlarla belki fibrozis modifiye edilebilir. Muhtemelen fibrotik kemik iliğinden dolaşıma salınan CD34+ hücrelerin artışı MPN’lerde hastalık progresyonuna yol gösterici olabilir.



7-ABSTRACT

Aim: The aim of this study is to determine the relationship between increased reticulin staining (reticulin fibrosis) in bone marrow biopsies of Bcr-Abl negative MPN patients and mast cell proliferation and CD34 positive cell expression.

Material and Method: A total of 77 patients were included in the study. 47 patients with Bcr-Abl negative MPN and 30 controls were examined. The patients were diagnosed according to WHO diagnostic criteria revised in 2008. Bone marrow biopsy were performed in all patients and specimens were evaluated in the division of pathology. Each specimen was stained with Gomory and graded for reticulin fibrosis. Then they were stained with mast cell tryptase and CD34 immunostain. Specimens were observed under a light microscope at 40x magnification. The number of mast cells and CD34+ cells seen in 20 different areas were averaged. The average CD34+ cells and mast cells were correlated with the degree of the reticulin fibrosis by Kruskal Wallis test. P value <0,05 was statistically significant.

Result: Mean age of patients was 54,71 years, whereas mean age of the control group was 52,63 years. There was statistically advanced level of significance between reticulin fiber levels and mean mast cell count in patients with bcr-abl negative chronic MPN ($p < 0,05$). While there was no statistically significant difference between means of CD34+ cell counts of cases according to reticulin fibers levels ($p < 0,05$) ; mean CD34+ cell coun in cases with intense reticulin fibers was lower than those cases without reticulin fibers. Means of mast cells in JAK2 positive cases were significantly higher than those cases with the negative cases($p < 0,05$). According to JAK2 status, there was no statistically significant difference between means of CD34+ cell count in cases ($p > 0,01$).

Discussion and Conclusion: It has been demonstrated that many substances and cytokines produced in mast cells contribute in fibrogenesis. In this present study, we showed that reticulin fiber increase, which was encountered at various rates in MPN subtypes, was correlated with mast cell increase. Moreover, we detected the decrease in CD34+ stained cell number in the bone marrow as the intensity of reticulin fibers was increased. CD34+ cell counts were increased in patients with mildly fibrotic, predominantly hypercellular bone marrows. According to these results, drugs inhibiting mast cellsin MPNs might modify fibrosis. Possibly, increase in CD34+

cells secreted from fibrotic bone marrow to the circulation can be guiding us for the disease progression



8- KAYNAKLAR

1. Fialkow PJ, Faguet GB, Jacobson RJ, Vaidya K, Murphy S. Evidence that essential thrombocythemia is a clonal disorder with origin in a multipotent stem cell. *Blood* 1981;58: 916–919
2. Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet*.2005;365:1054–1061
3. Levine RL, Wadleigh M, Cools J, et al. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell*. 2005;7: 387–397
4. James C, Ugo V, Le Couedic JP, et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature*. 2005;434: 1144–1148
5. Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, et al. A gain of function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders, *The New England Journal of Medicine*. 2005;350:1779–1790
6. Susanne Schnittger, Utrike Bacher, Claudia Haferlach. Detection of JAK2 exon 12 mutations in 15 patients with JAK2V617F negative polycythemia vera. *Haematologica* 2009;94: 414–418
7. Chaligne R, James C, Tonetti C, Besancenot R, Le Couedic JP, Fava F et al. Evidence for MPL W515L/K mutations in hematopoietic stem cells in primitive myelofibrosis. *Blood* 2007;110:3735–3743
8. Steensma DP, Dewald GW, Lasho TL, Powell HL, Mc Clure RF, Levine RL, et al. The JAK2 V617F activating tyrosine kinase mutation is an infrequent event in both ‘atypical myeloproliferative disorders and myelodysplastic syndrome. *Blood* 2005;106(4):1207–1209
9. Georgii A, Vykoupil KF, Buhr T et al. Chronic myeloproliferative disorders in bone marrow biopsies. *Pathology Research and Practice* 1990;186:3–27
10. Okayama Y, Kawakami T. Development, migration and survival of mast cells. *Immunol Res* 2006; 34(2) 97–115

11. Ercan F, Çetinel Ş. Role of mast cells in inflammation. Review of studies on human and experimental animal models. *Marmara Med J* 2008;21(2):179–186
12. Crivellato E, Beltrami C.A, Mallardi F, Ribatti D. The mast cell: an active participant or an innocent bystander? *Histol. Histopathol.* 2004;19: 259–270
13. Krishnaswamy G, Ajitawi O, Chi D.S. The human mast cell: an overview, *Methods Mol. Biol.*2006; 315: 13–34
14. Hoffman R, Benz E.J, Shattil S.J, Furie B, Silberstein L, McGlave P, Heslop H. *Hematology Basic Principles and Practice* 2009;70: 1125–1147
15. Thiele J, Kvasnicka H.M. CD34+ stem cells in chronic myeloproliferative disorders. *Histol. Histopathol.*2002;17: 507–521
16. Ni H, Barosi G, Rondelli D, Hoffman R. Studies of the site and distribution of CD34+ cells in idiopathic myelofibrosis. *Am J Clin Pathol* 2005;123: 833–839
17. Tefferi A, Vardiman J.W. Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: The 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms. *Leukemia*2008; 22: 14–22
18. Tefferi A, Gilliland D.G. Oncogenes in myeloproliferative disorders. *Cell Cycle* 2007;6: 550–566
19. Tefferi A, Thiele J, Vardiman J.W. The 2008 World Health Organization classification system for myeloproliferative neoplasm. *Cancer* 2009;115: 3842–3847
20. Geary CG. The story of chronic myeloid leukemia. *Br J Haematol* 2000;110(1):2–11
21. Goldman JM, Melo JV. Chronic myeloid leukemia-advances in biology and new approaches to treatment. *N Engl J Med* 2003;349(15):1451–1464
22. Jager R, Kralovics R. Molecular pathogenesis of Philadelphia chromosome negative chronic myeloproliferative neoplasms. *Current Cancer Drug Targets* 2011;11: 20–30
23. Tefferi A, Vainchenker W. Myeloproliferative neoplasm: molecular pathophysiology, essential clinical understanding, and treatment strategies. *J Clin Oncol* 2011; 29(5):573–582

24. Thiele J, Kvasnicka HM, Facchetti F, et al. European consensus on grading bone marrow fibrosis and assessment of cellularity. *Haematologica* 2005;90: 1128–1132
25. Spivak JL, Barosi G, Tognoni G, Barbui T, Finazzi G, Marchioli R et al. Chronic myeloproliferative disorders. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2003; 200–224
26. Ania BJ, Suman VJ, Sobel JL, et al. Trends in the incidence polycythemia vera among Olmsted County, Minnesota residents. *Am J Hematol.*1994;47: 89–93
27. Chaiter Y, Brenner B, Aghai E, et al. High incidence of myeloproliferative disorders in Ashkenazi Jews in Northern Israel. *Leuk Lymphoma.* 1992;7: 251–255
28. Prchal JF, Adamson JW, Murphy S, et al. Polychthemia vera. The in vitro response of normal and abnormal stem cell lines to erythropoietin. *J Clin Invest.*1978;61: 1044–1047
29. James C, Ugo V, Le Couedic JP, et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythemia vera. *Nature.* 2005;434: 1144–1148
30. Ohnishi K, Aota Y, Akahane D, et al. JAK2V617F mutational status as determined by semiquantitative sequence-specific primer-single molecule fluorescence detection assay is linked to clinical features in chronic myeloproliferative disorders. *Leukemia.* 2007;21: 1097–1099
31. Moliterno AR, Hankins WD, Spivak JL. Impaired expression of the thrombopoietin receptor by platelets from patients with polycythemia vera. *N Eng J Med.* 1998;338:572–580
32. Silva M, Richard C, Benito A, et al. Expression of bcl-x in erythroid precursors from patients with polycythemia vera. *N Eng J Med.*1998;338:564–571
33. Klippel S, Strunck E, Busse CE, et al. Biochemical characterization of PRV-1 a novel hematopoietic cell surface receptor which is overexpressed in polycythemia rubra vera. *Blood* 2002;100:2441–2448
34. Berlin NI. Diagnosis and classification of the polycythemias. *Semin Hematol.*1975;12: 339–351

35. Falanga A, Marchetti M, Evangelista V, et al. Polymorphonuclearleukocyte activation and hemostasis in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Blood* 2000;96: 4261–4266
36. Jensen MK, De Nully Brown P, Lund BV, et al. Increased circulating thrombocyte leukocyte aggregates in myeloproliferative disorders is correlated to previous thrombosis, thrombocyte activation and thrombocyte count. *Eur J Haematol* 2001;66: 143–151
37. Falanga A, Marchetti M, Vignoli A, et al. Leukocyte-thrombocyte interaction in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Exp Hematol* 2005;33: 523–530
38. Arellano-Rodrigo E, Alvarez-Larran A, Reverter JC, et al. Increased thrombocyte and leukocyte activation as contributing mechanisms for thrombosis in essential thrombocythemia and correlation with the JAK2 mutational status. *Haematologica* 2006;91; 169–175
39. Cheung B, Radia D, Pantedelis P, Yadegarfar G, Harrison C. The presence of the JAK V617F mutation is associated with a higher haemoglobin and increased risk of thrombosis in essential thrombocythemia. *Br J Haematol* 2005;132: 244–250
40. Spivak J.L. Chronic myeloproliferative disorders: clonality and clinical heterogeneity. *Semin. Hematol.* 2004;41: 1–5
41. Abdulkarim K, Ridelli B, Johansson P. The impact of peripheral blood values and bone marrow findings on prognosis for patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Eur J Haematol.* 2011; 86(2):148–155
42. Marchioli R, Finazzi G, Landolfi R, et al. Vascular and neoplastic risk in a large cohort of patients with polycythemia vera. *J Clin Oncol.* 2005;23: 2224–2232
43. Tefferi A, Polycythemia vera: A comprehensive review and clinical recommendations. *Mayo Clin Proc.* 2003;78: 174–194
44. Pearson TC, Wetherley Mein G, Vascular occlusive episodes and venous hematocrit in primary proliferative polycythemia. *Lancet* 1978;2: 1219–1222

45. Kaplan ME, Mack K, Goldberg JD, et al. Long term management of polycythemia vera with hydroxyurea: A progres report. *Semin Hematol.* 1986;23: 167–171
46. Silver RT. Interferon- α : Effect of long term treatment of polycythemia vera. *Semin Hematol.* 1997;34: 40–50
47. Kiladjian JJ, Cassinat B, Tulture P, et al. High moleculer response rate of polycythemia vera patients with treated with pegylated interferon alpha-2a. *Blood* 2006;108:2037–2040
48. Moliterno AR, Hexner E, Roboz GJ, et al. An open label study of CEP-701 in patient with JAK2V617F positive PV and ET: Update of 39 enrooled patient. *Blood* Nov 20, 2009; 114:22 Abstract 753
49. Tefferi A. The Philedelphia chromosome negative chronic miyeloproliferative disorders: a practical overview. *Mayo Clin Proc* 1998; 73: 1177–1184
50. Harrison CN. Current trends in essential thrombocytemia. *Br J Haematol* 2002;117:796
51. McNally RJ, Rowland D, Roman E, Cartwright RA. Age and sex distributions of hematological malignancies in the U.K. *Hematol Oncol* 1997;15: 173
52. Mesa RA, Silverstein MN, Jacobsen SJ et al. Population-based incidence and survival figures in essential thrombocytemia and agnogenic miyeloid metaplasia: An Olmsted Country Study. 1999;61: 10–15
53. Jacobson S, Carneskog J, Ridelli B, Linch DC. Flow cytometric analysis of megakaryocyte ploidy in chronic miyeloproliferative disorders and reactive thrombocytosis. *Br J Haematol* 1996;56: 287–292
54. Falcetta R, Sacerdote C, Bazzan M, et al. Occupational and environmental risk factors for essential thrombocytemia. *G Ital Med Lav Ergon* 2003; 25;9–12
55. Campbell PJ, Scott LM, Buck G, et al. Definations of subtypes of essential thrombocytemia and relation to polycythemia vera based on JAK2 V617F mutation status: a prospective study. *Lancet* 2005;366; 1945–1953
56. Beer PA, Green AR. Pathogenesis and management of essential thrombocytemia. *Hematology (ASH)* 2009;621–628

57. Elliott MA, Tefferi A. Thrombosis and haemorage in polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Br J Haematol* 2005;128: 275–290
58. Boca B, Ciabattini G, Tartaglione G, et al. Increased thromboxane biosynthesis in essential thrombocythemia. *Thromb Haemost* 1995; 74:1225–1230
59. Budde U, Schafer G, Mueller N, et al. Acquired von Willebrand disease in the myeloproliferative syndrome. *Blood* 1984;64: 981–985
60. Tefferi A, Diagnosis and clinical manifestations of essential thrombocythemia. www.uptodate.com 19;2 May 2011
61. Tefferi A, Essential thrombocythemia and thrombocytosis. In Wintrobe's *Clinical Hematology* 12th edition. 2009;1352–1360
62. 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: 270–276
63. Finazzi G, Barbui T. Risk-adapted therapy in essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Blood Rev* 2005;19: 243–252
64. Passamonti 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: 1645–1651
65. Wolanskyj AP, Schawager SM, McClure RF, Larson DR, Tefferi A. Essential thrombocythemia beyond the first decade: Life expectancy, long term complication rates, and prognosis factors. *Mayo Clin Proc* 2006; 81: 159–166
66. Carabbio A, Antonioli E, Guglielmelli P, et al. Leukocytosis and risk stratification assesment in essential thrombocythemia. *Clin Oncol*. 2008;26: 2732–2736
67. Tefferi A, Annual Clinical Updates in Hematological Malignancies: a continuing medical education series: polycythemia vera and essential thrombocythemia: 2011 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol*. 2011 1986;33:292-301
68. Harrison CN, Campbell PJ, Buck G, et al. Hydroxyurea compared with anagralide in high-risk essential thrombocythemia. *N Engl J Med* 2005;353: 33–45

69. Kiladjan JJ, Chomienne C, Fenaux P. Interferon-alpha therapy in bcr-abl negative myeloproliferative neoplasms. *Leukemia* 2008;22: 1991–1998
70. 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
71. 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):756–761
72. Cervantes F, Dupriez B, Pereira A. New prognostic scoring system for primary myelofibrosis based on a study of the International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment. *Blood* 2009;113(13): 2895–2901
73. Löfvenberg E, Wahlin A, Roos G, Ost A. Reversal of myelofibrosis by hydroxyurea. *Eur J Haematol*. 1990;;44(1):33-38
74. Wilks AF. Two putative protein-tyrosine kinases identified by application of the polymerase chain reaction. *PNAS* 1989;86: 1603–1607
75. Jones AV, Kreil S, Zoi K, Waghorn K, Curtis C, Zhang L, Score J, Seear R, Chase AJ, Grand FH, White H, Zoi C. Widespread occurrence of the JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders. *Blood* 2005; 106(6): 2162–2168
76. Xu X, Zhang Q, Luo J, et al. JAK2 V617F: Prevalence in a large Chinese hospital population. *Blood* 2007; 109: 339–342
77. Heberstreit D, Horejs-Hoeck J and Duschl A. JAK/STAT- dependent gene regulation by cytokines. *Drug News Perspect* 2005;18: 243–249
78. Ihle JN, Gilliland DG. Jak2:normal function and role in hematopoietic disorders. *Curr Opin Genet Dev* 2007;17(1):8–14
79. Nelson ME, Steensma DP. JAK2 V617F in myeloid disorders: what do we know now, and where are we headed? *Leuk Lymphoma* 2006; 47(2): 177–194

80. Lu X, Levine R, Tong W, Wernig G, Pikman Y, Zarnegar S, Gilliland DG, Lodish H. Expression of a homodimeric type I cytokine receptor is required for JAK2 V617F mediated transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102(52):18962–18967
81. Cazzola M. Somatic mutations of JAK exon 12 as a molecular basis of erythrocytosis. *Haematologica* 2007; 92(12):1585–1589
82. Lee TS, Ma W, Zhang X, Kantarjian H, Albitar M. Structural effects of clinically observed mutations in JAK2 exons 13–15: comparison with V617F and exon 12 mutations. *BMC Struct Biol* 2009;9:58
83. Percy MJ, Scott LM, Erber WN, Harrison CN, Reilly JT, Jones FG, Green AR, Mc Mullin MF. The frequency of JAK2 exon 12 mutations in idiopathic erythrocytosis patients with low serum erythropoietin levels. *Haematologica* 2007; 92(12):1607–1614
84. Royer Y, Staer J, Costuleanu M, et al. Janus kinases affect thrombopoietin receptor cell surface localisation and stability. *J Bio Chem* 2005; 280:27251–27261
85. Kralovics R, Teo SS, Buser AS, et al. Altered gene expression in myeloproliferative disorders correlates with activation of signalling by the V617F mutation of JAK2. *Blood* 2005;106:3374–3376
86. Robertson B, Urquhart C, Ford I, et al. Platelet and coagulation activation markers in myeloproliferative diseases: relationships with JAK2 V617F status, clonality and antiphospholipid antibodies. *J Thromb Haemost* 2007; 5: 1679–1685
87. Falanga A, Marchetti M, Vignoli A, et al. JAK2 V617F mutation in patients with essential thrombocythemia: relation to platelet, granulocyte, and plasma hemostatic and inflammatory molecules. *Exp Hematol* 2007; 35: 702–711
88. Pikman Y, Lee BH, Mercher T, Mc Dowell E, Ebert BL, Gozo M, Cuker A, Wernig G, Moore S, Galinsky I, DeAngelo DJ, Clark JJ. MPLW515L is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *PLoS Med* 2006;3(7):270

89. 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):673–683
90. Ito S, D'Alessio AC, Taranova OV, Hong K, Sowers LC, Zhang Y. Role of Tet proteins in 5Mc to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification. *Nature* 466(7310):1129–1133
91. Bacher U, Haferlach C, Schnittger S, Kohlmann A, Kern W, Haferlach T. Mutations of the TET2 and CBL genes.: novel molecular markers in myeloid malignancies. *Ann Hematol* 2010;89(7):643–652
92. Van Etten RA, Koschmieder S, Delhommeau F, Perrotti D, Holyoake T, Pardanani A, Mesa R, Green T, Ibrahim AR, Mughal T, Gale RP, Goldman J. The Ph –positive and Ph-negative myeloproliferative neoplasms: some topical pre-clinical issues. *Haematologica* 96(4): 590–601
93. Grand FH, Hidalgo-Curtis CE, Ernst T, Zoi K, Zoi C, McGuire C, Kreil S, Jones A, Score J, Metzgeroth G, Oscier D, Hall A, Brandts C, Serve H, Reiter A. Frequent CBL mutations associated with 11q acquired uniparental disomy in myeloproliferative neoplasms. *Blood* 2009; 113(24):6182–6192
94. Stenton GR, Befus AD. Role of intestinal mast cell in modulating gastrointestinal pathophysiology. *Ann Allergy Asthma Im* 1998; 81: 1–15
95. Chugunova E. Biological Function of Mast Cell Chymase. Doctoral thesis, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala 2004.
96. Okayama Y, Kawakami T. Development, migration and survival of mast cells. *Immunol Res* 2006; 34(2):97–115
97. Ercan F, Çetinel Ş. Role of mast cells in inflammation: Review of studies on human and experimental animal models. *Marmara Med J* 2008;21(2)179–186
98. Da Silva CA, Reber L, Frossard N. Stem cell factor expression, mast cells and inflammation in asthma. *Fundam Clin Pharmacol* 2006;20(1):21–39
99. Enerback L. Mast cells in rat gastrointestinal mucosa. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1966;66(3):289–322
100. Irani AA, Schechter NM, Craig SS, DeBlois G, Schwartz LB. Two types of human mast cells that have distinct neutral protease compositions. *Proc Natl Acad Sci* 1986;88,4464–4468

101. Mc Neil HP, Gotis-Graham I. Human mast cell subsets-distinct functions in inflammation? *Inflam Res* 2000; 49,3–7
102. Schwart LB. Mast cells and their role in urticaria. *J Am Acad Dermatol* 1991; 25:190–204
103. Wolters PJ, Laig-Webster M, Caughey GH. Dipeptyl peptidase I cleaves matrix-associated proteins and is expressed mainly by mast cells in normal dog airways. *Am J Resp Cell Mol* 2000; 22:183–190
104. Brown JK, Jones JA, Rooney LA, Caughey GH. Mast cell tryptase activates extracellular-regulated kinases in airway smooth-muscle cells. *Am J Res Cell Mol* 2001; 24: 146–154
105. Caughey GH, Mast cells tryptases and cyhmases in inflammation host defense. *Immunol Rev* 2007; 217: 141–154
106. Schwartz LB. Tryptase, a mediator of human mast cells. *J Allergy Clin Immunol* 1990; 86: 594–598
107. Payne V, Kam CA. Mast cell tryptase: review of its physiology and clinical significance. *Anaesthesia*2004; 59: 695–703
108. Rossi GL, Olivieri D. Does the mast cell stil have a key role in asthma? *Chest* 1997; 112: 523–529
109. Weidinger S, Mayerhofer A, Frungieri MB, Meineke V, Ring J, Kohn FM. Mast cell-sperm interaction: evidence for tryptase and proteinase-activated receptors in the regulation of sperm motility. *Human Reprod* 2000; 318: 2519–2524
110. Levi-Schaffer F, Piliponsky AM. Tryptase, a novel link between allergic inflammation and fibrosis. *Trends Immunol* 2003; 24: 158–161
111. Brown JK, Tyler CL, Jones CA, Ruoss SJ, Hartmann T, Caughey GH. Tryptase, the dominant secretory granuler protein in human mast cells, is a potent mtogen for cultured dog tracheal smooth muscle cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1995; 13: 227–236
112. Sali A, Matsumato R, Mc Neil HP, Karplus M, Stevens RL. Three-dimensional models of four mouse mast cell chymases. Identification of proteoglycan binding regions and protease-specific antigenic epitopes. *J Biol Chem* 1993; 268: 9023–9034

113. Pejler G, Berg L. Regulation of rat mast cell protease 1 activity. Protease inhibition is prevented by heparin proteoglycan. *Eur J Biochem* 1995; 23: 192–199
114. Crivellato E, Beltrami C.A, Mallardi F, Ribatti D. The mast cell: an active participant or an innocent bystander? *Histol. Histopathol.* 2004; 19: 259–270
115. Krishnaswamy G, Ajitawi O, Chi D.S. The human mast cell: an overview, *Methods Mol. Biol.* 2006; 315: 13–34
116. Akgul A, Skrabal C.A, Thompson L.O, Loebe M, Lafuente J.A, Noon G.P, Youker K.A. Role of mast cells and their mediators in failing myocardium under mechanical ventricular support. *J. Heart Lung Transplant* 2004;23: 709–715
117. Edwards S.T, Cruz A.C, Donnelly S, Dazin P.F, Schulman E.S, Jones K.D, Wolters P.J, Hoopes C, Dolganov G.M, Fang K.C. c-kit immunophenotyping and metalloproteinase expression profiles of mast cells in interstitial lung diseases, *J Pathol* 2005; 206: 279–290
118. Ikura Y, Ohsawa M, Shiara N, Sugama Y, Fukushima Y, Suekane T, Hirayama M, Ehara S, Naruko T, Ueda M, Expression of angiotensin II type 1 receptor in human cirrhotic livers: its relation to fibrosis and portal hypertension, *Hepatol Res* 2005;32:107-116
119. Kkizoe E, Shiota N, Tanabe Y, Shimoura K, Kobayashi Y, Okunishi H. Isoform -selective upregulation of mast cell chymase in the development of skin fibrosis in scleroderma model mice. *J Invest Dermatol.* 2001;116:118–123
120. Xu X, Rivkind A, Pappo O, Pikarsky A, Levi-Schaffer F. Role of mast cells and myofibroblasts in human peritoneal adhesion formation, *Ann. Surg.* 2002; 236: 593–601
121. Tataroglu C, Sarioglu S, Kargi A, Ozkal S, Aydın O. Fibrosis in hodgkin and non-hodgkin lymphomas. *Pathol. Res. Pract.* 2007; 725–730
122. Bain B.J. Systemic mastocytosis and other mat cell neoplasm, *Br. J. Haematol.* 1999; 106: 9–17

123. Horny H.P, Kaiserling E, Sillaber C, Walchshofer S, Valent P, Bone marrow mastocytosis associated with an undifferentiated extramedullary tumor of hemopoietic origin, *Arch. Pathol Lab. Med.* 1997; 121: 423–426
124. Horny H.P, Parwaresch M.R, Lennert K, Bone marrow findings in systemic mastocytosis, *Hum. Pathol.* 1985; 16: 808–814
125. Horny H.P, Ruck M, Wehrmann M, Kaiserling E, Blood findings in generalized mastocytosis: evidence of frequent simultaneous occurrence of myeloproliferative disorders, *Br. J. Haematol* 1990; 76: 186–193
126. Lawrence J.B, Friedman B.S, Travis W.D, Chinchilli V.M, Metcalfe D.D, Gralnick H.R, Hematologic manifestations of systemic mast cell disease: a prospective study of laboratory and morphologic features and their relation to prognosis, *Am. J. Med.* 1991; 91: 612–624
127. Lennert K, Parwaresch M.R, Mast cells and mast cell neoplasia: a review, *Histol pathology* 1979; 3: 349–365
128. Travis W.D, Li C.Y, Bergstralh E.J, Solid and hematologic malignancies in 60 patients with systemic mast cell disease, *Arch. Pathol. Lab. Med* 1989; 113: 365–368
129. Travis W.D, Li C.Y, Yam L.T, Bergstralh E.J, Sweet R.G, Significance of systemic mast cell disease with associated hematologic disorders, *Cancer* 1988; 62: 965–972
130. Valent P, Escribano L, Parwaresch R.M, Schemmel V, Schwartz L.B, Sotlar K, Sperr W.R, Horny H.P, Recent advances in mastocytosis research. Summary of the Vienna mastocytosis meeting 1998, *Int. Arch. Allergy Immunol.* 1999; 120: 1–7
131. Webb T.A, Li C.Y, Yam L.T, Systemic mast cell disease: a clinical and hematopathologic study of 26 cases, *Cancer* 1982; 49: 927–938
132. Dunphy C.H, Evaluation of mast cells in myeloproliferative disorders and myelodysplastic syndromes, *Arch. Pathol. Lab. Med* 2005; 129: 219–222
133. Sotlar K, Bache A, Stellmacher F, Bultmann B, Valent P, Horny H.P, Systemic mastocytosis associated with chronic idiopathic myelofibrosis: a distinct subtype of systemic mastocytosis associated with a clonal hematological non-mast cell lineage disorder carrying the activating point mutations KITD816V and JAK2V617F, *J. Mol. Diagn.* 2008; 10: 58–66

134. Douer D, Fabian I, Cline MJ. Circulating pluripotent haematopoietic cells in patients with myeloproliferative disorders *Br J Haematol* 1983;54:373-381
135. Barosi G, Viarengo G, Pecci A, et al. Diagnostic and clinical relevance of the number of circulating CD34+ cells in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Blood* 2001;98: 3249–3255
136. Thiele J, Kvasnicka HM, Fisher R. Histochemistry and morphometry on bone marrow biopsies in chronic myeloproliferative disorders: aid to diagnosis and classification. *Ann Hematol.* 1999;78: 495–506
137. Thiele J, Kvasnicka HM, Czeslick C. CD34+ progenitor cells in idiopathic (primary) myelofibrosis: a comparative quantification between spleen and bone marrow tissue. *Ann Hematol* 2002;81: 86–89
138. A. Tefferi, Pathogenesis of myelofibrosis with myeloid metaplasia. *J. Clin. Oncol.* 23 (2005);8520–8530
139. Arsalan A, Martin P, Powers, Keith A, Youker, Lawrence R, April E, Cherie H, Dunphy, Chung-Che C. Mast cell burden and reticulin fibrosis in the myeloproliferative neoplasms: A computer-assisted image analysis study. *Pathol. Research and Practice* 2005; 205: 634–638
140. Barosi G, Fabian I, Cline MJ. Circulating pluripotent hematopoietic cells in patients with myeloproliferative disorders. *Br J Haematol.* 1983;54: 373–381
141. Hongyu Ni, Barosi G, Rondelli D, Hoffman R. Studies of the site and distribution of CD34+ cells in idiopathic myelofibrosis. *Am J Clin Pathol* 2005;123:833–839
142. Kirshner HP, Goldberg J, Landaw SA. The spleen as a site of colony-forming cell production in myelofibrosis. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1980;165:279–282
143. Wolf BC, Neiman RS. Hypothesis: splenic filtration and the pathogenesis of extramedullary hematopoiesis in agnogenic myeloid metaplasia. *Hematol Pathol* 1987;1: 77–80
144. Wolf BC, Neiman RS. Myelofibrosis with myeloid metaplasia: pathophysiologic implications of the correlation between bone marrow changes and progression of splenomegaly. *Blood* 1985; 65:83–809

145. Wang JC, Cheung CP, Ahmed F, et al. Circulating granulocyte and macrophage progenitor cells in primary and second myelofibrosis. *Br J Haematol.* 1983; 54: 301–307
146. Liesveld JL, Winslow JM, Kempski MC, et al. Adhesive interactions of normal and leukemic human CD34+ myeloid progenitors: role of marrow stromal, fibroblast and cytomatrix components. *Exp Hematol.* 1991; 19: 63–70
147. Wolf BC, Neiman RS. Myelofibrosis with myeloid metaplasia: pathophysiologic implications of the correlation between bone marrow changes and progression of splenomegaly. *Blood.* 1985;65: 803–809
148. Thiele J, Kvasnicka HM, Zankovich R, et al. Clinical and morphological criteria for the diagnosis of prefibrotic primary myelofibrosis. *Ann Hematol.* 2001;80:160-165
149. Buhr T, Busche G, Choritz H, et al. Evolution of myelofibrosis in chronic idiopathic myelofibrosis as evidenced in sequential bone marrow biopsy specimens. *Am J Clin Pathol* 2003;119: 152–158