



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ PATOLOJİ ANA BİLİM DALI**

Başkan: Prof. Dr. Sibel Erdamar Çetin

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Nükhet TÜZÜNER TUNCAY

**FİBROZİSİN EŞLİK ETTİĞİ
MYELODİSPLASTİK/MYELOPROLİFERATİF NEOPLAZİLER,
FİBROZİSİN EŞLİK ETTİĞİ MYELODİSPLASTİK SENDROM
VE PRİMER MYELOFİBROZ OLGULARINDA
ASXL1 MUTASYONU VE PROGNOZA ETKİSİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Doğu VURALLI BAKKALOĞLU

İSTANBUL - 2016



**Bu alışma, İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakóltesi Etik Kurulu'nca
onaylanmış ve İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
tarafından desteklenmiştir.**

Proje No: 51259

İÇİNDEKİLER

SAYFA NO:

ÖNSÖZ.....	v
KISALTMALAR	vi
TABLO LİSTESİ.....	x
ŞEKİL LİSTESİ.....	xii
RESİM LİSTESİ	xiii
ÖZET.....	1
ABSTRACT.....	3
1. AMAÇ.....	5
2. GENEL BİLGİLER.....	6
2.1.Kemik iliği fibrozisi	6
2.2.Myeloid kök hücre hastalıkları	8
2.2.1. Myelodisplastik/Myeloproliferatif Neoplaziler (MDS/MPN).....	9
2.2.1.1.Kronik Myelomonositik Lösemi (KMML).....	10
2.2.1.1.1. Klinik.....	10
2.2.1.1.2. Genetik değişiklikler	11
2.2.1.1.3. Morfoloji	11
2.2.1.1.4. Ayırıcı Tanı	13
2.2.1.1.5. Prognoz	13
2.2.1.2.Atipik Myeloid Lösemi, BCR-ABL1 negatif (aKML).....	13
2.2.1.2.1. Klinik.....	13
2.2.1.2.2. Genetik değişiklikler	14
2.2.1.2.3. Morfoloji	14
2.2.1.2.4. Ayırıcı Tanı	14
2.2.1.2.5. Prognoz	14
2.2.1.3.Sınıflandırılmayan Myelodisplastik/Myeloproliferatif Neoplazi (MDS/MPN-U)	15

2.2.1.3.1. Klinik.....	15
2.2.1.3.2. Genetik değişiklikler	15
2.2.1.3.3. Morfoloji	15
2.2.1.3.4. Ayırıcı Tanı	15
2.2.1.3.5. Prognoz	16
2.2.1.3.6. Trombositozla birlikte Ring Sideroblastlı Refrakter Anemi (RARS-T).....	16
2.2.1.3.6.1.Klinik	16
2.2.1.3.6.2.Genetik değişiklikler	16
2.2.1.3.6.3.Morfoloji.....	16
2.2.1.3.6.4.Ayırıcı Tanı.....	16
2.2.1.3.6.5.Prognoz	17
2.2.2. Myelodisplastik Sendrom (MDS).....	17
2.2.2.1.Klinik	17
2.2.2.2.Genetik değişiklikler	17
2.2.2.3.Morfoloji.....	18
2.2.2.4.Fibrozisle birlikte Myelodisplastik Sendrom (MDS-F).....	19
2.2.2.5.Ayırıcı Tanı.....	19
2.2.2.6.Prognoz	20
2.2.3. Primer Myelofibroz (PMF).....	20
2.2.3.1.Klinik	21
2.2.3.2.Genetik değişiklikler	21
2.2.3.3.Morfoloji.....	22
2.2.3.4.Ayırıcı Tanı.....	22
2.2.3.5.Prognoz	23
2.3.MDS, MPN ve MDS/MPN: Ortak genetik değişiklikler	23
2.3.1. Sinyal iletiminde görevli genler	24
2.3.2. DNA metilasyonunda görevli genler	24

2.3.3. Transkripsiyonun düzenlenmesinde görevli genler	24
2.3.4. RNA bağlanmasında görevli genler	25
2.3.5. Kromatin modifikasyonunda görevli genler	25
2.4.ASXL1 mutasyonları	25
2.4.1. ASXL1 geni ve lökomogenezdeki rolü	25
2.4.2. ASXL1 mutasyonları	26
2.4.3. ASXL1 mutasyonlarının prognoza etkisi	27
3. MATERYAL-YÖNTEM	28
3.1.Olgu seçimi	28
3.2.Klinik Değerlendirme	28
3.3.Morfolojik Değerlendirme	30
3.4.ASXL1 gen mutasyonları ve ASXL1 protein ekspresyonunun değerlendirilmesi...	36
3.4.1. Sanger dizi analizi.....	36
3.4.1.1.Parafine gömülü bloklardan DNA izolasyonu	36
3.4.1.2.DNA yoğunluk ve saflığının ölçümü	37
3.4.1.3.Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR).....	37
3.4.1.4.Kemik iliği aspirasyon lamlarından DNA izolasyonu ve saflık ölçümü	38
3.4.1.5.Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR).....	39
3.4.1.6.Saflaştırma işlemi	40
3.4.1.7.Sekans polimeraz zincir reaksiyonu (Sekans PZR)	41
3.4.1.8.Etanol presipitasyonu ve örneklerin cihaza yüklenmesi	41
3.4.2. İmmunohistokimya (İHK)	42
3.5.İstatistik.....	43
4. BULGULAR	45
4.1.Klinik özellikler	45
4.2.Kemik iliği aspirasyon ve biyopsisinde morfolojik özellikler.....	48
4.2.1. Selülerite	48
4.2.2. Hematopoetik diziler	48
4.2.3. Displazi	48
4.2.4. Megakaryosit morfolojisi.....	49

4.2.5. Megakaryositlerde aberan CD34 ekspresyonu	50
4.2.6. Blast oranları ve kemik iliği biyopsisinde CD34+ hücre dağılımları	50
4.2.7. Kemik iliği biyopsisinde demir skoru değerlendirmesi	51
4.3.Kemik iliği biyopsisinde fibrozis derecelendirmesi	53
4.4.Kemik iliği biyopsisinde stromal değişiklikler	56
4.5.Takip biyopsilerinde blast oranında artma ve lösemik dönüşüm	58
4.6.Klinik ve morfolojik parametrelerin ilişkisi	61
4.6.1. Megakaryosit morfolojisinin klinik parametrelerle ilişkisi	61
4.6.2. Megakaryositlerde aberan CD34 ekspresyonunun klinik parametrelerle ilişkisi	62
4.6.3. Kemik iliğinde stromal değişikliklerin klinik parametrelerle ilişkisi	62
4.7.Sağ kalım ve prognoz faktörleri	62
4.8.MDS/MPN-U grubu: Klinik, morfolojik özellikler ve prognoz faktörleri	69
4.9.Sanger dizi analizi ile ASXL1 mutasyonları, immunohistokimyasal yöntemle protein ekspresyonu tayini ve klinikomorfolojik parametrelerle ilişkileri	70
4.9.1. Sanger dizi analizi ile ASXL1 geninde mutasyon tayini	70
4.9.2. İmmunohistokimyasal yöntemle ASXL1 protein ekspresyonunun değerlendirilmesi	71
4.9.3. ASXL1 mutasyonları ve protein ekspresyonunun klinikomorfolojik parametrelerle ilişkisi	74
4.9.3.1.Sanger dizi analizinde saptanan frameshift mutasyonların klinikomorfolojik parametrelerle ilişkisi	74
4.9.3.2.Sanger dizi analizinde saptanan frameshift ve missense mutasyonların klinikomorfolojik parametrelerle ilişkisi	74
4.9.3.3.ASXL1 protein ekspresyonunun klinikomorfolojik parametrelerle ilişkisi	75
4.9.4. Dizi analizi ve protein ekspresyonu sonuçlarının karşılaştırılması	76
4.9.5. ASXL1 mutasyonları ve protein ekspresyonunun prognozla ilişkisi	76
5. TARTIŞMA	80
6. SONUÇLAR	93
7. KAYNAKLAR.....	99

ÖNSÖZ

Zorlu tez sürecinde bana tecrübesi ve engin bilgi birikimiyle yol gösteren, tatlı-sert mizacıyla beni seven ve eğiten, izinde ilerleme gayreti içinde olduğum, değerli danışman hocam, Prof. Dr. Nükhet Tüzüner Tuncay'a,

Patoloji eğitimim süresince bilgi birikimleri ve tecrübelerini aktaran, iyi bir patolog olacağıma dair bana güven aşılayan, inanan ve her an yanımda olduklarını bildiğim, başta Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Sibel Erdamar Çetin olmak üzere tüm hocalarım ve uzmanlarıma,

Moleküler Patoloji Laboratuvarı'mızda, bana dizi analizini öğreten, yardımını esirgemeyen, moleküler biyolog Canan Ünlü Özkurt ve biyolog M. Barış Bir'e...

Hasarlı DNA'ların tespiti ve tezin yönünü değiştirerek devam etmemde bana yardımları olan, Adli Tıp Kurumu Biyoloji İhtisas Dairesi'nden Uzm. Dr. Ömer A. H. Müslümanoğlu, Uz. T. Bio. Aybars Türker, biyolog Fatih Akyüz, laborant Nurullah Kara, İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'ndan Prof. Dr. Fatma Savran Oğuz, Doç. Dr. Çiğdem Kekik Çınar, Araş. gör. Dr. Hayriye Şentürk Çiftçi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'ndan Prof. Dr. Nur Buyru, Araş. gör. MSc. Seda Ekizoğlu'na,

Laboratuvar işlerinde her an yardımına koşan Ayşe Seymen, Banu Tata ve tez bloklarımı kesen Kübra Kadakal'a,

Cerrahpaşa Patoloji ailesine girdiğim ilk günden itibaren, gece-gündüz, haftasonu-tatil demeden, omuz omuza çalıştığım tüm asistan arkadaşlarıma,

Beni aydın, idealist ve özgür yetiştiren, potansiyelime inanan ve eğitimim uğruna 11 yaşımdan beri ayrılığı bile göze alan, sevgi ve desteklerini hiç esirgemeyen babam Ecz. Erdoğan Vurallı, annem emekli Cumhuriyet Savcısı Sevinç Vurallı, benimle aynı yaşam çizgisinde yürüyen canım ablam Uzm. Dr. Doğu Vurallı Karaoğlu ve kardeşim Uzm. Dr. Doğa Vurallı'ya,

Ve... Sonsuz sabır, anlayış ve destekleriyle, teknik, psikolojik ve finansal zorluklarla defalarca sındığım, kendi azmimi keşfetmemi sağlayan bu zorlu süreçte, bana pes etmeden yoluma devam etme gücü veren iki meleğe; yaşantımın son 10 yılında her an yanımda olan, desteğini ve yüreğinin sıcaklığını her daim hissettiğim, yolumdan sapmadan, yaşamın tüm zorluklarına göğüs germemi sağlayan, yaşam ortağım, en iyi dostum, sevgili eşim Doç. Dr. Hüseyin Bakkaloğlu ve son 3 yılımı aydınlatan, anlamım, yaşam enerjim, mutluluk kaynağım, tatlı kızım Ayşe Derin Bakkaloğlu'na,

Saygı, sevgi ve içten teşekkürü borç bilirim.

Barış, dostluk, doğruluk ve dürüstlüğün egemen olduğu, çocukların güldüğü, daha iyi, özgür ve mutlu yarınlar dileğiyle...

Dr. Doğu VURALLI BAKKALOĞLU

Mayıs 2016

KISALTMALAR

aCGH: Karşılaştırmalı genomik hibridizasyon

ACP: Asit fosfataz

AIDS: Edinsel bağışıklık eksikliği sendromu

AKİT: Allojeneik kemik iliği transplantasyonu

aKML: Atipik kronik myeloid lösemi

AML: Akut myeloid lösemi

ASX: Drosophila- Additional sex combs

ASXL1: Additional sex combs-like 1

CBL: Casitas B-lineage lenfoma geni

CEBPA α : CCAAT/enhancer binding protein α geni

dH₂O: Distile su

DNA: Deoksiribonükleik asit

DNMT3 α/β : DNA metiltransferaz 3 α/β geni

dNTP: Deoksiribonükleotid 3 fosfat

DSÖ: Dünya Sağlık Örgütü

EGF: Endotelyal büyüme faktörü

ET: Esansiyel Trombositemi

EpoR: Eritropoietin reseptörü

ESH: Eritrosit sedimentasyon hızı

EZH2: Enhancer of zeste homolog 2 geni

FGF: Fibroblast büyüme faktörü

FGFR1: Fibroblast büyüme faktörü reseptörü 1

FLT3: Fms-ilişkili tirozin kinaz 3 geni

FS: Frameshift (çerçeve kayması) mutasyon

G-CSFR: Granülosit stimule edici faktör

Hb: Hemoglobin

H&E: Hematoksilen-eozin

HIV: İnsan bağışıklık yetmezlik virüsü

HM: Hepatomegali

H3K27me3: H3 lizin 27 metiltransferaz

IDH1/2: İzositrat dehidrogenaz 1/2

İHK: İmmunohistokimya

JAK2: Janus kinaz 2

JMML: Juvenil myelomonositik lösemi

KRAS: Kirsten rat sarkom viral onkogen homolog geni

KML: Kronik myeloid lösemi

KMML: Kronik myelomonositik lösemi

LAP: Lökosit alkalen fosfataz

LDH: Laktat dehidrogenaz

MCV: Ortalama eritrosit hacmi

MDS: Myelodisplastik Sendrom

MDS-F: Fibrozisle birlikte Myelodisplastik Sendrom

MDS/MPN: Myelodisplastik/Myeloproliferatif Neoplaziler

MDS/MPN-U: Sınıflandırılmayan Myelodisplastik/Myeloproliferatif Neoplazi

MDS-U: Sınıflandırılmayan Myelodisplastik Sendrom

MgCl₂: Magnezyum klorür

MPL: Trombopoietin reseptörü

MPN: Myeloproliferatif Neoplaziler

MS: Missense (yanlış anlamalı) mutasyon

NPM1: Nükleofosmin 1 geni

NRAS: Nöroblastom RAS viral (v-ras) onkogen homolog geni

NS: Nonsense (anlamsız) mutasyon

NSE: Nonspesifik esteraz

PAS: Periodik asit-Schiff

PcG: Polycomb grup gen ailesi

PDGF: Trombosit kaynaklı büyüme faktörü

PDGFR α/β : Trombosit kaynaklı büyüme faktörü reseptörü α/β

Plt: Trombosit sayısı

PMF-SF: Primer Myelofibroz, selüler faz

Post-ET-MF: Esansiyel Trombositemi sonrası myelofibroz

Post-PV-MF: Polisitemia Vera sonrası myelofibroz

PRC2: Polycomb represif kompleks 2

PV: Polisitemia Vera

PZR: Polimeraz zincir reaksiyonu

RAEB 1/2: Blast artışlı refrakter anemi 1/2

RARS: Ring sideroblastlı refrakter anemi

RARS-T: Trombositozla birlikte Ring Sideroblastlı Refrakter Anemi

RCMD: Çoğul Displazi ile birlikte Refrakter Sitopeni

RCUD: Tek Dizide Displazi ile birlikte Refrakter Sitopeni

RNA: Ribonükleik asit

RUNX1: Runt-ilişkili transkripsiyon faktör 1 geni

SETBP1: SET binding protein 1 geni

SF3B1: Splicing factor 3B subunit 1 geni

SM: Splenomegali

SNP: Tek nükleotid polimorfizmi

TDBK: Total demir bağlama kapasitesi

TET2: Ten-eleven translokasyon 2 geni

TGF- β : Dönüştürücü büyüme faktörü- β

TpoR: Trombopoietin reseptörü

TxG: Trithorax grup gen ailesi

VEGF: Vasküler endoteyal büyüme faktörü

WBC: Lökosit sayısı

3'UTR: Genin 3' ucundaki kodlama yapmayan bölge

TABLO LİSTESİ

SAYFA NO:

TABLO 2.1: Manoharan ve Avrupa konsensus fibrozis derecelendirme sınıflamaları	8
TABLO 2.2: MDS, MPN ve MDS/MPN: Temel özellikler	9
TABLO 2.3: MDS/MPN; DSÖ tanı kriterleri	12
TABLO 2.4: MDS; DSÖ tanı kriterleri.....	18
TABLO 2.5: Displazi kriterleri	19
TABLO 2.6: PMF; DSÖ tanı kriterleri	22
TABLO 3.1: Hemogram eşik değerleri.....	29
TABLO 3.2: Kan biyokimyası eşik değerleri	29
TABLO 3.3: Eritroid, myeloid displazi ve megakaryositlerde displastik ve proliferatif değişiklik kriterleri (aspirasyon ve biyopsi).....	31
TABLO 3.4: Kullanılan primer çiftleri.	38
TABLO 3.5: PZR karışımı.	40
TABLO 3.6: PZR koşulları.	40
TABLO 4.1: Klinik özellikler.	47
TABLO 4.2: Sitogenetik anomalilerin tanı gruplarına göre dağılımı	47
TABLO 4.3: Morfolojik özellikler (aspirasyon ve biyopsi).....	52
TABLO 4.4: Olguların fibrozis derecelendirmesi	53
TABLO 4.5: Fibrozis sınıflamalarının klinik parametrelerle karşılaştırması.	54
TABLO 4.6: Fibrozis sınıflamalarının morfolojik parametrelerle karşılaştırması.....	55
TABLO 4.7: Stromal değişiklikler.....	57

TABLO 4.8: Takip süresi içinde blast oranında artış izlenen olgularda tanı biyopsilerinde blast oranları (%) dağılımı.....	59
TABLO 4.9: Tanı gruplarına göre başlangıç blast oranları, blast artışı, lösemik dönüşüm ve sağ kalım süreleri	59
TABLO 4.10: Tüm hastalar: Klinik parametrelerin medyan yaşam süresine etkileri.....	63
TABLO 4.11: Tüm hastalar: Morfolojik parametrelerin medyan yaşam süresine etkileri.	64
TABLO 4.12: Tüm hastalar: Çok değişkenli analizde bağımsız prognoz faktörleri.....	66
TABLO 4.13: Displastik özellik gösteren hastalıklar ve PMF-SF'da klinik parametreler ve sağ kalım üzerine etkileri.	67
TABLO 4.14: Displastik özellik gösteren hastalıklar ve PMF-SF'da morfolojik parametreler ve sağ kalım üzerine etkileri.....	68
TABLO 4.15 Fibrozisin eşlik ettiği MDS ve MDS/MPN: Çok değişkenli analizde bağımsız prognoz faktörleri.	69
TABLO 4.16: MDS/MPN-U: Çok değişkenli analizde bağımsız prognoz faktörleri.	70
TABLO 4.17: ASXL1 geninin 12. ekzonunda ve 3' UTR bölgesinde gözlenen genetik değişiklikler	72
TABLO 4.18: Birden çok genetik değişiklik görülen olguların tanı grupları, blast artışı ve lösemik dönüşümüne göre dağılımı.	73
TABLO 4.19: Frameshift ve frameshift+missense mutasyonların takip sırasında blast artışı ve lösemik dönüşüm ile ilişkisi.....	75
TABLO 4.20: Dizi analizi ve immunohistokimyasal ASXL1 protein ekspresyonu.	76
TABLO 4.21: ASXL1 mutasyonları ve ASXL1 protein ekspresyonunun sağ kalımla ilişkisi.. ..	77
TABLO 4.22: İHK-ASXL1 ekspresyonunun klinik ve morfolojik parametrelere göre sağ kalımla ilişkisi.	78

ŞEKİL LİSTESİ

SAYFA NO:

ŞEKİL 4.1: Tanı gruplarına blast oranlarının (%) dağılımı (aspirasyon ve biyopsiler).....	51
ŞEKİL 4.2: Tanı gruplarına göre Manoharan ve Avrupa fibrozis derecelendirme sınıflamalarının karşılaştırması	56
ŞEKİL 4.3: Megakaryosit morfolojisi ile takip süresi içinde blast artışı, lösemik dönüşüm ve sağ kalım arasındaki ilişki	60
ŞEKİL 4.4: Kan değerleri ve megakaryosit morfolojisi	61
ŞEKİL 4.5: a) Tanı grupları, b) megakaryosit morfolojisi, c) plazma hücre artışı ve d) lenfoid nodül varlığının sağ kalım üzerine etkileri	65
ŞEKİL 4.6: : Manoharan sınıflamasına göre yaşam eğrileri; a) 3 farklı fibrozis grade'ine göre, b) orta (Grade 2) ve ağır (Grade 3-4) fibrozise göre	65
ŞEKİL 4.7: İHK-ASXL1 protein ekspresyonu ve sağ kalım.	79

RESİM LİSTESİ

SAYFA NO:

- RESİM 3.1:** **A)** Myeloid hiperplazi (X400), **B)** Eritroid hiperplazi (X400), Megakaryositlerde; **C)** hafif artma (X200), **D)** fokal belirgin artma (X200), **E)** yaygın belirgin artma (X200), **F)** CD61 ile megakaryositlerde yaygın artma (X1000)..... 32
- RESİM 3.2:** Biyopside; **A)** dağınık paternde CD34+ hücreler; $<5\%$ (X1000), **B)** küçük küme ve dağınık paternde CD34+ hücreler, $\geq 5\% - < 10\%$ (X1000), **C)** küme ve yaygın dağınık paternde CD34+ hücreler, $\geq 10\% - < 15\%$ (X400), **D)** büyük küme ve yaygın dağınık paternde CD34+ hücreler, $\geq 15\% - < 20\%$ (X1000)..... 33
- RESİM 3.3:** Megakaryositlerde; **A)** Displastik morfoloji (X400), **B)** Proliferatif morfoloji (X400), **C)** Displastik+proliferatif morfoloji (x400)..... 33
- RESİM 3.4:** Megakaryositlerde; **A)** Sıkı kümeleşme (x400), **B)** Gevşek kümeleşme (x400), **C)** Sıkı+gevşek kümeleşme (x400) 34
- RESİM 3.5:** **A)** Megakaryositlerde aberan CD34 ekspresyonu (X1000), **B)** İnterstisyel lenfoid nodül (x400)..... 34
- RESİM 3.6:** Manoharan (M) ve Avrupa (A) sınıflamalarına göre; **A)** M: Grade 1, A: Grade 1 (X400), **B)** M: Grade 2, A: Grade 2 (X400), **C)** M: Grade 3, A: Grade 2 (X400), **D)** M: Grade 4, A: Grade 3 (X400) fibrozis 35
- RESİM 3.7:** **A)** CD34 ile belirgin anjiogenez artışı (X400), **B)** Sinuzal hematopoez (X400). 35
- RESİM 3.8:** PZR ürünlerinin UV ışık altında jel görüntüsü 39
- RESİM 3.9:** İlk kez çalışmamızda saptanan frameshift (çerçeve kayması) mutasyonlar; **A)**c.2015_2019del(p.C672SfsX3),**B)**c.2604_2604delT(p.G869VfsX7)..... 42

ÖZET

FİBROZİSİN EŞLİK ETTİĞİ MYELODİSPLASTİK/MYELOPROLİFERATİF NEOPLAZİLER, FİBROZİSİN EŞLİK ETTİĞİ MYELODİSPLASTİK SENDROM VE PRİMER MYELOFİBROZ OLGULARINDA ASXL1 MUTASYONLARI VE PROGNOZA ETKİSİ

AMAÇ:

Çalışmamızda, fibrozisin eşlik ettiği myelodisplastik/myeloproliferatif neoplaziler (MDS/MPN), myelodisplastik sendrom (MDS) ve primer myelofibrosis-selüler faz (PMF-SF) gibi myeloid kök hücre hastalıklarında, morfolojik ayırıcı tanı özelliklerinin belirlenmesi ve bu hastalıklarda sık görülen ASXL1 mutasyonları ve protein ekspresyonunun prognoza etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

MATERYAL-YÖNTEM:

2008-2013 yılları arasında Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda tanı alan, fibrozisin eşlik ettiği, erişkin MDS/MPN, MDS ve PMF-SF hastaları taranarak 84 ardışık hastaya ait tüm kemik iliği aspirasyon ve biyopsileri çalışma kapsamına alınmıştır. Hastalar, klinik, morfolojik parametreler, ASXL1 mutasyonu ve protein ekspresyonu açısından incelenmiş, bu parametrelerin birbirleriyle ve sağ kalımla ilişkisi araştırılmıştır.

ASXL1 mutasyonlarına Sanger dizileme, protein ekspresyonuna immunohistokimya (İHK) yöntemleriyle bakılmış, sonuçlar karşılaştırılmıştır.

BULGULAR:

MDS ve MDS/MPN hastalarında, düşük hemoglobin, yüksek/düşük ferritin düzeyleri, kemik iliğinde çoğul displazi (≥ 2 dizi), displastik megakaryosit morfolojisi, yüksek blast oranları ($\geq 5\%$, özellikle $\geq 15\%$ - $< 20\%$), interstisyel plazma hücre artışı ve lenfoid nodül sağ kalımı kısaltmaktadır.

ASXL1 mutasyonları ve protein ekspresyonu, sağ kalımı kısaltmakla birlikte, erkek cinsiyet, lökositoz, anemi, yüksek blast oranları, yüksek ferritin ve $\beta 2$ mikroglobulin

düzeyleri, çoğul displazi, interstisyel plazma hücre artışı, takip sırasında blast oranında artma ve lösemik dönüşüm ile ilişkilidir, ancak fibrozisle arasında ilişki gösterilememiştir.

Bu çalışmada, literatürde ilk kez uygulanan yöntemler ve yeni saptanan bulgular elde edilmiştir. Bunlar; DNA'nın kazıma yöntemiyle kemik iliği aspirasyonlarından elde edilmesi, bu sayede, hastalığın değişik evrelerinde mutasyon varlığının araştırılması, ASXL1 mutasyonlarına dizileme yöntemiyle bakılması yanısıra ASXL1 protein ekspresyonuna da bakılıp birbirleriyle karşılaştırılması, morfolojik parametrelerle ilişkisinin araştırılması ve dizilemede yeni 2 frameshift, 6 missense, 1 sessiz mutasyon ile 3' UTR'de daha önce tanımlanmamış 2 genetik değişikliğin gösterilmesidir.

SONUÇ:

İmmunohistokimya; skor 2/3 İHK-ASXL1 protein ekspresyonu, Sanger dizileme yöntemiyle saptanan frameshift mutasyonlarla tam örtüştüğünden, dizileme yapılacak hastaların seçilmesinde, ucuz ve güvenilir bir yöntem olarak kullanılabilir.

Anahtar kelimeler: Myelodisplastik/Myeloproliferatif Neoplaziler, Myelodisplastik Sendrom, Primer Myelofibroz, Kemik iliği Fibrozisi, ASXL1 mutasyonları, ASXL1 protein ekspresyonu, megakaryosit morfolojisi, displazi, blast oranı, lösemik dönüşüm, sağ kalım.

ABSTRACT

THE INCIDENCE AND PROGNOSTIC IMPACT OF ASXL1 MUTATIONS IN MYELOYDYSPLASTIC SYNDROME& MYELOYDYSPLASTIC/MYELOPROLIFERATIVE NEOPLASIAS WITH CONCURRENT FIBROSIS AND PRIMARY MYELOFIBROSIS

OBJECTIVE:

The aim of the study is to identify the morphological criteria for the differential diagnosis of myeloid stem cell diseases such as myelodysplastic/myeloproliferative neoplasias (MDS/MPN) and myelodysplastic syndrome (MDS) with concurrent fibrosis and primary myelofibrosis-cellular phase (PMF-SF) and to determine the incidence and prognostic impact of ASXL1 mutations and protein expression in these patients.

PATIENTS, MATERIALS AND METHODS:

The bone marrow aspirations and biopsies of 84 consecutive adult patients diagnosed as MDS-F, MDS/MPN-F and PMF-SF at Cerrahpaşa Faculty of Medicine, Pathology Department between the years 2008-2013 were included in the study. Patients were evaluated according to clinical, morphological parameters, presence of ASXL1 mutations and protein expression. Correlations between these parameters and their prognostic value were investigated.

Patients were examined for ASXL1 mutations by Sanger sequencing and protein expression by immunohistochemistry (IHC) and the results were compared.

RESULTS:

In MDS-F and MDS/MPN-F patients, low hemoglobin, high blast count ($\geq 5\%$, especially $\geq 15\%$ - $<20\%$), high/low ferritin levels, bone marrow dysplasia in ≥ 2 myeloid lineages, dysplastic megakaryocyte morphology, increase in stromal plasma cells and lymphoid nodules were associated with shorter overall survival (OS).

ASXL1 mutations and protein expression shorten the OS and were significantly associated with male gender, leukocytosis, anemia, high blast count, high ferritin and $\beta 2$

microglobulin levels, dysplasia in ≥ 2 lineages, increase in stromal plasma cells, blast count raise during follow-ups and leukemic transformation, but not associated with bone marrow fibrosis.

In this study, novel findings were obtained and new methods were used for the first time in literature. These are; extracting DNA by scraping off the bone marrow aspiration slides in order to detect mutations in the course of the disease, searching for ASXL1 protein expression by IHC together with mutation analysis by Sanger sequencing, comparing these two methods, investigating the associations between mutational status/protein expression and the morphological parameters, also indicating 2 frameshift, 6 missense, 1 silent novel mutations and 2 unannotated genetic alterations in 3'UTR.

CONCLUSION:

IHC could be performed as a cheap and reliable method to select the suitable cases for sequencing, since score 2/3 IHC-ASXL1 protein expression is 100% concordant with frameshift mutations in sequencing.

Key words: Myelodysplastic Syndrome, Myelodysplastic/myeloproliferative Neoplasias, Primary Myelofibrosis, Bone Marrow Fibrosis, ASXL1 mutations, megakaryocyte morphology, dysplasia, blast count, leukemic transformation, overall survival.

1. AMAÇ:

Myelodisplastik/myeloproliferatif neoplaziler (MDS/MPN), myelodisplastik sendrom (MDS) ve myeloproliferatif neoplaziler (MPN), klinik, morfolojik ve genetik olarak birbirleriyle örtüşen, myeloid kök hücreden köken alan klonal hematopoietik kök hücre neoplazileridir. Bu tablolara kemik iliğinde orta/ağır düzeyde fibrozisin eklenmesi ile ayırıcı tanı daha da güçleşmektedir.

Çalışmamızda, orta/ağır düzeyde fibrozisin eşlik ettiği MDS/MPN grubu hastalıklar (kronik myelomonositer lösemi (KMML), sınıflandırılmayan MDS/MPN (MDS/MPN-U), atipik kronik myeloid lösemi, BCR-ABL1 (-) (aKML), trombositozla birlikte ring sideroblastlı refrakter anemi (RARS-T)), fibrozisle birlikte MDS (MDS-F) ve fibrozisin hafif/orta düzeyde olduğu ve MPN grubu hastalıklar içinde yer alan primer myelofibrozelüler faz (PMF-SF) olguları seçildi. Tanı ve günümüze kadar yapılan tüm kemik iliği biyopsileri yeniden incelenerek, hastalık seyri, takip sırasında blast artışı, lösemik dönüşüm ve sağ kalım gibi prognostik parametreler, klinik, morfolojik ve genetik özellikleri değerlendirilerek tanı grupları arasında karşılaştırıldı.

Son yıllarda, myeloid kök hücre hastalıklarında tanımlanan gen mutasyonları içinde ASXL1 mutasyonları, prognozla muhtemel ilişkisi ve sık görülmesi nedeniyle bir adım öne çıkmaktadır. Çalışmamızda, ASXL1 gen mutasyonları, altın standart olan Sanger dizileme yöntemiyle araştırılmış, bunun yanı sıra ASXL1 protein ekspresyonuna çok daha ucuz ve kolay uygulanabilir bir yöntem olan immunohistokimya ile bakılmıştır. İki yöntem hem birbiri ile karşılaştırılmış, hem de prognoz faktörleri ile ilişkileri araştırılmıştır.

Literatürde, ASXL1 mutasyonlarının, klinik ve prognostik parametrelerle karşılaştırıldığı çalışmalar olmasına karşın, çalışmamız, mutasyon durumunu protein ekspresyonu ile karşılaştıran ve fibrozisin eşlik ettiği myeloid kök hücre hastalıklarında ASXL1 mutasyonunu morfolojik parametrelerle ilişkisini inceleyen ilk çalışmadır.

2. GENEL BİLGİLER:

2.1. KEMİK İLİĞİ FİBROZİSİ:

Birçok benign ve malign hastalık, kemik iliği stromasında normalde var olan liflerde artışa neden olabilir. Çoğunlukla retikülin liflerde görülen bu artışa bazı durumlarda tip I ve tip III kollajen lifler de eşlik eder (1). Mevcut çalışmalar, kollajen lif artışının, altta yatan hastalık, anormal kan değerleri ve kötü prognozla kuvvetli ilişkisi olduğu halde retikülin lif artışının etkisi olmadığı yönündedir (1-5). Retikülin fibrozis, zeminde yatan hastalığa yönelik tedavilerle geri dönüşlü seyir izler. Kollajen fibrozis, allojeneik kemik iliği transplantasyonu (AKİT) veya kortikosteroid gibi tedavilerle nadiren geriler (6-11).

Kemik iliği mikroçevresi, makrofaj, fibroblast, adiposit, endotel hücresi, lenfosit, plazma ve mast hücresi gibi hücresel bileşenler, retikülin, kollajen, laminin, fibronektin gibi yapısal lifler ve glikozaminoglikan, glikoprotein, su ve tuzlar gibi hücre dışı matriksten oluşmaktadır (12-17). Bu bileşenler, bir yandan hematopoietik progenitor hücreler için fiziki destek sağlarken bir yandan da hematopoietik hücreler için gerekli humoral faktörleri oluşturarak hematopoezin sürekliliğini sağlarlar (18-21).

Kemik iliği fibrozisi görülen çoğu hastalıkta, megakaryosit ve trombosit sayı veya işleviyle ilgili anormallik saptanmıştır. Megakaryosit ve trombositlerden salınan sitokinlerin fibrozis gelişimi için gerekli olduğu ancak tek başına yeterli olmadığı bilinmektedir (22). Trombosit kaynaklı büyüme faktörünün (PDGF), kemik iliği fibrozisini başlatan fibroblast artışını uyardığı ancak retikülin veya kollajen yapımında sınırlı etkisi olduğu anlaşılmıştır (23-26). Daha sonraları, megakaryosit ve trombositlerde bulunan, dönüştürücü büyüme faktörü- β 'nın (TGF- β) asidik mikroçevre ve proteazlar tarafından aktive edilerek kollajen sentezinde etkili olduğu ortaya çıkmıştır (27-35). Bugün için geçerli olan, megakaryosit, trombosit, monosit ve lenfositlerden salınan birçok sitokin, kemokin ve hücre dışı matrikste bulunan matriks metalloproteinazları gibi proteazların fibrozis sürecinde etkili olduğudur. Aktive olan fibroblast ve fibrositler, sitokin, büyüme faktörü ve kemokinler üreterek inflamasyonun devamlılığını sağlar ve fibrotik sürece katkıda bulunurlar (26, 30, 36-38). Kemik iliğinde fibrozis ile birlikte, sinuzoidler çevresi ve intrasinuzoidal yerleşimli megakaryositler, PDGF ve TGF- β dışında vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), endotelial büyüme faktörü (EGF), fibroblast büyüme faktörü (FGF) salgılayarak endotelial hücrelerle sitokin aracılı tepkimelere girerek fibrozisin yanı sıra neo-anjiogeneze de yol açarlar (36).

Kollajen fibrozis, hematoksilin-eozin boyasıyla da ayırd edilebilmesine karşın kollajen lifler Masson trikrom histokimyasal boyasıyla daha net seçilmektedir. Retikülin fibrozis ise gümüşleme tekniği ile Gomori boyasıyla ayırd edilir. Retiküler liflerdeki bol miktarda bulunan heksoz şekerlerin gümüşü tutması için önce potasyum permanganat, ardından ferrik amonyum nitrat ile muamele edilir. Gümüş diamin eklendikten sonra retiküler liflerdeki gümüş birikimlerinin görünür hale gelmesi için formaldehid eklenir ve zemin boyası için nötral kırmızı ya da eozin kullanılır (39). Böylece, retiküler lifleri siyah, zemindeki diğer kemik iliği elemanları kırmızı görülür.

Fibrozis derecelendirmesinin objektif ve standardize olması adına geçmişten bugüne ilk kez 1964'te Kundel, 1969'da Roberts ve 1971 yılında Bauermeister kendi sınıflamalarını yayınlamışlardır. Ancak fibrozis derecelendirme sınıflamalarının yaygın kullanımı, 1979'da Manoharan'ın yaptığı (modifiye Bauermeister) fibrozis sınıflamasıyla başlamıştır. Thiele, 2005 yılında sınıflamayı 4 kategoriye sınırlayarak şu an kemik iliği fibrozis sınıflaması için Avrupa konsensusunda da kabul edilen halini vermiştir (5).

Manoharan ve Avrupa konsensus fibrozis derecelendirme sınıflamaları **Tablo 2.1**'de özetlenmiştir. Normal kemik iliğinde de perivasküler ve peritrabeküler alanlarda retikülin liflerde artış ve yoğunlaşma görülür. Bu nedenle, fibrozis derecelendirmesi yapılırken hematopoietik hücrelerin yer aldığı alanlar lif yoğunluğu için değerlendirilmelidir (5).

Kemik iliğinde retikülin ve kollajen fibrozis; primer myelofibroz (PMF) başta olmak üzere diğer myeloid kök hücre hastalıkları, akut lösemi, multipl myelom, kemik iliğine yayılan Hodgkin ve non-Hodgkin lenfoma gibi hematolojik maligniteler, metastatik karsinom, sistemik lupus eritematozus, sistemik skleroz, Sjögren hastalığı gibi otoimmün hastalıklar, tüberküloz ve diğer granümatöz hastalıklar, osteopetrozis, primer ve sekonder hiperparatiroidizm, osteomalazi, D vitamini eksikliği gibi hastalıklarda görülür. Bu hastalıklarda kemik iliği fibrozisi yaygındır. Osteomyelit, Paget hastalığı, kemik iliği nekrozu, radyoterapi, kırık iyileşmesi ya da kemik iliği biyopsi lojunda ise fibrozis lokalizedir. Tüylü hücreli lösemi, HIV enfeksiyonu, pulmoner hipertansiyon, viseral leishmaniyazis, hematopoietik büyüme faktörleriyle tedavi sonucu kemik iliğinde retiküler lif artışı görülürken kollajen liflerde artış görülmez (1, 4, 22, 40-44).

Primer myelofibroz olgularında yapılan çalışmalarda fibrozis artışının kötü prognostik faktör olduğu gösterilmiştir (45, 46). Myelodisplastik sendrom olgularında orta-ağır derecede kemik iliği fibrozisinin gerek sağ kalım gerekse akut myeloid lösemi (AML) dönüşümü

üzerinde kötü etkisi olduğu, hafif derecedeki fibrozisin ise sağ kalımı etkilemediği bildirilmektedir (47-52).

TABLO 2.1: Manoharan ve Avrupa konsensus fibrozis derecelendirme sınıflamaları

	GRADE	TANIM
MANOHARAN FİBROZİS DERECELENDİRME SINIFLAMASI	0	Perivasküler veya benign lenfoid folikül ilişkili ağ oluşturan ya da yer yer tek tük ince lifler
	1	Kesitin çoğunda ağ oluşturan, ince lifler, yer yer tek tük kalın lifler, damarlardan ve benign lenfoid foliküllerden uzak fokal retikülün lif artışı
	2	Difüz ağ oluşturan lif artışı ve aralara dağılmış kalın lifler.
	3	Difüz genellikle kalın liflerden oluşan retikülün ağı, Masson Trikrom boyasıyla kollajene rastlanmaz.
	4	Difüz kalın lif ağı ve Masson Trikrom boyasıyla kollajen varlığı.
AVRUPA KONSENSUS FİBROZİS DERECELENDİRME SINIFLAMASI	0	Dağınık, birbirleriyle kesişmeyen, çizgisel retikülün lifler
	1	Özellikle perivasküler alanlarda birbirleriyle kesişen gevşek ağ oluşturan retikülün lifler
	2	Birbirleriyle çoğu alanda kesişen ve ağ oluşturan, difüz ve yoğun retikülün lif artışı, yalnızca fokal kollajen lif demetleri
	3	Birbirleriyle çoğu alanda kesişen ve ağ oluşturan, difüz ve yoğun retikülün lif artışı, sıklıkla belirgin osteoskleroz ile ilişkili kalın kollajen lif demetleri

2.2. MYELOİD KÖK HÜCRE HASTALIKLARI:

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) sınıflamasında “myeloid” terimi, granülositik (nötrofil, eozinofil, bazofil), monositik/makrofaj, eritroid, megakaryositik diziler ile mast hücre dizisinin tümünü kapsar.

DSÖ, myeloid maligniteleri morfoloji, immunfenotip, klinik ve genetik özelliklerini göz önüne alarak 5 ana gruba ayırmıştır. Bunlar; 1) Myelodisplastik Sendrom (MDS); 2) Myeloproliferatif Neoplaziler (MPN); 3) Myelodisplastik/ Myeloproliferatif neoplaziler (MDS/MPN); 4) Eozinofili ve PDGFRA, PDGFRB ve FGFR1 anormalliklerinin eşlik ettiği myeloid ve lenfoid neoplaziler; ve 5) Akut Myeloid Lösemidir (AML) (53). Myeloid kök hücre hastalıklarından MDS, MPN ve MDS/MPN grubu hastalıkların temel özellikleri **Tablo 2.2**'de özetlenmiştir.

TABLO 2.2: MDS, MPN ve MDS/MPN: Temel özellikler

HASTALIK	HEMATOPOEZ	KAN SAYIMI	KEMİK İLİĞİ SELÜLERİTESİ	KEMİK İLİĞİ BLAST ORANI (%)	MATURASYON	MORFOLOJİ	ORGANOMEGALİ
MDS	İnefektif	Sitopeni (ler)	Genelde hiperselüler, ancak bazen hiposelüler	<%20	Mevcut	Bir veya daha çok myeloid dizide displazi	Sık değil
MPN	Efektif	Bir veya daha çok dizide artma	Genelde hiperselüler	<%10	Mevcut	Göreceli normal	Sık
MDS/MPN	Efektif/ inefektif	Değişken	Genelde hiperselüler	<%20	Mevcut	Bir veya daha çok myeloid dizide displazi	Sık

Bu hastalık gruplarının tanısında morfolojiyi temel alan geleneksel yaklaşım önemli olmakla birlikte yeterli değildir. DSÖ 2008 kriterlerine göre myeloid kök hücre hastalıklarının sınıflandırması ancak klinik, laboratuvar verileri, immunfenotip, morfoloji ve sitogenetik/moleküler testlerin birlikte değerlendirilmesi ile mümkündür.

Etyolojisi bilinmeyen bu grup hastalıkların patogeneğinde hücre proliferasyonu, olgunlaşması ve yaşamının sürdürülmesinde etkin olan myeloid yolakların düzenlenmesindeki bozuklukların etkili olduğu düşünülmektedir. Bu hastaların bir bölümünde metafaz sitogenetik çalışmalarla kromozomal anomaliler saptanmıştır.

Son dönemlerde yapılan moleküler çalışmalar, bazı genetik ve epigenetik değişiklikleri açığa çıkarmıştır. Bu çalışmalar, bir yandan hastalık patogeneğini anlamamıza ışık tutarken bir yandan da hedefe yönelik tedavi çalışmaları için aday genleri ortaya çıkarabilirler.

2.2.1. MYELODİSPLASTİK/ MYELOPROLİFERATİF NEOPLAZİLER (MDS/MPN):

Myelodisplastik/myeloproliferatif neoplaziler (MDS/MPN), tanı anında hem myelodisplastik hem de myeloproliferatif özellikleri eş zamanlı gösteren hibrid klonal hematopoietik malignitelerdir. Bir yandan myelodisplastik sendromdaki gibi inefektif hematopoeze bağlı periferik sitopeniler, bir veya daha çok myeloid dizide displazi ile sitogenetik anomaliler ve lösemik dönüşüm özelliklerini gösterirken bir yandan myeloproliferatif neoplazilerdeki gibi bir veya daha çok myeloid dizide proliferasyon, anormal hematopoietik hücre proliferasyonunun sekestrasyonuna bağlı organomegali

(splenomegali, hepatomegali) özelliklerini gösterirler. Blast oranları değişken olmakla birlikte daima <%20'dir.

DSÖ 2008 sınıflamasına göre myelodisplastik/myeloproliferatif neoplaziler (53);

- Kronik Myelomonositik Lösemi (KMML)
- Juvenil Myelomonositik Lösemi (JMML)
- Atipik Kronik Myeloid Lösemi, BCR-ABL1 negatif (aKML)
- Myelodisplastik/Myeloproliferatif Neoplazi-Sınıflandırılmayan (MDS/MPN-U) ve bu grup içinde yer alan Trombositozla birlikte Ring Sideroblastlı Refrakter Anemi (RARS-T)

Çalışmamız erişkin hastalar üzerine kurulduğundan çocukluk çağı hastalığı olan Juvenil Myelomonositik Lösemi (JMML) dahil edilmemiştir.

2.2.1.1. KRONİK MYELOMONOSİTİK LÖSEMİ (KMML):

KMML, kanda ve kemik iliğinde monosit proliferasyonu, sebebi açıklanamayan, inatçı monositoz, bir veya daha fazla dizide displazi ile ayırt edilen bir kronik lösemi tipidir (54). Tanı için ilk adımda mutlak monositoz ($>1000/\text{mm}^3$) saptanan ve blast oranı <%20 olan hastalar seçilmeli, BCR-ABL1 füzyonu ve PDGFRA ile PDGFRB genlerinde yeniden düzenlenmelerin olduğu olgular dışlanmalıdır. Morfolojik displaziler, sıklıkla anemi, nötropeni ve trombopeniye neden olan inefektif hematopoez ile ilişkilidir. Belirgin displastik özelliklerin olmadığı durumlarda, KMML tanısı için; açıklanamayan monositozun 3 aydan daha uzun süre devam etmesi veya MDS tipi klonal sitogenetik/moleküler anomalilerin saptanması gereklidir (54). **Tablo 2.3'**te MDS/MPN tanısı için DSÖ tanı kriterleri özetlenmiştir. Dalak, karaciğer, deri ve lenf düğümleri, kan ve kemik iliği dışında lösemik infiltrasyonun en sık görüldüğü organlardır (55-57).

2.2.1.1.1. Klinik:

Enfeksiyona yatkınlık, kanama ve halsizlik gibi ilik yetmezliğine bağlı bulgular sık görülür (58). Mutlak monositoz, hastalığın tanımlayıcı özelliği olmakla birlikte diğer diziler de etkilendiğinden kan tablosu değişkendir. Lökositoz, trombositoz gibi lökopeni, anemi veya trombopeni de görülebilir. Kilo kaybı, gece terlemeleri, ateş gibi hiperkatabolik semptomların yanı sıra, olguların %30-50'sinde splenomegaliye bağlı erken doygunluk hissi ve karın ağrısı izlenir (57). Bennett ve ark., KMML olgularını, lökosit sayısını $13.000/\text{mm}^3$ eşik değer olarak myelodisplastik ve myeloproliferatif olarak ikiye ayırmıştır (59). Bu konuda yapılan diğer çalışmalarda iki grup arasında, biyolojik özellikler, sağ kalım ve lösemik dönüşüm açısından

belirgin fark saptanmadığından DSÖ 2008 sınıflaması bu yönde bir ayırım yapmamıştır (57, 60-62).

2.2.1.1.2. □□□□□ Genetik değişiklikler:

KMML olgularının %20-%50'sinde anormal karyotip saptanır. En sık görülenler, trizomi 8, monozomi 7/del(7q) ve 12p anomalileri olmakla birlikte hiçbiri KMML'ye özgü değildir (54). Son dönemlerde, myeloid kök hücre hastalıklarında, bir dizi gen mutasyonu saptanmıştır. Bu mutasyonlar, hücrenin çoğalma, yaşam ve olgunlaşmasını etkileyen, translasyon ve transkripsiyonun genetik/epigenetik düzenlenmesi gibi temel işlevleri sağlayan sinyal yollarını yöneten genleri etkilemektedir. En sık görülen gen mutasyonları ASXL1 (*additional sex combs like 1*), TET2 (*ten eleven translocation 2*) ve SRSF2 (*serine/arginine-rich splicing factor 2*) olup görülme sıklıkları %30-60 arasındadır (63). Bunlar dışında, daha az sıklıkta EZH2 (*enhancer of zeste 2 polycomb repressive complex 2 subunit*), RUNX1 (*Runt-related transcription factor 1 gene*), DNMT3α (*DNA methyltransferase 3α*), NRAS (*neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog*), KRAS (*Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*), CBL (*Casitas B-lineage lymphoma gene*), IDH1 ve IDH2 (*Isocitrate dehydrogenase 1 ve 2*), FLT3 (*Fms-related tyrosine kinase 3*), NPM1 (*Nucleophosmin 1*), CEBPA (*CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), alpha*) mutasyonları da bildirilmiştir.

Bu genler içinde ASXL1'in lösemik transformasyon, EZH2'nin de kötü prognozla ilişkisi öne çıkmaktadır (64-68). NPM1, CEBPA ve WT1 mutasyonları çok nadir görülmesine karşın kötü klinik seyirle ilişkilidir (69, 70).

JAK2 V617F mutasyonu, myeloproliferatif özellikleri baskın KMML olgularında hastaların ~%10'unda görülmektedir (71-73).

2.2.1.1.3. □□□□□ Morfoloji:

Kemik iliği hiperselüler nadiren normo-hiposelülerdir (74). Myeloid:Eritroid oranı tipik olarak artmış olup myeloid ve monositik öncülerin baskın olduğu bir myelopoez vardır. Monositleri ayırt etmek zor olduğundan nonspesifik esteraz (NSE) sitokimyasal boyası fayda sağlayabilir. Granülopoezde sola kaymanın yanı sıra hipogranülasyon, psödo Pelger-Huët hücreleri ve nükleer anormallikler şeklinde displastik değişiklikler sıktır (59). Eritropoez normal veya azalmıştır. Eritroid dizide megaloblastoid değişiklikler, çekirdek ve sitoplazma olgunlaşma uyumsuzluğu, nükleer fragmantasyon, çekirdek zarında düzensizlik, multinükleer formlar, artmış ring sideroblastlar gibi displastik değişiklikler vardır. Megakaryositler sayıca artmış olup mono/hipolobe veya multipl çekirdek ya da mikromegakaryosit gibi displastik

formlardadır (75, 76). Orta-belirgin retikülin lif artışı olguların yaklaşık %20'sinde gözlenir (77).

Displastik hipogranüler myeloid öncüler ve immatür/atipik monositlerin morfolojik olarak benzerliği yüzünden kemik iliği aspirasyon sayımı oldukça güçtür. Blast ve eşdeğeri kabul edilen monoblast ve promonositlerin tanınması pratikte çok önemlidir. Zira, promonositlerin kötü prognoz ve akut lösemiye dönüşüm riskinde en güvenilir prognostik parametre olduğu kabul edilmektedir (61). Monoblastlar, büyük, hafif düzensiz sınırlı, yuvarlak-oval nükleuslu, dantelimsi kromatinli, bir veya daha çok belirgin nükleollü, ince granüllü ve az sayıda vakuol içeren orta-geniş bazofil sitoplazmalı büyük hücreler iken promonositler, düzensiz, hafif katlantılı nükleuslu, ince kromatinli, belirsiz nükleollü, ince granüllü ve az sayıda vakuol içeren orta-geniş sitoplazmalı hücrelerdir.

DSÖ 2001 ve 2008 sınıflamaları KMML'de iki alt tip ayırt eder:

KMML-1: Periferik kanda <%5, kemik iliğinde <%10 blast ve promonosit,

KMML-2: Periferik kanda $\geq$ %5-<%20, kemik iliğinde $\geq$ %10-<%20 arasında blast ve promonosit

Auer rod görülmesi blast sayısından bağımsız olarak KMML-2 tanısını kesinleştirir. KMML ve akut myelomonositik/monositik lösemi arasında eşik değer $\geq$ %20 blast+ promonosit görülmesidir (53).

TABLO 2.3: MDS/MPN; DSÖ tanı kriterleri

ERİŞKİN OLGULARDA MDS/MPN TANI KRİTERLERİ:		
Kronik Myelomonositik Lösemi (KMML)	Atipik Kronik Myeloid Lösemi (aKML)	Sınıflandırılmayan Myelodisplastik/myeloproliferatif Neoplazi (MDS/MPN-U)
1-Periferik kanda inatçı monositöz (1.000/mm ³ , monosit/lökosit >%10) 2- Philadelphia kromozomu/BCR-ABL1 (-) ve PDGFRA, PDGFRB, FGFR1 yeniden düzenlenmesi(-) 3-Kanda veya kemik iliğinde <%20 blast 4-Bir veya daha fazla myeloid dizide displazi -Displazi minimal/yoksa; diğer 4 kriter ve + Edinsel klonal sitogenetik/ moleküler anomali varlığı veya + En az 3 ay devam eden monositöz + Monositözün olası tüm nedenlerinin dışlanması	1-Belirgin displazi ve sola kayma gösteren nötrofili, lökositöz ($\geq$ 13.000/mm ³) 2-Philadelphia kromozomu/BCR-ABL1 (-) ve PDGFRA, PDGFRB, FGFR1 yeniden düzenlenmesi(-) 3-Nötrofil prekürsörler (promyelosit, myelosit, metamyelosit) lökositlerin $\geq$ %10'unu oluşturur. 4-Bazofili veya monositöz yokluğu (periferik kanda <%10 monosit, <%2 bazofil) 5-Granülositik proliferasyon ve displazi gösteren hiperplastik kemik iliği, eritroid ve megakaryositik dizilerde displazi eşlik edebilir. 6-Periferik kan ve kemik iliğinde <%20 blast varlığı	1-KMML ve aKML tanı kriterlerine uymayan ancak hem myelodisplastik hem de myeloproliferatif özellikler gösteren olgular 2-Daha önceden var olan myeloid neoplazi varlığının dışlanması 3-Büyüme faktörü veya sitotoksik ilaç kullanımının dışlanması *RARS-T: 1-Trombositöz varlığı ($\geq$ 450.000/mm ³) 2- $\geq$ %15 ring sideroblast varlığı 3-Kemik iliğinde büyük, atipik megakaryositlerin varlığı ve diseritropoez 4-BCR-ABL1 (-), izole kromozom 5 delesyonu ve kromozom 3 anomalileri yokluğu 5-Ring sideroblast artışına neden olan ilaç kullanımı ve durumların dışlanması

2.2.1.1.4. □□□□□□ **Ayırıcı tanı:**

Mutlak monositoz süresi bilinmeyen, sitogenetik anomali ve displazi izlenmeyen durumlarda KMML tanısı güçtür. Öncelikle, tüberküloz, sifiliz, subakut bakteriyel endokardit gibi enfeksiyonlar, romatoid artrit, sistemik lupus eritematozus, ülseratif kolit, poliarteritis nodosa gibi otoimmün hastalıklar, sarkoidoz, Hodgkin ve non-Hodgkin lenfoma ve karsinom gibi malign hastalıklar seyrinde görülebilen reaktif monositoz dışlanmalıdır (78). BCR-ABL1 negatif ve ağır fibrozis görülen olgular, periferik kanda mutlak monositozun izlendiği, KMML benzeri kemik iliği özellikleri gösteren, agresif gidişli PMF olgularından ayırt edilmelidir (79). Displazinin belirgin olduğu olgularda, MDS; özellikle RCMD ve RAEB alt tipleri ayırıcı tanıya alınmalı ve DSÖ kriterlerine göre ayırım yapılmalıdır. BCR-ABL1 negatif olan aKML olguları da KMML ile benzer özellikler gösterir, ancak periferik kandaki monosit oranı ve aKML olgularında daha ağır granülositik displazi varlığı tanıya götürür (78)

2.2.1.1.5. □□□□□□ **Prognoz:**

Sağ kalım oldukça değişken olup 1-100 ay arasında değişmektedir (54, 75, 80-81). Akut lösemiye dönüşüm farklı çalışmalarda %15-52 oranlarında bildirilmiştir (54, 77, 80). AML dönüşümü gösteren KMML olguları agresif seyirlidir (82). Çok değişkenli analizlerde, periferik kan ve kemik iliği blast oranı AML'ye dönüşüm ve sağ kalımı etkileyen bağımsız prognostik faktörlerdir. Lösemik dönüşüm, KMML-1 olgularında 5 yıllık takipte %18, KMML-2 olgularında ise %63'tür (61, 74, 77, 80, 83).

Risk değerlendirme sistemlerine göre kötü prognostik özellikler; erkek cinsiyet, düşük hemoglobin değeri (<10 g/dL), yüksek lökosit sayısı ($\geq 13.000/\text{mm}^3$), düşük trombosit sayısı ($<100.000/\text{mm}^3$), kemik iliği blast oranı ($\geq 10\%$), yüksek laktat dehidrogenaz (LDH) seviyeleri, trizomi 8, monozomi 7 ve kompleks kromozom anomalileridir (84, 85).

2.2.1.2. **ATİPİK KRONİK MYELOİD LÖSEMİ, BCR-ABL1 NEGATİF (aKML):**

Atipik KML, klinik ve morfolojik olarak BCR-ABL1 pozitif kronik myeloid lösemi ile benzer özellikler gösteren, ancak belirgin disgranülopoez ve BCR-ABL1 gen füzyonunun olmayışı ile ayrılan, bir veya daha çok myeloid dizide belirgin displazi ve granülositik proliferasyon ile tanımlanan myelodisplastik/myeloproliferatif özellikte, oldukça nadir görülen klonal myeloid kök hücre neoplazisidir. Atipik KML için tanı kriterleri **Tablo 2.3**'te özetlenmiştir.

2.2.1.2.1. □□□□□□ **Klinik:**

Hastalığın en belirgin özellikleri, sola kayma ve belirgin displazi gösteren nötrofilik lökositöze ($\geq 13.000/\text{mm}^3$) ile promyelosit, myelosit ve metamyelosit gibi myeloid öncülerin

tüm lökositlerin $\geq 10\%$ 'unu oluşturmaktadır (53). Anemi ve trombositopeni sıktır. Splenomegali, hepatomegali ve bunlara bağlı erken doygunluk hissi, karın ağrısı gibi semptomlar görülebilir. Atipik KML, benzer myeloproliferatif özelliklerine rağmen KML'ye göre agresif klinik seyir gösterir (86).

2.2.1.2.2. Genetik değişiklikler:

Atipik KML olgularının %80'inde 12, 13, 14, 17 ve 19. kromozomları tutan karyotipik anomaliler tanımlanmış olup en sıkları +8 ve del(20q)'dur (76, 87-89). İzole izokromozom 17q tanımlanan nadir olgular daha çok KMML tanı kriterlerine uymaktadır (90).

ASXL1, TET2, EZH2, NRAS ve KRAS mutasyonları %5-25 oranlarında bildirilmiştir (91, 92). SETBP1 (SET binding protein 1) mutasyonu, KMML olgularında yalnızca %4 oranında görülürken aKML olgularında %24 oranında izlenmektedir (93). JAK2 V617F mutasyonu ise KMML olgularında ~%10 saptanırken aKML olgularında genellikle görülmez (94).

2.2.1.2.3. Morfoloji:

Kemik iliği, nötrofil ve öncülerinin belirgin proliferasyonu nedeniyle hiperselülerdir. Myeloid:Eritroid oranı myeloid dizi lehine artmıştır. Disgranülopoez, en tipik özellik olup psödo Pelger-Huët hücreleri, nötrofillerde anormal kromatin kümeleşmesi, hipogranülasyon ve hipersegmentasyon şeklindedir (95-99). Nötrofillerde anormal kromatin kümeleşmesi, mikofenolat mofetil tedavisi, HIV enfeksiyonu ve bazı lenfoproliferatif hastalıklarda da görülebilir (100, 101).

Atipik KML, klonal myeloid kök hücre neoplazisi olduğundan eritroid ve megakaryositik dizilerde de displazi görülebilir. (88, 89). Blast oranı genelde %5 civarındadır. Kemik iliğinde retikülün lif artışı az sayıda olguda görülür. Lökosit alkalin fosfat (LAP) skoru, aKML olgularında düşük/normal/yüksek olabildiğinden tanıda yardımcı olmaz (76, 102).

2.2.1.2.4. Ayırıcı tanı:

Ayırıcı tanıda ilk dışlanması gereken KML ve kronik nötrofilik lösemidir. BCR-ABL1 füzyon geninin yokluğu ve belirgin disgranülopoez KML'den, monositoz görülen olgularda, lökositlerin $< 10\%$ 'unun monositlerden oluşması ve belirgin disgranülopoez varlığı KMML'den ayırt eder. Kronik nötrofilik lösemi ve sınıflandırılmayan MDS/MPN'den ayırımı ise güçtür.

2.2.1.2.5. Prognoz:

Atipik KML, günümüz yöntemleri ile tedavi edilemeyen, medyan sağ kalım süresi 14-37 ay arasında değişen, agresif gidiş gösteren bir hastalıktır (88-89, 102-103). Olumsuz

prognoz faktörleri arasında; ileri yaş (>65 yaş), kadın cinsiyet, yüksek lökosit sayısı ($\geq 50.000/\text{mm}^3$), düşük hemoglobin değeri (<10 g/dL) ve düşük trombosit sayısı (<100.000/ mm^3) sayılabilir. AML dönüşümünde etkin olan faktörler; kemik iliği (>%5) blast oranı, belirgin diseritropoez ve dolaşımda immatür myeloid öncülerin varlığıdır (88, 89). Hastaların çoğu ilik yetmezliğinden kaybedilir. Akut lösemiye dönüş %15-40 oranındadır (88, 102). Genç hastalarda allojeneik kemik iliği nakli sonrası sağ kalım süresini uzatmaktadır (104).

2.2.1.3. SINIFLANDIRILAMAYAN MYELODİSPLASTİK/

MYELOPROLİFERATİF NEOPLAZİ (MDS/MPN-U):

MDS/MPN-U grubu, myelodisplastik ve myeloproliferatif özelliklere sahip oldukları halde KMML, aKML, MDS ve MPN tanı kriterlerinin hiçbirini tam anlamıyla dolduramayan olguları içermektedir (105).

Tanı sırasında önceden var olan myeloid bir neoplazi, büyüme faktörü ve/veya sitotoksik ilaçlarla tedavi sorgulanmalı, sitogenetik/ moleküler özellikler dikkate alınmalıdır (105). MDS/MPN-U için tanı kriterleri **Tablo 2.3'**te özetlenmiştir.

2.2.1.3.1. □□□□□ Klinik:

Myeloid dizide aşırı proliferasyona bağlı lökositoz ($\geq 13.000/\text{mm}^3$), inefektif hematopoeze bağlı sitopeniler ya da trombositoz ($\geq 450.000/\text{mm}^3$), splenomegali veya hepatomegali gibi ilik dışı organların tutulumu görülebilir (105).

2.2.1.3.2. □□□□□ Genetik değişiklikler:

Sitogenetik anomalilerin sıklığı ve tipi, diğer MDS/MPN olgularına benzer. Moleküler çalışmalar ise RARS-T grubuyla sınırlıdır.

2.2.1.3.3. □□□□□ Morfoloji:

Kemik iliği hiperselüler olup myeloid hiperplazi ve en az bir dizide displazi görülür. Belirgin fibrozis eşlik edebilir. Periferik kan veya kemik iliği aspirasyonlarında psödo Pelger-Huët hücreleri ve hipogranüler nötrofiller, dev, hipogranüler trombositler, makrositoz görülebilir (58). Blast oranının %10'un üzerinde olması, hastalığın daha agresif seyredeceğine işaret edebilir (105).

2.2.1.3.4. □□□□□ Ayırıcı tanı:

MDS/MPN-U, diğer olası tanılar dışlanarak ulaşılan bir tanı olduğundan displastik ve proliferatif özellikler gösteren tüm myeloid neoplaziler ayırıcı tanı içine alınmalıdır. DSÖ 2008 tanı kriterlerine göre bu tanı gruplarına uymayan olgular, MDS/MPN-U kategorisinde değerlendirilir.

2.2.1.3.5.□□□□□□ **Prognoz:**

MDS/MPN-U hasta grubunun insidansı ve prognozu ile ilgili fazla çalışma yoktur. Wang ve ark., RARS-T hariç MDS/MPN-U hastalarında %23.2 oranında lösemik dönüşüm görüldüğünü bildirmiştir (106). Az görülen ve prognozu kötü olan bu hasta grubunda yapılan çalışmalarda medyan sağ kalım süresi 12.4-21.4 ay arasında verilmiştir (106-108).

2.2.1.3.6.□□□□□□

RİNG

(RARS-T):

TROMBOSİTOZLA BİRLİKTE

SİDEROBLASTLI REFRAKTER ANEMİ

DSÖ 2001 ve 2008 sınıflamalarında MDS/MPN-U grubu içinde geçici bir öge olarak yer almıştır. Belirgin trombositoz ($\geq 450.000/\text{mm}^3$), proliferatif megakaryositler ve ring sideroblastların eşlik ettiği diseritropoez ile ayırt edilir. RARS-T tanı kriterleri **Tablo 2.3**'te özetlenmiştir.

2.2.1.3.6.□.□□□□2□

Klinik:

Anemi ve trombositozun yanı sıra lökositoz da görülebilir. Splenomegali olguların birçoğunda mevcuttur.

2.2.1.3.6.□.□□□□2□

Genetik değişiklikler:

RARS-T olgularının çoğunda karyotip normaldir (109-111). Buna karşın hastaların %60-80'inde JAK2 V617F mutasyonu, %87'sinde SF3B1 mutasyonu görülür (110, 112-113). Bu iki mutasyon, hastaların %64'ünde birliktedir. Cazzola ve ark., ilk olarak SF3B1 mutasyonunun edinilip mitokondrial demir yüklenmesi ve inefektif hematopoezin geliştiğini, sonradan edinilen JAK2 V617F mutasyonunun da myeloproliferatif özelliklere neden olduğunu ileri sürmüşlerdir (114).

MPL W515 mutasyonları az görülür (115). ASXL1 ve TET2 gen mutasyonları da bildirilmiştir (111).

2.2.1.3.6.□.□□□□2□

Morfoloji:

Kemik iliği hiperselülerdir. Aspirasyonlarda eritroid hiperplazi, diseritropoez ve eritroid öncülerin $\geq 15\%$ 'ini kapsayan ring sideroblastlar vardır. Kemik iliği biyopsilerinde inefektif eritroid hiperplazi, proliferatif nitelikli, büyük, atipik megakaryositler görülür. Blast oranı $< 5\%$ 'tir.

2.2.1.3.6.□.□□□□2□

Ayırıcı Tanı:

Benzer morfolojik özellikler sitogenetik olarak del(5q) saptanan olgularda da görülebilir (116). Bu tip olgular, izole del(5q) ile ilişkili MDS olarak tanımlanmalıdır.

Kromozom 3q21q26 anomalilerinin saptandığı MDS ve AML olgularında trombositoz ve megakaryositik displazi görülebilir (105).

2.2.1.3.6. Prognoz:

MDS/MPN grubu içinde prognozu en iyi olan hastalıktır. Medyan sağ kalım süresi 71-101 aydır (117, 118). Çok merkezli son çalışmalarda, RARS-T olgularının esansiyel trombositemi (ET) olgularından daha kısa, RARS olgularından ise daha uzun yaşadıklarını göstermiştir (115, 117-119). AML'ye dönüşme sıklığı ET olgularından fazla, RARS olgularından daha azdır (115).

2.2.2. MYELODİSPLASTİK SENDROM (MDS):

Myelodisplastik sendrom, bir veya daha çok hematopoietik dizide displazi, inefektif hematopoez, artmış apoptoz ve sitopenilerle ayırt edilen, klonal, heterojen bir grup hematopoietik kök hücre hastalığıdır. Kemik iliği ve periferik kanda eş zamanlı blast artışı mevcut olmakla birlikte AML tanı sınırı olan %20'nin altındadır.

MDS, herhangi bir nedene bağlı olmaksızın primer ya da kemo/radyoterapi veya myelotoksik çevresel faktörlere maruz kalma sonrasında sekonder olarak görülebilir (120). DSÖ MDS sınıflaması, **Tablo 2.4'**te özetlenmiştir.

2.2.2.1. Klinik:

Klinik semptomlar, anemiye bağlı halsizlik, trombositopeniye bağlı kanama ve nötropeniye bağlı enfeksiyona yatkınlık gibi ilik yetmezliğine bağlı belirtilerdir (121-123). Splenomegali nadir de olsa görülebilir.

2.2.2.2. Genetik değişiklikler:

Hastaların ~%50'sinde sitogenetik anomali mevcut olup AML'nin aksine dengelenmemiş translokasyonlar ve delesyonlar daha sık görülür (124-129). En sık görülen anomaliler, -5/del(5q), -7/del(7q), +8, del(20q), -Y, del(17p) ve inv(3)/inv(3)(q21q26.2)'dir (128). Sitogenetik anomaliler tek başına olabileceği gibi birkaç tanesi birlikte kompleks formlarda da görülebilir.

Son yıllarda tanımlanan gen mutasyonları arasında MDS için en ayırt edici mutasyon SF3B1 olup ring sideroblast varlığı ile ilişkilidir. Ring sideroblastlarla birlikte olan MDS ve RARS-T olgularının büyük çoğunluğunda SF3B1 mutasyonu saptanmaktadır (130). Diğer gen mutasyonları içinde, TET2, MDS'de ~%20 oranında görülür. RUNX1, TP53 ve NRAS mutasyonlarının, trombositopeni ve kemik iliğinde yüksek blast oranıyla ilişkili olduğu

bildirilmiştir (131). Çok değişkenli analizlerde, ASXL1, EZH2, TP53, RUNX1 ve ETV6 mutasyonları birbirlerinden bağımsız olarak kısa sağ kalımla ilişkili bulunmuştur (131).

JAK2 V617F mutasyonu, MDS’da özellikle izole -5q hastalarında görülmektedir (132).

TABLO 2.4: MDS; DSÖ tanı kriterleri

MDS ALT GRUPLARI		PERİFERİK KAN BULGUSU	KEMİK İLİĞİ BULGUSU	LÖSEMİK DÖNÜŞÜM RİSKİ (%)***
Tek dizide displazi ile birlikte refrakter sitopeniler (RCUD)	Refrakter anemi	<%1 blast* Tek dizide sitopeni**	Tek dizide ≥%10 displazi <%5 blast <%15 ring sideroblast	%16
	Refrakter nötropeni			
	Refrakter trombositopeni			
Ringed sideroblastlı refrakter anemi (RARS)		Anemi Blast yok	≥%15 ring sideroblast yalnızca eritroid displazi <%5 blast	%2
Çoğul displazi ile birlikte refrakter sitopeni (RCMD)		<%1 blast* ≥2 dizide sitopeni Auer rod yok Monosit : <1x10 ⁹ /L	≥2 dizide ≥%10 displazi <%5 blast Auer rod yok ±%15 ring sideroblast	%19
Blast artışı refrakter anemi (RAEB-1)		Sitopeniler %2-4 blast* Auer rod yok Monosit : <1x10 ⁹ /L	Tek/çoğul displazi ≥%5-<%10 blast Auer rod yok	%24
Blast artışı refrakter anemi (RAEB-2)		Sitopeniler ≥%5-<%20 blast ± Auer rod*** Monosit : <1x10 ⁹ /L	Tek/çoğul displazi ≥%10-<%20 blast ± Auer rod***	%50
MDS-sınıflandırılmayan (MDS-U) • Fibrozisli seyreden MDS (MDS-F)		Sitopeniler ≤%1 blast*	Tek/çoğul <%10 displazi <%5 blast	%28
İzole del(5q) ile ilişkili MDS		Anemi Normal/artmış trombosit sayısı <%1 blast	<%5 blast İzole del(5q) Auer rod yok	%20

*Kemik iliğinde <%5, periferik kanda %1 blast varlığında olgu, MDS-U sınıfında, kemik iliğinde <%5, periferik kanda %2-4 blast varlığında olgu, RAEB-1 sınıfında değerlendirilmelidir.

**Nadiren iki dizide sitopeni de gözlenebilir, ancak pansitopeni görülen durumlarda olgu, MDS-U sınıfında değerlendirilmelidir.

***Auer rod bulunan, periferik kanda <%5, kemik iliğinde <%10 blast varlığında olgu, RAEB-2 sınıfında değerlendirilmelidir.

2.2.2.3. Morfoloji:

Kemik iliği hiper/normo/hiposelüler olabilir. Kemik iliği aspirasyonları değerlendirilirken displazi olarak yorumlanması gereken özellikler **Tablo 2.5**’te özetlenmiştir (124).

MDS’da bazı sitogenetik anomaliler, ayırt edici morfolojik özelliklerle ilişkilidir. İzole 5q delesyonu; hipononlob nükleuslu, küçük megakaryositlerde artma, 17p delesyonu; psödo Pelger-Huët tipi nötrofiller ve sitoplazmik vakuollerle, 3. kromozom anomalileri; hipolobe, küçük megakaryosit ve mikromegakaryosit artışı ile ilişkilidir (133-138).

TABLO 2.5: Displazi kriterleri

DİSERİTROPOEZ		DİSGRANÜLOPOEZ	DİSMEGAKARYOPOEZ
NÜKLEER 1-Nükleer tomurcuklanma 2-Intranükleer köprüleşme 3-Karyoreksis 4-Multipl çekirdek 5-Nükleer hiperlobasyon 6-Megaloblastik değişiklikler	SİTOPLAZMİK 1-Ring sideroblastlar 2-Vakuolizasyon 3-PAS pozitifliği	1-Küçük veya anormal büyük boyut 2-Nükleer hipolobasyon (psödo Pelger-Huët, pelgeroid) 3-Düzensiz hipersegmentasyon 4-Hipo veya agranüler formlar 5-Psödo Chediak-Higashi granülleri 6-Auer rodlar	1-Mikromegakaryositler 2-Nükleer hipolobasyon 3-Multipl çekirdek *Normal megakaryositlerde lobule tek nükleus vardır.

2.2.2.4. Fibrozisle birlikte Myelodisplastik Sendrom (MDS-F):

MDS-F, hiperselüler kemik iliği, çoğul displazi, sık transfüzyon ihtiyacı doğuran derin sitopeniler, kompleks karyotip gibi kötü risk faktörleri ve kısa yaşam süresi ile ayırt edilen bir gruptur (47). DSÖ 2008 sınıflamasında sınıflandırılmayan MDS alt grubu içinde yer almaktadır.

Buesche ve ark., MDS’da fibrozis insidansının %16 olup en sık blast artışlı refrakter anemi (RAEB) ve çoğul displazi ile birlikte refrakter sitopeni (RCMD) hastalarında görüldüğünü, ring sideroblastlı refrakter anemide (RARS) ise rastlanmadığını bildirmiştir (48). Della Porta ve ark. çalışmalarında fibrozis insidansı %17 olup RCMD’de sık, RA, RARS ve izole del(5q)’da nadirdir (139).

2.2.2.5. Ayırıcı tanı:

Ayırıcı tanı, nedeni açıklanamayan sitopeniler ve morfolojik displaziler arasında yapılır. Displazi bir dizi klonal ve nonklonal hastalıkta görülebilir. Bunlar arasında B12 vitamini ve folik asit eksikliği, arsenik gibi ağır metallere maruziyet, kotrimaksazol gibi antibiyotik ya da kemoterapötik ilaç kullanımı, paroksizmal nokturnal hemoglobinüri sayılabilir. Bakır eksikliğinde sitopeniler, ring sideroblastlar, kemik iliğinde myeloid öncüllerde vakuolizasyon görülebilir (140-142). Displazi eritroid diziyle sınırlıysa konjenital diseritropoietik anemi ayırıcı tanıya alınmalıdır (143, 144). Viral enfeksiyonlar içinde, parvovirüs B19 enfeksiyonu dev eritroblastlara, HIV virüsü diseritropoez ve disgranülopoeze neden olur (145-147). Granülosit koloni stimulan faktör kullanımında nötrofillerde hipergranülasyon, Dohle cisimcikleri, belirgin nükleer hipolobulasyon görülebilir (148).

RAEB1 ve RAEB 2 ayırımında önemli olduğundan sınırda kalan olgularda blast oranı saptanırken 500 ve üzerinde hücre sayılmalıdır. Aynı şekilde, blast oranı yüksek ve %20 sınırına yakın olgularda da AML’den ayırım için fazla sayıda hücre sayımına gidilmelidir. MDS-F’da aspirasyonlar hiposelüler olduğundan displazi ve blast oranını değerlendirmek

güçtür. Bu nedenle MDS/MPN grubu hastalıklar ve PMF ile ayırıcı tanı biyopsi ile mümkündür.

2.2.2.6. Prognoz:

MDS'da, başlıca mortalite ve morbidite nedeni kemik iliği yetmezliğidir. Prognozu olumsuz etkileyen faktörler içinde en önemlileri, ileri yaş, erkek cinsiyet, MDS-alt tipi, yüksek riskli tek ya da kompleks kromozom anomalileri, komorbidite yaratan ek hastalıklar, yüksek blast oranı ve CD34+ hücre artışı, derin sitopeniler, yüksek ferritin ve LDH düzeyleri ve kemik iliği fibrozisidir (139, 149-150). AML dönüşümü %2-50 arasında olup MDS alt tipine ve eşlik eden kromozom anomalisine göre değişir (151). MDS olgularında prognoz değerlendirme sınıflamalarına göre olgular çeşitli risk gruplarına ayrılmıştır. Son genişletilmiş uluslararası prognoz skorlama sistemine (IPSS-R) göre 5 risk grubunun düşükten yükseğe doğru medyan sağ kalımları sırasıyla 8.8, 5.3, 3.0, 1.5, 0.8 yıldır. Medyan lösemik dönüşüm sürelerine en düşük risk grubunda ulaşamamış olup diğerlerinde ise sırasıyla 10.8, 3.2, 1.4 ve 0.7 yıl olarak belirtilmiştir (150-153).

2.2.3. PRİMER MYELOFİBROZ (PMF):

PMF, myeloid kök hücre hastalığı olup BCR-ABL1 negatif kronik Myeloproliferatif Neoplazi (MPN) grubu içinde yer alır. Bu grup hastalıklarda eşlik eden morfolojik displaziler ve blast artışı görülmez veya hastalığın erken evrelerinde ön planda değildir.

PMF, kemik iliğinde retiküler ve kollajen lif artışı, atipik megakaryosit proliferasyonu, myeloid dizi artışı ve ekstramedüller hematopoez ile karakterize klonal bir myeloid neoplazidir. Hastalığın iki fazı vardır. **Prefibrotik-selüler faz;** retikülin lif artışı ve ekstramedüller hematopoez minimal olup kemik iliği hiperselülerdir. Bu dönemde trombosit sayısı genellikle yüksektir. **Fibrotik faz;** retikülin ve/veya kollajen lif artışı belirgin olup kemik iliği normo/hiposelüler olabilir. Periferde lökoeritroblastoz belirgindir ve ekstramedüller hematopoeze bağlı splenomegali ve hepatomegali vardır (154, 155). Hastalık, zaman içinde prefibrotik fazdan fibrotik faza doğru ilerler.

Fibroblastlar neoplastik klonal olarak olmayıp megakaryositlerin salgıladığı trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) ve dönüştürücü büyüme faktörü- β (TGF- β) gibi fibrojenik sitokinlere yanıt olarak çoğalmakta, retikülin ve kollajen yapımıyla fibrozise neden olmaktadır (36, 156, 157). Bu sitokinler aynı zamanda endotel hücreleri üzerine de etkili olduğundan eş zamanlı olarak kemik iliğinde anjiogenez de artar. Dalaktaki anjiogenez artışı ise ekstramedüller hematopoez ile ilişkilidir (158, 159). PMF'da fibrozis ve vasküler

proliferasiyona neden olan sitokinler dışında başka birçok inflamatuvar sitokin de hastalık patogeneğinde etkili olan “sitokin fırtınası”nda rol almaktadır (160).

2.2.3.1. Klinik:

Prefibrotik fazda, trombosit sayısındaki artış ve işlev bozukluklarına bağlı trombotik olaylar ve kanamaya yatkınlık, fibrotik fazda ise derin anemi, masif hepatosplenomegali ve buna bağlı portal hipertansiyon, varis kanamaları, asit görülebilir (154, 155, 157). Prefibrotik-selüler faz PMF’a özgü hematolojik özellikler, lökosit sayısında hafif artma (ortalama 14.000/mm³), normal ya da hafif azalma gösteren hemoglobin değerleri (ortalama 13g/dl), belirgin trombositoz (ortalama 962.000/mm³) şeklindedir (155). Monositoz nadiren görülebilir ve olumsuz prognoz faktörüdür (79, 161). Hastalık fibrotik faza geçtiğinde, dalak boyutları artar, derin anemi, trombositopeni, lökopeni gibi ilik yetmezliği bulguları öne geçer (155). Periferik kan tablosunda lökoeritroblastoz, gözyaşı hücreleri, çıplak megakaryosit çekirdekleri ve bazen megakaryositler izlenir. Blast görülebilir, ancak genellikle %10’un altındadır. Fibrotik faz süresi uzun olup hemen akut lösemiye dönüşmez. DSÖ kriterlerine göre, periferik kan ve/veya kemik iliğinde ≥ 10 - <20 blast varlığı “akselere” faz PMF olarak tanımlanır (154). PMF için DSÖ tanı kriterleri **Tablo 2.6**’da özetlenmiştir.

2.2.3.2. Genetik Değişiklikler:

Anormal karyotip görülme sıklığı %30-50 olup en sık görülenler del(20q), del(13q), +9 ve/veya +8 ve 1q anomalileri, monozomi7/del(7q), -5/del(5q) ve del(12p)’dir (157, 162, 163). Kompleks karyotip %10-15, monozomiler ise %2-3 oranlarında bildirilmiştir (164).

JAK2 V617F mutasyon sıklığı %50-60, MPL mutasyon sıklığı %5-10 arasındadır (157, 162, 165). JAK2 ve MPL mutasyonları saptanmayan esansiyel trombositemi (ET) ve PMF olgularının çoğunda kalretikülin geninde (CALR) 9. ekzonda somatik delesyon veya insersiyonlar gösterilmiştir. CALR mutasyonları polisitemia vera (PV) hastalarında ise görülmemektedir (166). Son yıllarda, PMF’da epigenetik düzenlemede rol alan TET2, ASXL1 ve DNMT3 α genlerindeki ~%10, RNA kırılmasıyla ilişkili proteinleri kodlayan SF3B1 ve SRSF2 gibi genlerdeki mutasyonlar ~%20 oranlarında tanımlanmıştır (157, 162).

TABLO 2.6: PMF; DSÖ tanı kriterleri

PRİMER MYELOFİBROZ (PMF)*	
Major kriterler	Minör kriterler
1-Megakaryosit proliferasyonu ve atipisinin** bulunması veya retikülin/kollajen fibrozis veya belirgin fibrozis yokluğunda megakaryosit değişikliklerinin granülositik proliferasyon ve azalmış eritropoez ile karakterize artmış kemik iliği selüleritesine eşlik etmesi (PMF-selüler faz) 2-Belirgin retiküler fibrozis yokluğunda, megakaryosit değişikliklerinin eşlik ettiği granülositik proliferasyon ve düşük eritropoezle karakterize hiperselüler kemik iliği (prefibrotik-selüler faz) 3-Polisitemia vera (PV), BCR-ABL1 (+) kronik myeloid lösemi (KML), MDS veya diğer myeloid neoplazilerin DSÖ kriterlerini karşılamaması 4-JAK2 V617F veya MPLW515K/L gibi diğer klonal belirteçlerin gösterilmesi veya bu klonal belirteçlerin yokluğunda kemik iliği fibrozisinin enfeksiyon, otoimmün hastalık, diğer kronik inflamatuvar durumlar, tüylü hücreli lösemi veya diğer lenfoid neoplaziler, metastatik maligniteler, toksik (kronik) myelopatiler gibi hastalıklara sekonder gelişme ihtimalleri dışlanmalı.	1-Lökoeritroblastoz 2-Yüksek serum LDH düzeyi 3-Anemi 4-Splenomegali

* Tanı için major kriterlerin 3'ü, minör kriterlerin 2'si gereklidir.

** Atipik megakaryositler; çekirdek/sitoplazma oranı anormal, hiperkromatik, bulböz veya düzensiz katlantılı çekirdek, sıkı kümeleşme gösteren küçük/büyük megakaryositlerdir.

2.2.3.3. Morfoloji:

Prefibrotik-selüler fazda, kemik iliği hiperselülerdir. Segmente nötrofillerin baskın olduğu myeloid hiperplazi ve kümeleşme gösteren, çekirdek/sitoplazma oranı anormal, şişkin, iri, bulutsu çekirdekli megakaryosit artışı ön plandadır. Retiküler lif artışı damarlar etrafında ve minimal olabileceği gibi hafif/orta düzeyde de olabilir. Kollajen lif artışı yoktur. Fibrotik fazda kollajen fibrozis eklenir, selülerite normaldir. Megakaryositlerde sıkı kümeleşmeler, pleomorfizm ve hiperkromazi görülür. Daha ileri evrelerde ilik alanlarında daralma, osteoskleroz ve hiposelülerite eklenir. Atipik megakaryositler azalmakla birlikte bu dönemde de görülür.

2.2.3.4. Ayırıcı tanı:

Selüler fazda, esansiyel trombositemiden (ET) ayırmak güçtür. PMF-SF yönünde olan bulgular; myeloid hiperplaziye eşlik eden gevşek ve sıkı kümeler oluşturan değişik boyutlarda, küçüklü-büyük, bulutsu, iri çekirdekli, bazen çıplak çekirdek şeklinde görülebilen anormal megakaryositlerdir. ET'de yalnızca dağınık ya da gevşek kümeler oluşturan derin çentikli çekirdekli, geniş sitoplazmalı büyük megakaryositler artmıştır. PMF-

SF'da trombosit sayısı $\geq 450.000/\text{mm}^3$ olabildiği gibi normal de olabilir, oysa ET'de daima $\geq 450.000/\text{mm}^3$ 'tür. PMF-SF'da lökosit sayısı değişken olmakla birlikte sıklıkla artmıştır, ET'de ise normaldir.

Displastik megakaryositlerin ve CD34+ hücrelerin varlığıyla MDS-F ve myelofibrozisle birlikte akut panmyelozisten ayırt edilir. Myeloproliferatif özelliklerden dolayı diğer MPN'ler ve MDS/MPN grubu hastalıklar özellikle KMML ayırıcı tanıya alınmalı, ayırım DSÖ 2008 tanı kriterlerine göre yapılmalıdır.

Otoimmün hastalıkların seyrinde kemik iliğinde fibrozis gelişebilir. Bu olgularda kemik iliği biyopsilerinde megakaryosit morfolojisi normaldir ve lenfoid foliküller ile lenfoplazmositer hücre artışı izlenir.

Fibrotik faz morfolojik olarak polisitemia vera (PV), esansiyel trombositemi (ET) ve kronik myeloid lösemi (KML) seyrinde gelişen myelofibrozdaki ayırt edilemez.

2.2.3.5. Prognoz:

Kötü prognoz faktörleri arasında, ileri yaş (>65 yaş), anemi (hemoglobin <10g/dL), lökositoz (lökosit >25.000/mm³), trombositopeni (trombosit <100.000/mm³), dolaşımda >%1 blast, kan transfüzyonu ihtiyacı ve kötü risk sitogenetik anomali varlığı sayılabilir (157, 167). Periferik kanda mutlak monositoz, kemik iliğinde KMML benzeri özellikler ve blast artışı akselere faz PMF yönünde bulgulardır (79).

2.3. MDS, MPN VE MDS/MPN: ORTAK GENETİK DEĞİŞİKLİKLER:

Kronik myeloproliferatif neoplazilerin (KMPN) patogeneğinde anormal hücre çoğalmasına yol açan ortak özellik tümünde mutant tirozin kinazların varlığıdır. Bu anormal kinazlar içinde ilk bulunan BCR-ABL1 kinaz olup KMPN'ler içinde sadece KML'de görülür (168-173). Geri kalan BCR-ABL1 (-) KMPN'lerde ortak olarak görülen diğer mutant tirozin kinazlar JAK2 V617F ve MPL kinazlardır (174-177).

JAK2 V617F mutasyonu, en sık PV'da görülmekle birlikte ET ve PMF gibi farklı fenotipte hastalıklarda ortaktır. Ailevi MPN olgularında JAK2 mutasyonunun her zaman bulunmaması, JAK2 V617F mutasyonunun başlatıcı mutasyon olmayıp sonradan edinildiğini düşündürmektedir (178, 179). JAK2 V617F mutasyonunun, hematopoietik büyüme faktörlerinden bağımsız bir proliferasyon sağlayabilmesi için eritropoietin (EpoR), trombopoietin (TpoR) veya granülosit stimüle edici faktör (G-CSFR) gibi sitokin

reseptörlerinin oluşturduğu yapıya gereksinimi vardır (180). Bu, JAK2 V617F mutasyonunun neden farklı fenotipte myeloid kök hücre hastalıklarında görülebildiği ve farklı myeloid hücre proliferasyonlarına yol açtığını açıklamaktadır.

Son yıllarda, myeloid malignitelerde patogeneze, prognoz ve tedavi ilişkili olabilecek çok sayıda gen ve bu genleri tutan mutasyonlar saptanmıştır. Bu genler içinde TET2, DNMT3A, IDH1 ve IDH2 DNA metilasyonunda, ASXL1 ve EZH2 kromatin modifikasyonunda, RUNX1 transkripsiyonun düzenlenmesinde, JAK2, MPL, CBL, NRAS ve KRAS sinyal iletiminde, p53 DNA onarımında, SRSF2 ve SF3B1 RNA bağlanmasında rol almaktadır.

2.3.1. Sinyal iletiminde görevli genler:

JAK2 V617F mutasyonu, her üç myeloid dizide proliferasyona neden olduğu halde JAK2 ekzon 12 mutasyonu eritroid, MPL mutasyonu megakaryositik dizide proliferasyona yol açmaktadır (181, 182).

Trombopoietin reseptörünü kodlayan MPL geninin, JAK/STAT, MAP kinaz, PI3K-AKT sinyal yollarında aktive edici rolü olduğu gösterilmiştir (183). CBL geninin, JAK/STAT sinyal yolağında STAT5, EpoR, C-KIT, Grb2, JAK2 ve Tyk2 gibi proteinlerle doğrudan etkileşerek ve MAP kinaz sinyal yolağında RAS onkogeni üzerinden düzenleyici görev aldığı gösterilmiştir (184, 185).

2.3.2. DNA metilasyonunda görevli genler:

TET2, DNA demetilasyonunda görevlidir. İn vitro çalışmalar, TET2 mutasyonlarının TET2 geninde işlev kaybı yaparak DNA hipermetilasyonuna neden olup hematopoietik hücrelerin farklılaşmasını önlediğini göstermektedir (186). TET2 mutasyonları myeloid malignitelerde en sık görülen iki mutasyondan biri olsa da sağ kalım ile ilişkisi gösterilememiştir (64, 85, 187-190). IDH1 ve IDH2 mutasyonlarının, DNA metilasyonu üzerine etkisi TET2 mutasyonlarına benzer. KMML’de sıklığı %10’un altındadır (64, 191, 192). Epigenetik düzenlemelerde rol alan DNMT3α gen mutasyonu normal karyotipli olgularda daha sıktır (192).

2.3.3. Transkripsiyonun düzenlenmesinde görevli genler:

Düzenleyici transkripsiyon faktörü olan RUNX1, tümör süpresör gen olarak görev yapar ve normal hematopoezde kritik rolü olan DNA core binding faktörün alt ünitelerinden birini kodlar (193).

2.3.4. RNA bağlanmasında görevli genler:

SRSF2, RNA kırılmasında düzenleyici bir gendir. RUNX1 mutant olgularda SRSF2 mutasyonu olumlu prognoz bulgusudur (194, 195). SF3B1 ve U2AF1 yanı sıra RNA

kırılmasında görevli diğer genlerde de daha düşük oranlarda mutasyonlar tanımlanmıştır (195-197).

2.3.5. Kromatin modifikasyonunda görevli genler:

Çalışmamızda incelenen ASXL1 geniyle ilgili ayrıntılı bilgi 2.4. bölümde verilmiştir. Polycomb gen ailesine üye olan ASXL1 ve EZH2 gen mutasyonlarının kötü prognozla ilişkileri gösterilmiştir (64, 198). Prognostik öneme sahip bu iki gen, hedefe yönelik tedavi araştırmaları için aday olabilecek değere sahiptir. ASXL1 mutasyonlarının EZH2 mutasyonlarına göre çok daha sık bulunuşu nedeniyle ASXL1 geni bir adım daha öne çıkmaktadır. Myeloid malignitelerde, Polycomb ailesinin SUZ12, EED ve JARID2 gibi birçok diğer üyesinde de mutasyonlar saptanmıştır (199, 200).

2.4. ASXL1 MUTASYONLARI:

2.4.1. ASXL1 geni ve lökomogenezdeki rolü:

Additional Sex Combs-Like 1 (ASXL1) geni, “Drosophila- Additional sex combs” geninin (Asx) insandaki homologudur. ASXL1, 20. kromozomda, 20q11 bölgesinde yer alan, 12 ekzonu bulunan bir gendir. Protein kodlayan 8 transkripti olan bu gen, 1541 aminoasitlik bir protein sentezler.

Asx genindeki delesyonlar hem Polycomb (PcG) grubu gen delesyonları gibi baskılayıcı hem de Trithorax (TxG) grubu gen delesyonları gibi aktive edici özellik taşıdığından çift yönlü işleve sahiptir (201).

ASXL1 geninin lökomogenezdeki rolü henüz tam olarak açıklanamamıştır. Drosophila ve fareler üzerinde yapılan çalışmalarda, nükleus içinde kromatin ile ilişkili protein kodlayan ASXL1’in normal hematopoez için gerekli olduğu anlaşılmıştır. Myeloid lökomogenezle ilişkili olarak Hox genlerinin aktivasyon ve baskılanmasında etkin olduğu düşünülmektedir (202).

Polycomb grubu proteinler, Hox genlerinin baskılanmasında görevlidirler. ASXL1 proteini, polycomb represif kompleks 2 (PRC2) komponentleri olan, EZH2 ve SUZ12 proteinleriyle etkileşir. PRC2, H3K27’nin trimetilesyonunu katalize eder ve sonuç ürün H3K27me3 oluşur. H3 lizin 27 metiltransferaz, kök hücre yenilenmesi üzerinde etkilidir. Bunu hücre ölümü ile ilişkili genlerin epigenetik baskılanması yoluyla sağlar (165). Basitçe, ASXL1 mutasyonları, H3K27me3 kaybına ve HoxA gen ekspresyonunda artışa neden olur.

ASXL1'in heterokromatin represif kompleksin bir komponenti olan HP1 α /CBX5 ile ilişkili olduğu bilinmektedir (203, 204). HP1 α , histon H3Y41'e bağlanır. JAK2, histon H3Y41'i fosforiller ve HP1 α 'yı kromatinden uzaklaştırır (205). Bu nedenle, ASXL1 ve JAK2 mutasyonları arasında henüz açıklığa kavuşturulmamış, muhtemel bir ilişki olabilir.

2.4.2. ASXL1 mutasyonları:

Gelsi-Boyer ve ark., 2009 yılında karşılaştırmalı genomik hibridizasyon (aCGH) yöntemiyle bir hastada 20q11-q13 bölgesinde delesyon fark etmişler ve bu bölgede yer alan ASXL1 ve DNMT3 β genlerinin dizilemesini yaparak ASXL1 genindeki mutasyonları ilk kez göstermişlerdir.

ASXL1 mutasyonlarının büyük çoğunluğu 12. ekzonda yer alan çerçeve kayması (frameshift) veya nokta mutasyon sonucu nonsense (anlamsız) ya da missense (yanlış anlamlı) mutasyonlar şeklinde olup diğer ekzonlarda da az sayıda mutasyon bildirilmiştir. En sık görülen mutasyon, guanin nükleotidinin duplikasyonu sonucu gelişen frameshift (çerçeve kayması) mutasyonudur (c.1934_1935insG; G646WfsX12). Bir çalışmada, bu mutasyonun polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) artefaktı olduğu ileri sürülmüştür (206). Ancak germ-line, kontrol DNA'larda veya diğer tip kanserlerde görülmediğinden ve hastaların tekrarlanan analizlerinde sürekli saptandığından gerçek mutasyon olduğu sonucuna varılmıştır (66, 207).

ASXL1 mutasyonları, KMML'de %12.5-52, sekonder AML'de %12.5-53, de novo AML'de %4.5-29.6, MDS'da %11.4-20.7, MPN'lerde %6.5-54.8 oranlarında bildirilmiştir (198, 207-216). MPN'lerde en sık PMF, MDS'da en sık RAEB'de görülürken az sayıda JMML ve RARS-T olgusunda da bildirilmiştir (111, 208, 211, 217-218).

ASXL1 mutasyonları, NPM1 ve FLT3 dışında, IDH1/2, RUNX1, TET2, CBL, JAK2, NF1, RAS, SF3B1, SRSF2, U2AF35 gibi birçok mutasyonla birliktelik göstermektedir.

ASXL1 mutasyonları, JAK2 pozitif ve negatif MPN'lerde benzer oranlarda saptanmıştır (215, 219-220). MDS'da RUNX1, AML'de RUNX1 ve CEBPA mutasyonlarıyla sıklıkla birlikte görülür (212, 221-222).

PRC2 ile etkileşerek işlev gösteren ASXL1 ile kendisi PRC2 komponenti olan EZH2, sanılanın aksine birbirlerini dışlayan mutasyonlar olmayıp birliktelik gösterebilirler (198).

2.4.3. ASXL1 mutasyonlarının prognoza etkisi:

ASXL1 mutasyonları, MPN, KMML, MDS ve AML’de kısa sağ kalım ve agresif klinik seyirle ilişkili bulunmuştur (67, 207, 219, 223). MDS’da 18 gen üzerinde yapılan bir çalışmada prognozla ilişkili olduğu saptanan 5 genden biri ASXL1 olup diğeri TP53, EZH2, ETV6 ve RUNX1’dir (131).



3. MATERYAL-YÖNTEM:

3.1.OLGU SEÇİMİ:

2008-2013 yılları arasında Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda MDS, MDS/MPN ve PMF-SF tanıları alan tüm erişkin olgular arşivden tarandı ve bunlar içinde fibrozisle seyreden, ardışık 84 olgu çalışma kapsamına alındı. Seksen dört olgunun, geçmişten günümüze kadar yapılan tüm kemik iliği aspirasyon ve biyopsilerine ait lam ve blokları arşivden çıkarıldı.

Seksen dört hastanın 44'ü Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, 10'u Haseki Eğitim Araştırma Hastanesi, 9'u Bakırköy Sadi Konuk Eğitim ve Araştırma Hastanesi, 7'si Okmeydanı Eğitim Araştırma Hastanesi, 2'si İstanbul Eğitim Araştırma Hastanesi, 1'i Göztepe Eğitim Araştırma Hastanesi, 1'i Bezm-i Alem Vakıf Gureba Vakıf Hastanesi hematoloji veya dahiliye polikliniklerinden, 10'u özel bir klinikten takip edilmekte olup kemik iliği aspirasyon ve biyopsileri tarafımıza tanı ve takipteki değişimleri izleme amaçları ile gönderilmiştir. Hastalara ait klinik bilgiler servis arşivlerinden taranarak kaydedildi.

3.2. KLİNİK DEĞERLENDİRME:

Hastaların yaş, cinsiyet, fizik muayene ve batın ultrasonografisinde (USG) ölçülen dalak ve karaciğer boyutları, tanı ve tekrarlayan biyopsiler sırasındaki lökosit, absolu nötrofil, absolu monosit, hemoglobin, ortalama eritrosit kitle hacmi (MCV), trombosit sayıları, kan biyokimyasal değerlerinden laktat dehidrogenaz (LDH), β 2 mikroglobulin, eritrosit sedimentasyon hızı (ESH), demir, total demir bağlama kapasitesi (TDBK), ferritin düzeyleri olguların takiplerinin yapıldığı 8 ayrı merkezin bilgisayar sistemi ve hasta arşiv kayıtlarından tarandı. Karyotip tayini, JAK2 V617F mutasyonu ve/veya JAK2 ekzon 12, MPL W515L/K mutasyonları gibi genetik testlere ilişkin bilgiler hasta takip dosyaları veya ilgili tıbbi biyoloji ve genetik bölümlerinden elde edilmiştir. Sağ kalım süreleri hasta takip dosyalarından kaydedildi. Takip dışı kalan hastalarda ise hasta yakınlarından ölüm tarihleri öğrenildi.

Dalak ve karaciğer boyutları için fizik muayene ve batın USG sonuçları birlikte değerlendirildi. Splenomegali sınır değeri 13 cm, masif splenomegali 17 cm ve üstü, hepatomegali sınırı da 16 cm olarak alındı.

Kan değerleri, hem sayısal, hem de eşik değerler kullanılarak düşük, normal, yüksek vb. kategorik gruplara ayrılarak iki ayrı yöntemle yapılmıştır. Hemogram ve kan biyokimyasal değerleri için kabul edilen eşik değerler **Tablo 3.1** ve **3.2**'de verilmiştir.

TABLO 3.1: Hemogram eşik değerleri

Lökosit sayısı (WBC)	Absolu nötrofil sayısı (ANC)	Absolu monosit sayısı (AMC)	Hemoglobin (Hb)	MCV	Trombosit sayısı (Plt)
Lökopeni: <4000/mm ³	Nötropeni: <1500/mm ³	Normal: <1000/mm ³	Ağır anemi: <8 gr/dL;	Mikrositer: <80 fL	Orta-ağır trombopeni: <100.000/mm ³
Normal: ≥4000-10.000/mm ³			Orta dereceli anemi: ≥8-10 gr/dL	Normositer: ≥80-100 fL	Hafif trombopeni: ≥100.000- <150.000/mm ³
Lökositoz : ≥10.000/mm ³	Normal: ≥1500/mm ³	Monositoz: ≥1000/mm ³	Hafif anemi-normal: ≥10 gr/dL	Makrositer: ≥100 fL	Normal: ≥150.000- <400.000/mm ³
					Trombositoz: ≥400.000/mm ³

TABLO 3.2: Kan biyokimyası eşik değerleri

Laktat dehidrogenaz (LDH)	β2 mikroglobulin	Eritrosit sedimentasyon hızı (ESH)	Demir (Fe)	Total demir bağlama Fe kapasitesi (TDBK)	ferritin
Düşük: <135 U/L	Düşük: <900 ng/mL	Normal: <20/sa	Düşük: <50 µg/dL	Düşük: <250 µg/dL	Düşük: <13 ng/mL
Normal: ≥135-243 U/L	Normal: ≥900-2000 ng/mL		Yüksek: ≥20/sa	Normal: ≥50-175 µg/dL	Normal: ≥13-150 ng/mL
Yüksek: ≥243 U/L	Yüksek: ≥2000 ng/mL		Yüksek: ≥175 µg/dL	Yüksek: ≥410 µg/dL	Yüksek: ≥150 ng/mL

Tanı ve takip sırasında alınan biyopsilerle eş zamanlı hemogram değerlerine tüm olgularda ulaşıldı. Tanı biyopsileri sırasında LDH 77, β2 mikroglobulin 28, ESH 61, demir 63, TDBK 61, ferritin 62 hastada bakılmıştı.

Konvansiyonel karyotipleme 39/84 (%46.4) hastada bakılmıştı, 5 olguda metafaz izlenmediğinden sonuçlar 34/84 (%40.5) hastada değerlendirilebildi.

JAK2 V617F mutasyonuna hastaların %61.9'unda (52/84) bakılmıştı (26 PMF-SF, 13 KMML, 6 MDS/MPN-U, 3 MDS-F, 2 aKML, 2 RARS-T). İki PMF-SF, 1 KMML ve 1 MDS-F olgusunda JAK2 ekzon 12 ve MPL W515L/K mutasyonlarına da bakılmıştı.

Takip sırasında gerek tedavi yanıtının gerekse progresyonun değerlendirilmesi için alınan biyopsi ve aspirasyonlar blast ve CD34+ hücre oranlarındaki değişiklikler, AML dönüşümü açısından değerlendirildi. Periferdeki blast oranı ve akım sitometri sonuçları ile

lösemik dönüşüm saptanan olgular da kaydedildi. Tedaviler ve allojeneik kemik iliği transplantasyonu yapılan hastalar kaydedildi.

Yaşam süreleri hesaplanırken, takip süresi, tanı tarihi başlangıç alınarak 01 Eylül 2015 tarihinde sonlandırıldı. Bu tarihler arasında sağ ve kaybedilmiş olan hastalar kaydedilerek yaşam süreleri ay olarak hesaplandı.

3.3.MORFOLOJİK DEĞERLENDİRME:

Seksen dört olguya ait 128 kemik iliği aspirasyonu ve 129 kemik iliği biyopsisinin tamamı arşivden çıkarıldı. Geçmiş yıllara ait lamlardan zaman içinde boyası solan, değerlendirmeye elverişli olmayan lamalar soldurulduktan sonra hematoksil-eozin (H&E), gümüşleme ve Prusya mavisi histokimyasal boyaları ile boyandı. İmmunohistokimya lamalarında da (*MPO, CD34, CD117, CD68, GlyA, CD3, CD20, CD38, CD138*) aynı şekilde karşıt hematoksil-eozin boyaları yenilendi.

Kemik iliği aspirasyonları selülerite, myeloid/eritroid hücre oranı, myeloid, eritroid ve megakaryositik dizilerde olgunlaşma ve sola kayma, displazi, ring sideroblastlar ve blast sayısı açısından değerlendirildi. Blast oranları aspirasyonlarda yüzde (%) olarak düşük (<%5), orta ($\geq$ %5-<%10), yüksek ($\geq$ 10-<%20) şeklinde gruplandırıldı. Yüksek blast oranı olan olgular, kendi içinde yüksek ($\geq$ 10-<%15) ve çok yüksek ($\geq$ %15-<%20) olarak iki gruba daha ayrıldı. Giemsa ve Prusya mavisi (demir) yanı sıra NSE (nonspesifik esteraz), LAP (lökosit alkalin fosfat), ACP (asit fosfat), PAS (periodik asit-Schiff) gibi enzim boyaları da gerektiğinde değerlendirildi. Hücre sayısı azlığı nedeniyle 5 olguda demir skoru ve ring sideroblast varlığı, 36 olguda LAP skoru değerlendirilemedi (demir skoru 79 (%94), LAP skoru 48 (%57.1) olguda istatistiksel analize alınmıştır). Myeloid, eritroid displazi ve megakaryositik dizideki displastik ve proliferatif değişiklik kriterleri **Tablo 3.3**'te özetlenmiştir.

Kemik iliği biyopsisinde selülerite değerlendirilirken, yağ/hücre oranı yüzde olarak hesaplandıktan sonra hasta yaşına göre düzeltildi ve hiper/normo ve hiposelüler olarak 3 grupta değerlendirildi. Myeloid, eritroid ve megakaryositik diziler sırasıyla, olgunlaşma özellikleri, sayısal değerleri ve displazi açısından değerlendirildi. Megakaryositlerdeki artma hafif, fokal belirgin ya da yaygın belirgin olarak kaydedildi (**Resim 3.1 a-f**). Bu değerlendirmeler sırasında H&E boyasına ek olarak immunohistokimya ile myeloid dizi (MPO), monositler (CD68), eritroid dizi (GlyA), megakaryositler (CD61) monoklonal

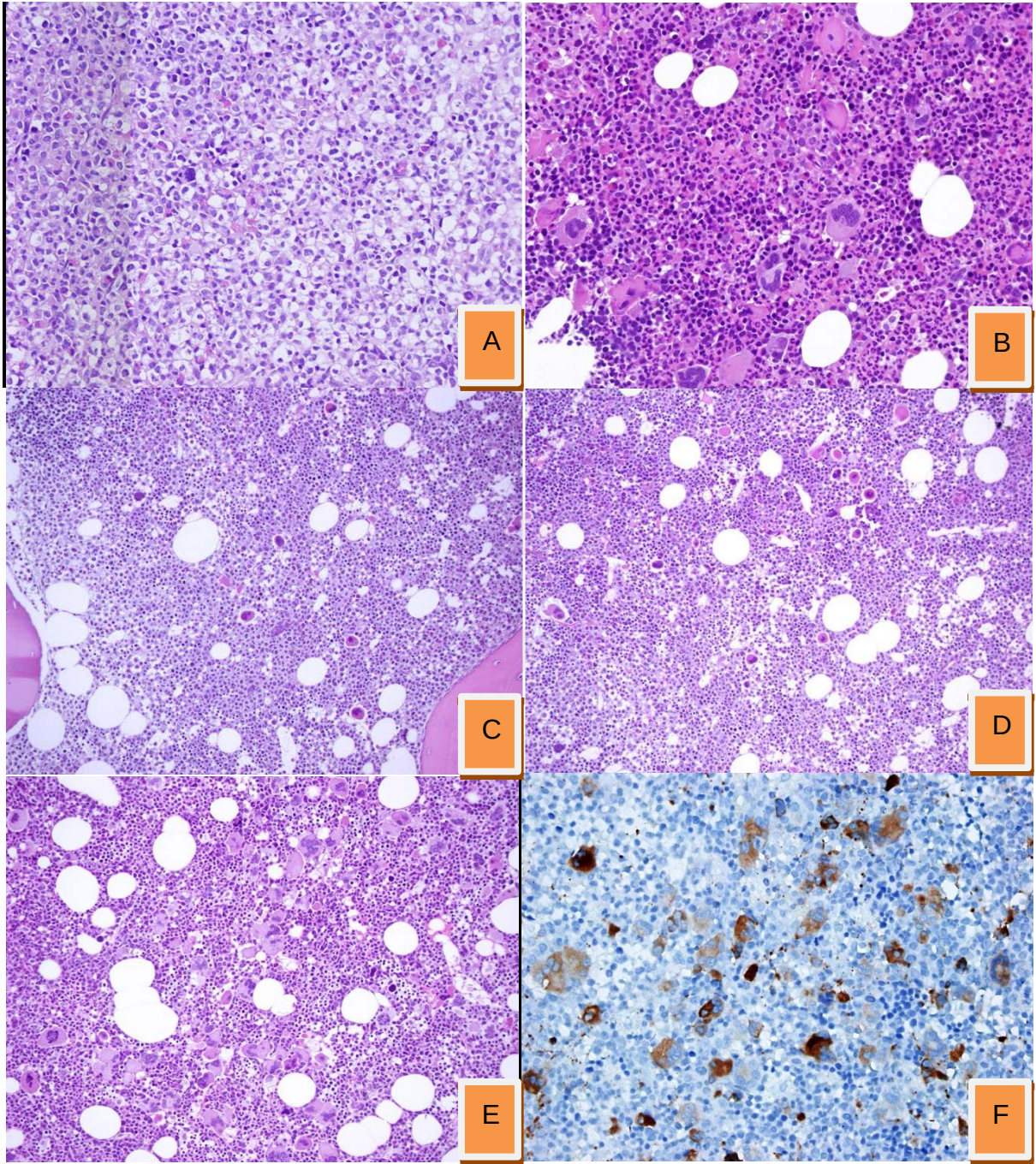
antikorlar yardımı ile daha ayrıntılı incelendi. Biyopside blast oranı morfoloji yanı sıra immunohistokimya ile CD34+ ve CD117+ hücrelerin varlığı ve dağılım paternlerine göre seyrek/dağınık (<%5), küçük kümeler ($\geq$ %5-<%10), yaygın dağınık ve kümeler ($\geq$ %10-<%20) olarak değerlendirildi (**Resim 3.2**).

TABLO 3.3: Eritroid, myeloid displazi ve megakaryositlerde displastik ve proliferatif değişiklik kriterleri (aspirasyon ve biyopsi)

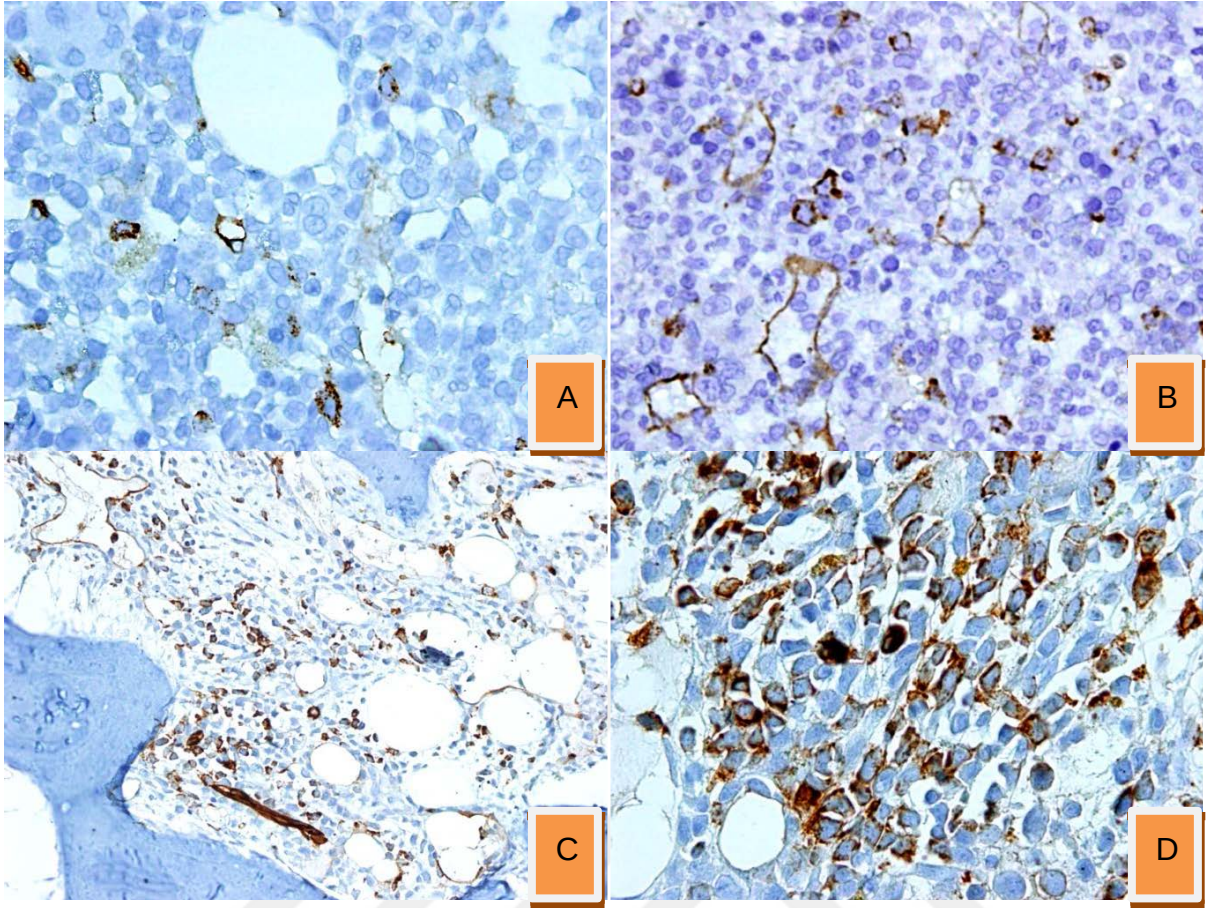
ERİTROİD DİSPLAZİ	MYELOİD DİSPLAZİ	MEGAKARYOSİTLERDE GÖRÜLEN DEĞİŞİKLİKLER	
		DİSPLASTİK DEĞİŞİKLİKLER	PROLİFERATİF DEĞİŞİKLİKLER
Nükleusta tomurcuklanma İnternükleer köprüleşme Karyoreksis Multipl veya hiperlobe çekirdek Çekirdekte megaloblastik değişiklikler Çekirdek/sitoplazma olgunlaşma uyumsuzluğu Sitoplazmada vakuolizasyon PAS pozitifliği Ring sideroblast varlığı	Küçük veya anormal büyük formlar Hipolobe çekirdek (psödo Pelger-Huët, pelgeroid) Düzensiz hipersegmentasyon Hipo veya agranüler formlar Psödo Chediak-Higashi granülleri Auer rodları	Hipo/monolobe çekirdek Multipl çekirdek Mikromegakaryosit	Büyük/dev megakaryosit Hiperkromatik çekirdek Pleomorfizm Çekirdekte hipolobasyon veya derin çentiklenme (bulböz, bulut, balon (PMF)/ geyik boynuzu (ET) çekirdek) Çıplak çekirdek Çekirdek/sitoplazma olgunlaşma uyumsuzluğu

Megakaryosit morfolojisi; normal, displastik, proliferatif olarak değerlendirildi. Her iki megakaryosit morfolojisini birlikte barındıran olgularda megakaryositler, displastik ağırlıklı ve proliferatif ağırlıklı mikst morfoloji şeklinde gruplandırıldı (**Resim 3.3 a-c**). Mikromegakaryositler immunohistokimyasal olarak anti CD61 antikoruyla boyanan lamlarda değerlendirildi (**Resim 3.1 f**). Megakaryositlerin kümeleşme eğilimi olup olmaması, varsa sıkı küme, gevşek küme, her iki tip kümeleşmenin de olması durumunda sıkı ağırlıklı ve gevşek ağırlıklı mikst tip kümeleşme şeklinde 5 kategoriye ayrıldı (**Resim 3.4 a-d**). Megakaryositlerde aberan CD34 ekspresyonu olan olgular da kaydedildi (**Resim 3.5 a**).

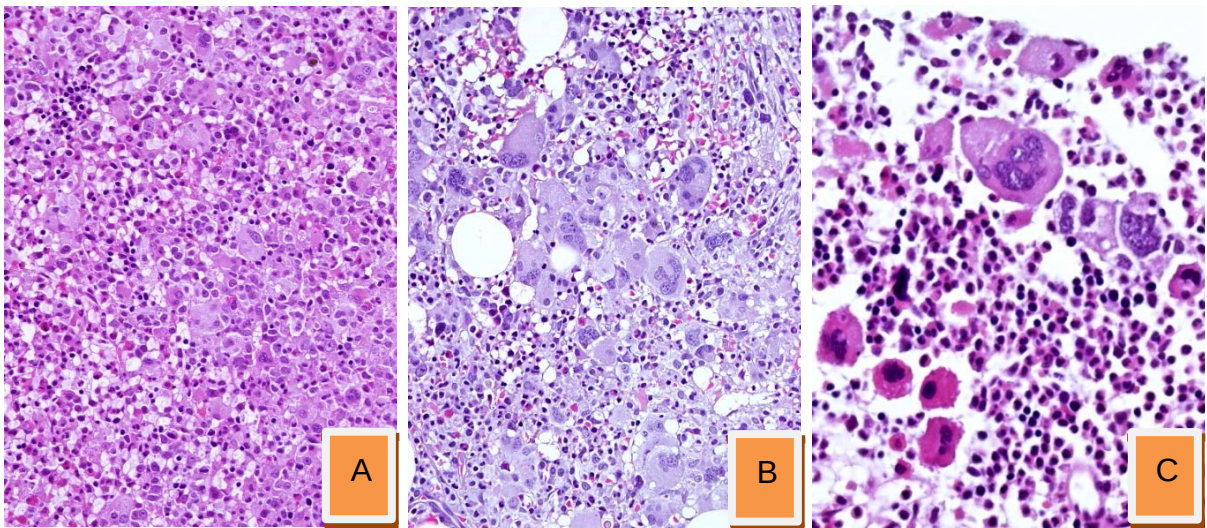
Biyopsilerde, stromal değişiklikler olarak lenfosit, plazma ve mast hücre artışı ile lenfoid nodül varlığına bakıldı. Lenfoid nodül (**Resim 3.5 b**) ve lenfositler CD3/CD5 ve CD20, plazma hücreleri CD38/CD138, mast hücreleri CD117 ve/veya triptaz antikorları kullanılarak immunohistokimyasal olarak, eozinofil artışı H&E kesitlerinden değerlendirildi. Depo demiri Prusya mavisi ile skorlandı.



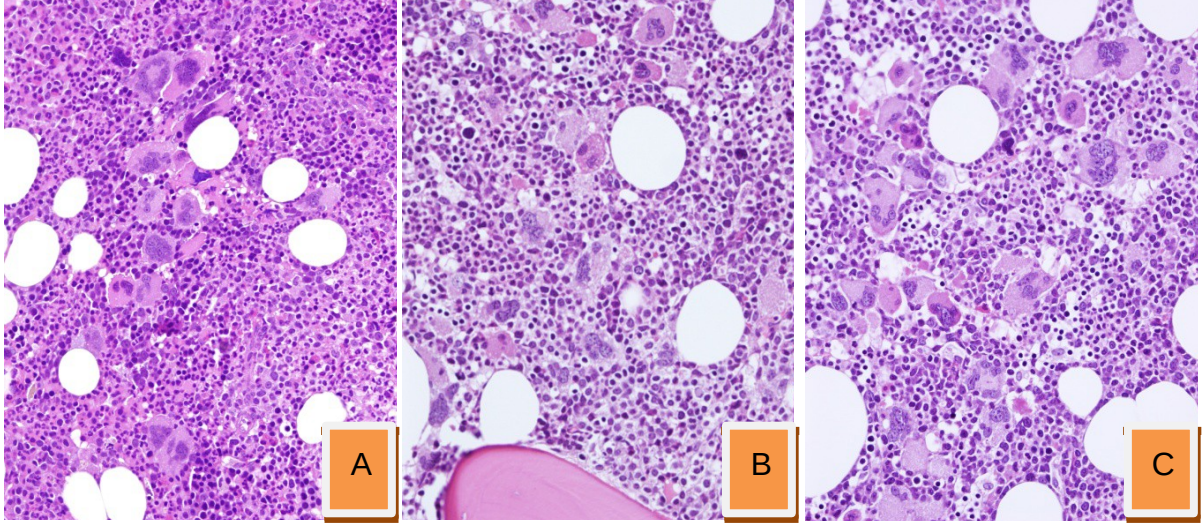
RESİM 3.1: **A)** Myeloid hiperplazi (X400), **B)** Eritroid hiperplazi (X400), Megakaryositlerde; **C)** hafif artma (X200), **D)** fokal belirgin artma (X200), **E)** yaygın belirgin artma (X200), **F)** CD61 ile megakaryositlerde yaygın artma (X1000)



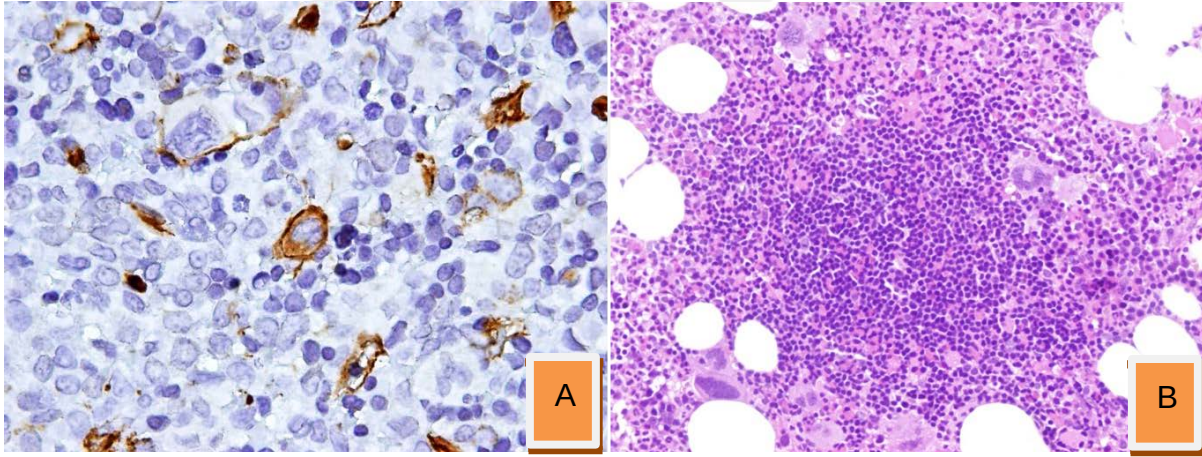
RESİM 3.2: Biyopside; **A)** dağınık paternde CD34+ hücreler; $<5\%$ (X1000), **B)** küçük küme ve dağınık paternde CD34+ hücreler, $\geq 5\%$ - $<10\%$ (X1000), **C)** küme ve yaygın dağınık paternde CD34+ hücreler, $\geq 10\%$ - $<15\%$ (X400), **D)** büyük küme ve yaygın dağınık paternde CD34+ hücreler, $\geq 15\%$ - $<20\%$ (X1000)



RESİM 3.3: Megakaryositlerde; **A)** Displastik morfoloji (X400), **B)** Proliferatif morfoloji (X400), **C)** Displastik+proliferatif morfoloji (x400)



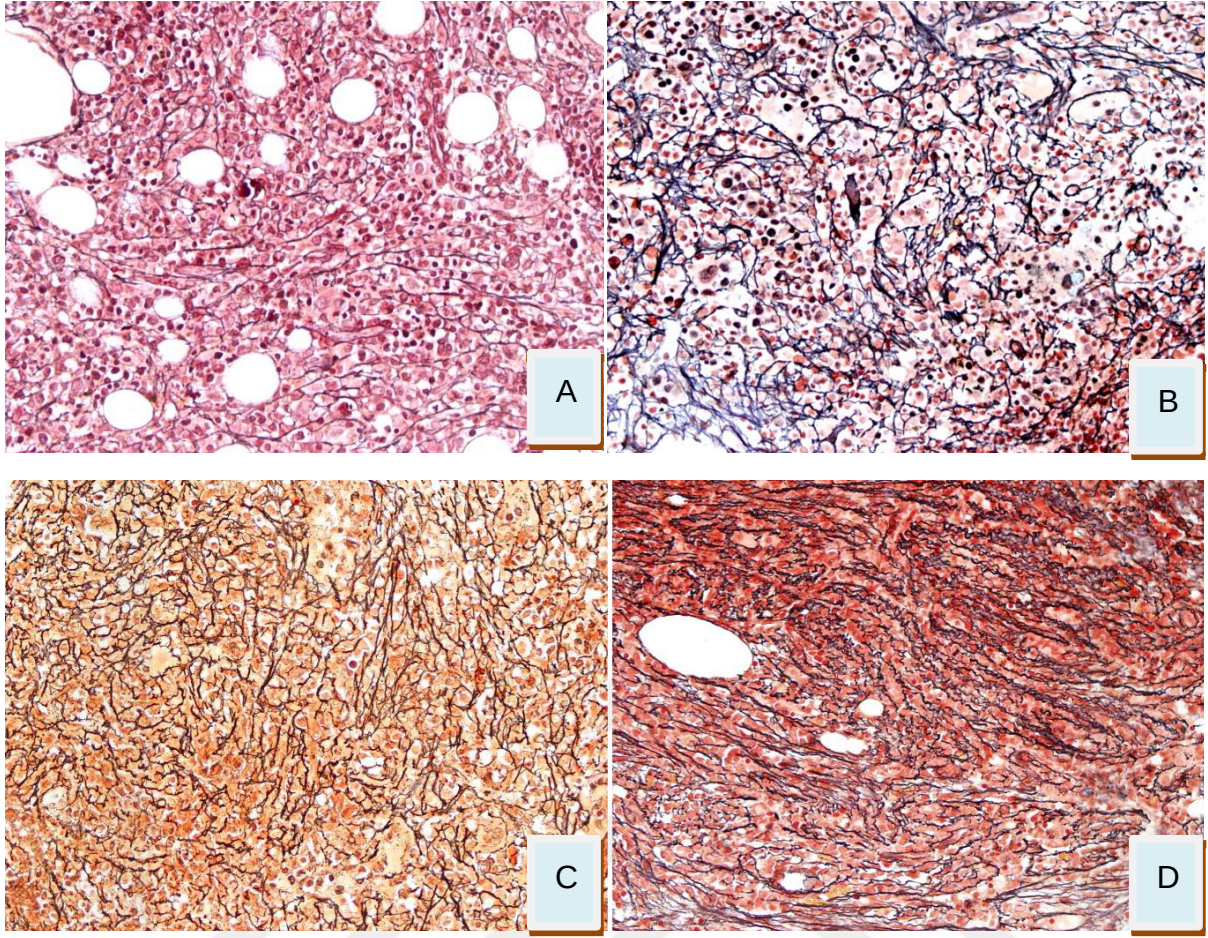
RESİM 3.4: Megakaryositlerde; **A)** Sıkı kümeleşme (x400), **B)** Gevşek kümeleşme (x400), **C)** Sıkı+gevşek kümeleşme (x400)



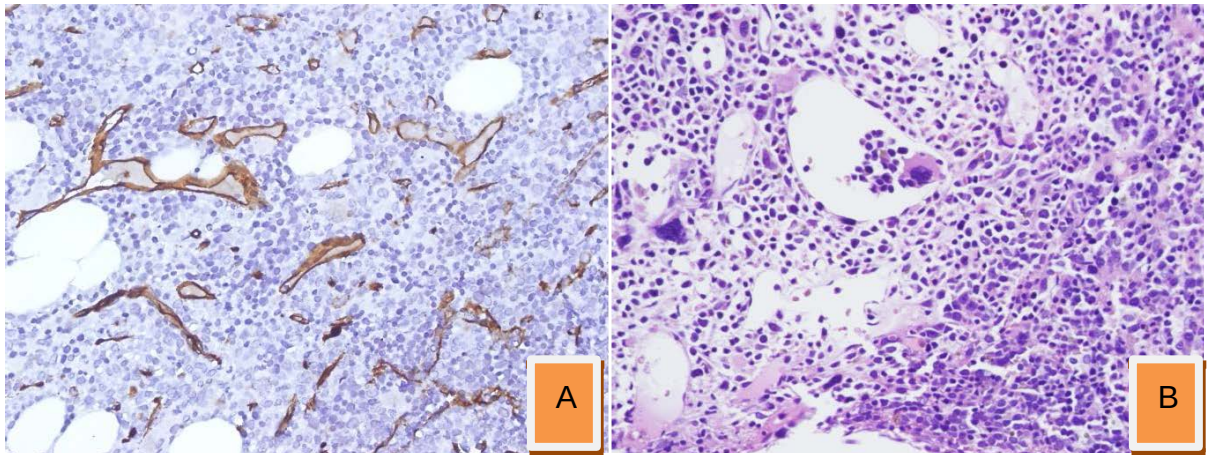
RESİM 3.5: **A)** Megakaryositlerde aberan CD34 ekspresyonu (X1000), **B)** İnterstisyel lenfoid nodül (x400)

Kemik iliği fibrozisi gümüşleme boyası ile Avrupa konsensus ve Manoharan fibrozis sınıflamalarına göre ayrı ayrı derecelendirildi (**Resim 3.6 a-d**). Anjiogeneizde artma (**Resim 3.7 a**); immunohistokimyasal olarak CD34 antikoruyla boyanan damar sayılarına göre; yok/hafif/orta/ağır, sinuzal hematopoez (**Resim 3.7 b**); hematoxilen-eozin ve CD34 boyalı kesitlerde morfolojik olarak var/yok şeklinde değerlendirildi.

Takip biyopsilerinde ilk biyopsilerine göre blast oranındaki artışlar, tip değişimi olan KMML olguları ve lösemik dönüşüm görülen olgular (blast oranı $\geq$ %20) kaydedildi.



RESİM 3.6: Manoharan (M) ve Avrupa (A) sınıflamalarına göre; **A)** M: Grade 1, A: Grade 1 (X400), **B)** M: Grade 2, A: Grade 2 (X400), **C)** M: Grade 3, A: Grade 2 (X400), **D)** M: Grade 4, A: Grade 3 (X400) fibrozis



RESİM 3.7: **A)** CD34 ile belirgin anjiogenez artışı (X400), **B)** Sinuzal hematopoez (X400)

Tanı grupları, klinik ve morfolojik veriler bir arada değerlendirilerek DSÖ 2008 kriterlerine göre belirlendi. Daha önce PMF-selüler faz tanısı konulan 3 hastada tanı MDS-F, KMML ve MDS/MPN-U olarak değiştirildi. Böylece tanı gruplarının son dağılımı MDS-F (11 hasta), KMML (23 hasta; displastik 15, proliferatif 8), MDS/MPN-U (17 hasta), aKML (2 hasta), RARS-T (2 hasta) ve PMF-SF (29 hasta) şeklindedir.

3.4.ASXL1 GEN MUTASYONLARI VE ASXL1 PROTEİN EKSPRESYONUNUN DEĞERLENDİRİLMESİ:

ASXL1 geninin (ENSG00000171456) protein kodlayan 8 transkripti mevcuttur. Bunlar içinde en uzun olan ASXL1-203 (ENST00000613218) isimli transkript çalışma için seçilmiştir. Yedi bin otuz sekiz baz çifti içeren bu transkript, 1541 aminoasitlik bir protein (ENSP00000480487) sentezlemektedir. On iki ekzon içeren bu transkriptin tanımlanmış 1786 varyantı vardır.

Çalışmamızda ASXL1 geninde görülen değişiklikler iki ayrı yöntemle araştırılmıştır. İlk yöntem altın standart olan Sanger dizi analizi iken diğer yöntem çok daha ucuz ve kolay uygulanabilir olan immunohistokimya'dır.

3.4.1. Sanger dizi analizi:

Dizi analizi için izlenen aşamalar sırasıyla DNA izolasyonu, DNA yoğunluğu ve kalitesinin ölçümü, polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile hedef gen bölgesinin çoğaltılması, elde edilen ürünün saflaştırılması ve Sanger dizileme cihazında dizi analizidir.

3.4.1.1. Parafine gömülü bloklardan DNA izolasyonu:

Kemik iliği biyopsilerine ait parafine gömülü bloklardan yarı steril koşullarda elde edilen 5-10 µm kalınlığında 8-10 kesit, 1.5 ml'lik eppendorf tüplere aktarıldıktan sonra deparafinizasyon aşaması için üzerlerine 1 ml moleküler grade ksilen eklenerek maksimum hızda (14800 rpm) 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant kısmı atılıp peletin üzerine yeniden 1 ml ksilen eklenerek bir kez daha santrifüj tekrarlandı. Ardından ksileni uzaklaştırmak için 1 ml moleküler grade absolu alkol eklenip maksimum hızda 5 dakika santrifüj edilerek süpernatant kısmı atılıp bu aşama bir kez daha tekrarlandı. Alkol tamamen çekilip atıldıktan sonra dokular kurumaları için 37°C sıcak bloğa bırakılıp 10 dakikada bir kontrol edilerek yaklaşık yarım saat sonra kuruyan dokular bloktan alındı. Ardından Roche FFPE kit kullanılarak izolasyon işlemine geçildi.

Kuruyan dokuların üzerlerine 180 µL doku lizis tamponu ve 20 µL proteinaz K eklenerek 30 saniye vortekslenip 1 saat 56°C'de 600 rpm hızda karıştırılarak inkübe edildi. Parçalanmış lizat berraklaşınca 90°C'deki sıcak blokta 600 rpm hızda karıştırılarak 1 saat daha inkübasyon edilerek 15-25°C'ye kadar soğumaya bırakılıp 200 µL bağlayıcı tampon eklenerek 3-4 kez pipetleyip homojen olana kadar karıştırıldı ve 15 dakika inkübasyona bırakıldı. Sonraki aşamada üzerine 100 µL isopropanol eklenerek birkaç kez karıştırılıp atık tüplerinin içine yerleştirilmiş filtrelili tüplere aktarıldı. 8000g'de 1 dakika santrifüj edildikten sonra atık tüplerinde biriken sıvı uzaklaştırılıp 500 µl yıkama tamponu I eklendi ve 8000 g'de 1 dakika santrifüj edilip atık tüplerinde biriken sıvı uzaklaştırıldı. Aynı işlem 2 kez 500 µl yıkama tamponu II ile tekrarlanıp 1 dakika 16000 g'de santrifüj edilip atık tüpleri atıldı. Filtrelili tüpler 1.5ml'lik steril, kapaklı, DNaz/RNaz içermeyen reaksiyon tüplerine konularak üzerlerine 50 µl elution tamponu eklenip oda sıcaklığında 10 dakika tamponun filtreye nüfuz etmesi beklendi. 8000 g'de 1 dakika santrifüj sonunda izole edilen DNA tüpe aktarıldı.

3.4.1.2.DNA yoğunluk ve saflığının ölçümü:

İzole edilen DNA'nın yoğunluk ve saflık tayini, Nanodrop 2000c spektrofotometre ile gerçekleştirildi (Thermo Scientific, USA). Spektrofotometrede 260 nm ve 280 nm dalga boylarında yapılan ölçümlerle DNA'nın saflığı ve yoğunluğu belirlendi. Elde edilen DNA çalışma yapılına kadar kısa dönem için +4°C'de saklandı.

3.4.1.3.Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR):

Elde edilen DNA'lardan ön denemeler için farklı konsantrasyonlarda 2 örnek seçilip hedef gen bölgelerini çoğaltmak için PZR işlemine alındı. On ikinci ekzon ve 3' UTR (kodlama yapmayan bölge) bölgesini çoğaltmak için daha önce Gelsi-Boyer ve arkadaşlarının (208) tasarladığı 6 adet primer çifti kullanıldı. Primerler **Tablo 3.4'**te verilmiştir.

PZR reaksiyonu için primerler önceden sulandırılarak 10 pmol/µl yoğunluğa getirildi. PZR, taq polimerazın üretici firmasının önerisiyle 12.5 µl'lik iki ayrı karışım elde edildikten sonra bunların birleştirilmesiyle toplam 25 µl olacak şekilde hazırlandı. Kitin içinde yazdığı gibi ileri ve geri primerler 0.75'er µl, dNTP 0.5 µL, taq polimeraz 0.3 µL, tampon çözeltisi 2.5 µL olmak üzere, DNA µL'de 50 ng olacak şekilde, MgCl₂ dışında total hacmi 25 µL'ye tamamlayacak kadar dH₂O konulmuştur. MgCl₂ düzeyi 1.5-2.5 µl arasında değişecek şekilde 3 farklı kombinasyonda, literatürde bildirilen bağlanma sıcaklıklarından başlayarak A-T, G-C nükleotid sayılarının hesaplanmasıyla elde edilen muhtemel bağlanma sıcaklıklarını da

içerecek şekilde 55-67°C arasında 7 farklı sıcaklıkta Biorad T100 PZR cihazında gradient PZR kuruldu.

TABLO 3.4: Kullanılan primer çiftleri

Primer çiftleri	Primer dizisi- İLERİ 5'-3'	Primer dizisi- GERİ 5'-3'	PZR ürününün uzunluğu (bp)
12. ekzon 1. primer	AGGTCAGATCACCCAGTCAGTT	TAGCCCATCTGTGAGTCCAAGTGT	561
12. ekzon 2. primer	AGAGGACCTGCCTTCTCTGAGAAA	TTCGATGGGATGGGTATCCAATGC	558
12. ekzon 3. primer	ACTTGAAAACCAAGGCTCTCGT	GCAACCATCCCATCTGTCCTTGTA	532
12. ekzon 4. primer	GGTGGACAAGGATGAGAAACCCAA	TGTCCTGTGACATAGCACGGACTT	674
12. ekzon 5. primer	TGGATTCCAAAGAGCAGTTCTCTTC	CATGACAAAGGGCATCCCTTCCAA	533
12. ekzon 6. primer	ACAGGAAAGCTACTGGGCATAGTC	CAAGAGTGCTCCTGCCTAAAGAGT	593

Elde edilen PZR ürünlerinin kontrolü için %2'lik agaroz jel hazırlanarak 2.5 µl PZR ürünü 0.5 µl yükleme tamponu ile karıştırılarak jeldeki kuyulara yüklendikten sonra ilk kuyuya yüklenen 3 µl 100 bp'lik DNA markeri ile birlikte elektroforezde yürütüldü ve jel üzerindeki bantlar UV ışık altında incelendi. Bu işlem sonrası beklenen PZR ürünleri elde edilemedi. DNA yoğunluğu ve taq polimeraz miktarı değiştirilerek çok kez tekrar denemesine rağmen PZR ürünü elde edilemeyince izole edilen DNA'lar %0.6'lık agaroz jelde yürütüldü. DNA'lar, UV ışık altında jelde smear olarak izlendi ve kemik iliği biyopsilerine ait parafin bloklardan elde edilen bu DNA örneklerinin çok küçük parçalar halinde kırık olduğu görüldü. Bu kırılmaların %10'luk formik asitte bekletilerek yapılan dekalsifikasyon işlemi sırasında oluştuğu düşünüldü. Kırıklı DNA'ların kurtarılma ihtimalleri Adli Tıp Kurumu, DETAM, İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Boğaziçi Genetik bölümlerine danışıldı, ancak Sanger dizilemede her baz çiftinin net okunması için kusursuz dizi eldesi gerektiğinden parafin blokların kullanımından vazgeçilip DNA izolasyonunun kemik iliği aspirasyon lamlarından kazıma yöntemiyle denemesine karar verildi.

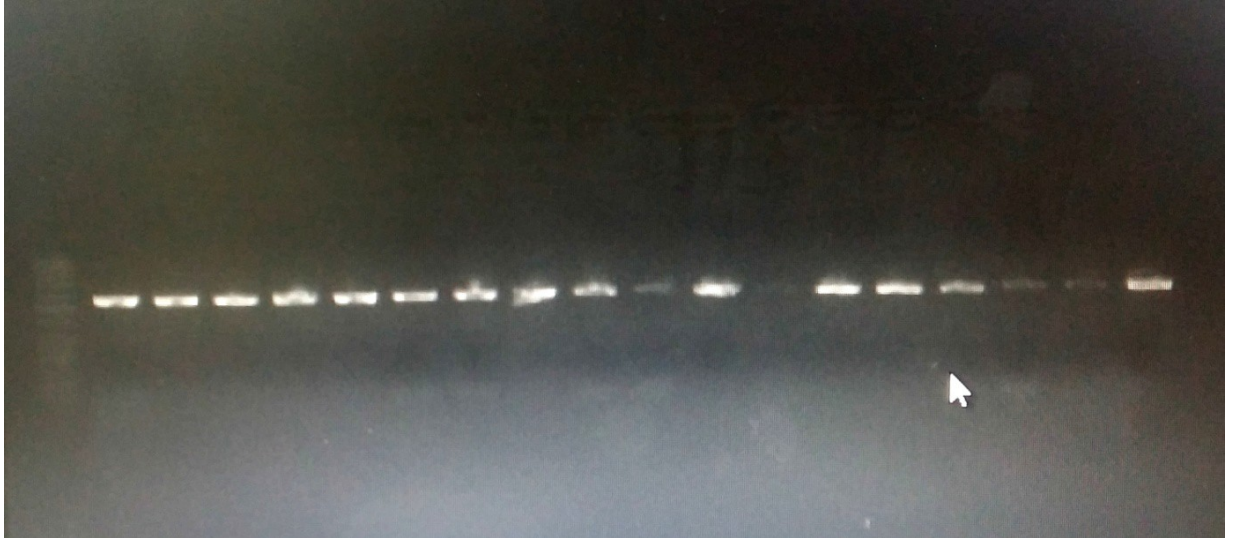
3.4.1.4. Kemik iliği aspirasyon lamlarından DNA izolasyonu ve saflık ölçümü:

Arşivden çıkarılan aspirasyon lamaları içinden boya yapılmamış olanlar, yoksa Giemsa veya diğer enzim boyaları uygulanmış 2-3 lam DNA ekstraksiyonu için seçildi. Boya varsa

soldurulduktan sonra lamalar dik pozisyonda kurutuldu. Kuruyan lamlardaki hücreler, 180 µL doku lizis tamponu ile kazınarak 1,5 ml'lik eppendorf tüplere aktarılıp üzerlerine 70 µL proteinaz K eklenerek 30 saniye vortekslendi ve 1 saat 56°C'de 600 rpm hızda karıştırılarak inkübe edildi. Ardından, 90°C'de 600 rpm hızda inkübasyon basamağı atlanarak aynı DNA izolasyon prosedürüne devam edildi. Saflık ölçümü sonrası örnekler, çalışma yapılana kadar kısa dönem için +4°C'de, uzun dönem için -20°C'de saklandı.

3.4.1.5. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR):

Hücre kazıma yoluyla elde edilen DNA'lardan farklı konsantrasyonlarda 2 örnek seçilip hedef gen bölgelerini çoğaltmak için PZR işlemine alınarak aynı koşullarda gradient PZR kuruldu. Kontrol amacıyla Sanger dizilemede başarılı olunmuş, bir DNA örneği de eklendi. Uygun bağlanma sıcaklıklarında hem kontrol, hem de hasta DNA'larından PZR ürünü elde edilebildi. Elde edilen PZR ürünleri kullanılan primere göre 532-674 bp arasında değişen boyutu ve yoğunluğu kontrol edilip jel görüntüleme sistemine kaydedildi. PZR ürünlerinin UV ışık altında jel görüntüsüne ait örnek **Resim 3.8**'de verilmiştir. Bantın en parlak olduğu bağlanma sıcaklığı ve MgCl₂ yoğunluğu saptandıktan sonra optimum PZR koşulları bu banta göre belirlendi. PZR karışım içeriği **Tablo 3.5**'te, PZR koşulları **Tablo 3.6**'da verilmiştir. Gradient PZR dışındaki PZR çalışmaları, Techne 3200 cihazında gerçekleştirildi.



RESİM 3.8: PZR ürünlerinin UV ışık altında jel görüntüsü

TABLO 3.5: PZR karışımı

1.KARIŞIM	50-100 ng/ µl DNA (genelde 1-2 µl)	0.5 µl dNTP	0.75 µl ileri primer	0.75 µl geri primer	Toplam hacmi 12.5 µl'ye tamamlayacak kadar dH ₂ O	TOPLAM HACİM: 25 µl
2. KARIŞIM	2 µl MgCl ₂	0.3 µl taq polimeraz (ROCHE expand high fidelity PCR system)	2.5 µl tampon çözeltisi	7.7 µl dH ₂ O		

TABLO 3.6: PZR koşulları

94°C	5 dk	İlk denatürasyon	
94°C	15 sn	Denatürasyon	35 döngü
65°C(1-4. Primerler için) 63°C (5-6. Primerler için)	30 sn	Bağlanma	
72°C	45 sn	Uzama	
72°C	10 dk	Son uzama	
+4°C	∞		

Kemik iliği aspirasyon lamlarından DNA elde edilmesi ve DNA'ların %0.6'lık agaroz jelde yürütülmesinde sorun olmamasına ve koşullar değiştirilerek defalarca çalışılmasına karşın 38 örnekte PZR ürünü elde edilemedi. Bunun nedeni olarak önceden uygulanmış olan histokimyasal boyaların, hassas olan PZR koşullarını olumsuz etkilemesine ve polimeraz zincir reaksiyonunu inhibe etmesi düşünüldü. PZR ürünü elde edilen 46 örnek bir sonraki basamak olan saflaştırma evresine alındı.

3.4.1.6. Saflaştırma işlemi:

Bu işlem için "ROCHE high pure" saflaştırma kiti kullanıldı. PZR ürünü üzerine 100 µl bağlayıcı tampon çözeltisi eklenerek iyice pipetlenip kolona aktarıldıktan sonra maksimum hızda (14800 rpm) 1 dakika santrifüj edildi. Biriken atık kısım atılarak kolon yeniden toplama tüpüne kondu ve üzerine 500 µl yıkama tamponu eklendi. Maksimum hızda 1 dakika daha santrifüj edilip toplama tüpünde biriken atık yeniden uzaklaştırılarak kolon yine toplama tüpüne alındı ve 200 µl yıkama tamponu eklenip maksimum hızda 3 dakika daha santrifüj edilip 1.5 ml'lik eppendorf tüpe aktarıldı. 50 -100 µl elution tamponu eklenip maksimum hızda 1 dakika santrifüj sonrası temizlenmiş amplikonlar tüpe aktarıldı. Saflaştırma sonrası temizlenen üründen alınan 2.5 µl örnek 0.5 µl yükleme tamponu ile karıştırılıp %2'lik agaroz jele yüklenerek elektroforezde yürütüldü. Yoğunluğu kontrol edilerek jel görüntüleme sistemine kayıt edildi ve uygun bulunan örnekler, sekans PZR işlemine alındı.

3.4.1.7. Sekans polimeraz zincir reaksiyonu (Sekans PZR):

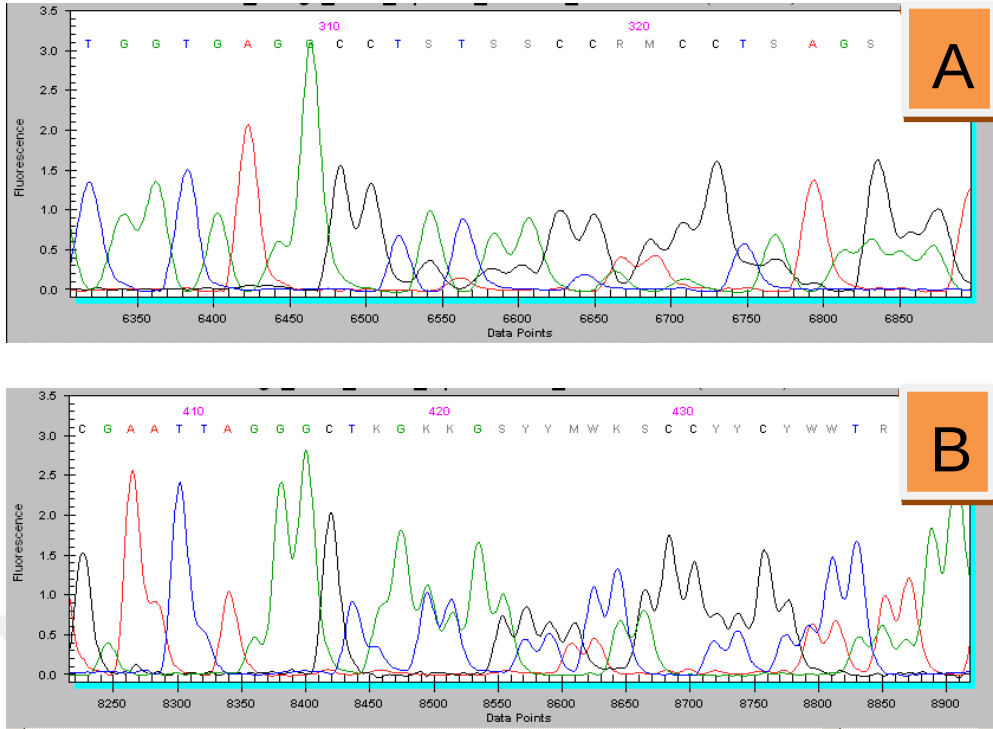
Sekans PZR ampikon eldesi için değil, önceki PZR'ndan alınan ve temizlenen ampikonlardan DNA dizisi oluşturmak ve oluşan diziyi okumak için kullanılan bir işlem olduğundan bağlandığı noktada uzamayı sonlandıran bir OH grubu eksik, farklı renkte floresan boya içeren nükleotidler kullanıldı.

10 µL PZR grade saf su, 1 µL tek yönlü primer (ileri ya da geri), 1 µL (50-100 ng) hedef DNA, 8 µL master miks (DTCS Quick start kit) kullanılarak toplam 20 µL reaksiyon karışımı oluşturularak uygun PZR koşullarında amplifiye edilip oluşan ürün, temizleme işlemine tabi tutuldu.

3.4.1.8. Etanol presipitasyonu ve örneklerin cihaza yüklenmesi

Temizlenmiş sekans PZR ürününe 2 µL 3M sodyum asetat, 2 µL 0.1M EDTA ve 1 µL glikojen karışımı ile elde edilen STOP solüsyondan 5 µL eklenerek karıştırıldı ve temiz 1.5 ml'lik eppendorf tüplere aktarıldı. Karışım üzerine 60 µL %95'lik soğuk alkol eklenip 4°C'ye ayarlanmış soğutmalı santrifüjde 10 dakika santrifüjden sonra süpernatant uzaklaştırıldı. Pelet üzerine 200 µL %70'lik soğuk alkol eklenip 4 dakika santrifüj edilerek aynı işlem tekrarlandı. Alkol, pelete zarar vermeden, pipetle tamamen uzaklaştırıldıktan sonra 37°C'ye ayarlanan ısıtıcı blokta 5-10 dakika kurumaya bırakıldı. Kuruduktan sonra 40 µL SLS (örnek yükleme çözeltisi) kullanılarak 20-25 defa yavaşça pipetleme yapılarak pelet çözündürülüp cihaza yüklenmeye hazır hale getirildi. Örnekler, 96 wellplate'e yüklendikten sonra başka bir 96 wellplate'e ayrıştırma tamponu konarak her iki plate de cihaza yüklendi. Beckman Coulter GeXP sekans cihazı için okuma şablonu oluşturulduktan sonra başlatıldı. Cihaz okumayı sonlandırdığında kaydedilen veriler referans diziyi kıyaslanarak farklı gen dizilimleri olup olmadığı incelendi. Dizilerin kesintili elde edildiği durumlarda, kesintinin yerine göre ileri veya geri primerler tercih edilerek sekans PZR işleminden itibaren basamaklar tekrar edildi.

Saptanan genetik değişiklikler, cancer.sanger.ac.uk/cosmic ve www.ensembl.org veri tabanlarında tarandı, cosmic ya da rs kodları olanlar belirlenerek PolyPhen-2 programıyla muhtemel hastalık yapma durumları incelendi. İki frameshift, 6 missense, 1 sessiz mutasyon ve 3'UTR'de 2 genetik değişiklik **ilk kez** bu çalışmada tanımlandı (**Resim 3.9 a-d**).



RESİM 3.9: İlk kez çalışmamızda saptanan frameshift (çerçeve kayması) mutasyonlar; **A)** *c.2015_2019del (p.C672SfsX3)*, **B)** *c.2604_2604delT (p.G869VfsX7)*

3.4.2. İmmunohistokimya (İHK):

Tanı ve izleme sırasında alınan tüm kemik iliği biyopsilerinde ASXL1 antikoru ile immunohistokimyasal boyama yapıldı ve nükleer boyanma olup olmadığı ışık mikroskopunda değerlendirildi. Tüm kemik iliği biyopsileri değerlendirilerek ASXL1 için boyanmanın hangi aşamada görüldüğü kaydedildi.

Kemik iliği biyopsi parafin bloklarından 2’şer mikronluk kesitler pozitif şarjlı lama alındı. İmmunohistokimyasal boyama için otomatik boyama cihazı (Ventana Medical Systems, Tuscon, AZ, USA) ve indirekt avidin biotin peroksidaz kit kullanıldı. İki mikronluk kesitler gece boyunca 40°C ayarlı etüvde bekletildikten sonra deparafinize edilip azalan oranlarda alkol solüsyonları ve distile sudan geçirilerek hidrate edilmiştir. Antijeni geri alma (retrieval) işlemi için 10 mmol/L’lik tamponlu sitrat çözeltisinde 30 dakika 36 °C’de bekletildi. Ticari olarak elde edilen ASXL1 antikoru (Elabscience Biotechnology co., ltd) damlatılarak 1 saat beklendi ve yıkama işlemleri sonrası %0.1 hematoksin ile karşıt boyama yapıldı. Kontrol olarak testis dokusu kullanıldı.

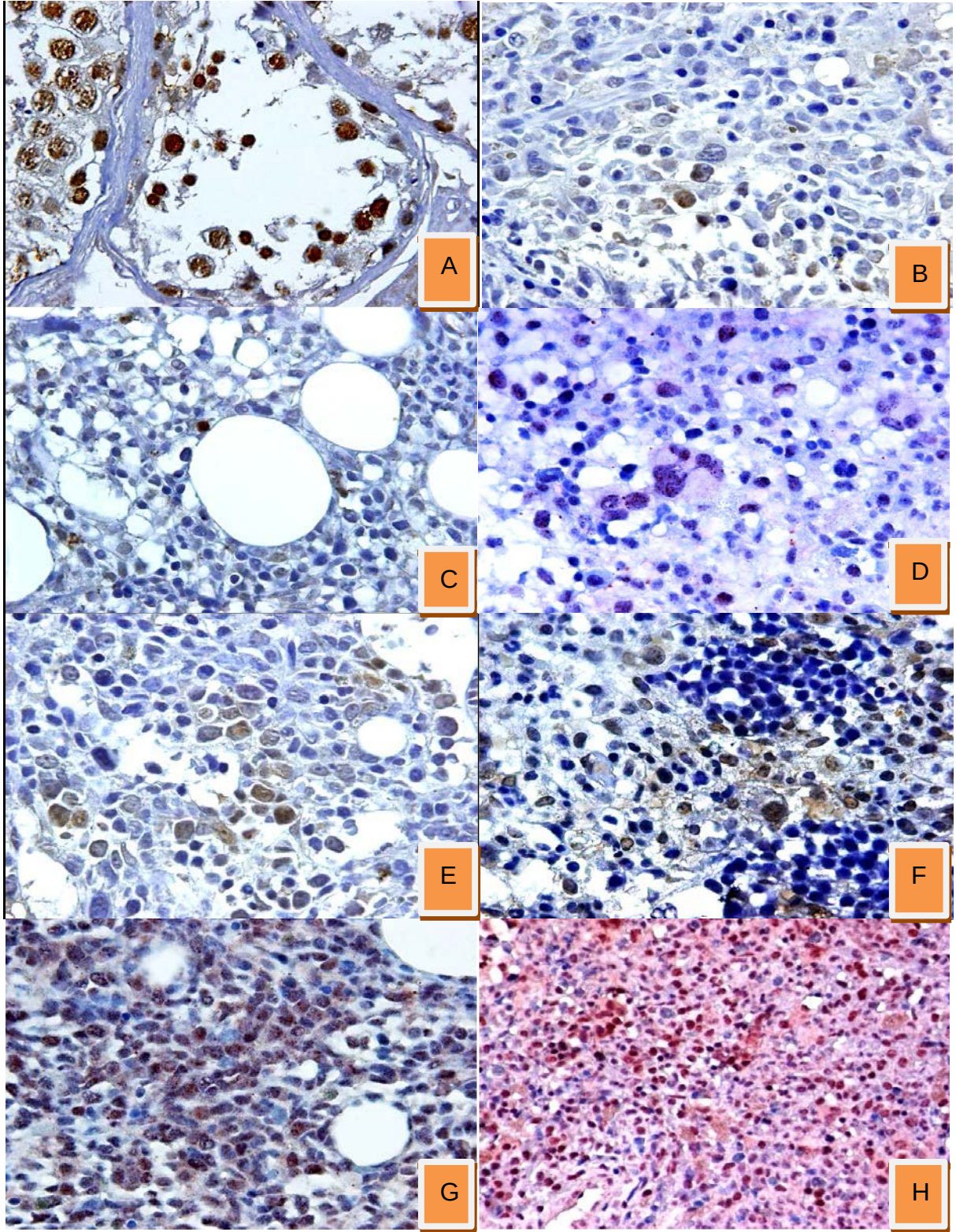
ASXL1 ile nükleer boyanma saptandığında boyanmanın, zayıf ya da kuvvetli, fokal ya da yaygın oluşu kaydedilerek 0’dan 3’e kadar bir skorelama sistemi oluşturuldu. ASXL1

negatif olgular skor 0, fokal zayıf nükleer boyanma izlenenler skor 1, fokal kuvvetli ve yaygın zayıf boyanma izlenenler skor 2, yaygın kuvvetli nükleer boyanma izlenenler ise skor 3 olarak değerlendirildi. Skor 0 ve 1, ASXL1 mutasyonu için negatif, skor 2 ve 3, pozitif kabul edildi **(Resim 3.10 a-h)**.

3.5.İSTATİSTİK:

Kaydedilen tüm hasta verileri SPSS 21.0 (SPSS Inc.) istatistik programına yüklendi. İstatistiksel analizde kullanılan yaş, hematolojik parametreler, splenomegali ve hepatomegali varlığı, displazi, blast oranı ve diğer morfolojik parametreler hastanın ilk başvurusunda tanı sırasındaki verilerdir.

Cinsiyet, klinik, morfolojik ve genetik verilerin kategorik gruplandırıldığı analizlerde “Pearson’s ki-kare testi” ve “Fisher’s exact testi” kullanıldı. Yaş, selülerite ve klinik verilerin sayısal değerlerinin normal dağılıma uygun olup olmadığı “Kolmogorov-Smirnov testi” ile hesaplandı. Normal dağılım gösteren (parametrik) iki grup arasındaki farklılıklar “Student T testi” ile, üç ve daha fazla grup arasındaki farklılıklar “Anova tek yönlü varyans analizi” kullanılarak değerlendirildi. Parametrik olmayan iki grup arasındaki farklılıklar “Mann-Whitney U testi”, üç veya daha fazla grup arasındaki farklılıklar ise “Kruskal-Wallis testi” ile yapıldı. Analizler 84 hastayı kapsayan tüm grup için yapıldıktan sonra, displastik özelliklerin baskın olduğu fibrozisle birlikte MDS, KMML ve MDS/MPN-U grupları birleştirilerek proliferatif özelliklere sahip PMF-SF grubu ile karşılaştırıldı. Yaşam süreleri, “Kaplan-Meier analizi” ile hesaplanıp grafikleri çizildi, “log-rank testi (Mantel-Cox)” ile karşılaştırıldı. Çok değişkenli analiz için Cox regresyon modeli kullanıldı. Tüm analizlerde anlamlılık sınırı $p < 0.05$ olarak kabul edildi.



RESİM 3.10: ASXL1 protein ekspresyonu A: Kontrol doku; testis (A: X1000), B, C: Skor 1+ boyanma (X400), D: Megakaryositlerde nükleer dot-like boyanma paterni (X1000), E, F: Skor 2+ boyanma, (X1000), G: Skor 3+ nükleer dot-like boyanma paterni (X1000), H: Skor 3+ boyanma (x400)

4. BULGULAR:

4.1.KLİNİK ÖZELLİKLER:

Çalışmaya, Grade 2-3 fibrozisin eşlik ettiği; 11 MDS-F, 23 KMML, 17 MDS/MPN-U, 2 aKML, 2 RARS-T ve 29 PMF-SF olgusundan oluşan 84 hasta alındı. Tanı gruplarına göre karşılaştırmalı hasta özellikleri **Tablo 4.1**'de özetlenmiştir. Seksen dört hasta genelinde, yaş ortalaması 61, medyan 62 ± 13.8 , yaş aralıkları 34-87 yaş arasındadır. Olguların 52'si (%61.9) erkek, 32'si (%38.1) kadın olup Erkek/Kadın = 1.6'dır.

Fizik muayene ve batin USG ile ölçülen dalak boyutlarına göre 84 hastadan 21'i masif (>17 cm) olmak üzere 50'sinde (%59.5) splenomegali (>13 cm) mevcut olup en sık PMF-SF ve ardından KMML'de görüldü ($p=0.040$). Hepatomegali (>16 cm) 30 hastada (%35.7), en sık MDS-F ve PMF-SF olgularında saptandı, ancak farklı tanı grupları göz önüne alındığında istatistiksel anlam taşımıyordu.

Lökosit, hemoglobin, MCV ve trombosit düzeyleri, hem sayısal, hem de eşik değerler kullanılarak incelendi. Lökosit sayısı tüm hastaların %36.3'ünde normaldi. Lökopeni ($<4000/\text{mm}^3$), MDS-F hastalarının %63.6'sında ve MDS/MPN-U hastalarının %29.5'inde görüldü. Buna karşın lökositoz ($>10.000/\text{mm}^3$) KMML'de %65.2, PMF-SF'da %55.2 ve MDS/MPN-U'de %35.3 oranlarında izlendi. Lökosit sayısı, medyan olarak alınıp tanı grupları arasında karşılaştırıldığında; MDS-F'de düşük ($3800/\text{mm}^3$), MDS/MPN-U'de normal ($6400/\text{mm}^3$), KMML ($15300/\text{mm}^3$) ve PMF-SF'da ($10500/\text{mm}^3$) yüksek bulundu ($p<0.001$). Medyan hemoglobin düzeylerine göre, PMF-SF'da anemi saptanmazken (Hb 12.6 g/dL), MDS-F ve MDS/MPN-U olgularında ağır anemi (sırasıyla Hb 7.3g/dL ve 7.9 g/dL), KMML olgularında hafif anemi (Hb 9.3 g/dL) saptandı ($p<0.001$). MCV değerleri açısından tanı grupları arasında anlamlı bir fark yoktu. Medyan trombosit düzeyleri, MDS-F ($63.000/\text{mm}^3$) ve MDS/MPN-U ($72.000/\text{mm}^3$) olguları arasında benzer olup trombopeni orta düzeyde, KMML'de ise hafif ($120.000/\text{mm}^3$) düzeylerdeydi. PMF-SF hastalarında belirgin trombositoz ($841.000/\text{mm}^3$) mevcuttu ($p<0.001$).

LDH değerine 77 olguda bakılmış olup genellikle tüm hastalık gruplarında yüksekti (PMF-SF %100, KMML %90.9, MDS-F %77.8 ve MDS/MPN-U %52.6). β_2 -mikroglobulin düzeyine 28 olguda bakılmıştı ve tanı gruplarında sıklıkla yüksekti (MDS-F %100, KMML %87.5, MDS/MPN-U %85.7, PMF-SF %81.8). Başlangıç ESH değeri 61 olguda mevcut olup PMF-SF olguları dışında yüksekti (MDS-F %100, MDS/MPN-U %72.7, KMML %72.2 ve

PMF-SF %30.8). Yüksek ferritin değerleri, MDS-F (%77.8), KMML (%72.2) ve MDS/MPN-U (%61.5) hastalarında sıklıkla görüldüğü halde PMF-SF hastalarının sadece %5'inde görüldü ($p<0.001$).

Konvansiyonel karyotipleme 39 (%46.4) hastada yapılmış ancak 5'inde metafaz görülmediğinden 34 hastada sonuç verilmişti. Buna göre, normal karyotip 20 (%58.8), sitogenetik anomali 14 (%41.2) hastada saptandı. Sitogenetik anomalilerin tanı gruplarına göre dağılımı **Tablo 4.2**'de verilmiştir. Hastaların 11'inde (%32.4) tek anomali, 3'ünde (%8.8) kompleks karyotip (2 MDS-F ve 1 KMML) izlendi. Gruplar arasında istatistiksel anlamlılık görülmemesine rağmen sitogenetik anomali saptanma sıklıkları MDS-F olgularında %60, KMML olgularında %55.6, MDS/MPN-U olgularında %42.9 oranlarındaydı. En sık görülen anomaliler, trizomi 8, del(20) ve del(21) şeklindeydi.

JAK2 V617F mutasyonu, 52 (%61.9) hastada bakılmış olup pozitiflik oranları, PMF-SF (%53.8), KMML (%38.5), MDS-F (%33.3), MDS/MPN-U (%16.7)'dir. JAK2 mutasyon sıklığı, PMF-SF'de en yüksek olsa da gruplar arasında anlamlı farklılık yoktur. JAK2 mutasyonu saptanmayan 4 hastada (2 PMF-SF, 1 KMML, 1 MDS-F) JAK2 ekzon 12 ve MPL W515L/K mutasyonlarına da bakılmış, ancak mutasyon saptanmamıştır.

RARS-T (n:2) ve aKML (n:2) olguları sayı azlığı nedeniyle **Tablo 4.1**'de yer almamıştır. Özetle; 4 hasta da kadın olup ortalama yaş, aKML'de 72.5 (72-73) yaş ve RARS-T'de 70.5 (64-77) yaş şeklindeydi. Splenomegali, aKML ve RARS-T hastalarının yarısında mevcuttu. Hepatomegali, RARS-T olgularında görülmediği halde, aKML olgularının %50'sinde mevcuttu. Lökosit sayısı, aKML'de yüksek ($>10.000/\text{mm}^3$), RARS-T'de olguların birinde yüksek, diğerinde normaldi. Her iki hastalık grubunda hafif/ağır anemi mevcut olup aKML'de makrositer ($>100 \text{ fL}$), RARS-T'de ise normositer anemi şeklindeydi. Trombosit sayısı, RARS-T'de yüksek ($>400.000/\text{mm}^3$), aKML'de olguların birinde $100.000/\text{mm}^3$ 'ün altında, diğerinde normaldi. LDH, aKML ve RARS-T olgularının tümünde, ferritin RARS-T'de yüksekti. Karyotip $\frac{3}{4}$ hastada normal olup bir aKML olgusunda trizomi 8 saptandı. JAK2 mutasyonu, RARS-T olgularından birinde pozitif iken diğer 3 hastada saptanmadı.

TABLO 4.1: Klinik özellikler

		MDS-F n:11	KMML n: 23	MDS/MPN-U n: 17	PMF-SF n: 29	P- DEĞERİ
YAŞ (ORTALAMA/MEDYAN/ARALIK)		55.09; 58 (38-75)	63.91; 63 (45-82)	64.59; 65 (39-87)	57.59; 61 (34-80)	=0.058
CİNSİYET (E/K)		7(%63.6)/ 4(%36.4)	19(%82.6)/ 4(%17.4)	10(%58.8)/ 7(%41.2)	16(%55.2)/ 13(%44.8)	=0.087
WBC (/mm³)	MEDYAN(ARALIK)	3800 (1300-6200)	15300 (3400-165800)	6400 (1300-176000)	10500 (5700-49200)	<0.001
	DÜŞÜK (<4000)	7(%63.6)	2(%8.7)	5(%29.4)	0(%)	
	NORMAL (≥4000- <10000)	4(%36.4)	6(%26.1)	6(%35.3)	13(%44.8)	
	YÜKSEK (≥10000)	0(%)	15(%65.2)	6(%35.3)	16(%55.2)	
Hb (g/dL)	MEDYAN(ARALIK)	7.3(4.3-11.9)	9.3(5.7-16)	7.9(5.4-12.3)	12.6(7.9-17.5)	<0.001
	<8	7(%63.6)	4(%17.4)	9(%52.9)	1(%3.5)	
	8-10	3(%27.3)	11(%47.8)	4(%23.5)	3(%10.3)	
	>10	1(%9.1)	8(%34.8)	4(%23.5)	25(%86.2)	
MCV (fL)	MEDYAN(ARALIK)	88(77.8-102)	90(67.3-123)	86.9(71-143)	85(57-96)	=0.122
	<80	2(%18.2)	3(%13.0)	2(%11.8)	3(%10.3)	
	80-100	8(%72.7)	16(%69.6)	11(%64.7)	26(%89.7)	
	>100	1(%9.1)	4(%17.4)	4(%23.5)	0(%)	
Trombosit (/mm³)	MEDYAN(ARALIK)	63000 (96000-165000)	120000 (10000- 2137000)	72000 (7000-616000)	841000 (155000-1742000)	<0.001
	<100.000	7(%63.6)	10(%43.5)	10(%58.8)	0(%)	
	≥100.000- <150.000	3(%27.3)	2(%8.7)	3(%17.6)	0(%)	
	≥150.000- <400.000	1(%9.1)	8(%34.8)	3(%17.6)	4(%13.8)	
Absolü Nötrofil Sayısı (ANC)	≥1500	6(%54.5)	21(%91.3)	14(%82.4)	29(%100)	=0.001
	<1500	5(%45.5)	2(%8.7)	3(%17.6)	0(%)	
Absolü Monosit Sayısı (AMC)	≥1000	0(%)	20(%87.0)	5(%29.4)	5(%17.2)	<0.001
	<1000	11(%100)	3(%13.0)	12(%70.6)	24(%82.8)	
SPLENOMEGALİ		5 (%45.5) (1 MASİF)	15 (%65.2) (4 MASİF)	7 (%41.2) (4 MASİF)	23 (%79.3) (11 MASİF)	=0.040
HEPATOMEGALİ		6(%54.5)	5(%21.7)	5(%29.4)	14(%48.3)	=0.113
SİTOGENETİK ANOMALİ		3/5*(%60)	5/9*(%55.6)	3/7*(%42.9)	2/9*(%22.2)	=0.401
JAK2 V617F MUTASYONU		1/3**(%33.3)	5/13**(%38.5)	1/6**(%16.7)	14/26**(%53.8)	=0.304

NOT: aKML (n:2) ve RARS-T (n:2) olgu sayıları az olduğu için tabloya alınmamış, metin içinde yazılmıştır.

* Olguların 34'ünde karyotip tayini yapılmıştır.

**Olguların 52'sinde JAK2 V617F mutasyonu araştırılmıştır.

TABLO 4.2: Sitogenetik anomalilerin tanı gruplarına göre dağılımı

Sitogenetik anomaliler	MDS-F n: 5	KMML n: 9	MDS/MPN-U, aKML ve RARS-T n: 11	PMF-SF n: 9
Normal karyotip	2 (%40)	4 (%44.4)	7 (%63.6) 4 MDS/MPN-U, 1 aKML, 2 RARS-T	7 (%77.7)
Tek anomali	1 (%20) del(19)	3 (%33.3) Trizomi 8 (n:2), monozomi 7	4 (%36.4) 3 MDS/MPN-U (del(6), del(20), trizomi 8), 1 aKML (trizomi 8)	0 (%)
Kompleks anomali	2(%40) 1.del(10), del(21) 2.trizomi 8, del(17), del(18), del(20)	1(%11.1) del(Y), del(20), del(21)	0 (%)	0 (%)
Tetraplöidi	0 (%)	1 (%11.1)	0 (%)	2 (%22.2)

4.2. KEMİK İLİĞİ ASPIRASYON VE BİYOPSİSİNDE MORFOLOJİK ÖZELLİKLER:

Seksen dört olgu, tanı biyopsilerindeki özellikler temel alınarak değişik morfolojik parametreler açısından karşılaştırıldı. İzleme sırasında tekrar biyopsileri tanı grupları arasında farklı olup ortalama biyopsi sayıları sırasıyla MDS-F (1.22), KMML (2.13), MDS/MPN-U (1.82) şeklindeydi ($p<0.001$). PMF-selüler faz hastalarında ise biyopsi tekrarı yoktu. Kemik iliği biyopsi ve aspirasyonlarında gözlenen morfolojik özellikleri **Tablo 4.3**'te özetlenmiştir.

4.2.1. Selülerite:

Selülerite, yaşa göre düzeltilerek değerlendirildiğinde, tüm tanı gruplarında artmıştı. Dört olguda yoğun fibrozis ve hematopoetik hücrelerin belirgin azalması nedeniyle selülerite verilememiştir.

4.2.2. Hematopoetik diziler:

Myeloid dizi, tüm olguların %17.5'inde normal, %63.8'inde artmış, %18.7'sinde ise azalmıştı. Myeloid dizide azalma, MDS-F'de %72.7 oranında görüldüğü halde diğer tanı gruplarında normal veya hiperplastikti ($p<0.001$). Eritroid dizi, tüm olguların %25'inde normal, %57.5'inde artmış, %17.5'inde ise azalmıştı. Eritroid dizide azalma en sık KMML (%34.8) ve MDS/MPN-U'de (%29.4) görülürken MDS-F'de nadir (%9.1), PMF-SF'da ise yoktu ($p=0.001$). Megakaryosit sayısındaki artma, tüm olguların %22.5'inde hafif, %46.3'ünde fokal belirgin, %31.2'sinde ise yaygın belirgindi. Fokal belirgin megakaryosit artışı, PMF-SF'da %86.2, MDS/MPN-U'de %47.1 oranlarında görülmesine karşın MDS-F'de görülmedi ($p<0.001$). Öte yandan megakaryositlerdeki yaygın belirgin artış, MDS-F, MDS/MPN-U ve KMML'de sırasıyla %54.5, %41.2 ve %34.8 oranlarında görülürken bu oran PMF-SF'de oldukça az olup %13.8 oranındaydı ($p<0.001$).

4.2.3. Displazi:

Displazi, her üç hematopoetik dizi için aspirasyon ve biyopsiler birlikte incelenerek değerlendirildi. Dokuz hastada (7 MDS-F, 2 MDS/MPN-U) ağır fibrozise bağlı hip/aselülerite nedeniyle aspirasyonlar değerlendirilemedi. Displazi PMF-SF olgularının %82.8'inde görülmedi. Geri kalan 5 olguda ise hipogranüler nötrofiller, eritroid dizide sitoplazma/nükleus olgunlaşma uyumsuzluğu ve proliferatif megakaryositlere eşlik eden displastik megakaryosit gibi değişikliklere rastlandı. Öte yandan, MDS-F'de olguların tümünde üç dizide, KMML'de %95.7'sinde ≥ 2 dizi, %4.3'ünde tek dizide, MDS/MPN-U'de

%70.6'sında ≥ 2 dizi, %29.4'ünde tek dizide displazi izlendi. Displazi dizilere göre sıralandığında; eritroid, myeloid ve megakaryositik dizilerde displazi görülme sıklıkları, KMML için sırasıyla %87, %73.3 ve %95.7, MDS/MPN-U için %76.5, %100 ve %100 oranlarındadır ($p < 0.001$). Atipik KML'de olguların birinde her üç dizide, diğerinde yalnızca myeloid dizide, RARS-T olgularında ise yalnızca eritroid dizide displazi mevcuttu.

4.2.4. Megakaryosit morfolojisi:

Proliferatif tip megakaryosit morfolojisi, PMF-SF'da %96.6, KMML'de %4.3 oranlarında görüldü ($p < 0.001$). Displastik tip megakaryosit morfolojisi PMF-SF olgularında görülmezken KMML, MDS-F ve MDS/MPN-U'de sırasıyla %52.2, %45.5 ve %35.3 oranlarında izlendi ($p < 0.001$). Proliferatif megakaryosit morfolojisi ön planda olmakla birlikte displastik megakaryositlerin de eşlik ettiği "**proliferatif ağırlıklı mikst morfoloji**" KMML ve MDS/MPN-U'de sırasıyla %30.4 ve %29.4 oranlarında görülürken MDS-F ve PMF-SF'da sadece birer olguda izlendi ($p < 0.001$). Displastik megakaryosit morfolojisinin baskın olduğu ancak proliferatif morfolojide megakaryositlerin de görüldüğü "**displastik ağırlıklı mikst morfoloji**" sırasıyla MDS-F (%45.5), MDS/MPN-U (%35.3) ve KMML'de (%13) oranlarında görüldüğü halde PMF-SF'da görülmedi ($p < 0.001$). Her iki RARS-T ve bir aKML'de proliferatif, diğer aKML'de displastik morfolojide megakaryositler mevcuttu.

Megakaryositlerde kümeleşme, olguların %75'inde görüldü. **Gevşek kümeleşme**, tüm olguların %11.3'ünde mevcut olup görülme sıklığı MDS-F, MDS/MPN-U ve KMML olgularında sırasıyla %27.3, %23.5 ve %8.7 oranlarındaydı. PMF-SF'da ise görülmedi ($p < 0.001$). **Sıkı kümeleşme**, tüm olguların %13.8'inde mevcut MDS/MPN-U'de görülmedi. Görülme sıklıkları sırasıyla, KMML (%21.7), PMF-SF (%17.2) ve MDS-F (%9.1) şeklindeydi. **Gevşek ağırlıklı mikst patern** en sık PMF-SF (%31) ve MDS/MPN-U'de (%17.6) görülmekle birlikte düşük oranlarda da olsa MDS-F (%9.1) ve KMML'de (%8.7) de gözlemlendi. **Sıkı ağırlıklı mikst patern**, sıklık sırasına göre PMF-SF (%51.7), MDS/MPN-U (%35.3), KMML (%13) ve MDS-F (%9.1) oranlarında saptandı ($p < 0.001$).

Megakaryositlerde fokal belirgin artış; proliferatif ve proliferatif ağırlıklı mikst megakaryosit morfolojisi ile paralellik gösterdi ($p = 0.001$). Displastik ve displastik ağırlıklı mikst megakaryosit morfolojisi; megakaryositlerde kümeleşme olmaması, myeloid ve eritroid dizilerde displazi ile birlikte gözlemlendi ($p < 0.001$). Megakaryositler displastik olduğunda sıkı ve sıkı ağırlıklı mikst kümeleşme görülme sıklığı azalmaktaydı ($p < 0.001$).

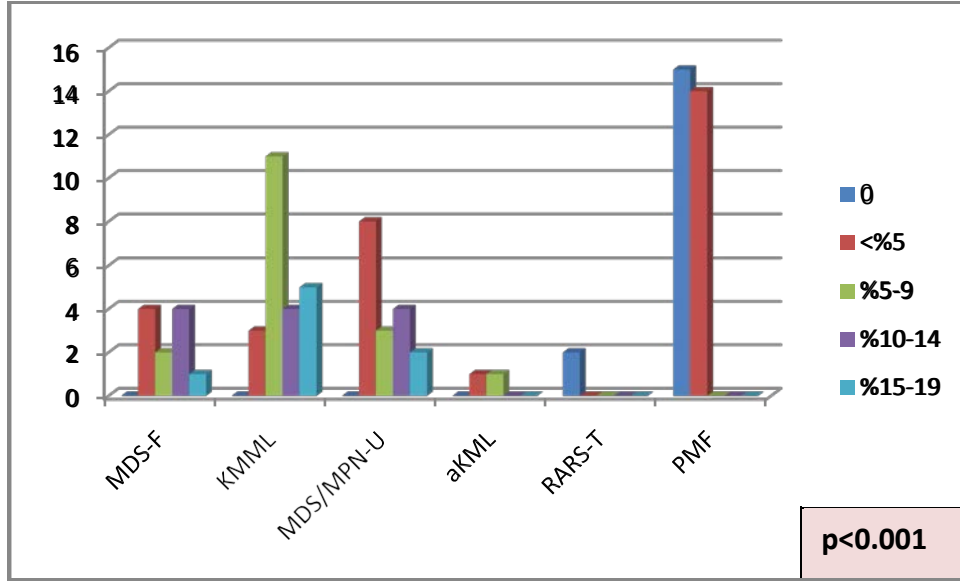
Displastik ve displastik ağırlıklı mikst megakaryosit morfolojisi MDS-F (%90.9), KMML (%65.2), MDS/MPN-U (%70.6), aKML'de (%50) oranlarında görülürken PMF-SF ve RARS-T'de görülmedi ($p<0.001$).

4.2.5. Megakaryositlerde aberan CD34 ekspresyonu:

Megakaryositlerde aberan CD34 ekspresyonu, 20/84 (%23.8) hastada saptandı. Görülme sıklığı sırasıyla MDS-F (%45.5), MDS/MPN-U (%41.2), KMML (%34.8) ve PMF-SF (%3.5) oranlarında olup aKML ve RARS-T'de görülmedi ($p=0.010$). Aberan CD34 ekspresyonu, displastik özelliklerin baskın olduğu, MDS ve MDS/MPN grubu hastalıklarda daha sık izlendi ($p=0.001$). Öte yandan, megakaryositlerde aberan CD34 ekspresyonu, ≥ 2 dizide displazi ($p=0.004$), displastik/displastik ağırlıklı megakaryosit morfolojisi ($p=0.005$), megakaryositlerde kümeleşme eğilimi ($p=0.018$), yüksek blast oranı ($p=0.012$) ve stromada mast hücre artışı ($p=0.022$) ile birliktelik göstermekteydi.

4.2.6. Blast oranları ve kemik iliği biyopsisinde CD34+ hücre dağılımları:

Blast oranı; aspirasyonu olan olgularda yüzde (%) olarak, biyopsilerde CD34/CD117 pozitif hücre dağılımlarına göre seyrek ($<5\%$), orta ($\geq 5\%-<10\%$) ve yüksek ($\geq 10\%-<20\%$) şeklinde değerlendirildi. Aspirasyon ve biyopsi birlikte yorumlandığında; PMF-SF olgularının %51.7'si ve iki RARS-T olgusunda blast görülmedi. **Düşük blast oranı ($<5\%$)**, geri kalan PMF-SF olguları (%48.3) ile MDS/MPN-U (%47.1), MDS-F (%36.4), KMML (%26.1) ve 1 aKML'de izlendi. **Orta düzeyde blast oranı ($\geq 5\%-<10\%$)**, sırasıyla KMML (%47.8), MDS-F (%18.2), MDS/MPN-U (%17.6) ve 1 aKML'de saptandı. **Yüksek blast oranı ($\geq 10\%-<20\%$)**, sıklık sırasına göre MDS-F (%45.4), KMML (%39.1) ve MDS/MPN-U (%35) olgularında görüldü. Kemik iliği biyopsilerinde CD34+ hücre sayısı lösemik dönüşüm sınırına yakın yükseklikte olduğunda ($\geq 15\%-<20\%$) çok yüksek olarak değerlendirildi. Bu olguların dağılımı; KMML (%21.7), MDS/MPN-U (%17.6) ve MDS-F (%9.1) şeklindeydi ($p<0.001$). Tanı gruplarına göre aspirasyon ve biyopsilerde saptanan blast oranlarının (%) dağılımı **Şekil 4.1**'de verilmiştir. Blast oranı arttıkça, displastik ve displastik ağırlıklı mikst megakaryosit morfolojisi daha sık izlenirken ($p<0.001$) megakaryositlerde aberan CD34 ekspresyonu görülme sıklığı da artmaktadır ($p=0.012$).



ŞEKİL 4.1: Tanı gruplarına göre blast oranlarının (%) dağılımı
(aspirasyon ve biyopsiler)

Kemik iliği biyopsilerinde CD34+ hücrelerin dağılım paterni blast oranı ile paraleldi ($p<0.001$). Aspirasyonda blast oranının düşük ($<\%5$) olduğu olgularda, biyopside de CD34+ hücreler dağınık olup sıklık sırasına göre aKML (%100), MDS/MPN-U (%52.9), PMF-SF (%48.3), KMML (%39.1) ve MDS-F (%27.3) oranlarında izlendi. Blast oranının aspirasyonda ($\geq\%5$ - $<\%10$) oranlarında olduğu olgularda CD34+ hücreler kümeler oluşturmaktaydı. Bu dağılım paterni, MDS-F (%27.3), MDS/MPN-U (%11.8), KMML’de (%8.7) oranlarında görüldü. CD34+ hücrelerin hem küme hem de yaygın dağınık şekilde arttığı olgularda ise blast oranı $\geq\%10$ - $<\%20$ düzeylerinde olup sırasıyla KMML (%52.2), MDS-F(%45.5), MDS/MPN-U’de (%35.3) oranlarında izlendi. Aspirasyonda blast oranındaki artma, kemik iliği biyopsisinde CD34+ hücrelerin küme veya küme+yaygın dağınık paternde görülmesi ile istatistiksel olarak da bağlantılı bulundu ($p<0.001$).

4.2.7. Kemik iliği biyopsisinde demir skoru değerlendirilmesi:

Kemik iliği biyopsilerinde depo demiri, 79/84 (%94) olguda değerlendirildi ve %38’inde normal, %16.4’ünde düşük, %45.6’sında yüksek bulundu. Depo demirinde artma aKML ve RARS-T olgularının hepsinde, diğer olgularda sıklık sırasına göre, MDS-F (%72.7), KMML (%52.2), MDS/MPN-U (%47.1) ve PMF-SF’de (%16.7) oranlarında görüldü ($p=0.005$). Depo demirinde azalma, sırasıyla PMF-SF (%20.8), MDS-F (%18.2), MDS/MPN-U (%17.6), KMML’de (%13) oranlarında görüldü. Biyopside demir skorunda

artma saptanan olguların %66.7'sinde megakaryositlerde displastik veya displastik ağırlıklı mikst megakaryosit morfolojisi mevcuttu (p=0.002).

TABLO 4.3: Morfolojik özellikler (Aspirasyon ve biyopsi)

		MDS-F n: 11	KMML n: 23	MDS/MPN- U n: 17	PMF-SF n: 29	P- DEĞERİ
BİOPSİ SAYILARI (ORTALAMA/ARALIK)		1.22(1-2)	2.13(1-5)	1.82(1-5)	1(1)	<0.001
SELLÜLERİTE (YAŞA GÖRE DÜZELTİLMİŞ)	HİPERSELÜLER	9/9 (%100)*	22/22 (%100)*	15/16 (%93.8)*	29(%100)	=0.376
	NORMOSELÜLER	0(%0)	0(%0)	1/16*	0(%0)	
	HİPOSELÜLER	0(%0)	0(%0)	0(%0)	0(%0)	
MYELOİD DİZİ	NORMAL	1(%9.1)	2(%8.7)	2(%11.8)	9(%31.0)	<0.001
	ARTMA	2(%18.2)	18(%78.3)	11(%64.7)	20(%69.0)	
	AZALMA	8(%72.7)	3(%13.0)	4(%23.5)	0(%0)	
ERİTROİD DİZİ	NORMAL	1(%9.1)	2(%8.7)	3(%17.6)	14(%48.3)	=0.001
	ARTMA	9(%81.8)	13(%56.5)	9(%52.9)	15(%51.7)	
	AZALMA	1(%9.1)	8(%34.8)	5(%29.4)	0(%0)	
MEGAKARYOSİTİK DİZİ	HAFİF ARTMA	5(%45.5)	11(%47.8)	2(%11.8)	0(%0)	<0.001
	FOKAL BELİRGİN ARTMA	0(%0)	4(%17.4)	8(%47.1)	25(%86.2)	
	YAYGIN BELİRGİN ARTMA	6(%54.5)	8(%34.8)	7(%41.2)	4(%13.8)	
DİSPLAZİ	DİSPLAZİ YOK	0(%0)	0(%0)	0(%0)	24(%82.8)	<0.001
	TEK DİZİDE DİSPLAZİ	0(%0)	1(%4.3)	5(%29.4)	5(%17.2)	
	ÇOĞUL DİZİDE DİSPLAZİ	11(%100)	22(%95.7)	16(%70.6)	0(%0)	
MEGAKARYOSİT MORFOLOJİSİ	PROLİFERATİF	0(%0)	1(%4.3)	0(%0)	28(%96.6)	<0.001
	PROLİFERATİF AĞIRLIKLİ MİKST	1(%9.1)	7(%30.4)	5(%29.4)	1(%3.5)	
	DİSPLASTİK	5(%45.4)	12(%52.2)	6(%35.3)	0(%0)	
	DİSPLASTİK AĞIRLIKLİ MİKST	5(%45.4)	3(%13.0)	6(%35.3)	0(%0)	
MEGAKARYOSİTLERDE KÜMELEŞME	KÜME YOK	5(%45.4)	11(%47.8)	4(%23.5)	0(%0)	<0.001
	GEVŞEK/GEVŞEK AĞIRLIKLİ MİKST KÜME	4(%36.4)	4(%17.4)	7(%41.2)	9(%31.0)	
	SIKI/SIKI AĞIRLIKLİ MİKST KÜME	2(%18.2)	8(%34.8)	6(%35.3)	20(%69)	
MEGAKARYOSİTLERDE ABERAN CD34 EKSPRESYONU		5(%45.5)	8(%34.8)	7(%41.2)	1(%3.5)	=0.010
BLAST ORANI	BLAST YOK	0(%0)	0(%0)	0(%0)	15(%51.7)	<0.001
	DÜŞÜK (<%5)	4(%36.4)	3(%13.0)	8(%47.1)	14(%48.3)	
	ORTA (≥%5 - <%10)	2(%18.2)	11(%47.8)	3(%17.6)	0(%0)	
	YÜKSEK (≥%10 - <%15)	4(%36.4)	4(%17.4)	4(%23.5)	0(%0)	
	ÇOK YÜKSEK (≥%15 - <%20)	1(%9.1)	5(%21.7)	2(%17.6)	0(%0)	
CD34(+) HÜCRELERİN DAĞILIM PATERNİ	CD34(+) HÜCRE YOK	0(%0)	0(%0)	0(%0)	15(%51.7)	<0.001
	DAĞINIK	3(%27.3)	9(%39.1)	9(%52.9)	14(%48.3)	
	KÜME/ KÜME VE DAĞINIK	8(%72.7)	14(%60.9)	8(%47.1)	0(%0)	
DEMİR SKORU	NORMAL	1(%9.1)	8(%34.8)	6(%35.3)	15/24(%62.5)**	=0.005
	ARTMA	8(%72.7)	12(%52.2)	8(%47.1)	4/24(%16.7)**	
	AZALMA	2(%18.2)	3(%13.0)	3(%17.6)	5/24(%20.8)**	

* Myeloid displazi. ağır fibrozis nedeniyle 9 olguda (7 MDS-F, 2 MDS/MPN-U) değerlendirilememiştir.

** Demir skoru, 5 PMF olgusunda çökme nedeniyle değerlendirilememiştir.

4.3.KEMİK İLİĞİ BİYOPSİSİNDE FİBROZİS DERECELENDİRMESİ:

Kemik iliği biyopsilerinde fibrozis derecelendirmesi hem Manoharan hem de Avrupa fibrozis sınıflamalarına göre yapıldı. Her iki sisteme göre tanı gruplarının dağılımı **Tablo 4.4**'te özetlenmiştir.

TABLO 4.4: Olguların fibrozis derecelendirmesi

FİBROZİS DERECELENDİRMESİ:		MDS-F n:11	KMML n:23	MDS/MPN-U n:17	PMF-SF n:29	P-DEĞERİ
MANOHARAN SINIFLAMASI	2	0(%0)	11(%47.8)	1(%5.8)	12(%41.4)	=0.045
	3	5(%45.5)	6(%26.1)	8(%47.1)	10(%34.5)	
	4	6(%54.5)	6(%26.1)	8(%47.1)	7(%24.1)	
AVRUPA SINIFLAMASI	2	4(%36.4)	17(%73.9)	9(%52.9)	23(%79.3)	=0.058
	3	7(%63.6)	6(%26.1)	8(%47.1)	6(%20.7)	

Manoharan sınıflamasına göre, Grade 2 (hafif/orta) fibrozis, 25/84 (%29.8), Grade 3 (orta) fibrozis 29/84 (%34.5) ve Grade 4 (ağır) fibrozis 27/84 (%32) olguda saptandı. Hafif fibrozis sıklıkla KMML ve PMF-SF hastalarında görülürken orta/ağır fibrozis MDS-F ve MDS/MPN-U hastalarında izlendi.

Avrupa sınıflamasına göre Grade 2 (orta) fibrozis, olguların %67.9'unda mevcut olup en sık PMF-SF ve KMML hastalarında görülmekle birlikte tüm tanı gruplarında görüldü. Grade 3 (ağır) fibrozis tüm olguların %32.1'inde mevcut olup en sık MDS-F (%63.6) ve MDS/MPN-U (%47.1) olgularında izlendi. Manoharan sınıflaması ile tanı grupları arasında istatistiksel anlamlılık mevcuttu ($p=0.045$). PMF-SF dışında kalan 55 hasta, tanı gruplarına ayrıldığında Manoharan sınıflamasına göre MDS-F ve MDS/MPN-U hastalarında ağır (Grade 3-4), KMML hastalarında hafif/orta dereceli fibrozis (Grade 2) mevcuttu ($p=0.021$). Manoharan ve Avrupa fibrozis derecelendirme sınıflamalarının klinik parametrelerle ilişkisi **Tablo 4.5**'te, morfolojik parametrelerle ilişkisi **Tablo 4.6**'da, tanı gruplarına göre karşılaştırması **Şekil 4.2**'de verilmiştir.

Her iki fibrozis derecelendirme sistemine göre hemoglobin değeri ve kemik iliği fibrozisi arasında ilişki mevcuttur (*Manoharan sınıflamasına göre; $p=0.002$, Avrupa sınıflamasına göre; $p=0.004$*). Öte yandan, lökositözün görüldüğü KMML ve PMF-SF olgularında fibrozis derecesi daha düşüktür (*Avrupa sınıflamasına göre; $p=0.023$*). PMF-SF hastaları ayrı olarak incelendiğinde, düşük-normal trombosit düzeyleri ağır, yüksek trombosit

düzeyleri orta derecede fibrozis ile ilişkili bulundu (Avrupa sınıflamasına göre $p=0.020$, Manoharan sınıflamasına göre $p=0.030$).

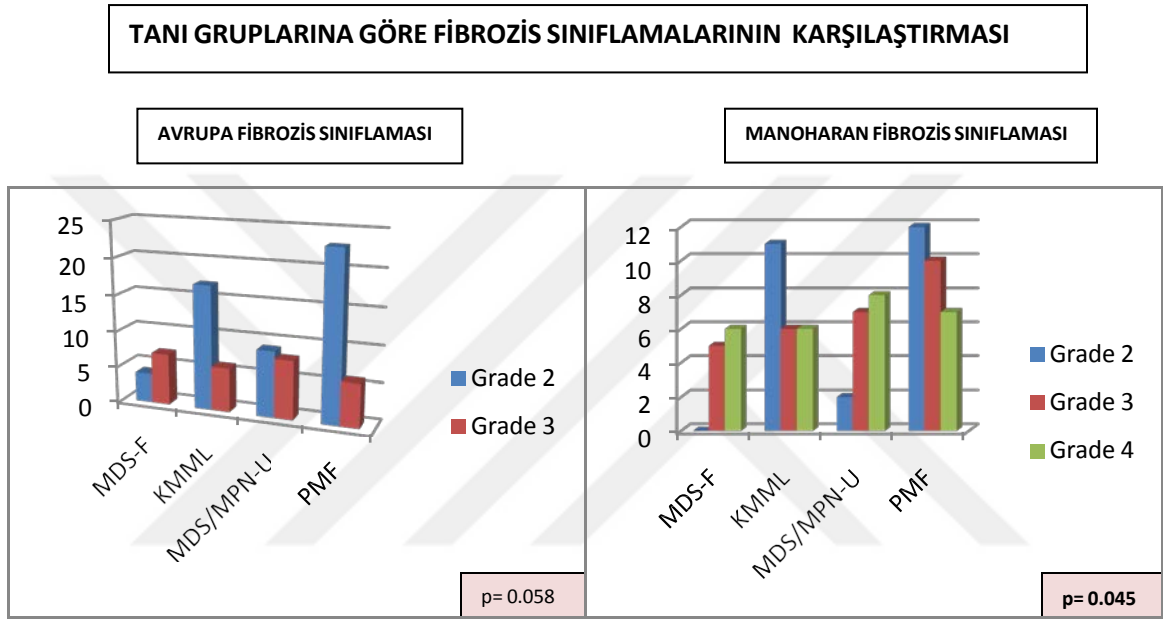
TABLO 4.5: Fibrozis sınıflamalarının klinik parametrelerle karşılaştırması

FİBROZİS DERECELENDİRME SINIFLAMALARI		MANOHARAN SINIFLAMASI			P- DEĞERİ	AVRUPA SINIFLAMASI		P- DEĞERİ
		GRADE 2	GRADE 3	GRADE 4		GRADE 2	GRADE 3	
YAŞ	<60	13 (%15.5)	10 (%11.9)	13 (%15.5)	= 0.321	23 (%27.4)	13 (%15.5)	= 0.637
	≥60	13 (%15.5)	21 (%25)	14 (%16.6)		34 (%40.5)	14 (%16.6)	
CİNSİYET	Kadın	11 (%13.1)	12 (%14.3)	9 (%10.7)	= 0.794	22 (%26.2)	10 (%11.9)	= 0.891
	Erkek	15 (%17.9)	19 (%22.6)	18 (%21.4)		35 (%41.7)	17 (%20.2)	
WBC (/mm ³)	<4000	2 (%2.4)	7 (%8.3)	5 (%6)	= 0.093	8 (%9.5)	6 (%7.1)	= 0.023
	≥4000-<10000	8 (%9.5)	8 (%9.5)	14 (%16.6)		16 (%19)	14 (%16.6)	
	≥10000	16 (%19)	16 (%19)	8 (%9.5)		33 (%39.3)	7 (%8.3)	
Hb (g/dL)	<8	1 (%1.2)	8 (%9.5)	13 (%15.5)	= 0.002	9 (%10.7)	13 (%15.5)	= 0.004
	8-9.9	6 (%7.1)	10 (%11.9)	7 (%8.3)		16 (%19)	7 (%8.3)	
	≥10	19 (%22.6)	13 (%15.5)	7 (%8.3)		32 (%38.1)	7 (%8.3)	
PLT (/mm ³)	<100000	6 (%7.1)	11 (%13.1)	11 (%13.1)	= 0.305	16 (%19)	12 (%14.3)	= 0.054
	≥100000-<400000	7 (%8.3)	8 (%9.5)	10 (%11.9)		15 (%17.9)	10 (%11.9)	
	≥400000	13 (%15.5)	12 (%14.3)	6 (%7.1)		26 (%31)	5 (%6)	
ESH (/sa) (n=61)	≤20	12 (%19.7)	8 (%13.1)	6 (%9.8)	= 0.629	20 (%32.8)	6 (%9.8)	= 0.629
	>20	12 (%19.7)	14 (%23)	9 (%14.8)		25 (%41)	10 (%16.4)	
FERRİTİN (ng/mL) (n=62)	<13	1 (%1.6)	0 (%0)	1 (%1.6)	= 0.035	1 (%1.6)	1 (%1.6)	= 0.830
	13-149	15 (%24.2)	5 (%8.1)	9 (%14.5)		20 (%32.3)	9 (%14.5)	
	≥150	7 (%11.3)	14 (%22.6)	10 (%16.1)		20 (%32.3)	11 (%17.7)	
SPLENOMEGALİ	Var	17 (%20.2)	15 (%17.9)	20 (%23.8)	= 0.121	33 (%39.3)	19 (%22.6)	= 0.271
	Yok	9 (%10.7)	16 (%19)	7 (%8.3)		24 (%28.6)	8 (%9.5)	
HEPATOMEGALİ	Var	9 (%10.7)	11 (%13.1)	11 (%13.1)	= 0.880	20 (%23.8)	11 (%13.1)	= 0.616
	Yok	17 (%20.2)	20 (%23.8)	16 (%19)		37 (%44)	16 (%19)	
SİTOGENETİK ANOMALİ (n=34)	Var	5 (%14.7)	7 (%20.6)	2 (%5.9)	= 0.332	12 (%35.3)	2 (%5.9)	= 0.264
	Yok	5 (%14.7)	9 (%26.5)	6 (%17.6)		14 (%41.2)	6 (%17.6)	
JAK2 V617F MUTASYONU (n=52)	Var	7 (%13.5)	7 (%13.5)	8 (%15.4)	= 0.322	14 (%26.9)	8 (%15.4)	= 0.189
	Yok	15 (%28.8)	9 (%17.3)	6 (%11.5)		24 (%46.2)	6 (%11.5)	

TABLO 4.6: Fibrozis sınıflamalarının morfolojik parametrelerle karşılaştırması

FİBROZİS DERECELENDİRME SINIFLAMALARI		MANOHARAN SINIFLAMASI			P- DEĞERİ	AVRUPA SINIFLAMASI		P- DEĞERİ
		Grade 2	Grade 3	Grade 4		Grade 2	Grade3	
ASPIRASYONDA HÜCRESELLİK (n=79)	Hiposelüler	11 (%13.9)	24 (%30.4)	22 (%27.8)	= 0.003	36 (%45.6)	21 (%26.6)	= 0.004
	Normoselüler	3 (%3.8)	1 (%1.3)	2 (%2.5)		4 (%5.1)	2 (%2.5)	
	Hiperselüler	11 (%13.9)	5 (%6.3)	0 (%0)		16 (%20.3)	0 (%0)	
MYELOİD DİZİ	Normal	7 (%8.3)	4 (%4.8)	3 (%3.6)	= 0.049	12 (%14.3)	2 (%2.4)	= 0.022
	Artma	18 (%21.4)	22 (%26.2)	15 (%17.9)		39 (%46.4)	16 (%19)	
	Azalma	1 (%1.2)	5 (%6)	9 (%10.7)		6 (%7.1)	9 (%10.7)	
ERİTROİD DİZİ	Normal	9 (%10.7)	9 (%10.7)	2 (%2.4)	=0.104	19 (%22.6)	1 (%1.2)	= 0.008
	Artma	15 (%17.9)	17 (%20.2)	18 (%21.4)		31 (%37)	19 (%22.6)	
	Azalma	2 (%2.4)	5 (%6)	7 (%8.3)		7 (%8.3)	7 (%8.3)	
MEGAKARYOSİTİK DİZİ	Yaygın belirgin artma	6 (%7.1)	9 (%10.7)	10 (%11.9)	= 0.725	14 (%16.6)	11 (%13.1)	= 0.300
	Fokal belirgin artma	12 (%14.3)	16 (%19)	11 (%13.1)		29 (%34.5)	10 (%11.9)	
	Hafif artma	8 (%9.5)	6 (%7.1)	6 (%7.1)		14 (%16.6)	6 (%7.1)	
DİSPLAZİ	Displazi yok	10 (%11.9)	8 (%9.5)	5 (%6)	=0.547	19 (%22.6)	4 (%4.8)	=0.193
	1 dizide displazi	4 (%4.8)	4 (%4.8)	4 (%4.8)		8 (%9.5)	4 (%4.8)	
	≥2 dizide displazi	12 (%14.3)	19 (%22.6)	18 (%21.4)		30 (%35.7)	19 (%22.6)	
MEGAKARYOSİT MORFOLOJİSİ	Displastik/ displastik ağırlıklı mikst	10 (%11.9)	13 (%15.5)	15 (%17.9)	= 0.411	22 (%26.2)	16 (%19)	= 0.076
	Proliferatif/ proliferatif ağırlıklı mikst	16 (%19)	18 (%21.4)	12 (%14.3)		35 (%41.7)	11 (%13.1)	
MEGAKARYOSİT KÜMELEŞMESİ	Kümeleşme yok	8 (%9.5)	8 (%9.5)	5 (%6)	= 0.212	16 (%19)	5 (%6)	= 0.206
	Gevşek/ gevşek ağırlıklı mikst küme	10 (%11.9)	10 (%11.9)	5 (%6)		19 (%22.6)	6 (%7.1)	
	Sıkı/ sıkı ağırlıklı mikst küme	8 (%9.5)	13 (%15.5)	17 (%20.2)		22 (%26.2)	16 (%19)	
BLAST ORANI(%)	Blast yok	8 (%9.5)	4 (%4.8)	5 (%6)	= 0.639	13 (%15.5)	4 (%4.8)	= 0.410
	<%5	8 (%9.5)	14 (%16.6)	8 (%9.5)		22 (%26.2)	8 (%9.5)	
	%5-9	6 (%7.1)	6 (%7.1)	5 (%6)		12 (%14.3)	5 (%6)	
	%10-14	2 (%2.4)	5 (%6)	5 (%6)		6 (%7.1)	6 (%7.1)	
	%15-19	2 (%2.4)	2 (%2.4)	4 (%4.8)		4 (%4.8)	4 (%4.8)	
CD34+ HÜCRELERİN DAĞILIM PATERNİ	Blast yok	8 (%9.5)	4 (%4.8)	5 (%6)	= 0.233	13 (%15.4)	4 (%4.8)	= 0.191
	Dağınık	13 (%15.4)	15 (%17.8)	10 (%11.9)		28 (%33.3)	10 (%11.9)	
	Küme/Küme ve yaygın dağınık	5 (%6)	12 (%14.3)	12 (%14.3)		16 (%19.1)	9 (%15.5)	
ABERAN CD34 EKSPRESYONU (MEGAKARYOSİT)	Var	5 (%6)	8 (%9.5)	7 (%8.3)	= 0.804	12 (%14.3)	8 (%9.5)	= 0.389
	Yok	21 (%25)	23 (%27.4)	20 (%23.8)		45 (%53.6)	19 (%22.6)	
ANJİOGENEZ ARTIŞI	Yok	2 (%2.4)	0 (%0)	0 (%0)	< 0.001	2 (%2.4)	0 (%0)	< 0.001
	Hafif	15 (%17.9)	3 (%3.6)	0 (%0)		18 (%21.4)	0 (%0)	
	Orta	6 (%7.1)	16 (%19)	5 (%6)		22 (%26.2)	5 (%6)	
	Ağır	3 (%3.6)	12 (%14.3)	22 (%26.2)		15 (%17.9)	22 (%26.2)	
SİNÜZAL HEMATOPOEZ	Var	7 (%8.3)	18 (%21.4)	21 (%25)	= 0.001	26 (%31)	20 (%23.8)	= 0.014
	Yok	19 (%22.6)	13 (%15.5)	6 (%7.1)		31 (%37)	7 (%8.3)	
BİYOPSİDE DEPO DEMİRİ (n=79)	Artma	6 (%7.6)	16 (%20.3)	14 (%17.7)	= 0.094	22 (%27.8)	14 (%17.7)	= 0.232
	Normal	12 (%15.2)	12 (%15.2)	6 (%7.6)		24 (%30.4)	6 (%7.6)	
	Azalma	6 (%7.6)	1 (%1.3)	6 (%7.6)		7 (%8.9)	6 (%7.6)	
PLAZMA HÜCRE ARTIŞI	Var	12 (%14.3)	19 (%22.6)	18 (%21.4)	= 0.291	30 (%35.7)	19 (%22.6)	= 0.124
	Yok	14 (%16.6)	12 (%14.3)	9 (%10.7)		27 (%32.1)	8 (%9.5)	
LENFOİD NODÜL VARLIĞI	Var	2 (%2.4)	9 (%10.7)	8 (%9.5)	= 0.091	10 (%11.9)	9 (%10.7)	= 0.106
	Yok	24 (%28.6)	22 (%26.2)	19 (%22.6)		47 (%56)	18 (%21.4)	
MAST HÜCRE ARTIŞI	Var	4 (%4.8)	5 (%6)	8 (%9.5)	= 0.336	9 (%10.7)	8 (%9.5)	= 0.140
	Yok	22 (%26.2)	26 (%31)	19 (%22.6)		48 (%57.1)	19 (%22.6)	
TANI GRUPLARI	MDS-F	0 (%0)	5 (%6)	6 (%7.1)	= 0.045	4 (%4.8)	7 (%8.3)	= 0.058
	KMML	11 (%13.1)	6 (%7.1)	6 (%7.1)		17 (%20.2)	6 (%7.1)	
	MDS/MPN-U	3 (%3.6)	10 (%11.9)	8 (%9.5)		13 (%15.5)	8 (%9.5)	
	PMF-SF	12 (%14.3)	10 (%11.9)	7 (%8.3)		23 (%27.4)	6 (%7.1)	
BLAST ARTIŞI	Var	7 (%8.3)	7 (%8.3)	4 (%4.8)	= 0.551	14 (%16.6)	4 (%4.8)	= 0.309
	Yok	19 (%22.6)	24 (%28.6)	23 (%27.4)		43 (%51.2)	23 (%27.4)	
LÖSEMİK DÖNÜŞÜM	Var	7 (%8.3)	3 (%3.6)	6 (%7.1)	= 0.225	10 (%11.9)	6 (%7.1)	= 0.610
	Yok	19 (%22.6)	28 (%33.3)	21 (%25)		47 (%56)	21 (%25)	

Her iki sınıflamaya göre fibrozis düzeyindeki artma, myeloid dizide azalma (*Manoharan sınıflaması: p=0.049, Avrupa sınıflaması: p=0.022*), anjiogeneizde artma (*Her iki sınıflamada da p<0.001*) ve sinuzal hematopoez (*Manoharan sınıflaması: p=0.001, Avrupa sınıflaması: p=0.014*) ile ilişkili bulunurken eritroid dizide artma daha çok Grade 2 fibrozis ile birlikte görüldü (*Avrupa sınıflaması: p=0.008*). Beklenildiği gibi fibrozis arttıkça kemik iliği aspirasyonunda hücresellik azalmaktaydı (*Manoharan sınıflaması: p=0.003, Avrupa sınıflaması: p=0.004*).



ŞEKİL 4.2: Tanı gruplarına göre Manoharan ve Avrupa fibrozis derecelendirme sınıflamalarının karşılaştırması

4.4.KEMİK İLİĞİ BİYOPSİSİNDE STROMAL DEĞİŞİKLİKLER:

Kemik iliği biyopsisinde görülen stromal değişikliklerin tanı gruplarına göre dağılımı **Tablo 4.7'**de özetlenmiştir. Anjiogeneizde değişik düzeylerde artma hastaların %97.6'sında gözlemlendi. Orta düzeyde anjiogeneiz artışı en sık PMF-SF (%37.9) ve MDS/MPN-U (%35.3), belirgin artış ise MDS-F (%81.8) hastalarında saptanmakla birlikte diğer tanı gruplarında da mevcuttu. Anjiogeneiz artışı ile tanı grupları arasında istatistiksel anlamlılık saptandı (p=0.025).

Sinuzal hematopoez, tüm olguların %54.8'inde mevcut olup görülme sıklığı sırasıyla MDS/MPN-U (%70.6), PMF-SF (%62.1), KMML (%52.2), RARS-T (%50), MDS-F'de (%27.3) oranlarındadır. Sinuzal hematopoezin görüldüğü olguların %65.2'sinde megakaryosit morfolojisi proliferatif veya proliferatif ağırlıklı mikst tiptedir (p=0.034).

TABLO 4.7: Stromal değişiklikler

STROMAL DEĞİŞİKLİKLER		MDS-F n:11	KMML n:23	MDS/MPN-U n:17	PMF-SF n:29	P-DEĞERİ
ANJİOGENEZ ARTIŞI	YOK	0(%0)	0(%0)	1(%5.8)	0(%0)	<u>=0.025</u>
	HAFİF	0(%0)	8(%34.8)	2(%11.8)	8(%27.6)	
	ORTA	2(%18.2)	5(%21.7)	6(%35.3)	11(%37.9)	
	BELİRGİN	9(%81.8)	10(%43.5)	8(%47.1)	10(%34.5)	
SİNÜZAL HEMATOPOEZ		3(%27.3)	12(%52.2)	12(%70.6)	18(%62.1)	=0.215
LENFOSİT ARTIŞI		11(%100)	23(%100)	16(%94.1)	29(%100)	=0.386
LENFOİD NODÜL VARLIĞI		8(%72.7)	4(%17.4)	5(%29.4)	2(%6.9)	<u><0.001</u>
PLAZMA HÜCRE ARTIŞI		10(%90.9)	17(%73.9)	12(%70.6)	7(%24.1)	<u><0.001</u>
MAST HÜCRE ARTIŞI		0(%0)	9(%39.1)	7(%41.2)	1(%3.5)	<u>=0.002</u>
EOZİNOFİL ARTIŞI		7(%63.6)	11(%47.8)	12(%70.6)	24(%82.8)	=0.060

Lenfosit artışı, tüm olguların %97.6'sında değişen yoğunluklarda görüldü.

Plazma hücre artışı, olguların %58.3'ünde izlenmiş olup aKML, MDS-F, KMML, MDS/MPN-U, RARS-T olgularında sırasıyla %100, %90.9, %73.9, %70.6, %50 oranlarında olup PMF- SF'de olguların %24.1'inde mevcuttu ($p<0.001$). Kemik iliği selüleritesi plazma hücre artışı olan (ortalama selülerite %84.5) ve olmayan (ortalama selülerite %72) olgularda yüksek olmasına rağmen aradaki fark anlamlıdır ($p=0.001$). Plazma hücre artışı, myeloid dizide azalma izlenen olguların %86.7'sinde ($p=0.007$), megakaryositik dizide yaygın belirgin artış görülenlerin %72'sinde ($p=0.026$) mevcuttu. Displazi, plazma hücre artışı gözlenen olguların %80.5'inde myeloid, %79.6'sında eritroid, %81.6'sında megakaryositik dizilerde izlendi ($p<0.001$). Plazma hücre artışıyla displastik ve displastik ağırlıklı mikst megakaryosit morfolojisi ve megakaryositlerde kümeleşme görülmemesi arasında anlamlı ilişki görüldü (sırasıyla $p<0.001$ ve $p=0.042$). Plazma hücre artışı ile aspirasyonlarda blast oranlarında (%) blast oranı ve biyopside CD34+ hücrelerin küme veya küme ve yaygın dağınık dağılım paterni göstermeleri arasında anlamlı ilişki görüldü ($p<0.001$). Depo demirinde artma da plazma hücre artışı ile birlikte izlendi ($p=0.009$).

Lenfoid nodül, tüm olguların %23.8'inde görülmüş olup en sık MDS-F'de (%72.7) izlendi. Bunu sırasıyla MDS/MPN-U (%29.4), KMML (%17.4), PMF-SF (%6.9) izlemekteydi ($p<0.001$). Lenfoid nodül görülme sıklığı, biyopside myeloid dizide azalma ($p=0.029$), megakaryositik dizide yaygın belirgin artma ($p=0.018$) ile artarken fokal belirgin megakaryosit artışı olan olgularda daha az görüldü. Lenfoid nodül görülen olguların %75'inde myeloid, %94.7'sinde eritroid ($p<0.001$) ve %89.5'inde megakaryositlerde displazi ($p=0.005$) mevcuttu. Lenfoid nodül görülme sıklığı, (%) blast oranında artma ($p=0.008$) ve CD34+ hücrelerin küme veya küme+yaygın dağınık dağılım paterni ($p=0.029$) ile paralel artış gösterdi. Lenfoid nodül görülme sıklığı, biyopside depo demirinde artma ($p<0.001$) ve plazma hücre artışı ($p=0.002$) ile de paraleldir.

Mast hücre artışı, tüm olguların %20.2'sinde mevcut olup en sık MDS/MPN-U (%41.2) ve KMML (%39.1) olgularında izlendi. MDS-F, aKML ve RARS-T'de ise görülmedi ($p=0.002$). Kemik iliği biyopsisinde eritroid dizide hipoplazi, mast hücre artışı ile daha sık birlikte görüldü ($p=0.026$). Mast hücre artışı görülen olguların %94.1'inde megakaryositler displastik morfolojide ($p=0.002$) olup %47.1'inde megakaryositlerde aberan CD34 ekspresyonu vardı ($p=0.022$). Blast oranı (%) ve mast hücrelerindeki artış arasında ilişki izlendi ($p=0.032$). Sinuzal hematopoez izlenen olguların %76.5'ine mast hücre artışı da eşlik etmekteydi ($p=0.044$).

Eozinofil artışı, tüm olguların %67.9'unda mevcut olup sıklık sırasına göre RARS-T (%100), PMF-SF (%82.8), MDS/MPN-U (%70.6), MDS-F (%63.6), aKML (%50) ve KMML (%47.8) oranlarındadır. Eozinofil artışı, biyopside myeloid dizi artışı ($p=0.017$), megakaryositlerde fokal belirgin artış ($p=0.038$), proliferatif morfolojide megakaryositler ($p=0.016$) ile birlikte izlendi. Biyopside eozinofil artışı görülme sıklığı, düşük (%) blast oranı ile ilişkili bulundu ($p=0.015$).

4.5.TAKİP BİYOPSİLERİNDE BLAST ORANINDA ARTMA VE LÖSEMİK DÖNÜŞÜM:

Takip sırasında hastaların %27.4'ünde periferik yayma ve/veya tekrar biyopsilerinde blast oranında artma görüldü. Blast oranındaki artma gerek aspirasyonlarda (%) olarak, gerekse biyopsilerde CD34+ veya CD117+ hücre sayılarında önceki biyopsilere oranla artma şeklinde değerlendirildi. Bu hastalar tanı gruplarına göre dağıldığında KMML (%60.9), MDS/MPN-U (%35.3) ve MDS-F (%27.3) şeklinde olup aKML, PMF-SF ve RARS-T'de takip sırasında blast oranında artma görülmedi ($p<0.001$). Aspirasyonlarda blast oranındaki artışlar kemik iliği biyopsilerine CD34+ hücrelerin küme veya küme+yaygın patern şeklinde artışı olarak yansımıştır ($p<0.001$).

Takip sırasında blast oranındaki artışlar, ≥ 2 dizide displazi ($p=0.003$), megakaryositlerde yaygın belirgin artma ($p<0.001$), displastik ve displastik ağırlıklı mikst megakaryosit morfolojisi ($p<0.001$) ile birlikte izlendi. Öte yandan fokal megakaryosit artışı olan olguların sadece %5.1'i, proliferatif ağırlıklı megakaryosit morfolojisi olan olguların %17.4'ünde takip sırasında blast artışı mevcuttu. Displazinin eşlik etmediği proliferatif megakaryosit morfolojisi saptanan olgularda ise takip sırasında blast artışı görülmedi ($p<0.001$). Takip sırasında blast artışına eşlik eden diğer bir faktör, megakaryositlerde kümeleşme olmaması idi. Bununla birlikte, sıkı kümeleşme görülen olgularda takip sırasında blast artışı nadiren (%10.5) izlendi ($p=0.044$). Tanı sırasındaki blast oranı ve takip sırasındaki

blast artışları **Tablo 4.8**'de özetlenmiştir. Beklenildiği gibi başlangıç blast oranı yüksek olan hastalarda takip sırasında blast oranında artış daha sıktır (p=0.001).

TABLO 4.8: Takip süresi içinde blast oranında artış izlenen olgularda, tanı biyopsilerinde blast oranları (%) dağılımı.

		BLAST (%)						P-DEĞERİ
		0	<5	5-9	10-14	15-19	Toplam	
BLAST ARTIŞI	Var	0 (%0)	5 (%16.7)	7 (%41.2)	5 (%41.7)	6 (%75)	23	=0.001
	Yok	17 (%100)	25 (%83.3)	10 (%58.8)	7 (%58.3)	2 (%25)	61	
	Toplam	17	30	17	12	8	84	

Takip sırasında blast oranında artma izlenen olguların, %87'sinde plazma (p=0.001), %39.1'inde mast hücrelerinde (p=0.014), %69.6'sında ise depo demirinde artış (p=0.017) görüldü. Takip sırasında blast oranında artış izlenen hastaların %57.1'inde sitogenetik anomali mevcuttu (p=0.012).

Tanı gruplarına göre başlangıç blast oranları, takip sırasında blast oranında artış, lösemik dönüşüm, lösemik dönüşüm için geçen süre ve sağ kalım oranları **Tablo 4.9**'da özetlenmiştir.

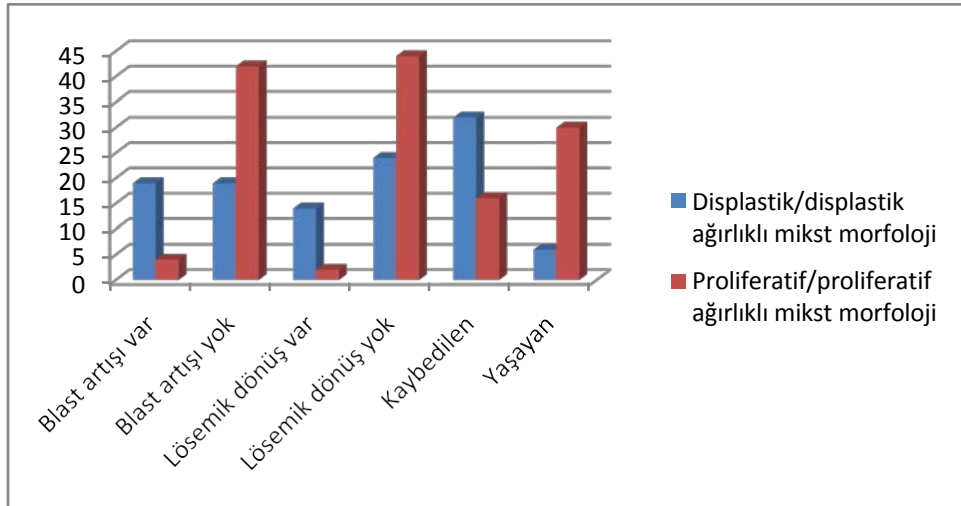
TABLO 4.9: Tanı gruplarına göre başlangıç blast oranları, blast artışı, lösemik dönüşüm ve sağ kalım süreleri

		MDS-F n:11	KMML n: 23	MDS/MPN-U n: 17	PMF n: 29	P-DEĞERİ
KEMİK İLİĞİNDE BLAST ORANI (%)	BLAST YOK	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)	15 (%51.7)	≤0.001
	<%5	4 (%36.4)	3 (%13)	8 (%47.1)	14 (%48.3)	
	%5-9	2 (%18.2)	11 (%47.8)	3 (%17.6)	0 (%0)	
	%10-14	4 (%36.4)	4 (%17.4)	4 (%23.5)	0 (%0)	
	%15-19	1 (%9.1)	5 (%39.1)	2 (%35.3)	0 (%0)	
TAKİPTE BLAST ORANINDA ARTIŞ		3 (%27.3)	14 (%60.9)	6 (%35.3)	0 (%0)	≤0.001
LÖSEMİK DÖNÜŞÜM		1 (%9.1)	10 (%43.5)	5 (%29.4)	0 (%0)	=0.001
LÖSEMİK DÖNÜŞÜM İÇİN GEÇEN SÜRE (ORTALAMA/ARALIK)		4 AY	14.5 AY (1-62)	26.7 AY (9-56)	(-)	
SAĞ KALIM DURUMU (KAYBEDİLEN OLGULAR)		9 (%90.9)	17 (%74.9)	15 (%88.2)	5 (%17.2)	≤0.001
SAĞ KALIM (MEDYAN/ARALIK)		6 AY (2-56 AY)	25 AY (2-67 AY)	20 AY (1-81 AY)	(-) (22-78 AY)	≤0.001

Takip süresi 84 hasta için 1-81 ay arasında olup ortalama 31 ± 20.9 aydır. Bu süre içinde 16 hastada (%19) lösemik dönüşüm izlendi. Lösemik dönüşüm sıklık sırasına göre KMML (%43.5), MDS/MPN-U (%29.4) ve MDS-F'de (%9.1) oranlarında görüldü. PMF-SF, aKML ve RARS-T'de ise görülmedi ($p < 0.001$).

Tanı biyopsilerinden lösemik dönüşüm anına kadar geçen ortalama süre MDS-F'de 4 ay, KMML'de 14.5 ay (1-62 ay) ve MDS/MPN-U'de 26.7 ay (9-56 ay) olarak izlendi. Takip sırasında blast artışı olan olguların %69.6'sında lösemik dönüşüm görüldü ($p < 0.001$). Beklenildiği gibi tanı sırasındaki yüksek blast oranı da lösemik dönüşüm riskini arttırmaktaydı ($p < 0.001$). Lösemik dönüşüm gelişen hastaların %68.8'inde kemik iliği biyopsisinde CD34+ hücre sayısı artmış olup dağılımı, küme veya küme+yaygın dağınık paterneydi ($p = 0.014$).

Lösemik dönüşüm; ≥ 2 dizide displazi ($p < 0.001$), megakaryositlerde yaygın belirgin artış ($p = 0.003$), kümeleşme olmaması ($p = 0.018$) ve displastik megakaryosit morfolojisi ($p < 0.001$) ile ilişkili bulundu. Öte yandan, proliferatif megakaryosit morfolojisi lösemik dönüşüm ile birlikte görülmedi ($p < 0.001$). Megakaryosit morfolojisi ile takip sırasında blast artışı, lösemik dönüşüm ve sağ kalım durumları (kaybedilen ve yaşayan hasta sayısı) arasındaki ilişki **Şekil 4.3**'te gösterilmiştir. Kemik iliği stromasında plazma ($p = 0.001$), mast ($p = 0.016$) hücre artışı ve lenfoid nodül ($p = 0.042$) varlığı ile AML dönüşümü arasındaki ilişki anlamlı bulundu.



ŞEKİL 4.3: Megakaryosit morfolojisi ile takip süresi içinde blast artışı, lösemik dönüşüm ve sağ kalım arasındaki ilişki

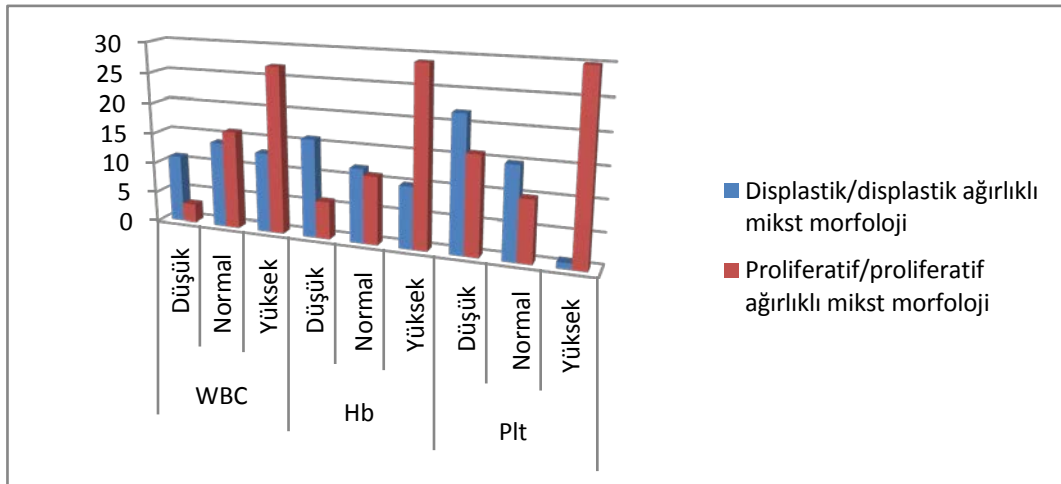
4.6.KLİNİK VE MORFOLOJİK PARAMETRELERİN İLİŞKİSİ:

4.6.1. Megakaryosit morfolojisinin klinik parametrelerle ilişkisi:

Megakaryosit morfolojisi ve klinik parametrelerin ilişkisi **Şekil 4.4**'te özetlenmiştir. Splenomegali, proliferatif megakaryosit morfolojisinin hakim olduğu olguların %80.4'ünde, displastik ağırlıklı megakaryosit morfolojisi gözlenen olguların %39.5'inde görüldü ($p<0.001$).

Displastik ağırlıklı megakaryosit morfolojisi ile hemogram değerleri karşılaştırıldığında; %36.5 normal lökosit düzeyi, %28.9 lökopeni, %34.2 lökositoz, %73.7 düşük hemoglobin (<10 g/dL) ve %57.9 trombopeni ($<100000/\text{mm}^3$), proliferatif ağırlıklı megakaryosit morfolojisi görülenlerde, %58.7 lökositoz, %63 hafif düşük/normal hemoglobin düzeyi (≥ 10 g/dL) ve %65.2 trombositoz ($\geq 400000/\text{mm}^3$) saptandı. Bu oranlar arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı bulundu (WBC; $p=0.012$, Hb; $p=0.001$, Plt $p<0.001$). Displastik veya displastik ağırlıklı mikst morfolojinin hakim olduğu olguların %78.3'ünde ESH ($p=0.003$), %69'unda ferritin düzeyi yüksekti ($p=0.037$).

JAK2 V617F mutasyonu, proliferatif/proliferatif ağırlıklı mikst megakaryosit morfolojisi görülen olguların %81.8'inde saptanmasına karşın displastik veya displastik ağırlıklı mikst megakaryosit morfolojisi görülen olguların %26.7'sinde mevcuttu ($p<0.001$).



ŞEKİL 4.4: Kan değerleri ve megakaryosit morfolojisi

4.6.2. Megakaryositlerde aberan CD34 ekspresyonunun klinik parametrelerle ilişkisi:

Megakaryositlerde aberan CD34 ekspresyonu ile splenomegali olmaması ($p=0.021$), belirgin trombopeni ($p=0.001$), yüksek ferritin düzeyi ($p=0.049$) ve JAK2 V617F mutasyonu yokluğu ($p=0.020$) arasında ilişki saptandı.

4.6.3. Kemik iliğinde stromal değişikliklerin klinik parametrelerle ilişkisi:

Kemik iliği biyopsilerinde lenfoid nodül görülme sıklığı düşük hemoglobin ($p<0.001$), trombopeni ($p=0.011$), lökopeni ($p=0.001$) ve yüksek ferritin düzeyleri ($p=0.049$) ile ilişkili bulundu. Düşük hemoglobin düzeyi aynı zamanda mast ($p=0.049$) ve plazma ($p<0.001$) hücre artışları ile de ilişkili bulundu.

Kemik iliği biyopsisinde plazma hücre artışı görülen olguların %80.6'sında ESH ($p<0.001$), %75.8'inde ferritin ($p<0.001$) değerleri yüksekti.

4.7.SAĞ KALIM VE PROGNOZ FAKTÖRLERİ:

Tüm hastalarda sağ kalım sürelerine ulaşılmış olup 1-81 aylık takip süresi içinde 84 hastanın 48'i (%57.1) kaybedilmiştir. Kaybedilen hastaların tanı gruplarına göre dağılımı MDS-F (%90.9), MDS/MPN-U (%88.2), KMML (%73.9), aKML (%50), PMF-SF (%17.2) şeklindedir. İki RARS-T olgusu halen yaşamaktadır ($p<0.001$). Tanı gruplarına göre medyan sağ kalım süreleri MDS-F 6 ay (2-56 ay), MDS/MPN-U 20 ay (1-81 ay), KMML 25 ay (2-67 ay) iken PMF-SF olgularında medyan yaşam süresine ulaşılammıştır (ortalama 67.5 ± 4.1 ay) (22-78 ay). Tanı grupları arasında yaşam süreleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.001$).

MDS-F olguları içinde yaşayan tek hasta olup allojeneik kök hücre nakli sonrası 56. ayda sağdır. Geri kalan 10 hastanın 8'i 2-11 ay (ortalama 4.9 ay) içinde, diğer ikisi ise 17 ve 24 ay içerisinde kaybedilmişlerdir. MDS/MPN-U grubunda yer alan 17 hastanın 7'si ilk bir yıl içinde 1-12 ay arasında (ortalama 6.8 ay), 8'i ise 18-58 ay (ortalama 35.1 ay) içinde kaybedilmiştir. İki hasta ise 37-81 ay arasında sağdır. İki aKML hastasından biri 2 ay içinde kaybedilmiş olup diğeri ise AKİT sonrası sağdır (28 ay). RARS-T hastalarının ikisi de sağdır (50 ve 58 ay). Yirmi üç KMML hastasının 6'sı 22-35 ay içinde sağdır. Geri kalan 17 hastanın 7'si bir yıl içinde, 2-12 ay arasında (ortalama 8.7 ay), 10'u ise 13-67 ay arasında (ortalama 25.9 ay) kaybedilmiştir. Yirmi dokuz PMF-SF hastası içinde sadece 5 hasta 24-42 ay içinde kaybedilmiştir. Buna karşın geri kalan 24 hasta 22-78 ay arasında sağdır.

Tanı gruplarına bakılmaksızın tüm hastalar birlikte değerlendirildiğinde, klinik parametrelerin medyan yaşam sürelerine etkisi **Tablo 4.10**'da, morfolojik parametrelerin

medyan yaşam sürelerine etkisi **Tablo 4.11**'de, tanı gruplarına ait yaşam eğrileri **Şekil 4.5a**'da verilmiştir.

TABLO 4.10: Tüm hastalar: Klinik parametrelerin medyan yaşam süresine etkileri

PROGNOSTİK FAKTÖRLER		MEDYAN YAŞAM SÜRESİ (AY)	P-DEĞERİ
Yaş	<60	58±12.1	=0.097
	≥60	35±6.7	
Cinsiyet	Kadın	Medyana ulaşamadı ortalama 45.3±5.2	=0.218
	Erkek	37±4.9	
Tanı grupları	MDS-F	6±2.2	<0.001
	KMML	25±9.4	
	MDS/MPN-U	20±6.2	
	aKML	Medyana ulaşamadı ortalama 15±18.4	
	RARS-T	Medyana ulaşamadı, ortalama 54±5.7	
	PMF	Medyana ulaşamadı, ortalama 67.5±4.1	
Splenomegali	Var	58±11	=0.007
	Yok	18±3.7	
Hepatomegali	Var	58±13.3	=0.146
	Yok	35±10.2	
Lökosit sayısı (WBC)	<4000/mm ³	11±6.5	=0.229
	≥4000-<10.000/mm ³	36±12.9	
	≥10.000/mm ³	42±11.8	
Hemoglobin değeri (Hb)	<8 g/dL	11±5.6	<0.001
	≥8-<10 g/dL	18±6.6	
	≥10 g/dL	Medyana ulaşamadı, ortalama 63.6±4.5	
Trombosit sayısı (Plt)	<100.000/mm ³	11±3.7	<0.001
	≥100.000-<400.000/mm ³	37±6.9	
	≥400.000/mm ³	Medyana ulaşamadı, ortalama 66±4.4	
ESR değeri	Normal	36±7	=0.001
	Yüksek	Medyana ulaşamadı, ortalama 64.9±5.2	
Feritin değeri	Normal	Medyana ulaşamadı, ortalama 63.3±5.5	<0.001
	Düşük	7	
	Yüksek	21±3.9	
Sitogenetik anomali	Var	31±11.1	=0.135
	Yok	67	
JAK2V617F mutasyonu	Var	63±4.8	=0.608
	Yok	58	

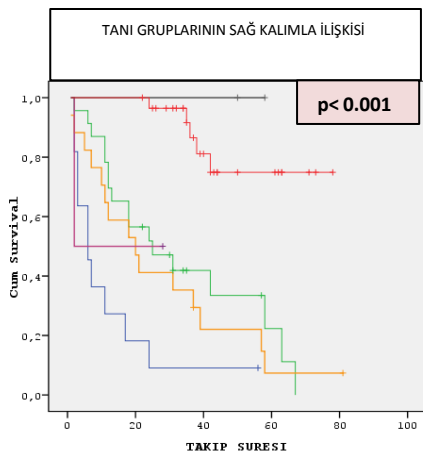
Tüm hasta grubu içinde yaş, cinsiyet, hepatomegali, lökosit sayısı, sitogenetik anomali ve JAK2 V617F mutasyonu varlığının sağ kalım üzerine olumsuz etkileri görülmemekle birlikte splenomegali, aneminin ağırlığı, düşük trombosit, yüksek ferritin ve ESH değerleri yaşam süresini kısaltmaktadır. Beklendiği şekilde ≥2 dizide displazi, aspirasyonlarda blast oranında (%) veya biyopsilerde CD34+ hücrelerin küme veya küme+yaygın dağınık paternde artmaları ve lösemik dönüşüm yaşam sürelerini olumsuz etkilemektedir. Morfolojik parametreler içinde myeloid ve eritroid dizilerde azalma ve displazi yaşam süresini kısaltan faktörlerdir. Benzer şekilde megakaryositlerdeki artışın yaygın belirgin olması, kümeleşme göstermemeleri, megakaryosit morfolojisinin displastik/displastik ağırlıklı mikst tipte olması (**Şekil 4.5 b**), megakaryositlerde aberan CD34 ekspresyonu, depo demirinde artma yaşam sürelerini olumsuz etkilemektedir. Kemik iliğindeki fibrozisin orta veya ağır düzeyde olmasının Avrupa sınıflamasında yaşam süreleri üzerine etkisi olmadığı halde Manoharan sınıflamasında Grade 3-4 fibrozis izlenen hastaların yaşam süreleri anlamlı olarak daha

kısadır. Manoharan fibrozis derecelendirme sınıflamasının sağ kalımla ilişkisi **Şekil 4.6 a-b'**de gösterilmiştir. Anjiogeneze artma ve sinuzal hematopoezin yaşam süreleri üzerine olumsuz etkisi görülmemiştir. Lenfoid nodül varlığı, plazma ve mast hücre artışları yaşam sürelerini olumsuz yönde etkilemektedir (**Şekil 4.5 c-d**).

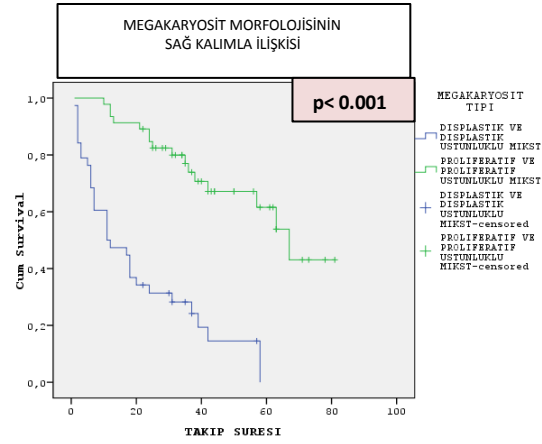
Çok değişkenli analizde, düşük hemoglobin değeri ($p<0.001$), yüksek blast oranları ($p<0.001$), displastik megakaryosit morfolojisi ($p=0.004$), ≥ 2 dizide displazi ($p=0.024$), Manoharan sınıflamasına göre ağır fibrozis ($p=0.013$) ve interstisyel plazma hücre artışı ($p=0.011$) bağımsız prognostik faktörler olarak öne çıkmaktadır (**Tablo 4.12**).

TABLO 4.11: Tüm hastalar: Morfolojik parametrelerin medyan yaşam süresine etkileri

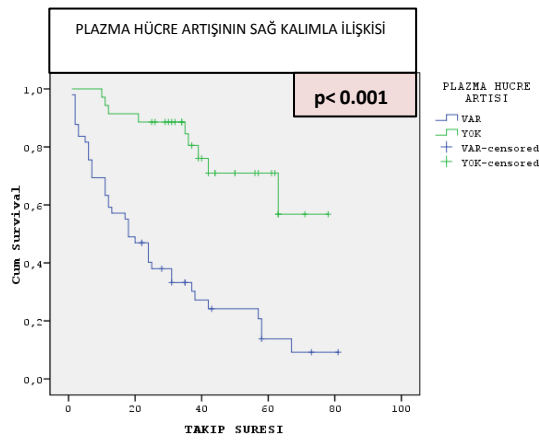
PROGNOSTİK FAKTÖRLER		MEDYAN YAŞAM SÜRESİ (AY)	P-DEĞERİ
Myeloid dizi	Normal	37±1.6	=0.001
	Artma	57±11.2	
	Azalma	7±4.8	
Eritroid dizi	Normal	67±21.8	=0.013
	Artma	38±10	
	Azalma	24±3.7	
Megakaryositik dizi	Yaygın belirgin artma	21±3.7	<0.001
	Fokal belirgin artma	Medyana ulaşamadı, ortalama 58.9±4.9	
	Hafif artma	25±8.2	
Displazi	Displazi yok	Medyana ulaşamadı, ortalama 66±4.6	<0.001
	Tek dizide displazi	63±17.7	
	≥ 2 dizide displazi	17±3.1	
Megakaryositlerde kümeleşme	Kümeleşme yok	12±4.6	<0.001
	Sıkı/Sıkı ağırlıklı mikst tip kümeleşme	58±12.6	
	Gevşek/Gevşek ağırlıklı mikst tip kümeleşme	57±16	
Megakaryosit morfolojisi	Displastik/ displastik ağırlıklı mikst morfoloji	11±5.1 ay	<0.001
	Proliferatif/ proliferatif ağırlıklı mikst morfoloji	67±6.9 ay	
Manoharan fibrozis sınıflaması	Grade 2	67±20.3	=0.018
	Grade 3-4	31±7.7	
Avrupa fibrozis sınıflaması	Grade 2	39±9	=0.220
	Grade 3	24±11.8	
Depo demiri	Azalma	39±10.1	<0.001
	Normal	Medyana ulaşamadı, ortalama 38±19.5	
	Artma	18±2.2	
Blast oranı (%)	Blast yok	Medyana ulaşamadı, ortalama 66.5±4	<0.001
	$<5\%$	57±41.5	
	$5-9\%$	18±7.9	
	$10-14\%$	17±5.2	
	$15-19\%$	6±5.7	
CD 34 (+) hücrelerin dağılım paterni	CD34 (+) hücre yok	Medyana ulaşamadı, ortalama 66.7±4.8	<0.001
	Dağınık	57±7.6	
	Küme/ Küme ve yaygın dağınık	18±0.9	
Megakaryositlerde aberan CD34 ekspresyonu	Var	17±7.8	=0.009
	Yok	57±8.5	
Blast artışı	Var	24±4.2	=0.021
	Yok	57±12.2	
Lösemik dönüşüm	Var	18±4.5	=0.001
	Yok	57±11.1	
Plazma hücre artışı	Var	18±3.4	<0.001
	Yok	Medyana ulaşamadı, ortalama 61.5±4.5	
Lenfoid nodül varlığı	Var	11±2.7	=0.001
	Yok	42±7.6	
Mast hücre artışı	Var	25±8.9	=0.034
	Yok	57±12.6	



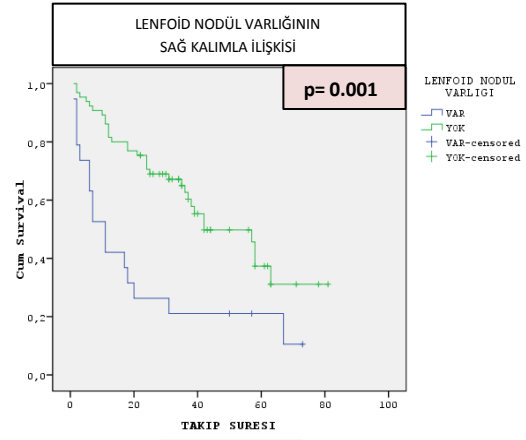
Şekil 4.5 a



Şekil 4.5 b

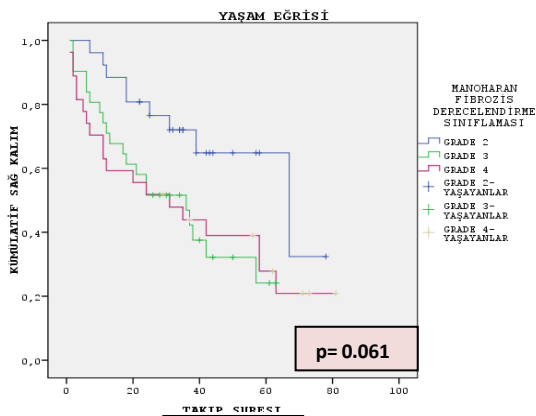


Şekil 4.5 c

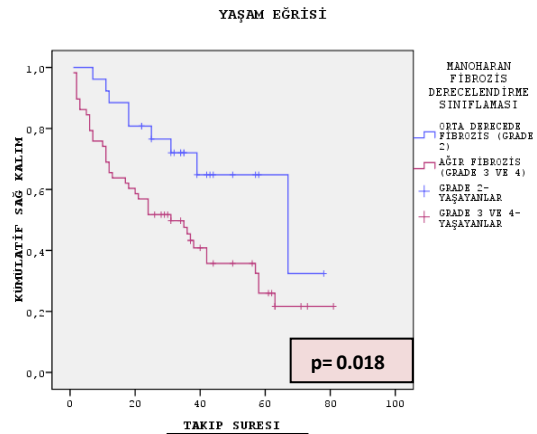


Şekil 4.5 d

ŞEKİL 4.5: a) Tanı grupları, b) megakaryosit morfolojisi, c) plazma hücre artışı ve d) lenfoid nodül varlığının sağ kalım üzerine etkileri



Şekil 4.6 a



Şekil 4.6 b

ŞEKİL 4.6: Manoharan sınıflamasına göre yaşam eğrileri; a) 3 farklı fibrozis grade'ine göre, b) orta (Grade 2) ve ağır (Grade 3-4) fibroze göre

Tablo 4.12: Tüm hastalar: Çok değişkenli analizde bağımsız prognoz faktörleri

TÜM OLGULAR	p-değeri	e ^b -Hazard ratio (Ölüm riski)	Hazard ratio (Ölüm riski) için %95 güven aralığı	
			Alt	Ust
Düşük hemoglobin değerleri (Hb <10 g/dL)	<0.001	7.382	3.110	17.522
Yüksek blast oranı	<0.001	7.937	2.577	24.440
Displastik megakaryosit morfolojisi	0.004	3.937	1.538	10.082
≥2 dizide displazi	0.024	3.230	1.165	8.955
Yoğun fibrozis (Manoharan Sınıflaması)	0.013	2.586	1.224	5.464
İnterstisyel plazma hücre artışı	0.011	2.925	1.281	6.679

Tüm hastalar birlikte değerlendirildiğinde, anlamlı parametreler PMF-SF ve diğer tanı grupları arasında ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle PMF-SF hastaları ayrılıp displastik özellikler gösteren diğer tanı grupları birleştirilerek analiz tekrarlanmıştır. PMF-SF hastalarının özellikleri **Tablo 4.13**'te özetlenmiştir. PMF-SF grubunda yaşam süresi diğer gruba göre uzundur (Medyana ulaşamadı, ortalama 67.5±4.1 ay). Klinik parametreler içinde düşük hemoglobin düzeyleri (Hb<10g/dL), yüksek ESH, morfolojik parametreler içinde megakaryositlerde aberan CD34 ekspresyonu ve depo demirinde artma/azalma yaşam sürelerini olumsuz yönde etkilemektedir.

Displastik özelliklerin ve blast artışının ön planda olduğu MDS-F, KMML, MDS/MPN-U hastaları birleştirilmiş, RARS-T ve aKML hastaları sayıca az ve henüz önerilen antiteler olduklarından MDS/MPN-U grubu içine alınarak analiz yapılmıştır (**Tablo 4.13** ve **4.14**). Tablolardan da izlendiği üzere; klinik parametreler içinde yaş, cinsiyet, hepatosplenomegali, lökosit, trombosit sayısı, ESH, sitogenetik anomali, JAK2 V617F mutasyonu ve lösemik dönüşümün sağ kalım üzerine olumsuz etkileri görülmemekle birlikte aneminin ağırlığı ve yüksek ferritin düzeyleri yaşam süresini kısaltmaktadır. Morfolojik parametreler içinde yaşam süreleri üzerinde olumsuz etkileri olanlar displazinin ≥2 diziye tutması, displastik/displastik ağırlıklı megakaryosit morfolojisi, megakaryositlerde kümeleşme olmaması, plazma hücre artışı, lenfoid nodül varlığı, yüksek blast oranı (≥%5) ve biyopside CD34+ hücre artışıdır. Çok değişkenli analizde düşük hemoglobin değeri (p<0.001), displastik megakaryosit morfolojisi (p=0.032) ve interstisyel plazma hücre artışının (p=0.033) bağımsız prognostik faktörler olduğu gösterilmiştir (**Tablo 4.15**).

TABLO 4.13: MDS, MDS/MPN grubu ve PMF-SF’da klinik parametreler ve sağ kalım üzerine etkileri

PROGNOSTİK FAKTÖRLER		Hasta sayısı (n)	MEDYAN YAŞAM SÜRESİ (AY) MDS-F, KMML, MDS/MPN-U, aKML, RARS-T (n:55)	P-değeri	Hasta sayısı (n)	MEDYAN YAŞAM SÜRESİ (AY) PMF-SF (n:29)	P-değeri
Yaş	<60	22	18±13.6	=0.612	14	Medyana ulaşılamadı, ortalama 73.8±4	=0.198
	≥60	33	18±9.2		15	Medyana ulaşılamadı, ortalama 51.4±3.8	
Cinsiyet	Kadın	19	18±2.2	=0.812	13	Medyana ulaşılamadı, ortalama 67.1±3.8	=0.420
	Erkek	36	18±8.7		16	Medyana ulaşılamadı, ortalama 64.7±5.5	
Tanı grupları	MDS-F	11	6±2.2	<u>=0.027</u>	29	Medyana ulaşılamadı, ortalama 67.5±4.1	-
	KMML	23	25±9.4				
	MDS/MPN-U	17	20±6.2				
	aKML	2	Medyana ulaşılamadı ortalama 15±18.4				
	RARS-T	2	Medyana ulaşılamadı, ortalama 54±5.7				
Hemoglobin değeri (Hb)	<8 g/dL	21	11±4.6	<u>=0.007</u>	1	42	<u><0.001</u>
	8-9.9 g/dL	20	13±5.6		3	35±9	
	≥10 g/dL	14	42±3.7		25	Medyana ulaşılamadı, ortalama 75.3±2.6	
ESH değeri	Normal	8	31±7.8	=0.843	18	Medyana ulaşılamadı, ortalama 48±17.6	<u>=0.003</u>
	Yüksek	27	12±11.3		8	38±2.1	
Ferritin değeri	Normal	11	58±14.5	<u>=0.045</u>	18	Medyana ulaşılamadı, ortalama 42.1±14.7	=0.520
	Düşük	1	7		1	Medyana ulaşılamadı, ortalama 71	
	Yüksek	30	20±3.8		1	Medyana ulaşılamadı, ortalama 40	
Sitogenetik anormali	Var	12	24±7.9	=0.429	2	Medyana ulaşılamadı, ortalama 34.5±13.4	=0.711
	Yok	12	31±5.9		7	Medyana ulaşılamadı, ortalama 45.1±13	
JAK2 V617F mutasyonu	Var	8	42±32.5	=0.458	14	Medyana ulaşılamadı, ortalama 45.2±15.7	=0.210
	Yok	18	31±7.6		12	Medyana ulaşılamadı, ortalama 43.3±16.7	

Blast oranı ayrı olarak ele alındığında yaşam süreleri; blast görülmeyen (39 ay) ve <%5 blast saptanan (57±41.5 ay) hastalarda uzundur. Kemik iliğinde ≥%5-<%10 (18±7.9 ay) ve ≥%10-<%15 (17±5.5 ay) oranlarında blast saptanan hastaların yaşam süreleri birbirine çok yakın olduğu halde kemik iliği blast oranı ≥%15-<%20 olan hastalarda yaşam süresi belirgin olarak kısalmaktadır (6±5.7 ay) (p=0.001). Biyopside CD34+ hücre artışı, CD34+ hücrelerin dağılım paterninden bağımsız olarak yaşam süresini olumsuz etkilemektedir.

İstatistiksel olarak anlamlılık saptanmamakla birlikte her iki fibrozis derecelendirme sisteminde, fibrozisin ağırlığının artması ile birlikte yaşam süreleri kısalmaktadır.

TABLO 4.14: MDS, MDS/MPN grubu ve PMF-SF’da morfolojik parametreler ve sağ kalım üzerine etkileri

PROGNOSTİK FAKTÖRLER		Hasta sayısı (n)	MEDYAN YAŞAM SÜRESİ (AY)	P-değeri	Hasta sayısı (n)	MEDYAN YAŞAM SÜRESİ (AY)	P-değeri
			MDS-F, KMML, MDS/MPN-U, aKML, RARS-T (n:55)			PMF-SF (n:29)	
Myeloid dizi	Normal	5	12±1.1	=0.031	9	Medyana ulaşılamadı, ortalama 44.4±2.5	=0.175
	Artma	35	31±7.5		20	Medyana ulaşılamadı, ortalama 71.8±4.1	
	Azalma	15	7±4.8		-	-	
Eritroid dizi	Normal	6	12±12.7	=0.897	14	Medyana ulaşılamadı, ortalama 70.5±4.9	=0.559
	Artma	35	17±3.4		15	Medyana ulaşılamadı, ortalama 60.5±5.8	
	Azalma	14	24±3.7		-	-	
Megakaryositik dizi	Yaygın belirgin artma	21	18±6.1	=0.615	4	36	=0.111
	Fokal belirgin artma	14	Medyana ulaşılamadı, ortalama 18±22.6		25	Medyana ulaşılamadı, ortalama 69±4	
	Hafif artma	20	18±13.8		-	-	
Displazi	Displazi yok	-	-	=0.049	23	Medyana ulaşılamadı, ortalama 44±15.5	=0.372
	Tek dizide displazi	6	63		6	Medyana ulaşılamadı, ortalama 40±16.6	
	≥2 dizide displazi	49	17±3.1		-	-	
Megakaryosit morfolojisi	Displastik/ displastik ağırlıklı morfoloji	38	11±5.1	=0.003	-	-	*
	Proliferatif/proliferatif ağırlıklı morfoloji	17	57±25.5		29	Medyana ulaşılamadı, ortalama 67.5±4.1	
	Grade 2	14	31±9.6		12	Medyana ulaşılamadı, ortalama 39.8±14.4	
Manoharan fibrozis sınıflaması	Grade 3-4	41	13±4.5	=0.094	24	Medyana ulaşılamadı, ortalama 45.6±16.3	=0.088
	Grade 2	34	21±5.7		23	Medyana ulaşılamadı, ortalama 67.2±4.7	
Avrupa fibrozis sınıflaması	Grade 3	21	12±5.7	=0.524	6	Medyana ulaşılamadı, ortalama 65.3±6.7	=0.759
	Yok	27	18±5.2		11	Medyana ulaşılamadı, ortalama 59.4±3.3	
	Azalma	8	11±12.7		5	42±4.9	
Depo demiri	Normal	15	57±24.3	=0.101	15	Medyana ulaşılamadı, ortalama 74.4±3.5	=0.025
	Artma	32	17±4		4	35	
	Blast yok	2	39		15	Medyana ulaşılamadı, ortalama 68.1±5	
Blast oranı (%)	<%5	16	57±41.5	=0.001	14	Medyana ulaşılamadı, ortalama 63.8±5.9	=0.857
	%5-9	17	18±7.9		-	-	
	%10-14	12	17±5.2		-	-	
	%15-19	8	6±5.7		-	-	
					-	-	
CD 34+ hücrelerin dağılım paterni	CD34 (+) hücre yok	2	39	=0.175	15	Medyana ulaşılamadı, ortalama 68.1±5	=0.857
	Dağınık	24	13±23		14	Medyana ulaşılamadı, ortalama 63.8±5.9	
	Küme/ Küme ve dağınık	29	18±1.9		-	-	
Megakaryositlerde aberan CD34 ekspresyonu	Var	19	17±6.5	=0.821	1	24	<0.001
	Yok	36	18±9		28	Medyana ulaşılamadı, ortalama 69.1±4	
Takip sırasında blast artışı	Var	18	24±4.2	=0.883	-	-	*
	Yok	37	13±3.6		29	Medyana ulaşılamadı, ortalama 67.5±4.1	
Lösemik dönüşüm	Var	16	18±4.5	=0.346	-	-	*
	Yok	39	21±6.7		29	Medyana ulaşılamadı, ortalama 67.5±4.1	
Plazma hücre artışı	Var	42	13±3.2	=0.016	7	Medyana ulaşılamadı, ortalama 55.1±9.8	=0.213
	Yok	13	63		22	Medyana ulaşılamadı, ortalama 69.8±4.2	
Lenfoid nodül varlığı	Var	18	7±2.6	=0.047	1	Medyana ulaşılamadı, ortalama 73	=0.585
	Yok	37	25±8.4		28	Medyana ulaşılamadı, ortalama 42.1±14.7	

*Her alt grupta hasta olmadığından log rank karşılaştırma analizi yapılamamıştır.

MDS-F hastalarının yaşam süreleri, diğer tanı gruplarına göre çok daha kısa olmakla birlikte her üç grup birlikte değerlendirildiğinde, derin anemi, kemik iliği blast oranı, CD34+ hücre sayısı, fibrozisin ağırlığı, depo demirindeki artma/azalma, lenfoid nodül varlığı ve plazma hücre artışı dışında gruplar arasında yaşam sürelerini olumsuz etkileyen faktörlerde önemli bir farklılık görülmemiştir.

TABLO 4.15: Fibrozisin eşlik ettiği MDS ve MDS/MPN: Çok değişkenli analizde bağımsız prognoz faktörleri

FİBROZİSİN EŞLİK ETTİĞİ MDS VE MDS/MPN	p-değeri	e ^b -Hazard ratio (Ölüm riski)	Hazard ratio (Ölüm riski) için %95 güven aralığı	
			Alt	Ust
Düşük hemoglobin	<0.001	5.695	2.243	14.463
Displastik megakaryosit	0.032	9.508	1.219	74.147
İnterstisyel plazma hücre artışı	0.033	2.697	1.082	6.723

4.8.MDS/MPN-U GRUBU; KLİNİK, MORFOLOJİK ÖZELLİKLER VE PROGNOZ FAKTÖRLERİ:

KMML ve aKML tanı kriterlerini doldurmayan, ancak myelodisplastik/myeloproliferatif özellikler içeren hastaları, tanı kriterleri çok net olan RARS-T grubunu dışlayarak sınıflandırılmayan MDS/MPN (MDS/MPN-U) başlığı altında topladık. Buna göre 84 hastanın 17'si (%20.2), MDS/MPN-U grubunu oluşturdu. MDS/MPN-U hastaları, klinik özellikleri açısından analiz edildiğinde; erkek/kadın oranı (E/K:1.4:1), anemi (%76.2), trombopeni (%58.8), splenomegali (%41.2) ve takip süresi içinde blast oranında artma açısından MDS-F, yaş ortalaması (64.6 yaş) ve lösemik dönüşüm sıklığı (%29.4) bakımından KMML'ye benziyordu (**Tablo 4.1 ve 4.9**). Morfolojik açıdan değerlendirildiğinde, MDS-F'a yakın olan özellikler; kemik iliği biyopsisinde blast oranı ve fibrozisin ağırlığı, KMML'ye yakın özellikler; myeloid hiperplazi (%64.7), displastik+proliferatif morfolojide megakaryositler, depo demirinde artma (%47.1), interstisyel plazma (%70.6), mast hücre artışları (%41.2), lenfoid nodül (%29.4) ve sinuzal hematopoez (%70.6) idi (**Tablo 4.3, 4.4 ve 4.7**).

Medyan yaşam süresi MDS/MPN-U hastaları için 20±6.2 ay olup MDS-F'ye göre (6±2.2 ay) daha uzun, KMML'ye (25±9.4 ay) benzerdir.

Tek değişkenli analizde sağ kalımı olumsuz etkileyen faktörler, düşük hemoglobin (<10g/dL) (p=0.021), düşük/yüksek ferritin (p=0.037) ve biyopside depo demirinde artma/azalma (p=0.020) olduğu halde, çok değişkenli analizde, sadece düşük hemoglobin düzeyi (p=0.025) ve depo demirinde artma/azalma (p=0.024) bağımsız prognoz faktörleri olarak kaldı (**Tablo 4.16**).

TABLO 4.16: MDS/MPN-U: Çok değişkenli analizde bağımsız prognoz faktörleri

MDS/MPN-U (RARS-T hariç)	p-değeri	e ^b -Hazard ratio (Ölüm riski)	Hazard ratio (Ölüm riski) için %95 güven aralığı	
			Alt	Ust
Düşük hemoglobin (Hb <10g/dL)	0.025	7.866	1.296	47.726
Biyopsi de depo demiri (artma/azalma)	0.024	8.003	1.317	48.623

4.9.SANGER DİZİ ANALİZİYLE ASXL1 MUTASYONLARI VE İMMUNOHİSTOKİMYASAL YÖNTEMLE PROTEİN EKSPRESYONU TAYİNİ VE KLİNİK MORFOLOJİK PARAMETRELERLE İLİŞKİLERİ:

4.9.1. Sanger dizi analizi ile ASXL1 geninde mutasyon tayini:

Kemik iliği aspirasyon lamplarından kazıma yöntemiyle elde edilen DNA'lardan 46/84 hastada (%54.8) dizileme ile sonuç alınabildi. Mutasyon analizi, 46 hastanın takip süresinde değişik zamanlarda alınan 74 kemik iliği aspirasyonundan elde edilen DNA'larla Sanger dizileme yöntemi ile yapıldı. Bu hastaların 30'unda (%65.2) 20 farklı genetik değişiklik saptanırken bunların 16'sında (%34.8) aminoasit değişikliği görüldü. Aminoasit değişikliğiyle sonuçlanmayan tek nükleotid değişimleri, aynı aminoasiti kodladığından silent (sessiz) mutasyona neden olmuştu. Yedi hastada (%15.2) insersiyon veya delesyon sonucu frameshift (çerçeve kayması) mutasyonlar görülürken 9 hastada klinik önemi belirsiz, missense (yanlış anlamlı) mutasyonlar izlendi. Sanger dizileme yöntemiyle saptanan genetik değişikliklerin ayrıntılı sonuçları **Tablo 4.17**'de verilmiştir. Saptanan genetik değişikliklerin 15'i 12. ekzonda, 2'si ise kodlama yapmayan, 3' UTR bölgesinde bulunmaktadır.

Sanger dizileme ile sırasıyla KMML (n=17), PMF-SF (n=14), MDS/MPN-U (n=10), MDS-F (n=2), RARS-T (n=2) ve aKML (n=1) olmak üzere 46 hastada sonuç alındı. İki MDS-F hastasında herhangi bir genetik değişiklik görülmedi. Buna karşın, 5/17 (%29.4) KMML, 2/10 (%20) MDS/MPN-U'de 5 farklı frameshift (çerçeve kayması), 3/10 (%30) MDS/MPN-U, 3/17 (%17.6) KMML, 2/14 (%14.3) PMF-SF ve bir aKML'de 10 farklı missense (yanlış anlamlı), 5/10 (%50) MDS/MPN-U, 7/14 (%50) PMF-SF, 4/17 (%23.5) KMML ve 1 RARS-T hastasında 3 farklı silent (sessiz) mutasyon bulundu. Bunlar dışında, 13 hastada, 12. ekzonun sonunda, kodlama yapmayan, 3' UTR bölgesinde yer alan, 2 genetik değişiklik (4 hastada biri, 9 hastada ikisi birlikte) saptandı. On yedi olguda 2-4 arasında değişen farklı tipte mutasyon birlikte görüldü. Birden çok mutasyon görülen hastaların tanı gruplarına göre

dağılımları, takip sırasında blast artışı, lösemik dönüşüm ve sağ kalım durumları **Tablo 4.18**'de özetlenmiştir.

Saptanan genetik değişiklikler cancer.sanger.ac.uk/cosmic ve www.ensembl.org veri tabanlarında tarandı. Daha önce tanımlanmış olanların *cosmic* veya *rs* numaraları **Tablo 4.17**'de özetlenmiştir. Tabloda rs/cosmic numarası bulunmayan genetik değişiklikler literatürde ilk kez çalışmamızda saptanmıştır. Veri tabanında tanımlı genetik değişikliklerin hastalık düzeyinde anlamlı olup olmadığına yönelik muhtemel tahmin niteliğindeki Polyphen-2 sonuçları da tabloda verilmiştir.

4.9.2. İmmunohistokimyasal yöntemle ASXL1 protein ekspresyonunun değerlendirilmesi:

İmmunohistokimyasal yöntemle ASXL1 protein ekspresyonu, 84 hastadan tanı ve takip sırasında alınan 129 kemik iliği biyopsisinde incelendi. Altı (%7.1) hastada yaygın ve kuvvetli (skor 3+), 7 (%8.3) hastada multifokal ve kuvvetli (skor 2+), 6 (%7.1) hastada fokal alanda zayıf (skor 1+) boyanma izlendi. Skor 2+ ve 3+ boyanma saptanan 13 (%15.5) hastada, ASXL1 ekspresyonu (İHK-ASXL1) pozitif kabul edildi.

İHK-ASXL1 (+)'liği, KMML, MDS-F ve MDS/MPN-U'de sırasıyla %30.4, %27.3, %17.6 oranlarında izlendi. PMF-SF, aKML ve RARS-T'de ise İHK-ASXL1 negatif bulundu ($p=0.015$).

Yaygın ve kuvvetli pozitif boyanma (skor 3+) saptanan, 6 hastanın hepsinde Sanger dizileme yöntemiyle delesyon veya insersiyon nedeniyle 5 farklı frameshift (çerçeve kayması) mutasyon görüldü ($p<0.001$).

Multifokal ve kuvvetli boyanma (skor 2+) görülen, 7 olgunun yalnızca birinde dizileme yöntemiyle sonuç alınabildi. KMML tanısı olan bu hastada, tanı konulan kemik iliği aspirasyonunda mutasyon saptanmamış ve eş zamanlı kemik iliği biyopsisinde İHK-ASXL1 negatifti. Lösemik evre DNA'sında ise dizileme yöntemiyle frameshift mutasyon saptandı ve eş zamanlı biyopsisi İHK-ASXL1 (+) bulundu.

Benzer şekilde, bir MDS/MPN-U hastası, tanı sırasında İHK-ASXL1 (-) iken takipte 8 ve 48 ay sonra alınan tekrar biyopsilerinde İHK-ASXL1 pozitifliği (skor 3+) izlendi. İHK'ya paralel olarak, moleküler yöntemle ilk aspirasyonunda mutasyon görülmezken tekrar biyopsileriyle eş zamanlı aspirasyonlarında frameshift mutasyon görüldü. Her iki hastada da İHK-ASXL1 pozitifliği, blast oranında artma ve sonrasında lösemik evrede saptandı.

Başlangıç biyopsilerinde İHK-ASXL1 (+) olan olguların tümü, tekrar biyopsilerinde de İHK-ASXL1 pozitif.

TABLO 4.17: ASXL1 geninin 12. ekzonunda ve 3' UTR bölgesinde gözlenen genetik değişiklikler

TANI	YERLEŞİM	GENETİK DEĞİŞİKLİK	n (%)	dbSNP ID	PolyPhen-2	Bölge	Primer çiftleri	
MDS/MPN-U (AML) KMML (AML)	<i>c.1733G>T</i> <i>p.R578L</i>	Heterozigot G→T değişimi Arg-578→Leu; CGT→CTT	2 (%4.3)	-	-	12. ekzon	1	
KMML (AML)	c.1900_1922del23 p.E635RfsX15	Heterozigot 23 bazlık delesyon	1 (%2.2)	COSM36165	Hastalık/ Fenotip			
KMML (3'ünde AML) MDS/MPN-U (AML)	c.1934_1935insG p.G646WfsX12	Heterozigot G insersiyonu	3 (%6.5)	COSM34210	Hastalık/ Fenotip			
KMML (AML)	c.1934_1934delG p.G645VfsX58	Heterozigot G delesyonu	1 (%2.2)	COSM85923	Hastalık/ Fenotip			
KMML (2'sinde AML) PMF-SF	c.1954G>S p.G652S	Heterozigot G→A dönüşümü Gly-652→Ser; GGC→AGC	2 (%4.3)	COSM1716555 rs3746609	Benign			
MDS/MPN-U (AML)	<i>c.2015_2019del</i> <i>p.C672SfsX3</i>	Heterozigot GTGGC delesyonu	1 (%2.2)	-	-			
PMF-SF	<i>c.2168C>T</i> <i>p.S723Y</i>	Heterozigot C→A dönüşümü Ser-723→Tyr; TCT→TAT	1 (%2.2)	-	-			
PMF-SF	<i>c.2226G>C</i> <i>p.G742G</i>	Heterozigot G→A dönüşümü Gly-742→Gly; GGG→GGA	1 (%2.2)	-	Sessiz mutasyon		2	
MDS/MPN-U (AML)	c.2227C>A p.L743I	Heterozigot C→A dönüşümü Leu-743→Ile; CTA→ATA	1 (%2.2)	rs145061712	Muhtemel hasarlayıcı			
KMML (AML)	<i>c.2604_2604delT</i> <i>p.G869VfsX7</i>	Heterozigot T delesyonu	1 (%2.2)	-	-			
KMML	<i>c.2658A>T</i> <i>p.K886N</i>	Heterozigot A→T dönüşümü Lys-886→Asn; AAA→AAT	1 (%2.2)	-	-			
KMML	<i>c.2659A>T</i> <i>p.T887S</i>	Heterozigot A→C dönüşümü Thr-887→Ser; ACC→TCC	1 (%2.2)	-	-			
KMML	c.2957A>G p.N986S	Heterozigot A→G dönüşümü Asn-986→Ser; AAC→AGC	1 (%2.2)	COSM96383 rs145132837	Benign		3	
KMML	<i>c.3148A>T</i> <i>p.M1050L</i>	Heterozigot A→T dönüşümü Met-1050→Leu; ATG→TTG	1 (%2.2)	-	-		4	
PMF-SF	c.3513G>A p.R1171R	Heterozigot G→A dönüşümü Arg-1171→Arg; AGG→AGA	1 (%2.2)	rs150391716	Sessiz mutasyon			
MDS/MPN-U	<i>c.3749C>T</i> <i>p.S1250L</i>	Heterozigot C→T dönüşümü Ser-1250→Leu; TCA→TTA	2 (%4.3)	-	-		5	
KMML MDS/MPN-U PMF-SF	c.3759T>C p.S1253S	Heterozigot T→C dönüşümü Homozigot T→C dönüşümü Ser-1253→Ser; AGT→AGC	10 (%21.7) 6 (%13)	rs4911231	Sessiz mutasyon			
MDS/MPN-U	c.4189G>A p.G1397S	Heterozigot G→A dönüşümü Gly-1397→Ser; GGT→AGT	1 (%2.2)	rs146464648	Benign		6	
KMML MDS/MPN-U PMF-SF	3'UTR'de 25. Baz	Heterozigot A→G dönüşümü Homozigot A→G dönüşümü	10 (%21.7) 3 (%6.5)	-	-	3' UTR		
KMML MDS/MPN-U PMF-SF	3'UTR'de 93. Baz	Heterozigot T→C dönüşümü Homozigot T→C dönüşümü	7 (%15.2) 2 (%4.3)	-	-			

TABLO 4.18: Birden çok genetik değişiklik görülen olguların tanı grupları, blast artışı ve lösemik dönüşüme göre dağılımı

TANI	HASTA SAYISI (n)	GENETİK DEĞİŞİKLİK	ADET	MUTASYON TİPİ	BLAST ARTIŞI	LÖSEMİK DÖNÜŞÜM	SAĞ KALIM
KMML	1	<i>p.R578L</i> p.G646WfsX12	2	FRAMESHİFT MISSENSE	VAR	VAR	EKS
	1	p.G646WfsX12 <i>p.K886N</i> <i>p.T887S</i>	3	FRAMESHİFT MISSENSE	VAR	YOK	SAĞ
	1	<i>p.G869VfsX7</i> p.S1253S	2	FRAMESHİFT SESSİZ	VAR	VAR	EKS
	1	p.N986S p.S1253S 3'UTR'de 25. bazda heterozigot A→G dönüşümü 3'UTR'de 93. bazda heterozigot T→C dönüşümü	4	MISSENSE SESSİZ 3'UTR	YOK	YOK	SAĞ
	1	p.S1253S 3'UTR'de 25. bazda homozigot A→G dönüşümü 3'UTR'de 93. bazda homozigot T→C dönüşümü	3	SESSİZ	YOK	YOK	EKS
	1	p.S1253S 3'UTR'de 25. bazda homozigot A→G dönüşümü 3'UTR'de 93. bazda homozigot T→C dönüşümü	3	SESSİZ 3'UTR	VAR	VAR	SAĞ
MDS/MPN-U	1	<i>p.C672SfsX3</i> p.S1253S 3'UTR'de 25. bazda heterozigot A→G dönüşümü	3	FRAMESHİFT SESSİZ 3'UTR	VAR	VAR	EKS
	1	<i>p.R578L</i> p.L743I	2	MISSENSE	VAR	VAR	EKS
	1	p.G1397S p.S1253S	2	MISSENSE SESSİZ	YOK	YOK	EKS
	1	p.S1253S 3'UTR'de 25. bazda heterozigot A→G dönüşümü 3'UTR'de 93. bazda heterozigot T→C dönüşümü	3	SESSİZ 3'UTR	YOK	YOK	SAĞ
RARS-T	1	p.S1253S 3'UTR'de 25. bazda homozigot A→G dönüşümü 3'UTR'de 93. bazda homozigot T→C dönüşümü	3	SESSİZ 3'UTR	YOK	YOK	SAĞ
PMF-SF	1	p.R1171R p.S1253S 3'UTR'de 25. bazda heterozigot A→G dönüşümü	3	SESSİZ 3'UTR	YOK	YOK	SAĞ
	5	p.S1253S 3'UTR'de 25. bazda heterozigot A→G dönüşümü 3'UTR'de 93. bazda heterozigot T→C dönüşümü	3	SESSİZ 3'UTR	YOK	YOK	SAĞ

4.9.3. ASXL1 mutasyonları ve protein ekspresyonunun klinikomorfolojik parametrelerle ilişkisi:

4.9.3.1. Sanger dizi analizinde saptanan frameshift (çerçeve kayması) mutasyonların klinikomorfolojik parametrelerle ilişkisi:

Frameshift mutasyon saptanan 7 hastanın 6'sı erkek ve biri hariç hepsi 60 yaşın üstünde olmasına rağmen aralarında istatistiksel anlamlılık görülmemiştir (sırasıyla $p=0.177$ ve $p=0.070$). Frameshift mutasyonlar (FS) ile klinik parametrelerden yüksek lökosit sayısı ($p=0.014$), düşük hemoglobin değeri ($p=0.030$), yüksek $\beta 2$ -mikroglobulin ($p=0.006$) düzeyleri arasında istatistiksel anlamlı ilişki bulundu. Hepatosplenomegali, trombosit sayısı, LDH, ESH, ferritin değerleri, sitogenetik anomali ve JAK2 V617F mutasyonu ile arasında ilişki saptanmadı.

FS mutasyonlarla birliktelik gösteren morfolojik parametreler; eritroid ($p=0.034$), megakaryositik displazi ($p=0.010$), megakaryositlerde hafif artış ($p=0.031$) ve kümeleşme olmamasıydı ($p=0.002$). Frameshift mutasyon görülen olguların hepsinde ≥ 2 dizide displazi görülmesine karşın gruplar arası istatistiksel anlamlılık gösterilemedi ($p=0.088$). FS mutasyonların, başta fibrozis derecesi olmak üzere diğer morfolojik parametrelerle arasında ilişki görülmedi.

Frameshift mutasyon görülen 7 olgunun (5 KMML, 2 MDS/MPN-U) tümünde takip biyopsilerinde blast oranında artış ($p<0.001$), 6'sında lösemik dönüşüm ($p=0.001$) görüldü. Bu hastalar arasında sağ olan 2 KMML hastasından biri lösemik evrede, diğeri blast artışı sonucu KMML-2 evresindedir.

4.9.3.2. Sanger dizi analizinde saptanan frameshift ve missense mutasyonların klinikomorfolojik parametrelerle ilişkisi:

ASXL1 geninde görülen frameshift (FS) ve missense (MS) mutasyonlar, klinik parametreler içinde düşük hemoglobin ($p=0.028$), düşük trombosit değerleri ($p=0.043$), yüksek ferritin ($p=0.025$) ve belirgin yüksek $\beta 2$ -mikroglobulin ($p=0.006$) düzeyleri ile ilişkili bulundu.

FS ve MS mutasyon görülen hastaların kemik iliği biyopsilerinde selülerite daha yüksekti ($p=0.019$). Morfolojik parametrelerden megakaryositlerde hafif artma ($p=0.022$), yüksek blast oranı ($p=0.022$), takip biyopsilerinde blast oranında artma ($p=0.012$) ve lösemik dönüşüm ($p=0.038$) ile arasında istatistiksel anlamlı ilişki görüldü.

ASXL1 geninde görülen FS ve FS+MS mutasyonların takip sırasında blast artışı ve lösemik dönüşüm ile ilişkisi **Tablo 4.19**'da verilmiştir.

TABLO 4.19: Frameshift ve frameshift+missense mutasyonların takip sırasında blast artışı ve lösemik dönüşüm ile ilişkisi

		FRAMESHIFT MUTASYON			FRAMESHIFT+MİSSENSE MUTASYON		
		VAR	YOK	P-DEĞERİ	VAR	YOK	P-DEĞERİ
TAKİP SIRASINDA BLAST ARTIŞI	VAR	7 (%15.2)	9 (%19.6)	<u>≤0.001</u>	9 (%19.6)	7 (%15.2)	<u>=0.012</u>
	YOK	0 (%0)	30 (%65.2)		6 (%13)	24 (%52.2)	
LÖSEMİK DÖNÜŞÜM	VAR	6 (%13)	6 (%13)	<u>=0.001</u>	8 (%17.4)	4 (%8.7)	<u>=0.009</u>
	YOK	1 (%2.2)	33 (%71.7)		7 (%15.2)	27 (%58.7)	

4.9.3.3. ASXL1 protein ekspresyonunun klinikomorfolojik parametrelerle ilişkisi:

İHK-ASXL1 pozitif 13 hastanın yaş ortalaması 64.69±9.58 yaş, İHK-ASXL1 negatif 71 hastanın 60.41±14.51 (p=0.309) yaş olup pozitif hastaların %92.3'ü erkektir (p=0.014). İHK-ASXL1 pozitifliği, yüksek lökosit sayısı (p=0.003), düşük hemoglobin değeri (p<0.001), yüksek ferritin düzeyleri (p=0.046) ile ilişkili bulundu. İHK-ASXL1 ile yaş, trombosit sayısı, LDH, β2-mikroglobulin, ESH değerleri, hepatosplenomegali, sitogenetik anomali ve JAK2 V617F mutasyonu arasında istatistiksel anlamlı ilişki görülmedi.

İHK-ASXL1 (+) hastalarda kemik iliği sellüleritesi, İHK-ASXL1 (-) hastalara göre belirgin olarak artmıştı (p=0.017). Morfolojik parametreler arasında İHK-ASXL1 ekspresyonu ile ilişkili bulunanlar; myeloid (p=0.021), eritroid (p=0.037), megakaryositik displazi (p=0.001), ≥2 dizide displazi varlığı (p=0.004), eritroid hiperplazi (p=0.018), megakaryositlerde hafif artma (p=0.002) ve stromada plazma hücre artışıdır (p=0.007).

Blast oranları ve İHK-ASXL1 ekspresyonu arasında ilişki mevcut olup (p=0.038), bu hastaların %53.8'inde biyopside CD34+ hücreler, küme+yaygın dağınık paternde, %46.2'sinde dağınık paternde izlendi. Benzer şekilde, İHK-ASXL1 pozitif hastaların %46.2'sinde takip biyopsilerinde blast artışı (p=0.028) ve lösemik dönüşüm (p=0.015) görüldü. Blast ve CD34+ hücre artışı izlenmeyen olgularda İHK-ASXL1 ekspresyonu saptanmadı (p=0.031).

4.9.4. Dizi analizi ve protein ekspresyonu sonuçlarının karşılaştırılması:

ASXL1 mutasyonlarını doğrudan gösteren dizi analizi ve dolaylı yoldan nükleer protein ekspresyonunu gösteren İHK yöntemleriyle ulaşılan sonuçlar karşılaştırıldığında, dizileme yöntemiyle frameshift mutasyon görülen olguların hepsinde İHK-ASXL1 ekspresyonu görüldü. Buna karşın, dizilemede missense mutasyon saptanan 9 olgunun 6'sında sadece skor 1+ olarak değerlendirilen boyanma mevcuttu.

Karşılaştırma yapılabilen 39/46 (%84.8) gerek dizileme yöntemiyle FS mutasyon, gerekse İHK-ASXL1 ekspresyonu saptanmadı. Öte yandan, altın standart yöntem olan dizi analizinde frameshift mutasyon saptanan olguların hepsinde skor 2+/3+ İHK-ASXL1 ekspresyonu mevcuttu. Bu bulgu, immunohistokimyasal yöntemin duyarlılık, özgüllük ve pozitif/negatif kestirim değerlerinin %100 olduğunu göstermekte olup iki yöntem arasında tam (%100) uyum vardır ($p < 0.001$). İki yöntemin karşılaştırmalı sonuçları **Tablo 4.20'**de verilmiştir.

TABLO 4.20: Dizi analizi ve immunohistokimyasal ASXL1 protein ekspresyonu

ASXL1 MUTASYONLARI		İHK-ASXL1 EKSPRESYONU		
		Pozitif	Negatif	P-DEĞERİ
FRAMESHIFT MUTASYON	Var	7 (%8.3)	0 (%0)	<0.001
	Yok	0 (%0)	39 (%46.4)	
	Dizileme başarısız	6 (%7.1)	32 (%38.1)	
FRAMESHIFT+MİSSENSE MUTASYON	Var	7 (%8.3)	9 (%10.7)	=0.001
	Yok	0 (%0)	30 (%35.7)	
	Dizileme başarısız	6 (%7.1)	32 (%38.1)	

4.9.5. ASXL1 mutasyonları ve protein ekspresyonunun prognozla ilişkisi:

ASXL1 mutasyonları ve protein ekspresyonu, erkek cinsiyet, düşük hemoglobin, lökositöz, yüksek blast oranı, yüksek ferritin, ≥ 2 dizide displazi, displastik/displastik ağırlıklı megakaryosit morfolojisi, interstisyel plazma hücre artışı, takip biyopsilerinde blast oranında artma ve lösemik dönüşüm gibi olumsuz prognostik faktörlerle ilişkili bulundu.

ASXL1 mutasyonları ve İHK-ASXL1 ekspresyonunun sağ kalımla ilişkisi ve medyan sağ kalım süreleri **Tablo 4.21'**de verilmiştir. Sanger dizi analiziyle saptanan mutasyonlar frameshift+missense ve frameshift mutasyon şeklinde gruplandığında, ASXL1 mutant olguların medyan sağ kalım süreleri daha kısa olmasına rağmen istatistiksel anlamlılık görülmedi. Buna karşın, İHK-ASXL1 (+) hastalar, İHK-ASXL1 (-) hastalara kıyasla daha

kısa yaşamaktadır (sırasıyla 24 ± 7.8 ay ve 42 ± 10.8 ay) ($p=0.024$) (**Şekil 4.7**). İHK-ASXL1 ekspresyonunun, tek değişkenli analizde sağ kalımı olumsuz etkilediği, ölüm riskini 2.14 kat arttırdığı halde çok değişkenli analizde bağımsız prognostik faktör olmadığı görüldü.

İki yıllık sağ kalım İHK-ASXL1 ekspresyonu görülen hastalarda %38.5 (2-58 ay) iken ekspresyon görülmeyen hastalarda %63.3 (1-67 ay) idi. Çalışma sonunda, İHK-ASXL1 (+) hastaların %84.6'sı, İHK-ASXL1 (-) hastaların %52.1'i kaybedilmiştir.

İHK-ASXL1 ekspresyonuna göre grupların karşılaştırması ve sağ kalım süreleri **Tablo 4.22**'de özetlenmiştir. Buna göre, İHK-ASXL1 (+) hastalarda sağ kalımı olumsuz etkileyen başlıca faktörler; ≥ 60 yaş, lökopeni, JAK2 V617F (+), biyopside depo demirinde artma, stromada lenfoid nodül, hepatosplenomegali yokluğudur.

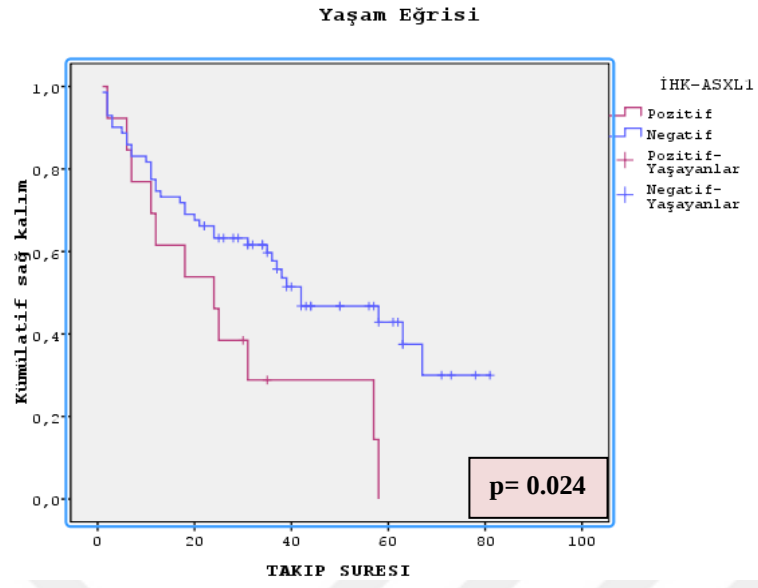
JAK2 V617F ve ASXL1 mutasyonu birlikte ele alındığında, en kısa sağ kalım İHK-ASXL1 (+)/JAK2 mutant grupta (12 ± 8.2 ay) görüldü. Bunu sırasıyla, İHK-ASXL1 (+)/JAK2 mutant tip (25 ± 5.7 ay), İHK-ASXL1 (-)/JAK2 mutant (67 ± 4 ay) ve İHK-ASXL1 (-)/JAK2 wild tip (medyana ulaşamadı, ortalama 57.1 ± 6 ay) hastalar izledi ($p < 0.001$).

TABLO 4.21: ASXL1 mutasyonları ve ASXL1 protein ekspresyonunun sağ kalımla ilişkisi

ASXL1 MUTASYONLARI/PROTEİN EKSPRESYONU		MEDYAN YAŞAM SÜRESİ (AY)	P-DEĞERİ
PROTEİN EKSPRESYONU (İHK)	Pozitif (n=13)	24 ± 7.8	=0.024
	Negatif (n=71)	42 ± 10.8	
FRAMESHIFT MUTASYON (SANGER DİZİ ANALİZİ)	Var (n=7)	31 ± 6	=0.350
	Yok (n=39)	58 ± 9.1	
FRAMESHIFT + MİSSENSE MUTASYON (SANGER DİZİ ANALİZİ)	Var (n=16)	31 ± 13.1	=0.176
	Yok (n=30)	58	

TABLO 4.22: İHK-ASXL1 ekspresyonunun klinik ve morfolojik parametrelere göre sağ kalımla ilişkisi

PROGNOSTİK FAKTÖRLER		Hasta sayısı (n)	MEDYAN YAŞAM SÜRESİ (AY) İHK-ASXL1 (+) (n:13)	Hasta sayısı (n)	MEDYAN YAŞAM SÜRESİ (AY) İHK-ASXL1 (-) (n:71)	P-değeri
İHK-ASXL1 ekspresyonu		13	24±7.8	71	42±10.8	=0.024
Yaş	<60	4	24±16.7	32	67±18.8	=0.026
	≥60	9	18±8.9	39	37±2.4	
Cinsiyet	Kadın	1	11	31	Medyana ulaşılamadı, ortalama 46.4±5.3	=0.041
	Erkek	12	24±6.1	40	38±3.5	
Tanı grupları	MDS-F	3	6±3.3	8	6±5.7	-
	KMML	7	24±7.9	16	31±18	
	MDS/MPN-U	3	57±21.2	14	18±8.5	
	PMF-SF	0	-	29	Medyana ulaşılamadı, ortalama 67.5±4.1	
Splenomegali	Var	9	25±1.5	43	63±10.7	=0.011
	Yok	4	7±6	28	20±4.3	
Hepatomegali	Var	4	24±18.7	27	58±13.9	=0.037
	Yok	9	18±8.9	44	39±5	
Lökosit sayısı (WBC)	<4000/mm ³	2	6	12	11±6.1	=0.021
	≥4000-<10000/mm ³	6	11±10.4	24	Medyana ulaşılamadı, ortalama 45.9±6.1	
	≥10.000/mm ³	5	25±7.7	35	58±16.7	
B2-mikroglobulin (n=28)	Yüksek	4	25±14.5	20	58±14.3	=0.043
	Normal	1	11	3	Medyana ulaşılamadı, ortalama 30±11.4	
	Düşük	0	-	2	7	
	Yüksek	9	24±17.9	22	20±4.1	
Sitogenetik anormali (n=34)	Var	2	57	12	24±7.9	=0.363
	Yok	5	25±1.1	15	67	
JAK2 V617F mutasyonu (n=52)	Var	3	12±8.2	19	67±4	<0.001
	Yok	3	25±5.7	27	Medyana ulaşılamadı, ortalama 57.1±6	
Displazi	Displazi yok	0	-	23	Medyana ulaşılamadı, ortalama 66±4.6	-
	Tek dizide displazi	0	-	12	Medyana ulaşılamadı, ortalama 63±17.7	
	≥2 dizide displazi	13	12±4.5	36	17±3.1	
Megakaryosit morfolojisi	Displastik/ displastik ağırlıklı morfoloji	9	18±10.4	29	11±3.4	=0.609
	Proliferatif/ proliferatif ağırlıklı morfoloji	4	24±6.5	42	67	
Manoharan fibrozis sınıflaması	Grade 2	3	25±5.7	23	67±20.3	=0.075
	Grade 3	4	6±18.3	27	36±9	
	Grade 4	6	12±8	21	42±22.4	
Avrupa fibrozis sınıflaması	Grade 2	7	25±9.2	50	39±7.3	=0.062
	Grade 3	6	12±8	21	42±24.5	
Anjiogenez artışı	Artış yok	0	-	2	11	-
	Hafif	2	25	16	67	
	Orta	3	12±8.2	24	37±5.1	
	Belirgin	8	18±9.2	29	42±20.1	
	Var	7	24±15.7	39	42±13.8	
Sinuzal hematopoez	Yok	6	18±11	32	39±11.4	=0.029
	Var	0	-	0	-	
Depo demiri (n=79)	Azalma	1	25	12	39±4.2	=0.026
	Normal	5	57±33.4	25	Medyana ulaşılamadı, ortalama 64.5±5.9	
	Artma	7	11±5.2	29	20±2.7	
Blast oranı (%)	Blast yok	0	-	31	Medyana ulaşılamadı, ortalama 66.5±4	-
	<%5	5	63±24.5	11	57±41.5	
	%5-9	3	13±5.6	14	18±7.9	
	%10-14	3	17±9	9	17±5.2	
	%15-19	2	3±2.4	6	6±5.7	
Lenfoid nodül varlığı	Var	4	6±2.5	15	11±6.4	=0.049
	Yok	9	25±1.5	56	58±10.7	
Mast hücre artışı	Var	3	25±11.4	14	20±16.4	=0.023
	Yok	10	18±9.5	57	63±14.1	
Eozinofil artışı	Var	8	18±9.2	49	58	=0.027
	Yok	5	24±18.6	22	35±14.9	



ŞEKİL 4.7: İHK-ASXL1 protein ekspresyonu ve sağ kalım

5. TARTIŞMA:

Bu çalışmada, displazi ve blast artışının eşlik ettiği MDS ve MDS/MPN gibi myeloid kök hücre hastalıklarında, başlı başına kötü prognostik faktör olan fibrozisin eklenmesi durumunda karşılaşılan klinik ve morfolojik ayırıcı tanı özellikleri ile ASXL1 gen mutasyonlarının araştırılması amaçlanmıştır. Aynı parametrelere, en belirgin özelliği fibrozis olan, ancak displazi ve blast artışının görülmediği myeloid kök hücre hastalığı olan selüler faz primer myelofibroz hastalarında da bakılmış, fibrozisin ortak bulgu olduğu bu myeloid kök hücre hastalıkları arasındaki ortak ve ayırt edici özellikler araştırılmıştır.

Kemik iliği fibrozisinin derecelendirilmesi oldukça subjektif bir yöntem olup bu, fibrozis derecesi ile daha da artmaktadır. Bu nedenle 2005 yılında 15 hematopatoloğun kör değerlendirdiklerinde yinelenebilirliği yüksek bulunan ve grade sayısının azaltıldığı “Avrupa” sınıflaması yayınlanmıştır (5). Çalışmamızda Avrupa sınıflamasından önce yaygın olarak kullanılan Manoharan sınıflaması da Avrupa sınıflamasına paralel olarak kullanılmıştır. Manoharan sınıflamasında Grade 4, Avrupa sınıflamasında Grade 3’e tam karşılık olarak geldiği halde, Manoharan sınıflamasında Grade 2, Avrupa sınıflamasında çoğu kez Grade 1, bazen de Grade 2 içine, Grade 3 ise Grade 2 veya 3 içine kaymaktadır. Bu nedenle tanı grupları ile fibrozis grade’i arasında istatistiksel anlamlılık Manoharan sınıflamasında görülmüştür.

Myeloid kök hücre hastalıklarına, kemik iliğinde retikülin-kollajen fibrozis değişik oranlarda eşlik edebilir. Della Porta ve ark. (47) 6 yıllık bir süre içinde kendi merkezlerinde orta/ağır fibrozisin eşlik ettiği 193 myeloid kök hücre hastalığı içinde ilk sırayı 123 hasta ile PMF’nin aldığını, bunu 52 hasta ile MDS’nin izlediğini bildirmişlerdir. Geri kalan hastalar, myeloproliferatif/myelodisplastik neoplazi (13 olgu), akut megakaryoblastik lösemi (3 olgu) ve akut panmyelosis (2 olgu) olarak bildirilmiştir. Bu dağılım bizim 6 yıllık süre içinde orta/ağır fibrozisin eşlik ettiği 84 myeloid kök hücre neoplazisi serimizden oldukça farklı olup her iki çalışmada ilk sırayı PMF olguları almakla birlikte MDS, bizim serimizde orta/ağır fibrozisin en az (11 hasta) görüldüğü hasta grubudur. KMML, Della Porta ve ark.’nın serisinde 7 hasta olarak görüldüğü halde bizim hasta grubumuzda 23 hasta ile PMF sonrası ilk sırayı almaktadır. On yedi hastanın yer aldığı MDS/MPN-U grubu Della Porta ve ark.’nın serisinde ise yoktur. Gruplar arası ayırım morfolojik kriterlere dayalı olup sitogenetik analiz tüm hastalarda olmadığından, MDS/MPN-U olarak sınıflandırdığımız hastaların bir bölümünün MDS olması mümkündür.

Della Porta ve ark. (47), MDS'da orta/ağır kemik iliği fibrozisinin, kötü riskli sitogenetik, yüksek blast oranı, ≥ 2 dizide displazi ve sık transfüzyon ihtiyacı gibi kötü risk faktörleri ile birlikte görüldüğünü, çok değişkenli analizde ise bağımsız kötü prognostik faktör olduğunu göstermişlerdir. Çalışmamızda, orta ve ağır fibrozis her iki sınıflamada da sağ kalım süresini kısaltmakla birlikte istatistiksel anlamlılık sadece Manoharan sınıflamasında saptanmıştır. Orta/ağır fibrozis ile birlikteliği anlamlı olan diğer parametreler, anjiogenezde artma ve sinuzal hematopoez gibi fibrozisle birlikte giden bulgulardır. Öte yandan, kemik iliğinde orta/ağır düzeyde fibrozis; ≥ 2 dizide displazi, yüksek blast oranı, displastik ağırlıklı megakaryosit morfolojisi, megakaryositlerde yaygın belirgin artma ve aberan CD34 ekspresyonu ile interstisyel plazma ve mast hücre artışı görülen hastalarda daha sık izlenmesine karşın istatistiksel anlamlı ilişki gösterilememiştir. Benzer şekilde, hasta takip süresinde blast oranında artma ve lösemik dönüşüm ile fibrozis derecesi arasında bağlantı bulunamamıştır.

Öte yandan, MDS hastalarında kemik iliği fibrozisi, düşük hemoglobin düzeyi, düşük trombosit sayısı ve kan transfüzyon ihtiyacında artma ile ilişkili bulunmuştur (47). Myeloid kök hücre hastalıklarında, uzun süren anemiye bağlı kompensatuvar olarak artan demir emilimi ve/veya kan transfüzyonu nedeniyle ferritin değerleri yüksektir. Çalışmamızda, gerek fibrozisin eşlik ettiği MDS ve MDS/MPN grubu hastalarda gerekse tanı gruplarına bakılmaksızın tüm hastalar ele alındığında kemik iliği fibrozisi, literatürle paralel olarak düşük hemoglobin ve yüksek ferritin düzeyleri ilişkili bulunmuştur.

Fibrozisin sağ kalımla ilişkisi olmadığını söyleyen yayınlar olsa da (224), bugün için geçerli olan kemik iliğinde orta/ağır fibrozisin bağımsız bir prognostik faktör olduğudur (5, 22, 45-49, 51, 225). Çalışmamızda, Manoharan derecelendirme sınıflamasına göre ağır (Grade 3-4) fibrozis tek ve çok değişkenli analizde sağ kalımı olumsuz yönde etkilediği halde aynı ilişki Avrupa sınıflamasında görülmemiştir. Bunun nedeni Avrupa sisteminde Grade 2 ve Grade 3 fibrozisi birbirinden ayıran kriterler içinde kollajen lif artış düzeyinin sadece retikülin boyası ile ayırd edilememesi olabilir. Bu nedenle, kemik iliği biyopsisinde Avrupa sınıflamasına göre fibrozisin değerlendirilmesinde Masson trikrom boyasıyla kollajen lif artışının düzeyi belirlenmelidir.

Myelofibroz patogenezinde megakaryositlerden salınan, PDGF, FGF ve TGF- β gibi fibrojenik ve VEGF, EGF gibi anjiogenik sitokinlerin rol oynadığı bilinmektedir (36). Thiele ve ark. (226) ile Kvasnicka ve ark. (227), myelofibrozisin anjiogenezde artma ve sinuzal

hematopoez ile ilişkili olduğunu bildirmelerine karşın bu parametrelerin fibrozisle ilişkisi olmayan bağımsız faktörler olduğunu bildiren yayınlar da vardır (158, 228). Çalışmamızda fibrozis, Manoharan ve Avrupa konsensus sınıflamalarına göre anjiogenez artışı ve sinuzal hematopoez ile ilişkili bulunmuştur.

Kemik iliği fibrozisinin başlıca megakaryositlerden salınan fibrojenik faktörlerle ilişkili olduğu uzun süredir bilinmektedir (36). Fibrozis görülen olgularda megakaryosit sayılarında belirgin artış olduğu da bir gerçektir. Bu nedenle megakaryosit morfolojisinin ve sayısal değişikliklerinin klinik ve morfolojik parametrelerle ilişkisi önem kazanmaktadır. Çalışmamızda tüm hastalara ait kemik iliği biyopsilerinde megakaryosit sayısında yaygın hafif, fokal belirgin ya da yaygın belirgin artışlar görülmesine rağmen megakaryosit artış düzeyi ve fibrozis arasında anlamlı ilişki saptanmamıştır. Literatürde, displastik megakaryosit morfolojisi ile sağ kalım arasındaki ilişkiye değinen yayınlar dışında megakaryositlerdeki sayısal ve morfolojik değişikliklerin sağ kalım ile ilişkisini ele alan kapsamlı bir çalışma yoktur. Riccardi ve ark. (229), dismegakaryopoez olarak kabul ettikleri mikromegakaryosit varlığı ile sağ kalım arasında ilişki bulamamıştır. MDS ve KMML hastalarını kapsayan diğer çalışmalarda, dismegakaryopoez ile lösemik dönüşüm ve sağ kalım sürelerinin kısalığı arasında ilişki gösterilmiştir (230-231). Çalışmamızda, kemik iliği biyopsisinde gözlenen **“displastik/displastik ağırlıklı”** megakaryosit morfolojisi, klinik parametrelerden lökopeni ($<4000/\text{mm}^3$), anemi ($<10\text{g/dL}$), trombopeni ($<100.000/\text{mm}^3$), ASXL1 mutasyonları, yüksek ESH ve ferritin düzeyleri, morfolojik parametrelerden ≥ 2 dizide displazi, yüksek blast oranı, takip sırasında blast artışı, megakaryositlerde aberan CD34 ekspresyonu, megakaryositlerde kümeleşme olmaması, depo demirinde artma, interstisyel plazma ve mast hücre artışı, lenfoid nodül varlığı gibi olumsuz prognostik faktörler ile birlikte görülmektedir. Çok değişkenli analizde **“displastik megakaryosit morfolojisinin”** bağımsız prognoz faktörü olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle, dismegakaryopoezin doğru olarak saptanması için H&E kesitlerine paralel olarak CD61 gibi megakaryosit belirteçleri de kullanılmalıdır.

Proliferatif/proliferatif ağırlıklı megakaryosit morfolojisi, MPN grubu hastalıklara özgü olmakla birlikte MDS/MPN grubunda da görülebilir. Çalışmamızda, proliferatif megakaryosit morfolojisi, splenomegali, megakaryositlerde fokal belirgin artma, sinuzal hematopoez, eozinofil artışı ve JAK2 V617F mutasyonu gibi MPN özellikleriyle birlikte olup sıklıkla PMF’da görüldü. Bennett ve ark., KMML’yi lökosit sayısı $13000/\text{mm}^3$ ’ü eşik değer olarak, displastik ve proliferatif olmak üzere iki gruba ayırmayı önermişler (59), Breccia ve ark., bu kritere göre iki gruba ayırdıkları KMML hastalarında, proliferatif özellikleri baskın

olanlarda sağ kalımının daha kısa olduğunu bildirmişlerdir (232). Öte yandan, KMML’de displastik ve proliferatif alt grupların prognostik anlamı olmadığını bildiren yayınlar daha çoktur (57, 60). Çalışmamızda, MDS/MPN grubu içinde yer alan hastalar, hem $13000/\text{mm}^3$ lökosit sayısı eşik değeri hem de megakaryosit morfolojisine göre değerlendirildiğinde, Breccia ve ark.’nın aksine, medyan yaşam süreleri displastik özellikleri baskın olan hastalarda daha kısadır.

Megakaryositlerde aberan CD34 ekspresyonu, genellikle MDS ile ilişkilendirilmekle birlikte diğer myeloid kök hücre hastalıkları, non-Hodgkin lenfoma infiltrasyonları ve reaktif değişiklikler içeren kemik iliklerinde de görülebilir (233). Tang ve ark. (234) 8 yıl içinde merkezlerinde MDS tanısı alan 202 hastanın 13’ünde yüksek ($\geq 20\%$) olmak üzere toplam 29 hastada (14%) megakaryositlerde aberan CD34 ekspresyonu saptadıklarını, düşük ekspresyon izlenen hastaların, CD34 negatif gruba benzemesine karşın yüksek CD34 ekspresyonunun ($\geq 20\%$), düşük trombosit düzeyleri, yüksek blast oranı, yüksek riskli sitogenetik ve kısa sağ kalım ile ilişkili olduğunu ve bu ilişkinin çok değişkenli analizde de bağımsız prognoz faktörü olarak kaldığını bildirmişlerdir. Çalışmamızda, megakaryositlerde aberan CD34 ekspresyonu, tek değişkenli analizde klinik ve morfolojik olumsuz prognoz faktörleri ile ilişkili olduğu halde bu ilişki çok değişkenli analizde kaybolmuştur.

Myeloid kök hücre hastalıklarında prognozu etkileyen en önemli morfolojik parametreler, blast oranı ve displazilerdir. MDS ve MDS/MPN’de sağ kalım ile displazinin tek ya da ≥ 2 diziyi tutması ve blast oranları arasında önemli prognostik ilişki mevcuttur (53, 61). Çalışmamızda da literatüre paralel olarak sağ kalım KMML-2 hastalarında KMML-1’e göre daha kısa olup MDS-F ve MDS/MPN-F hastalarında da blast oranı arttıkça sağ kalım kısalmaktadır. Blast oranı klasik olarak $\geq 5\%$ - $<10\%$ ve $\geq 10\%$ - $<20\%$ olarak ayrıldıktan sonra, $\geq 10\%$ - $<20\%$ grubunu kendi içinde $\geq 10\%$ - $<15\%$ ve $\geq 15\%$ - $<20\%$ olarak bölmüş olduğunda, medyan sağ kalım $\geq 5\%$ - $<10\%$ ve $\geq 10\%$ - $<15\%$ blast gruplarında sırasıyla 18 ± 7.9 ay ve 17 ± 5.2 ay gibi birbirine çok yakın süreler olmasına karşın $\geq 15\%$ - $<20\%$ blast grubunda bu süre çok daha kısadır (6 ± 5.7 ay). Bu bulgu, DSÖ risk sınıflamasında blast oranlarında yeni bir düzeltme gereğini ortaya koymaktadır.

Della Porta ve ark. (235) eritroid, granülositik ve megakaryositik displazi sıklığını fibrozisin olmadığı 414 ve eşlik ettiği 64 MDS hastasında değerlendirdiklerinde her iki grupta da en sık eritroid displazinin görüldüğünü, bunu sırasıyla granülositik ve daha siktir (50% ve 35%). Sağ kalımla eritroid displazi arasında ilişki bulmadıkları halde granülositik ve

megakaryositik displazi tek ve çok değişkenli analizlerde sağ kalımı olumsuz etkilemiştir. Displazinin etkilediği dizi sayısı arttıkça sağ kalım kısalmaktadır. Çalışmamızda, 84 hasta birlikte değerlendirildiğinde, tek değişkenli analizde tekil ya da çoğul olması fark etmeksizin tüm dizilerdeki displazi sağ kalımı olumsuz etkilediği halde çok değişkenli analizde bağımsız prognoz faktörleri megakaryositik dizide displazi ve ≥ 2 dizide displazidir. MDS-F ve MDS/MPN-F grubunda sağ kalımı olumsuz etkileyen displaziler, megakaryositik dizide displazi ve ≥ 2 dizide displazi olup çok değişkenli analizde megakaryositik displazi bağımsız prognoz faktörü olarak kalmaktadır.

Yaşam süresini kısaltan diğer kötü prognostik faktörler, takip süresi içinde blast oranında artma ve lösemik dönüşümdür. Çalışmamızda, 84 hasta birlikte değerlendirildiğinde, bu iki faktör diğer tüm klinik ve morfolojik olumsuz prognoz faktörleriyle birlikte görüldüğü halde, PMF-SF hastaları çıkartılıp analizler tekrarlandığında takipte blast oranında artma ve lösemik dönüşüm ile sağ kalım arasında istatistiksel ilişki görülmedi. Bu durum, muhtemelen hastaların lösemik dönüşümden önce kemik iliği yetmezliği nedeniyle kaybedilmeleri sonucudur.

MDS ve MDS/MPN’de sağ kalım ve lösemik dönüşüm risklerini belirleyecek prognostik skorlama sistemleri mevcuttur. Sıralanan başlıca risk faktörleri; yaş (≥ 65 yaş), erkek cinsiyet, düşük hemoglobin (<10 g/dL) ve trombosit ($<100.000/\text{mm}^3$) sayısı, yüksek mutlak lenfosit sayısı ($\geq 2500/\text{mm}^3$), kromozom anomalileri, periferik kan ve kemik iliği blast oranı ($\geq 10\%$), yüksek LDH düzeyleri, transfüzyon ihtiyacı ve performans durumudur (84, 85, 236). Çalışmamızda, fibrozisle seyreden MDS, KMML, aKML, MDS/MPN-U, RARS-T hasta grubunda, sağ kalımı olumsuz yönde etkileyen parametreler; düşük hemoglobin (<10 g/dL), yüksek veya düşük ferritin düzeyleri, kemik iliğinde ≥ 2 dizide displazi, displastik/displastik ağırlıklı megakaryosit morfolojisi, yüksek blast oranı ($\geq 5\%$, özellikle $\geq 15\%$ - $<20\%$), interstisyel plazma hücre artışı ve lenfosit nodül varlığıdır. Sağ kalım süresi, düşük trombosit sayısı ($<100.000/\text{mm}^3$) olan hastalarda olmayanlara göre daha kısa olmakla birlikte aralarında istatistiksel anlamlılık görülmedi. Kromozom anomalileri ve sağ kalım arasında istatistiksel anlamlılık gösterilememesi nedeni hastaların %45.4’üne karyotipleme yapılmasıdır. Yaş ve erkek cinsiyet faktörleri, diğer çoğu çalışmanın aksine mevcut çalışmada kötü prognoz faktörü değildir.

Myeloid kök hücre hastalıklarında, kemik iliği stromal değişikliklerin, patogenezdaki rolü tam bilinmemekle birlikte son yıllarda, birçok tümörün patogenezinde mikro çevrenin, T

regülatör hücreler ve immunsupresif sitokinler aracılığı ile önemli rol oynadığı anlaşılmıştır. Yapılan önceki çalışmalarda, kemik iliğindeki stromal değişikliklerin sağ kalım üzerindeki etkisi bilinmemektedir (121). Maschek ve ark. (51, 52), MDS ve KMML’de fibrozis ve sağ kalımı değerlendirdikleri iki ardışık çalışmada kemik iliğinde interstisyel lenfosit, plazma ve mast hücre artışı ile lenfoid nodül varlığı ve fibrozis arasında anlamlı bir ilişki bulmamışlar, sadece mast hücre artışının sağ kalım üzerinde olumlu etkisi olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmamızda, interstisyel lenfosit, plazma, mast hücre artışları ve lenfoid nodül fibrozis derecesi arttıkça belirginleşmelerine karşın aralarında istatistiksel anlamlılık gösterilememiştir. Tek değişkenli analizde sağ kalımı olumsuz etkileyen lenfoid nodül ve plazma hücre artışıdır. Plazma hücre artışı, çok değişkenli analizde, bağımsız bir prognostik faktör olarak kalmıştır. Çalışmamızda, KMML-F, MDS/MPN-U-F’de saptanan mast hücre artışının, Maschek ve arkadaşlarının (52) bulgularının aksine kısa sağ kalımla birlikte oluşunu, diğer olumsuz prognostik faktörler ile birlikte görülmesine bağlıyoruz. Bunlar dışında, lenfoid nodül ve interstisyel plazma hücre artışının, klinik ve morfolojik olumsuz prognoz faktörleri ile ilişkili bulunması da mikro çevrenin önemini dolaylı olarak göstermektedir.

Çalışmamızın, diğer amacı da sınıflandırılmayan MDS/MPN grubunun, klinik ve morfolojik özellikleri açısından diğer gruplardan hangisine daha yakın olduğunu göstermekti. DSÖ 2008 sınıflamasına göre MDS/MPN-U grubu; daha önce myeloid neoplazi geçmişi veya büyüme faktörü/sitotoksik ilaç kullanım öyküsü bulunmayan, myelodisplastik ve myeloproliferatif özellikler gösterdiği halde KMML ve aKML tanı kriterlerini dolduramayan, MDS/MPN içinde yer alan herhangi bir alt gruba yerleşemeyen, sınıflandırılmayan hasta popülasyonudur. Literatürde MDS/MPN-U grubu üzerinde yapılmış az sayıda çalışma vardır. Wang ve ark. (106), 8 yıl içinde 7 merkezde tanı konulan 65 aKML ve 69 MDS/MPN-U hastasında klinik ve morfolojik ayırıcı tanı kriterlerini araştırdıklarında MDS/MPN-U’de en sık görülen klinik bulgunun lökositoz (%90) olup bunu anemi (%39.1), trombopeni (%34.8) ve hepatosplenomegalinin (%34) izlediğini, 20/69 (%29) hastada kemik iliğinde Avrupa sınıflamasına göre Grade 2-3 fibrozis görüldüğünü bildirmişlerdir. Benzer şekilde çalışmamız 6 yıl içinde 8 hastaneden gelen ve merkezimizdeki tanı alan kemik iliği biyopsilerini kapsamaktadır. Tanı kriterleri net olan RARS-T dışlandığında, grade 2-3 fibrozisin eşlik ettiği MDS/MPN-U hasta sayımız 17 olup Wang ve ark.’nın çalışmasındaki hasta sayısına yakındır (106).

MDS/MPN-U grubu, erkek cinsiyet (E/K:1.4:1), anemi (%76.2), trombopeni (%58.8) ve splenomegali (%41.2) gibi klinik parametreler açısından MDS-F hastalarına yakın olmakla birlikte medyan yaş KMML yakın olup MDS-F hastalarından yüksektir. Morfolojik parametreler açısından, kemik iliği biyopsisinde CD34+ hücrelerin dağılımı, fibrozisin ağırlığı belirginliği ve takip süresi içinde blast artışı görülme sıklığı bakımından MDS-F'ye benzediği halde, biyopside megakaryositlerin displastik+proliferatif morfolojisi, myeloid hiperplazi ve mast hücre artışı açısından KMML'ye benzemektedir. Wang ve ark.'nın (106) çalışmasıyla (%23.2) uyumlu olarak MDS/MPN-U hastalarının %29.4'ünde lösemik dönüşüm görülmüştür. MDS/MPN-U hastalarının medyan sağ kalım süresi 12.4-21.4 ay arasında bildirilmekle birlikte çalışmamızda 20 ± 6.2 ay bulunmuş, KMML'ye (25 ± 9.4 ay) yakın olduğu görülmüştür (106-108).

DiNardo ve ark. (107) 27 yıl içinde RARS-T dışlandıktan sonra MDS/MPN-U tanısı alan, klinik verilerine ulaşılabilen 85 MDS/MPN-U hastasını prognoz faktörleri açısından değerlendirdiklerinde, <60 yaş, dolaşımda blast yokluğu, kemik iliği blast oranı <%5 ve trombositozun olumlu prognoz faktörleri olduğunu ancak çok değişkenli analizde sadece trombositozun bağımsız faktör kaldığını bildirmişlerdir. Çalışmamızda, tamamen farklı parametreler olarak düşük hemoglobin düzeyi (<10g/dL), düşük/yüksek ferritin değeri ve biyopside artmış/azalmış depo demiri sağ kalımı olumsuz etkilemekte, çok değişkenli analizde düşük hemoglobin düzeyi ve artmış/azalmış depo demiri bağımsız prognoz faktörleri olarak devam etmektedir.

KML'de, BCR-ABL1 gen yeniden düzenlenmesinin, hastalık patogenezindeki rolünün keşfiyle hedefe yönelik tedavi çalışmaları başlamıştır. Tirozin kinaz inhibitörü-imatinib geliştirilmiş ve tedaviyle klinik, sitogenetik ve moleküler remisyon görülmüştür (168-173). Bu önemli gelişmenin üzerinden çok geçmeden diğer myeloid malignitelerin moleküler patogenezinde rol alan muhtemel mutasyonlar ve klonalite üzerinde çalışmalar hız kazanmıştır. Geçtiğimiz son 10 yıl içinde, myeloid kök hücre hastalıklarında, önce JAK2 V617F mutasyonu (72, 174-176), ardından transkripsiyonun genetik ve epigenetik düzenlenmesi, translasyon, hücrenin çoğalma, yaşam ve olgunlaşma gibi temel işlevlerini sağlayan yollarda görevli birçok gen ve bu genleri etkileyen çok sayıda mutasyon bulunmuştur. Bu gen mutasyonları arasında sıklığı, lösemik dönüşüm ve kötü klinik seyirle muhtemel ilişkisi nedeniyle ASXL1 mutasyonları, bir adım öne çıkmaktadır (67, 131, 207, 219, 223). ASXL1 mutasyonları, en sık genin C-terminal ucundaki PHD (plant homeodomain) bölgesinden hemen önce yer alan 12. ekzonda frameshift (çerçeve kayması),

nonsense (anlamsız) ya da missense (yanlış anlamlı) mutasyonlar olarak görülmektedir. Bu mutasyonlar, ASXL1 proteininin kromatindeki metillenmiş lizinlere bağlanan C-terminal PHD bölgesinin hemen önünden kesilmesine neden olur. Tek nükleotid değişimi şeklindeki missense mutasyonların hangilerinin işlevsel değişikliğe neden olduğu ise henüz belirsiz olup yapılan çalışmalarla açıklık kazanacaktır. Bu tek nükleotid değişimlerinin bir kısmının tek nükleotid polimorfizmleri (SNP) olması nedeniyle bazı çalışmalarda missense mutasyonlar istatistiksel analizlere katılmamıştır (221, 237, 238). Çalışmamızda hem frameshift mutasyonlar, hem de frameshift+missense mutasyonlar ayrı gruplanarak istatistiksel analizler yapılmıştır.

ASXL1 mutasyonları, ilk kez 2009 yılında Gelsi Boyer ve arkadaşları tarafından MDS'de tanımlanmıştır (208). Sonraki çalışmalarda ASXL1 mutasyonları, MDS, KMML, de novo ve sekonder AML, PMF, ET, PV ve KML hastalarında sırasıyla %11.4-20.7, %12.5-52, %4.5-29.6, %12.5-53, %6.5-54.8, %3.8, %6.7 ve %14.6 oranlarında görülmüştür (198, 207-216). Literatürde ASXL1 mutasyonu, MDS, MPN, KMML ile primer ve sekonder AML hastalarında değişik oranlarda saptanmasına karşın MDS/MPN-U grubuna ait veri yoktur. Çalışmamız, MDS/MPN-U hastalarında ASXL1 mutasyonu insidansı ve prognoza etkisini araştıran ilk çalışmadır.

Çalışmamızda ASXL1 mutasyonu, fibrozisin eşlik ettiği KMML, MDS, MDS/MPN-U hastalarında sırasıyla %30.4, %27.3 ve %17.6 oranlarında saptanmış olup literatür verileriyle paraleldir. Öte yandan, literatürde ASXL1 mutasyonu, PMF'da %6.5-54.8 (198, 214) oranlarında bildirildiği halde çalışmamızda PMF-SF'da 2 hastada 2 farklı missense, 5 hastada 3 farklı silent mutasyon ve 5 hastada 3'UTR bölgesinde 2 farklı genetik değişiklik saptanmış, frameshift veya nonsense mutasyon ise görülmemiştir. Mutasyon sıklıklarının bu denli farklı olmasının nedeni, bazı çalışmaların frameshift mutasyonların yanı sıra yalnızca nonsense mutasyonları, bazılarının nonsense+missense mutasyonların tümünü dikkate almalarından ve Abdel-Wahab ve ark.'nın en sık görüldüğü bildirilen G646WfsX12 (c.1934_1935insG) mutasyonunu analizlerine katmamalarından kaynaklanmaktadır (206). PMF olgularının selüler ve fibrotik faz olarak ayrıldığı hiç çalışma olmadığından sadece PMF-SF hastalarını dahil ettiğimiz çalışmamızda sonucu yorumlamak güçleşmiştir. Kötü prognoz ve hastalık progresyonuyla ilişkili olan ASXL1 frameshift ya da nonsense mutasyonlarının serimizde görülmemesi, ileri evre- fibrotik faz PMF hastalarının çalışmamızda yer almamasına bağlanabilir.

ASXL1 mutasyonlarının yarısından fazlasını 646. kodondaki guanin nükleotidinin duplikasyonu nedeniyle kodlanan glisinin triptofana dönüştüğü, çerçeve kaymasıyla sonuçlanan G646WfsX12 (c.1934_1935insG) mutasyonu oluşturur (66). Ancak, Abdel-Wahab ve ark., bu mutasyonun gerçek bir somatik mutasyon olmayıp bir PZR artefaktı olduğunu ileri sürmüş (206), KMML ve PMF’da ASXL1 mutasyon sıklığını inceledikleri çalışmalarında, bu genetik değişikliği mutasyon olarak nitelendirmediklerinden ASXL1 mutasyon oranlarını daha düşük bildirmişlerdir (198). Thol ve ark. (207), 9/193 MDS hastasında G646WfsX12 (c.1934_1935insG) mutasyonunu saptadıkları halde, 65 sağlıklı kontrolde bu mutasyon da dahil olmak üzere hiçbir ASXL1 mutasyonu görmemişlerdir. Ricci ve ark. (214), 13 PV, 10 ET sonrası gelişen sekonder myelofibroz (PV-MF ve ET-MF), 42 PMF tanılı toplam 65 myelofibroz olgusunun 6’sında (%9) G646WfsX12 (c.1934_1935insG) mutasyonunu saptamış ancak bu hastaların immünomagnetik olarak pürifiye edilen CD3+ T lenfositlerinde bu mutasyona rastlamamışlardır. Sonuç olarak, yapılan birçok çalışmada, bu genetik değişiklik gerek germ-line DNA, gerekse kontrol DNA ya da meme kanseri gibi başka kanser tiplerinde saptanmadığından artık gerçek bir mutasyon olarak kabul edilmektedir (66, 215, 221). Çalışmamızda, G646WfsX12 mutasyonu, 3 KMML, 1 MDS/MPN-U olgusu olmak üzere 3 hastada saptanmış olup frameshift mutasyon görülen hastaların 3/7’sinde (%42.9), frameshift+missense mutasyon görülen hastaların 3/16’sında (%18.8) mevcuttur. G646WfsX12 (c.1934_1935insG) mutasyonu saptanan hastaların tümünde immunohistokimyasal yöntemle de kuvvetli (Skor 2/3) ASXL1 ekspresyonu mevcuttur. Bunlara ek olarak, hastaların klinik seyirlerinin de diğer frameshift mutasyonlarda olduğu gibi daha agresif oluşu, bu genetik değişikliğin gerçek bir mutasyon olduğu yönündeki bulgulardır.

Çalışmamızda saptanan frameshift mutasyonlar, delesyon ya da insersiyon nedeniyle çerçeve kaymasıyla sonuçlanan heterozigot mutasyonlar olup bunlar yanı sıra homozigot/heterozigot nitelikte missense mutasyonlar da bulunmuştur. Nonsense mutasyonlar ise izlenmemiştir. Çalışmamızda, literatürde ilk olan 2 frameshift ve 6 missense mutasyon tanımlanmıştır. Bu hastaların hemen tümü kaybedilmiş olduğundan nontümöral kontrol DNA’lar elde edilememiş ve missense mutasyonların SNP olup olmadıklarına bakılamamıştır.

Literatürde hastalık seyri boyunca farklı zamanlarda alınan doku örneklerini mutasyon açısından inceleyen az sayıda çalışma vardır. Bu çalışmalar içinde en büyük seri Chen ve ark.’nın 112 MDS, KMML ve post MDS-AML hastasının değişik dönemlerde elde edilen 305 doku örneğine aittir (238). ASXL1 mutasyonları, 32/112 (%28.6) hastada görülmüş olup bu hastaların %84.4’ünde hastalık progresyonu, %59.4’ünde lösemik dönüşüm izlenmiştir. Buna

karşın, ASXL1 mutasyonu olmayan 80/112 (%71.4) hastada, hastalık progresyonu %45, lösemik dönüşüm %25 oranlarındadır. ASXL1 mutasyonları, 29/32 hastada seri örneklerde de saptanmış, 2 hastada AKİT sonrası dizilemeyle mutasyon görülemediği halde duyarlılığı daha yüksek olan TA klonlama yöntemiyle 2/10 klonda ASXL1 mutasyonu saptanmıştır. ASXL1 mutasyonu saptanmayan 80 hastanın 2'sinde lösemik dönüşüm sırasında alınan örneklerde ASXL1 mutasyonu geliştiği görülmüştür.

Chou ve ark. (221), 127/501 de novo AML hastasından alınan 269 seri örneği ASXL1 mutasyonları açısından incelemiştir. Tanı sırasında ASXL1 mutasyonları, hastaların 18'inde (%14.2) görülmüş, 15'inde (%83.3) tedavi sonrası mutasyon kaybolurken 3'ünde (%16.7) mutasyon, klinik tam remisyon sırasında daha az yoğunlukta olmakla birlikte sebat etmiş ve 4-7.4 ay içinde relaps izlenmiştir. Remisyon sırasında mutasyonun kaybolduğu 6 hastanın 4'ünde relaps sırasında ASXL1 mutasyonu ortaya çıkmış, diğer iki hastanın birinde dizileme ile mutasyon görülmemesine rağmen TA klonlama yöntemiyle 1/20 klonda aynı ASXL1 mutasyonu gösterilmiştir. Diğer hastada ise hem dizileme hem de TA klonlama yöntemiyle önceden varolan ASXL1 mutasyonu bulunamamış, ancak yeni gelişen bir nonsense mutasyon saptanmıştır. Başlangıçta ASXL1 mutasyonu saptanmayan 2/109 (%1.8) hastada relaps sırasında ASXL1 mutasyonu bulunmuştur. Çalışmamızda dizi analiziyle ASXL1 frameshift mutasyonları 7/46 (%15.2), ASXL1 nükleer protein ekspresyonu 13/84 hastada gösterildi. Dizi analiziyle frameshift mutasyon saptanan hastaların tümünde skor 2/3+ İHK-ASXL1 ekspresyonu mevcuttu. İHK'nın, frameshift mutasyonların saptanmasında, %100 duyarlılık ve %100 özgüllükle Sanger dizi analiziyle tam uyumlu ve güvenilir bulunması, ASXL1 mutasyon tayininde, dizileme yönteminden önce kullanılabilecek ucuz ve güvenilir bir yöntem olabileceğini göstermektedir. Missense mutasyonların izole olarak saptandığı 6/9 (%66.7) hastada skor 1+ olarak değerlendirilen fokal zayıf boyanma olması, bu tip mutasyonların da İHK ile yakalanabileceğini göstermektedir.

Mutasyon ve protein ekspresyonunun birlikte saptandığı hastaların 2'sinde ASXL1 mutasyonu ve ekspresyonu, ilk kez hastalık progresyonu ve lösemik dönüşüm sırasında görüldüğü halde diğer hastalarda tanı ve takip biyopsi/aspirasyon örneklerinin hepsinde gösterildi. Takip biyosilerinde kaybolan mutasyon ve/veya protein ekspresyonu görülmemesi bu hastaların remisyona girmemelerine bağlandı. AKİT yapılan 4 hastanın 2'sinde (aKML ve 1 PMF-SF) 2 farklı missense mutasyon, 1'inde (PMF-SF) 1 sessiz mutasyon, 3'UTR bölgesinde 2 nükleotid değişimi bulunmuş, diğerinde (MDS-F) ise mutasyon görülmemiştir.

AKİT sonrası kemik iliği biyopsilerine ulaşamadığından mutasyonların sebat edip etmediklerine yönelik yorum yapılamadı.

ASXL1 mutasyonları, MDS, KMML, sekonder AML ve de novo AML hastalarında erkek cinsiyet ve ileri yaşla birlikte (221, 238). Çalışmamızda, literatüre paralel olarak, ASXL1 mutasyonu, erkek cinsiyet ile ilişkili olduğu halde mutasyonun görüldüğü hastalar daha yaşlı olsa da (64.7 ± 9.4 ve 60.4 ± 14.5 yaş) istatistiksel ilişki gösterilememesi hasta sayısının az oluşuna bağlandı.

ASXL1 mutasyonlarının kan değerleriyle ilişkisini bildiren çok sayıda çalışma vardır. Bunlar içinde, düşük hemoglobin (67, 219, 239) ve yüksek lökosit sayısı (67, 222, 238-240) sayılabilir. Öte yandan, Shivarov ve ark. (241), 3311 AML hastasını kapsayan 6 çalışmayı temel alarak yaptıkları meta-analizde, ASXL1 mutasyonu saptanan hastalarda lökosit sayısının düşük olduğunu belirtmişlerdir. Metzeler ve ark. (222), 38/423 (%9) normal karyotipli AML’de düşük trombosit değerlerinin mutasyonla ilişkili olduğunu göstermişlerdir. Çalışmamızda literatürle uyumlu olarak mutasyonun, yüksek lökosit ve düşük hemoglobin değerleriyle ilişkisi bulunmasına karşın trombosit değerleriyle arasında ilişki saptanmamıştır. ASXL1 mutasyonlarının, MDS’de ferritin düzeyi ve transfüzyon ihtiyacıyla ilişkili olmadığını, BCR-ABL negatif MPN’de ise kan transfüzyon ihtiyacıyla ilişkili olduğunu bildiren çalışmalar vardır (207, 215). AML hastalarında LDH düzeyleri ile mutasyon arasında ilişki yoktur (221). Çalışmamızda ASXL1 mutasyonları ile yüksek ferritin (İHK-ASXL1 ve moleküler FS+MS) ve $\beta 2$ -mikroglobulin (moleküler FS+MS) düzeyleri arasında istatistiksel ilişki saptanmış, ancak ESH ve LDH düzeyleri ile arasında ilişki bulunmamıştır.

BCR-ABL1 (-) MPN’lerde ASXL1 mutasyonları ve splenomegali birlikteliği hakkında çelişkili bulgular vardır. Stein ve ark. (215), herhangi bir ilişki bulmadıkları halde Vannucchi ve ark. (242), mutasyonun splenomegaliyle ilişkili olduğunu belirtmişlerdir. Çalışmamızda da, mutasyon ve splenomegali arasında ilişki görülmemiştir.

ASXL1 ve JAK2 V617F mutasyonunun birlikteliğini inceleyen çalışmalar, JAK2 mutasyonunun, MDS, KMML ve sekonder AML’de ASXL1 mutasyonu olanlarda olmayanlara göre daha sık, MPN’de ise daha az görüldüğünü bildirmişlerdir (214-215, 238). Çalışmamızda, ASXL1 mutasyonu veya protein ekspresyonu görülen ve görülmeyen hastalarda JAK2 V617F mutasyonu sıklığı benzer bulunmuştur. ASXL1 mutasyonlarının, prognoz üzerindeki olumsuz etkileri bilinmekle birlikte izole JAK2 V617F mutasyonunun sağ kalım üzerinde herhangi bir etkisi gösterilmemiştir. Öte yandan, ASXL1 ve JAK2 V617F

mutasyonlarının birlikte bulunuşunun prognoz üzerindeki etkisi açık değildir. Bununla birlikte çalışmamızda İHK-ASXL1 (+) ve JAK2 mutant hastaların sağ kalım sürelerinin daha kısa olduğu görülmüştür.

MDS, KMML ve AML'de ASXL1 mutasyonlarının orta riskli karyotip ile birlikteliğini gösteren çalışmaların (207, 211, 243) yanı sıra en sık trizomi 8 ile birlikte görüldüğü bildirilmiştir (221, 238, 244). Normal karyotipli AML'de ASXL1 mutasyonu saptandığında yaşam süresi kısalmaktadır (244). Çalışmamızda karyotip tayini yapılmış hasta sayımız az olduğundan sitogenetik anomali ve ASXL1 mutasyonları arasında ilişki gösterilememiştir.

MPN'lerde ASXL1 mutasyon sıklığının fibrozis ile birlikte arttığını gösteren çalışmalar mevcuttur. Fibrozisin eşlik etmediği PV ve ET hastalarında ASXL1 mutasyon sıklığı sırasıyla %2-6.7, %0-3.8 arasında bildirildiği halde fibrozis ile sonlanan PV, ET ve PMF hastalarında ASXL1 mutasyon sıklığı sırasıyla %36-50, %10-50 ve %20-32 oranlarındadır (215, 219). Myelodisplastik ve myelodisplastik/myeloproliferatif hastalıklarda ASXL1 mutasyonunun fibrozis ile ilişkisi yönünde herhangi bir çalışma yoktur. Çalışmamızda orta-ağır fibrozisin eşlik ettiği MDS, MDS/MPN grubu hastalar ve PMF-SF hastalarında, gerek Manoharan, gerekse Avrupa fibrozis sınıflamalarına göre fibrozis ağırlığı ve ASXL1 mutasyonları/protein ekspresyonu arasında ilişki saptanmamıştır.

ASXL1 mutasyonları ile kemik iliği morfolojisi arasındaki ilişki henüz çalışılmamış olup çalışmamız bu ilişkiyi irdeleyen ilk çalışmadır. ASXL1 mutasyonları, displastik megakaryosit morfolojisi, ≥ 2 dizide displazi ve interstisyel plazma hücre artışı gibi olumsuz bağımsız prognoz faktörleri ile ilişkili bulunmuştur.

Normal karyotipli AML'de ASXL1 mutasyonu, kemik iliği ve periferik kandaki yüksek blast oranıyla ilişkili bulunmakla birlikte (222), MDS, KMML ve AML'de ASXL1 mutasyonu ve yüksek blast oranı arasında ilişki gösterilememiştir (67, 207, 240-241, 245). Öte yandan, MDS'de ASXL1 mutasyonlarının MDS alt tipleri arasında anlamlı olarak en sık RAEB'de görüldüğünü belirten çalışmalar da mevcuttur (211, 238). Çalışmamızın sonuçları, ikinci grubu destekler nitelikte olup blast görülmeyen hastalarda ASXL1 mutasyonu görülmediği halde blast oranının artması ile birlikte mutasyon sıklığı da anlamlı olarak artmaktadır. İzleme süreleri içinde tekrarlanan kemik iliği biyopsilerinde blast oranındaki artış ile birlikte ASXL1 mutasyonu sıklığının arttığı da ilk kez çalışmamızda gösterilmiştir.

Değişik çalışmalarda ASXL1 mutasyonu ve lösemik dönüşüm arasında pozitif ilişki gösterilmiştir. Bunlar içinde, tanı sırasında ASXL1 mutasyonu saptanan KMML hastalarının %44'ünde lösemik dönüşüm görüldüğü (67) ve ASXL1 mutant hastalarda lösemik dönüşüm sıklığının anlamlı olarak yüksek olduğunu (238) gösteren çalışmalar sayılabilir. Çalışmamızda da ASXL1 mutasyonları ve lösemik dönüşüm arasında pozitif ilişki mevcuttur.

ASXL1 mutasyonları ve sağ kalım arasındaki ilişki değişik çalışmalarda farklı sonuçlar vermiştir. Gelsi-Boyer ve ark. (67), KMML'de ASXL1 mutasyonunun tek değişkenli analizde sağ kalım üzerine olumsuz etkisi olduğu halde bu ilişkinin çok değişkenli analizlerde kaybolduğunu, Patnaik ve ark. (240), nonsense ve missense mutasyonları birlikte değerlendirdiklerinde sağ kalımla ilişkisi olmadığını bildirmişlerdir. Aynı grup, iki farklı merkezin MDS hastalarında sadece nonsense mutasyonların sağ kalım üzerine etkisini incelemiş, tek ve çok değişkenli analizlerde mutasyonun sağ kalımı olumsuz etkilediğini göstermiştir (239). Thol ve ark. (207), mutasyonları, Frameshift mutasyonlara ek olarak nonsense ve nonsense+missense şeklinde ayırıp sağ kalımla ilişkisini değerlendirdiklerinde tek değişkenli analizde her iki grubun da sağ kalımı olumsuz etkilediği halde, çok değişkenli analizde bu etkinin sadece nonsense mutasyon eklenen grupta devam ettiğini göstermişlerdir. Çalışmamızda da tek değişkenli analizde frameshift mutasyon görülen hastalarda sağ kalım anlamlı olarak kısaldığı halde frameshift+missense mutasyonlar birlikte ele alındığında, yaşam süreleri daha kısa olmakla birlikte aralarında istatistiksel ilişki görülmemiştir. İHK-ASXL1 ekspresyonu görülen hastalarda, ekspresyon olmayan hastalara göre ölüm riski 2.14 kat artmasına rağmen çok değişkenli analizde bağımsız prognostik faktör olmadığı anlaşılmıştır. AKİT yapılan hastalar da sağ kalım analizlerini etkileyebilmektedir. AKİT yapılan 4 hastanın 2'sinde tedavi öncesi missense mutasyon, 1'inde 3'UTR'de nükleotid değişimi saptanmış olup tümü halen sağdır (28-56 ay).

Sonuç olarak, myeloid kök hücre hastalıklarında, ASXL1 mutasyonları, lösemik dönüşüm riskini arttırmakta ve prognozu olumsuz yönde etkilemektedir. Son yıllarda sayıları giderek artan çalışmalar yeni mutasyonlar tanımlamaktadır. Bunlar içinde, missense mutasyonların hangilerinin hastalık ilişkili oldukları henüz tam açıklığa kavuşmamıştır. İmmunohistokimyasal olarak kuvvetli ASXL1 protein ekspresyonu, frameshift mutasyonlarla tam örtüştüğünden hangi hastalarda dizileme yapılması gerektiği konusunda fikir verebilir. İHK ve dizileme yöntemlerini karşılaştıran çalışmaların sayısı arttığında, çalışmamıza benzer sonuçlar elde edilirse, İHK dolaylı olarak mutasyonu gösteren bir yöntem olarak da kullanılabilir.

6. SONUÇLAR

- Çalışma grubu, orta-ağır fibrozisin eşlik ettiği 11 MDS, 23 KMML, 17 MDS/MPN-U, 2 aKML, 2 RARS-T ve 29 PMF-SF olmak üzere 84 hastadan oluşmaktadır.
- Tanı gruplarına ayrılmaksızın ortalama yaş 61, medyan yaş 62 ± 13.8 yaştır (34-87). Hastaların 52'si (%61.9) erkek, 32'si (%38.1) kadın olup erkek/kadın oranı 1.6'dır
- Medyan kan değerleri hastalık grupları arasında farklı olup; **MDS-F**; lökopeni, derin anemi ve trombopeni, **KMML**; lökositoz, hafif anemi ve trombopeni, **MDS/MPN-U**; normal lökosit sayısı, derin anemi, trombopeni, **PMF-SF**; hafif lökositoz, normal hemoglobin değeri ve belirgin trombositoz şeklindedir.
- Splenomegali 50/84 (%59.5) hastada mevcut olup PMF-SF ve KMML hastalarında daha sıktır.
- Karyotipleme sonuçları 34/84 (%40.5) hastada mevcut olup 20 (%58.8) hastada normaldir. On bir (%32.4) hastada tek, 3 (%8.8) hastada ≥ 3 kromozomu tutan anomali izlenmiştir (*trizomi 8, del(20) ve del(21) en sık görülen kromozom anomalileri olup en sık MDS-F, ardından KMML ve MDS/MPN-U hastalarında izlenmiştir*).
- JAK2 V617F mutasyonu 52/84 (%62) hastada bakılmış olup 21 (%40.4) hastada heterozigot mutasyon saptanmıştır (**PMF-SF**; 14/26 (%53.8), **KMML**; 5/13 (%38.5), **MDS-F**; 1/3 (%33.3) ve **MDS/MPN-U**; 1/6 (%16.7)).
- Kemik iliği selüleritesi, biyopsilerde yaşa göre düzeltilerek değerlendirildiğinde tüm tanı gruplarında artmıştır. Aspirasyonlar fibrozis nedeniyle tüm tanı gruplarında çoğunlukla hiposelülerdir.
- PMF-SF hastalarının %83'ünde displazi görülmemiştir. Geri kalan az sayıdaki hastada tek diziyi tutan displazi görülmüştür. MDS-F, KMML, MDS/MPN-U'de ≥ 2 dizide displazi mevcuttur.
- Megakaryosit morfolojisi, MDS-F, KMML ve MDS/MPN-U'de displastik karakterde olup bazı hastalarda proliferatif karakterde megakaryositler de eşlik etmektedir.
- Proliferatif karakterde megakaryositler, KMML ve MDS/MPN-U hastalarının 1/3'ünde baskındır.
- PMF-SF ve RARS-T hastalarının tümünde megakaryositler proliferatif morfolojidedir.
- Proliferatif tip megakaryosit morfolojisi; splenomegali, megakaryositlerde fokal belirgin artma, sinuzal hematopoez, eozinofil artışı ve JAK2 V617F mutasyonu gibi MPN özellikleri ile ilişkilidir.

- Displastik tipte yaygın artış gösteren megakaryositler; ***klirik parametrelerden;*** takip sırasında blast oranında artma, lökopeni, anemi, trombopeni, yüksek ferritin ve kısa sağ kalım, ***morfolojik parametrelerden;*** yüksek blast oranı, ≥ 2 dizide displazi, megakaryositlerde aberan CD34 ekspresyonu, megakaryositlerde kümeleşme olmaması, depo demirinde artma, interstisyel plazma ve mast hücre artışı, lenfoid nodül ve ASXL1 mutasyonu varlığı gibi tüm olumsuz prognostik faktörler ile ilişkilidir.
- Çok değişkenli analizde, displastik megakaryosit morfolojisi bağımsız prognoz faktörüdür.
- Megakaryositlerde aberan CD34 ekspresyonu, splenomegali ve JAK2 V617F mutasyonu görülmeyen hastalarda daha sıktır. Hemen tüm olumsuz prognoz faktörleriyle birlikte.
- Tüm hastalar birlikte değerlendirildiğinde megakaryositlerde aberan CD34 ekspresyonu, tek ve çok değişkenli analizlerde sağ kalımı olumsuz etkilemekle birlikte PMF-SF hastaları çıkartıldığında, sağ kalım üzerindeki etkisi kaybolmuştur.
- MDS ve MDS/MPN'de tek değişkenli analizde yüksek blast oranı ve displazinin ≥ 2 dizi tutması ile sağ kalım arasında önemli prognostik ilişki mevcut olup çok değişkenli analizde her iki parametre de bağımsız prognoz faktörüdür.
- Yüksek blast oranını gösteren $\geq 10\%$ - $<20\%$ grubu kendi içinde $\geq 10\%$ - $<15\%$ ve $\geq 15\%$ - $<20\%$ olarak iki grup halinde değerlendirildiğinde, $\geq 10\%$ - $<15\%$ grubunun sağ kalım süreleri $\geq 5\%$ - $<10\%$ grubuyla birbirine çok yakın olmasına karşın $\geq 15\%$ - $<20\%$ grubu hastaların medyan yaşam süresi çok daha kısadır.
- Blast oranı $\leq 5\%$ olan hastalarda kemik iliği biyopsisinde CD34+ hücreler dağınık olduğu halde blast oranı $\geq 5\%$ - $<10\%$ olan hastalarda CD34+ hücreler küme oluşturmaktadır. CD34+ hücrelerin hem küme hem de yaygın dağınık paternde görüldüğü hastalarda blast oranı $\geq 10\%$ - $<20\%$ 'dir.
- Takip süresince blast oranındaki artış ve lösemik dönüşüm; başlangıç blast oranının $\geq 5\%$ olması, ≥ 2 dizide displazi, displastik megakaryosit morfolojisi, interstisyel plazma hücre artışı, lenfoid nodül ve depo demirinde artma gibi olumsuz prognoz faktörleri ile birlikte.
- Takip süresi içinde blast oranında artma ve lösemik dönüşüm, tüm olgular birlikte değerlendirildiğinde, tek değişkenli analizde sağ kalımı olumsuz etkilemekle birlikte PMF-SF hastaları çıkartıldığında bu etki kaybolmuştur.

- Kemik iliğinde ağır fibrozis, MDS-F ve MDS/MPN-U hastalarında daha belirgin olup düşük hemoglobin ve yüksek ferritin düzeyleri ile ilişkili bulunmuştur. Lökositozun sık görüldüğü KMML ve PMF-SF hastalarında fibrozis hafif/orta düzeydedir.
- Fibrozis ağırlığının Manoharan sınıflamasında sağ kalımı olumsuz etkilediği hem tek hem de çok değişkenli analizlerde gösterilmiştir. Orta (Grade 2) ve ağır (Grade 3 ve 4) fibrozis arasında sağ kalım açısından istatistiksel anlamlılık vardır. Bu ilişki Avrupa sınıflamasında saptanmamıştır.
- Kemik iliği fibrozisi ile kötü risk faktörleri (blast oranı, çoğul displazi, lösemik dönüşüm vb.) arasında istatistiksel ilişki görülmemiştir.
- Anjiyogenez artışı ve sinuzal hematopoez ile fibrozis arasında anlamlı ilişki vardır.
- Megakaryosit artış düzeyi ve fibrozis derecesi arasında istatistiksel ilişki bulunamamıştır.
- Manoharan sınıflamasına göre fibrozis, KMML’de orta, MDS ve MDS/MPN-U’de ağır düzeydedir.
- Fibrozis belirginleştikçe interstisyel lenfosit, plazma, mast hücre artışları ve lenfoid nodül artmakla birlikte aralarında istatistiksel anlamlılık yoktur.
- Kemik iliği stromal değişikliklerinden plazma hücre artışı ve lenfoid nodül; anemi, trombopeni, yüksek ferritin düzeyi, megakaryosit sayısında yaygın belirgin artma, ≥ 2 dizide displazi, yüksek blast oranı ve lösemik dönüşüm ile ilişkilidir.
- Plazma hücre artışı ve lenfoid nodül; tek değişkenli analizde, tüm hastalar birlikte ve PMF-SF ayrıldıktan sonra değerlendirildiğinde, sağ kalımı olumsuz etkilemektedir.
- Plazma hücre artışı, çok değişkenli analizde bağımsız prognoz faktörüdür.
- Stromal değişikliklerden mast hücre artışı, tek değişkenli analizde sağ kalımı kısaltmakla birlikte dismegakaryopoez, megakaryositlerde aberan CD34 ekspresyonu ve takip sırasında blast oranında artma gibi diğer olumsuz prognostik faktörler ile ilişkilidir.
- **MDS/MPN-U** grubu, medyan lökosit, hemoglobin ve trombosit sayıları, takip süresi içinde blast oranında artış, kemik iliği biyopsisinde CD34+ hücrelerin dağılımı ve fibrozisin ağırlığı bakımından MDS-F; kemik iliğinde myeloid ve eritroid dizilerin sayısal değişiklikleri, megakaryosit morfolojisi, stromal plazma ve mast hücre artışı, lenfoid nodül, lösemik dönüşüm ve medyan yaşam süresi açısından KMML’ye yakındır.
- ASXL1 mutasyonları, 46 hastaya ait 74 kemik iliği aspirasyon örneğinden elde edilen DNA’larda Sanger dizileme ile araştırıldı.

- ASXL1 mutasyonunu dolaylı olarak gösterebileceği düşünölen nükleer protein ekspresyonu, 84 hastaya ait 129 kemik iliği biyopsisinde immunohistokimyasal yöntemle incelendi.
- Çalışmamız, immunohistokimyasal yöntemle ASXL1 protein ekspresyonuna bakılan ve kemik iliği aspirasyon lamlarından kazıma ile DNA elde edilen ilk çalışmadır.
- Retrospektif olarak tanı, tedavi yanıtı, progresyon ve lösemik dönüşüm sırasında alınan tüm kemik iliği biyopsilerinde, ASXL1 nükleer protein ekspresyonuna bakıldı ve eş zamanlı alınan kemik iliği aspirasyonlarından DNA ekstraksiyonu ile dizileme yapıldı.
- Sanger dizileme yöntemiyle 15/46 (%32.6) hastada, 5 farklı frameshift ve 10 farklı missense mutasyon bulunmuştur. Bu mutasyonlardan 2 frameshift, 6 missense ve 1 sessiz mutasyon **ilk kez** çalışmamızda bildirilmiştir. Frameshift mutasyonlar (FS) sırasıyla; KMML; 5/17 (%29.4) ve MDS/MPN-U; 2/10 (%20), missense mutasyonlar (MS); MDS/MPN-U; 3/10 (%30), KMML; 3/17 (%17.6), PMF-SF; 2/14 (%14.3) ve 1 aKML hastasında saptanmıştır.
- PMF-SF’de literatürden farklı olarak moleküler yöntemle frameshift veya nonsense mutasyon görölmemiş, immunohistokimyasal olarak da ekspresyon görölmemiştir. Sadece, 2 hastada 2 farklı missense, 5 hastada 3 farklı silent mutasyon ve 5 hastada 3’UTR bölgesinde 2 farklı genetik değişiklik saptanmıştır.
- KMML, MDS/MPN-U ve PMF-SF hastalarında, ASXL1 geninin sonunda, 3’ UTR bölgesinde, literatürde henüz tanımlanmayan 2 nükleotid değişimi %28.3 ve %19.6 oranlarında ve genellikle birlikte görölmüştür. Bu değişikliklerin, ASXL1 gen ekspresyonu üzerindeki etkisi tam bilinmemektedir. Bu hastalarda gerek kan tablosu gerekse megakaryosit morfolojisi proliferatif niteliktedir.
- FS mutasyonlar tek başına ya da missense mutasyonlarla birlikte değerlendirildiğinde, klinik ve morfolojik olumsuz prognoz faktörleri ile ilişkilidir.
- FS ve FS+MS mutasyonlar ile fibrozisin ağırlığı (Manoharan ve Avrupa sınıflamaları) arasında ilişki yoktur.
- FS ve FS+MS mutasyonlar ile takip süresi içinde blast oranında artış ve lösemik dönüşüm arasında ilişki mevcuttur.
- İmmunohistokimyasal ASXL1 protein ekspresyonu, fibrozisin eşlik ettiği myeloid kök hücre hastalıklarında sırasıyla KMML 7/23 (%30.4), MDS 3/11 (%27.3), MDS/MPN-U 3/17 (%17.6) oranlarındadır.

- Dizi analiziyle frameshift mutasyon saptanan hastaların tümünde tümünde skor 2/3+ İHK-ASXL1 ekspresyonu mevcuttu.
- İHK; frameshift mutasyonların saptanmasında, %100 duyarlılık ve %100 özgüllükle, Sanger dizi analiziyle tam uyumlu ve güvenilir bulundu.
- ASXL1 mutasyonu/ekspresyonu, mutasyon ve protein ekspresyonunun birlikte görüldüğü hastaların 2'sinde ilk kez hastalık progresyonu ve lösemik dönüşüm sırasında görüldüğü halde diğer hastalarda tanı ve tüm takip biyopsi/aspirasyon örneklerinde gösterildi.
- İHK-ASXL1 protein ekspresyonu, erkek cinsiyet, yüksek lökosit, düşük hemoglobin ve yüksek ferritin düzeyleri, morfolojik parametrelerden myeloid, eritroid, megakaryositik displazi, ≥ 2 dizide displazi, eritroid dizide artma, megakaryositik dizide hafif artma ve stromada plazma hücre artışı ile ilişkili bulundu.
- İHK-ASXL1 protein ekspresyonu ile JAK2 V617F mutasyonu ve Manoharan veya Avrupa sınıflamalarına göre fibrozis derecesi arasında istatistiksel anlamlı ilişki görülmedi.
- İHK-ASXL1 pozitifliği ile takip süresi içinde blast oranında artış ve lösemik dönüşüm arasında kuvvetli ilişki izlendi.
- Sağ kalım süreleri, tanı gruplarına göre **MDS-F**; 6 ay (2-56 ay), **MDS/MPN-U-F**; 20 ay (1-81 ay), **KMML-F**; 25 ay (2-67 ay) iken **PMF selüler faz** olgularında medyan yaşam süresine ulaşılamamıştır (ortalama 67.5 ± 4.1 ay) (22-78 ay). Tanı grupları arasında medyan yaşam sürelerindeki fark istatistiksel olarak anlamlıdır.
- KMML başta olmak üzere tüm MDS/MPN grubu hastalar, displastik ve proliferatif olarak ayrıldıklarında displastik grupta medyan yaşam süreleri daha kısa saptanmış olmasına karşın iki grup arasında sağ kalım açısından anlamlı fark yoktur.
- Fibrozisin eşlik ettiği MDS ve MDS/MPN grubu hastalarda, tek değişkenli analizde sağ kalımı olumsuz yönde etkileyen parametreler; düşük hemoglobin, yüksek veya düşük ferritin düzeyleri, ≥ 2 dizide displazi, displastik ağırlıklı megakaryosit morfolojisi, yüksek blast oranları ($\geq 5\%$, özellikle $\geq 15\%$ - $<20\%$), plazma hücre artışı ve lenfoid nodüldür.
- Yaş ve erkek cinsiyet, prognostik risk sınıflamalarında yer aldıkları halde sağ kalımla ilişkisi gösterilemedi.
- Çok değişkenli analizde, düşük hemoglobin, displastik megakaryosit morfolojisi, stromada plazma hücre artışı bağımsız prognostik parametreler olarak saptandı.
- Çok değişkenli analizde, tüm hastalar birlikte ele alındığında, düşük hemoglobin değeri, displastik megakaryosit morfolojisi ve stromada plazma hücre artışına ek olarak, yüksek

blast oranları, ≥ 2 dizide displazi ve Manoharan sınıflamasına göre ağır fibrozis de bağımsız prognostik faktörler olarak saptanmıştır.

- FS ve MS mutasyonlar birlikte veya ayrı ayrı ele alındığında, yaşam süresi ASXL1 mutasyonu görülen hastalarda daha kısa olmasına rağmen istatistiksel anlamlılık gösterilememiştir.
- İHK-ASXL1 protein ekspresyonu sağ kalımı olumsuz etkilemektedir. İki yıllık sağ kalım, ekspresyon görülen hastalarda %38.5 (2-58 ay), ekspresyon görülmeyenlerde %63.3 (1-67 ay)'tür.
- Çalışmamızın sonunda, İHK-ASXL1 (+) hastaların %84.6'sı, İHK-ASXL1 (-) hastaların %52.1'i kaybedilmiştir.
- ASXL1 mutasyon/protein ekspresyonu görülen ve görülmeyen hastalarda JAK2 V617F mutasyon sıklığı benzerdir.
- İHK-ASXL1 protein ekspresyonu ve JAK2 V617F mutasyonunun birlikte görüldüğü hastalarda sağ kalım süresi daha kısadır.
- İmmunohistokimyasal olarak kuvvetli ASXL1 protein ekspresyonu, Sanger dizi analizinde frameshift mutasyon varlığı ile tam örtüştüğünden dizileme yapılması gerektiği konusunda ön fikir verebilir.
- İHK ve dizileme yöntemlerini karşılaştıran çalışmaların sayısı arttığında çalışmamıza benzer sonuçlar elde edilirse, İHK dolaylı olarak mutasyonu gösteren bir yöntem olarak da kullanılabilir.

7. KAYNAKLAR:

- 1- Bain BJ, Clark DM, Lampert IA, Wilkins BS. Bone Marrow Pathology. 2001. 2nd Edition. Blackwell Science Ltd, London.
- 2- Hann IM, Evans DI, Marsden HB, Jones PM, Palmer MK. Bone marrow fibrosis in acute lymphoblastic leukaemia of childhood. *Journal of Clinical Pathology*. 1978; 31: 313–315.
- 3- Thiele J, Grashof K, Fisher R. Follow-up study on bone marrow reticulin fibrosis in AML. *Analytical Cellular Pathology*. 1991; 3: 225–231.
- 4- O'Malley DP, Sen J, Juliar BE, Orazi A. Evaluation of stroma in human immunodeficiency virus/acquired immunodeficiency syndrome-affected bone marrows and correlation with CD4 counts. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*. 2005; 129: 1137–1140.
- 5- Thiele J, Kvasnicka HM, Facchetti F, Franco V, van der Walt J, Orazi A. European consensus on grading bone marrow fibrosis and assessment of cellularity. *Haematologica*. 2005; 90: 1128–1132.
- 6- Manoharan A, Pitney WR. Chemotherapy resolves and reverses marrow fibrosis in myelofibrosis. *Scandinavian Journal of Haematology*, 1984; 33: 453–459.
- 7- Pullarkat V, Bass RD, Gong JZ, Feinstein DI, Brynes RK. Primary autoimmune myelofibrosis: definition of a distinct clinicopathologic syndrome. *American Journal of Hematology*. 2003; 72: 8–12.
- 8- Pereira RM, Velloso ER, Menezes Y, Gualandro S, Vassalo J, Yoshinari NH. Bone marrow findings in systemic lupus erythematosus patients with peripheral cytopenias. *Clinical Rheumatology* 1998; 17(3): 219-22.
- 9- Udomsakdi-Auewarakul C, Visuthisakchai S, Sangruchi T, Issaragrisil S. Reversal of marrow fibrosis in agnogenic myeloid metaplasia by allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. *Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology*. 2003; 21: 121–126.
- 10- Sale GE, Deeg HJ, Porter, BA. Regression of myelofibrosis and osteosclerosis following hematopoietic cell transplantation assessed by magnetic resonance imaging and histologic grading. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 2006; 12: 1285–1294.
- 11- Kerbaux DM, Gooley TA, Sale GE, Flowers ME, Doney KC, Georges GE. et al. Hematopoietic cell transplantation as curative therapy for idiopathic myelofibrosis, advanced polycythemia vera, and essential thrombocythemia. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 2007; 13: 355–365.
- 12- Weiss L, Chen LT. The organization of hematopoietic cords and vascular sinuses in bone marrow. *Blood Cells*. 1975; 1: 617.

- 13-** Watanabe Y. Fine structure of bone marrow stroma. *Nippon Ketsueki Gakkai Zasshi - Acta Haematologica Japonica*. 1985; 48, 1688–1700.
- 14-** Cattoretti G, Schiro R, Orazi A, Soligo D, Colombo MP. Bone marrow stroma in humans: anti-nerve growth factor receptor antibodies selectively stain reticular cells in vivo and in vitro. *Blood*. 1993; 81, 1726–1738.
- 15-** Bentley SA, Alabaster O, Foidart JM. Collagen heterogeneity in normal human bone marrow. *British Journal of Haematology*. 1981; 48: 287–291.
- 16-** Reilly JT, Nash JR, Mackie MJ, McVerry BA. Immunoenzymatic detection of fibronectin in normal and pathological haematopoietic tissue. *British Journal of Haematology*. 1985; 59: 497–504.
- 17-** Clark BR, Keating A. Biology of bone marrow stroma. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1995; 770: 70–78.
- 18-** Harigaya K, Cronkite EP, Miller ME, Shadduck RK. Murine bone marrow cell line producing colony-stimulating factor. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*. 1981; 78: 6963–6966.
- 19-** Ohkawa H, Harigaya K. Effect of direct cell-to-cell interaction between the KM-102 clonal human marrow stromal cell line and the HL-60 myeloid leukemic cell line on the differentiation and proliferation of the HL-60 line. *Cancer Research*. 1987; 47: 2879–2882.
- 20-** Sudo T, Ito M, Ogawa Y, Iizuka M, Kodama H, Kunisada T et al. Interleukin 7 production and function in stromal cell-dependent B cell development. *Journal of Experimental Medicine*. 1989; 170: 333–338.
- 21-** Zhang Y, Adachi Y, Suzuki Y, Minamino K, Iwasaki M, Hisha H et al. Simultaneous injection of bone marrow cells and stromal cells into bone marrow accelerates hematopoiesis in vivo. *Stem Cells*. 2004; 22: 1256–1262.
- 22-** Kuter DJ. New thrombopoietic growth factors. *Blood*. 2007; 109: 4607–4616.
- 23-** Groopman JE. The pathogenesis of myelofibrosis in myeloproliferative disorders. *Annals of Internal Medicine*. 1980; 92: 857–858.
- 24-** McCarthy DM. Annotation. Fibrosis of the bone marrow: content and causes. *British Journal of Haematology*. 1985; 59: 1–7.
- 25-** Kimura A, Katoh O, Hyodo H, Kuramoto A. Transforming growth factor-beta regulates growth as well as collagen and fibronectin synthesis of human marrow fibroblasts. *British Journal of Haematology*. 1989; 72: 486–491.

- 26-** Terui T, Niitsu Y, Mahara K, Fujisaki Y, Urushizaki Y, Mogi Y et al. The production of transforming growth factor-beta in acute megakaryoblastic leukemia and its possible implications in myelofibrosis. *Blood*. 1990; 75: 1540–1548.
- 27-** Fava RA, Casey TT, Wilcox J, Pelton RW, Moses HL, Nanney LB. Synthesis of transforming growth factor-beta 1 by megakaryocytes and its localization to megakaryocyte and platelet alpha-granules. *Blood*. 1990; 76: 1946–1955.
- 28-** Kuter DJ, Gminski DM, Rosenberg RD. Transforming growth factor beta inhibits megakaryocyte growth and endomitosis. *Blood*. 1992; 79: 619–626.
- 29-** Martyre M.C, Romquin N, Le Bousse-Kerdiles MC, Chevillard S, Benyahia B, Dupriez B, Demory JL, Bauters F. Transforming growth factor-beta and megakaryocytes in the pathogenesis of idiopathic myelofibrosis. *British Journal of Haematology*. 1994; 88: 9–16.
- 30-** Rameshwar P, Denny TN, Stein D, Gascon P. Monocyte adhesion in patients with bone marrow fibrosis is required for the production of fibrogenic cytokines. Potential role for interleukin-1 and TGF-beta. *Journal of Immunology*. 1994; 153: 2819–2830.
- 31-** Johnston JB, Dalal BI, Israels SJ, Oh S, McMillan E, Begleiter A et al. Deposition of transforming growth factor-beta in the marrow in myelofibrosis and the intracellular localization and secretion of TGF-beta by leukemic cells. *American Journal of Clinical Pathology*. 1995; 103: 574–582.
- 32-** Le Bousse-Kerdiles MC, Chevillard S, Charpentier A, Romquin N, Clay D, Smadja-Joffe F et al. Differential expression of transforming growth factor-beta, basic fibroblast growth factor, and their receptors in CD34+ hematopoietic progenitor cells from patients with myelofibrosis and myeloid metaplasia. *Blood*. 1996; 88: 4534–4546.
- 33-** Chagraoui H, Komura E, Tulliez M, Giraudier S, Vainchenker W, Wendling F. Prominent role of TGF-beta 1 in thrombopoietin-induced myelofibrosis in mice. *Blood*. 2002; 100: 3495–3503.
- 34-** Shehata M, Schwarzmeier JD, Hilgarth M, Hubmann R, Duechler M, Gisslinger H. TGF-beta1 induces bone marrow reticulin fibrosis in hairy cell leukemia. *Journal of Clinical Investigation*. 2004; 113: 676–685.
- 35-** Roberts AB, McCune BK, Sporn MB. TGF-beta: regulation of extracellular matrix. *Kidney International*. 1992; 41: 557–559.
- 36-** Le Bousse-Kerdilès MC, Martyré MC, Samson M. Cellular and molecular mechanisms underlying bone marrow and liver fibrosis: a review. *European Cytokine Network*. 2008 Jun; 19(2): 69-80.

- 37-** Rameshwar P, Narayanan R, Qian J, Denny TN, Colon C, Gascon P. NF-kappa B as a central mediator in the induction of TGFbeta in monocytes from patients with idiopathic myelofibrosis: an inflammatory response beyond the realm of homeostasis. *Journal of Immunology* 2000; 165: 2271.
- 38-** Gruber G, Schwarzmeier JD, Shehata M, Hilgarth M, Berger R. Basic fibroblast growth factor is expressed by CD19/CD11cpositive cells in hairy cell leukemia. *Blood*. 1999; 94: 1077.
- 39-** Kiernan, J.A. *Histological and Histochemical Methods: Theory and Practice*. Butterworth/Heinemann, Oxford. 1999.
- 40-** Popat U, Frost A, Liu E, May R, Bag R, Reddy V et al. New onset of myelofibrosis in association with pulmonary arterial hypertension. *Annals of Internal Medicine*. 2005; 143: 466–467.
- 41-** Rocha Filho FD, Ferreira FV, Mendes Fde O, Ferreira FN, Karbage A, Alencar ML et al. Bone marrow fibrosis (pseudo-myelofibrosis) in human kala-azar. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2000; 33: 363–366.
- 42-** Orazi A, Cattoretti G, Schiro R, Siena S, Bregni M, Di Nicola M et al. Recombinant human interleukin-3 and recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor administered in vivo after high-dose cyclophosphamide cancer chemotherapy: effect on hematopoiesis and microenvironment in human bone marrow. *Blood*. 1992; 79: 2610–2619.
- 43-** Orazi A, Cooper RJ, Tong J, Gordon MS, Battiato L, Sledge Jr et al. Effects of recombinant human interleukin-11 (Neumega rhIL-11 growth factor) on megakaryocytopoiesis in human bone marrow. *Experimental Hematology*. 1996; 24: 1289–1297.
- 44-** Douglas VK, Tallman MS, Cripe LD, Peterson LC. Thrombopoietin administered during induction chemotherapy to patients with acute myeloid leukemia induces transient morphologic changes that may resemble chronic myeloproliferative disorders. *American Journal of Clinical Pathology*. 2002; 117: 844–850.
- 45-** Thiele J, Kvasnicka HM. Grade of bone marrow fibrosis is associated with relevant hematological findings-a clinicopathological study on 865 patients with chronic idiopathic myelofibrosis. *Annals of Hematology*. 2006; 85: 226–232.
- 46-** Ivanyi JL, Mahunka M, Papp A, Kiss A, Telek B. Prognostic significance of bone marrow reticulin fibres in idiopathic myelofibrosis: evaluation of clinicopathological parameters in a scoring system. *Haematologia*. 1994; 26: 75–86.

- 47-** Della Porta MG, Malcovati L, Boveri E, Travaglino E, Pietra D, Pascutto C et al. Clinical relevance of bone marrow fibrosis and CD34-positive cell clusters in primary myelodysplastic syndromes. *Journal Clinical Oncology*. 2009; 27(5):754-762.
- 48-** Buesche G, Teoman H, Wilczak W, Ganser A, Hecker H, Wilkens L et al. Marrow fibrosis predicts early fatal marrow failure in patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia*. 2008; 22(2): 313-322.
- 49-** Lambertenghi-Delilieri G, Orazi A, Luksch R, Annaloro C, Soligo D. Myelodysplastic syndrome with increased marrow fibrosis: A distinct clinico-pathological entity. *British Journal of Haematology*. 1991; 78: 161-166.
- 50-** Verhoef GE, De Wolf-Peeters C, Ferrant A, Deprez S, Meeus P, Stul M. et al. Myelodysplastic syndromes with bone marrow fibrosis: A myelodysplastic disorder with proliferative features. *Annals of Hematology*. 1991; 63: 235-241.
- 51-** Maschek H, Georgii A, Kaloutsi V, Werner M, Bandekar K, Kressel MG et al. Myelofibrosis in primary myelodysplastic syndromes: A retrospective study of 352 patients. *European Journal of Haematology*. 1992; 48: 208-214.
- 52-** Maschek H, Gutzmer R, Choritz H, et al. Life expectancy in primary myelodysplastic syndromes: A prognostic score based upon histopathology from bone marrow biopsies of 569 patients. *European Journal Haematology*. 1994; 53: 280-287.
- 53-** Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H et al. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon: IARC, 2008.
- 54-** Orazi A, Bennett J, Germing U. Chronic Myelomonocytic leukemia. In: Swerdlow S, ed. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. 4th ed. Lyon: IARC, 2008: 76-79.
- 55-** Groupe Francais de Cytogenetique Hematologique. Chronic myelomonocytic leukemia: single entity or heterogeneous disorder? A prospective multicenter study of 100 patients. *Cancer Genetics and Cytogenetics*. 1991; 55: 57–65.
- 56-** Fenaux P, Jouet JP, Zandecki M, Lai JL, Simon M, Pollet JP et al. Chronic and subacute myelomonocytic leukaemia in the adult: a report of 60 cases with special reference to prognostic factors. *British Journal of Haematology*. 1987; 65: 101–106.
- 57-** Germing U, Gattermann N, Minning H, Heyll A, Aul C. Problems in the classification of CMML-dysplastic versus proliferative type. *Leukemia Research*. 1998; 22(10): 871-878.
- 58-** Czader M, Orazi A. Myelodysplastic/Myeloproliferative neoplasms and related diseases. In: Orazi A, ed. *Knowles' Neoplastic Hematology*. 3rd ed. 2013: 1140-1156.

- 59-** Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick H et al. The chronic myeloid leukaemias: guidelines for distinguishing chronic granulocytic, atypical chronic myeloid, and chronic myelomonocytic leukaemia. Proposals by the French-American-British Cooperative Leukaemia Group. *British Journal of Haematology*. 1994; 87(4): 746-54.
- 60-** Voglová J, Chrobák L, Neuwirtová R, Malasková V, Straka L. Myelodysplastic and myeloproliferative type of chronic myelomonocytic leukemia-distinct subgroups or two stages of the same disease? *Leukemia Research*. 2001; 25(6): 493-499.
- 61-** Germing U, Strupp C, Knipp S, Kuendgen A, Giagounidis A, Hildebrandt B et al. Chronic myelomonocytic leukemia in the light of the WHO proposals. *Haematologica*. 2007; 92(7): 974-977.
- 62-** Nösslinger T, Reisner R, Grüner H, Tüchler H, Nowotny H, Pittermann E et al. Dysplastic versus proliferative CMML-a retrospective analysis of 91 patients from a single institution. *Leukemia Research*. 2001; 25(9): 741-747.
- 63-** Zoi K, Cross NC. Molecular pathogenesis of atypical CML, CMML and MDS/MPN-unclassifiable. *International Journal of Hematology*. 2015; 101(3): 229-242.
- 64-** Grossmann V, Kohlmann A, Eder C, Haferlach C, Kern W, Cross NC et al. Molecular profiling of chronic myelomonocytic leukemia reveals diverse mutations in >80% of patients with TET2 and EZH2 being of high prognostic relevance. *Leukemia*. 2011; 25(5): 877-879.
- 65-** Abdel-Wahab O, Pardananani A, Patel J, Wadleigh M, Lasho T, Heguy A et al. Concomitant analysis of EZH2 and ASXL1 mutations in myelofibrosis, chronic myelomonocytic leukemia and blast-phase myeloproliferative neoplasms. *Leukemia*. 2011; 25(7): 1200-1202.
- 66-** Gelsi-Boyer V, Brecqueville M, Devillier R, Murati A, Mozziconacci MJ, Birnbaum D. Mutations in ASXL1 are associated with poor prognosis across the spectrum of malignant myeloid diseases. *Journal of Hematology and Oncology*. 2012; 21:5-12.
- 67-** Gelsi-Boyer V, Trouplin V, Roquain J, Adélaïde J, Carbuccioni N, Esterni B et al. ASXL1 mutation is associated with poor prognosis and acute transformation in chronic myelomonocytic leukaemia. *British Journal of Haematology*. 2010; 151(4): 365-75.
- 68-** Ernst T, Chase AJ, Score J, Hidalgo-Curtis CE, Bryant C, Jones AV et al. Inactivating mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myeloid disorders. *National Genetics*. 2010; 42(8): 722-726.

- 69-** Ernst T, Chase A, Zoi K, Waghorn K, Hidalgo-Curtis C, Score J et al. Transcription factor mutations in myelodysplastic/ myeloproliferative neoplasms. *Haematologica*. 2010; 95(9): 1473-1480.
- 70-** Caudill JS, Sternberg AJ, Li CY, Tefferi A, Lasho TL, Steensma DP. C-terminal nucleophosmin mutations are uncommon in chronic myeloid disorders. *British Journal of Haematology*. 2006; 133(6): 638-641.
- 71-** Jelinek J, Oki Y, Gharibyan V, Bueso-Ramos C, Prchal JT, Verstovsek S et al. JAK2 mutation 1849G>T is rare in acute leukemias but can be found in CMML, Philadelphia chromosome-negative CML, and megakaryocytic leukemia. *Blood*. 2005; 106(10): 3370-3373.
- 72-** Levine RL, Loriaux M, Huntly BJ, Loh ML, Beran M, Stoffregen E et al. The JAK2V617F activating mutation occurs in chronic myelomonocytic leukemia and acute myeloid leukemia, but not in acute lymphoblastic leukemia or chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2005; 106(10): 3377-3379.
- 73-** Pich A, Riera L, Sismondi F, Godio L, Davico Bonino L, Marmont F et al. JAK2V617F activating mutation is associated with the myeloproliferative type of chronic myelomonocytic leukaemia. *Journal of Clinical Pathology*. 2009; 62(9): 798-801.
- 74-** Storniolo AM, Moloney WC, Rosenthal DS, Cox C, Bennett JM. Chronic myelomonocytic leukemia. *Leukemia*. 1990; 4(11): 766-770.
- 75-** Orazi A, Chiu R, O'Malley DP, Czader M, Allen SL, An C et al. Chronic myelomonocytic leukemia: The role of bone marrow biopsy immunohistology. *Modern Pathology*. 2006; 19(12): 1536-1545.
- 76-** Martiat P, Michaux JL, Rodhain J. Philadelphia-negative (Ph-) chronic myeloid leukemia (CML): comparison with Ph+ CML and chronic myelomonocytic leukemia. The Groupe Français de Cytogénétique Hématologique. *Blood*. 1991;78(1): 205-211.
- 77-** Tefferi A, Hoagland HC, Therneau TM, Pierre RV. Chronic myelomonocytic leukemia: natural history and prognostic determinants. *Mayo Clinical Proceedings*. 1989; 64(10): 1246-1254.
- 78-** Hyjek E, Vardiman J. Myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. In: Jaffe ES, ed. *Hematopathology*. 1st ed. 2011: 733-756.
- 79-** Boiocchi L, Espinal-Witter R, Geyer JT, Steinhilber J, Bonzheim I, Knowles DM et al. Development of monocytosis in patients with primary myelofibrosis indicates an accelerated phase of the disease. *Modern Pathology*. 2013; 26(2): 204-212.

- 80-** Fenaux P, Beuscart R, Lai JL, Jouet JP, Bauters F. Prognostic factors in adult chronic myelomonocytic leukemia: an analysis of 107 cases. *Journal of Clinical Oncology*. 1988; 6(9): 1417-1424.
- 81-** Aul C, Giagounidis A, Heinsch M, Germing U, Ganser A. Prognostic indicators and scoring systems for predicting outcome in patients with myelodysplastic syndromes. *Reviews in Clinical Experimental Hematology*. 2004; 8(2): E1.
- 82-** Courville EL, Wu Y, Kourda J, Roth CG, Brockmann J, Muzikansky A et al. Clinicopathologic analysis of acute myeloid leukemia arising from chronic myelomonocytic leukemia. *Modern Pathology* 2013; 218: 1-11.
- 83-** Germing U, Strupp C, Aivado M, Gattermann N. New prognostic parameters for chronic myelomonocytic leukemia. *Blood*. 2002; 100(2): 731-732.
- 84-** Onida F, Kantarjian HM, Smith TL, Ball G, Keating MJ, Estey EH et al. Prognostic factors and scoring systems in chronic myelomonocytic leukemia: a retrospective analysis of 213 patients. *Blood*. 2002;99(3): 840-849.
- 85-** Such E, Cervera J, Costa D, Solé F, Vallespi T, Luño E et al. Cytogenetic risk stratification in chronic myelomonocytic leukemia. *Haematologica*. 2011; 96(3): 375-383.
- 86-** Hyjek E, Vardiman J. Myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. In: Jaffe ES, ed. *Hematopathology*. 1st ed. 2011: 733-756.
- 87-** Vardiman J, Bennett J, Bain B. Atypical chronic myeloid leukemia, BCR-ABL1 negative. In: Swerdlow S, ed. *WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues*. 4th ed. Lyon: IARC, 2008: 80-81.
- 88-** Breccia M, Biondo F, Latagliata R, Carmosino I, Mandelli F, Alimena G. Identification of risk factors in atypical chronic myeloid leukemia. *Haematologica*. 2006; 91(11): 1566-8.
- 89-** Hernández JM, del Cañizo MC, Cuneo A, García JL, Gutiérrez NC, González M et al. Clinical, hematological and cytogenetic characteristics of atypical chronic myeloid leukemia. *Annals of Oncology*. 2000; 11(4): 441-444.
- 90-** McClure RF, Dewald GW, Hoyer JD, Hanson CA. Isolated isochromosome 17q: a distinct type of mixed myeloproliferative disorder/ myelodysplastic syndrome with an aggressive clinical course. *British Journal of Haematology*. 1999; 106(2): 445-454.
- 91-** Koldehoff M, Steckel NK, Hegerfeldt Y, Ditschkowski M, Beelen DW, Elmaagacli AH. Clinical course and molecular features in 21 patients with atypical chronic myeloid leukemia. *International Journal of Laboratory Hematology*. 2012; 34(1): e3-5.
- 92-** Cogswell PC, Morgan R, Dunn M, Neubauer A, Nelson P, Poland-Johnston NK et al. Mutations of the ras protooncogenes in chronic myelogenous leukemia: a high frequency of

ras mutations in bcr/abl rearrangement-negative chronic myelogenous leukemia. *Blood*. 1989; 74(8): 2629-2633.

93- Piazza R, Valletta S, Winkelmann N, Redaelli S, Spinelli R, Pirola A et al. Recurrent SETBP1 mutations in atypical chronic myeloid leukemia. *National Genetics*. 2013; 45(1): 18-24.

94- Fend F, Horn T, Koch I, Vela T, Orazi A. Atypical chronic myeloid leukemia as defined in the WHO classification is a JAK2 V617F negative neoplasm. *Leukemia Research*. 2008; 32(12): 1931-1935.

95- Brizard A, Huret JL, Lamotte F, Guilhot F, Benz-Lemoine E, Giraud C et al. Three cases of myelodysplastic-myeloproliferative disorder with abnormal chromatin clumping in granulocytes. *British Journal of Haematology*. 1989; 72(2): 294-295.

96- Felman P, Bryon PA, Gentilhomme O, French M, Charrin C, Espinouse D et al. The syndrome of abnormal chromatin clumping in leucocytes: a myelodysplastic disorder with proliferative features? *British Journal of Haematology*. 1988; 70(1): 49-54.

97- Gustke SS, Becker GA, Garancis JC, Geimer NF, Pisciotta AV. Chromatin clumping in mature leukocytes: a hitherto unrecognized abnormality. *Blood*. 1970; 35(5): 637-658.

98- Jaén A, Irriguible D, Milla F, Vallespi T, Torrabadella M, Abella E et al. Abnormal chromatin clumping in leucocytes: a clue to a new subtype of myelodysplastic syndrome. *European Journal of Haematology*. 1990; 45(4): 209-214.

99- Morel P, Bryon PA, Guyon JM, Coeur P, Gentilhomme O. Malignant hemopathy of the aplastic kind with important nuclear anomalies of granulocytes. *La Semaine des Hopitaux*. 1968; 44(49): 3026-3028.

100- Banerjee R, Halil O, Bain BJ, Cummins D, Banner NR. Neutrophil dysplasia caused by mycophenolate mofetil. *Transplantation*. 2000; 70(11): 1608-1610.

101- Daliphard S, Accard F, Delattre C, Toupance O, Guyot C, Méchinaud F et al. Reversible abnormal chromatin clumping in granulocytes from six transplant patients treated with mycophenolate mofetil: a rare adverse effect mimicking abnormal chromatin clumping syndrome. *British Journal of Haematology*. 2002; 116(3): 726-727.

102- Kurzrock R, Bueso-Ramos CE, Kantarjian H, Freireich E, Tucker SL, Siciliano M et al. BCR rearrangement-negative chronic myelogenous leukemia revisited. *Journal of Clinical Oncology*. 2001; 19(11): 2915-2926.

103- Costello R, Sainty D, Lafage-Pochitaloff M, Gabert J. Clinical and biological aspects of Philadelphia-negative/BCR-negative chronic myeloid leukemia. *Leukemia-Lymphoma*. 1997; 25(3-4): 225-232.

- 104-** Koldehoff M, Beelen DW, Trenchel R, Steckel NK, Peceny R, Ditschkowski M et al. Outcome of hematopoietic stem cell transplantation in patients with atypical chronic myeloid leukemia. *Bone Marrow Transplant*. 2004; 34(12): 1047-1050.
- 105-** Vardiman J, Bennett J, Bain B. Myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms, unclassifiable. In: Swerdlow S, ed. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. 4th ed. Lyon: IARC, 2008: 85-86.
- 106-** Wang SA, Hasserjian RP, Fox PS, Rogers HJ, Geyer JT, Chabot-Richards D et al. Atypical chronic myeloid leukemia is clinically distinct from unclassifiable myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Blood* 2014; **123**(17):2645-2651.
- 107-** DiNardo CD, Daver N, Jain N, et al. Myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms, unclassifiable (MDS/MPN, U): natural history and clinical outcome by treatment strategy. *Leukemia*. 2014. 28: 958-961.
- 108-** Cannella L, Breccia M, Latagliata R, Frustaci A, Alimena G. Clinical and prognostic features of patients with myelodysplastic/myeloproliferative syndrome categorized as unclassified (MDS/MPN-U) by WHO classification. *Leukemia Research*. 2008; 32(3): 514–516.
- 109-** Gurevich I, Luthra R, Konoplev SN, Yin CC, Medeiros LJ, Lin P. Refractory anemia with ringsideroblasts associated with marked thrombocytosis: a mixed group exhibiting a spectrum of morphologic findings. *American Journal of Clinical Pathology*. 2011; 135(3): 398-403.
- 110-** Jeromin S, Haferlach T, Grossmann V, Alpermann T, Kowarsch A, Haferlach C et al. High frequencies of SF3B1 and JAK2 mutations in refractory anemia with ring sideroblasts associated with marked thrombocytosis strengthen the assignment to the category of myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Haematologica*. 2013; 98(2): e15-7.
- 111-** Jankowska AM, Makishima H, Tiu RV, Szpurka H, Huang Y, Traina F et al. Mutational spectrum analysis of chronic myelomonocytic leukemia includes genes associated with epigenetic regulation: UTX, EZH2, and DNMT3A. *Blood*. 2011; 118(14): 3932-3941.
- 112-** Malcovati L, Della Porta MG, Pietra D, Boveri E, Pellagatti A, Gallì A et al. Molecular and clinical features of refractory anemia with ringed sideroblasts associated with marked thrombocytosis. *Blood* 2009; 114(17): 3538-3545.
- 113-** Flach J, Dicker F, Schnittger S, Kohlmann A, Haferlach T, Haferlach C. Mutations of JAK2 and TET2, but not CBL are detectable in a high portion of patients with refractory anemia with ring sideroblasts and thrombocytosis. *Haematologica*. 2010; 95(3): 518-519.

- 114-** Cazzola M, Malcovati L, Invernizzi R. Myelodysplastic/ myeloproliferative neoplasms. Hematology American Society Hematology Education Program. 2011; 2011: 264-272.
- 115-** Broseus J, Florensa L, Zipperer E, Schnittger S, Malcovati L, Richebourg S et al. Clinical features and course of refractory anemia with ring sideroblasts associated with marked thrombocytosis. *Haematologica*. 2012; 97(7): 1036-1041.
- 116-** Ingram W, Lea NC, Cervera J, Germing U, Fenaux P, Cassinat B, Kiladjan JJ et al. The JAK2 V617F mutation identifies a subgroup of MDS patients with isolated deletion 5q and a proliferative bone marrow. *Leukemia*. 2006; 20: 1319–1321.
- 117-** Shaw GR. Ringed sideroblasts with thrombocytosis: an uncommon mixed myelodysplastic/myeloproliferative disease of older adults. *British Journal of Haematology*. 2005; 131(2): 180-184.
- 118-** Wang SA, Hasserjian RP, Loew JM, Sechman EV, Jones D, Hao S et al. Refractory anemia with ringed sideroblasts associated with marked thrombocytosis harbors JAK2 mutation and shows overlapping myeloproliferative and myelodysplastic features. *Leukemia*. 2006; 20(9): 1641-1644.
- 119-** Atallah E, Nussenzweig R, Yin CC, Bueso-Ramos C, Tam C, Manshouri T et al. Prognostic interaction between thrombocytosis and JAK2 V617F mutation in the WHO subcategories of myelodysplastic/myeloproliferative disease-unclassifiable and refractory anemia with ringed sideroblasts and marked thrombocytosis. *Leukemia*. 2008; 22(6): 1295-1298.
- 120-** Foucar K, McKenna RW, Bloomfield CD, Bowers, T. K. and Brunning R. D. et al. Therapy related leukemia, a panmyelosis. *Cancer*. 1979; 43: 1285-1296.
- 121-** Tefferi A, Vardiman JW. Myelodysplastic syndromes. *New England Journal of Medicine*. 2009; 361(19): 1872-1885.
- 122-** Corey SJ, Minden MD, Barber DL, Kantarjian H, Wang JC, Schimmer AD. Myelodysplastic syndromes: the complexity of stem-cell diseases. *National Reviews Cancer*. 2007; 7(2): 118-129.
- 123-** Nimer SD. Myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2008; 111(10): 4841-4851.
- 124-** Brunning RD, Orazi A, Germing U, Le Beau MM, Porwit A, Baumann I et al. Myelodysplastic syndromes/neoplasms, overview. In: Swerdlow S, ed. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. 4th ed. Lyon: IARC, 2008: 88-93.
- 125-** Fenaux P, Morel P, Lai JL. Cytogenetics of myelodysplastic syndromes. *Seminars in Hematology*. 1996; 33(2): 127-138.

- 126-** Haase D. Cytogenetic features in myelodysplastic syndromes. *Annals of Hematology*. 2008; 87(7): 515-526.
- 127-** Jotterand M, Parlier V. Diagnostic and prognostic significance of cytogenetics in adult primary myelodysplastic syndromes. *Leukemia- Lymphoma*. 1996; 23(3-4): 253-266.
- 128-** Haase D, Germing U, Schanz J, Pfeilstöcker M, Nösslinger T, Hildebrandt B et al. New insights into the prognostic impact of the karyotype in MDS and correlation with subtypes: evidence from a core dataset of 2124 patients. *Blood*. 2007; 110(13): 4385-4395.
- 129-** Pozdnyakova O, Miron PM, Tang G, Walter O, Raza A, Woda B et al. Cytogenetic abnormalities in a series of 1,029 patients with primary myelodysplastic syndromes: a report from the US with a focus on some undefined single chromosomal abnormalities. *Cancer*. 2008; 113(12): 3331-3340.
- 130-** Papaemmanuil E, Cazzola M, Boulton J, Malcovati L, Vyas P, Bowen D et al. Chronic Myeloid Disorders Working Group of the International Cancer Genome Consortium. Somatic SF3B1 mutation in myelodysplasia with ring sideroblasts. *New England Journal of Medicine*. 2011; 365(15): 1384-1395.
- 131-** Bejar R, Stevenson K, Abdel-Wahab O, Galili N, Nilsson B, Garcia-Manero G et al. Clinical effect of point mutations in myelodysplastic syndromes. *N Engl J Med*. 2011; 364(26): 2496-2506.
- 132-** Steensma DP, Dewald GW, Lasho TL, Powell HL, McClure RF, Levine RL et al. The JAK2 V617F activating tyrosine kinase mutation is an infrequent event in both "atypical" myeloproliferative disorders and myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2005; 106(4): 1207-1209.
- 133-** Giagounidis AA, Germing U, Haase S, Hildebrandt B, Schlegelberger B, Schoch C et al. Clinical, morphological, cytogenetic, and prognostic features of patients with myelodysplastic syndromes and del(5q) including band q31. *Leukemia*. 2004; 18(1): 113-119.
- 134-** Lai JL, Preudhomme C, Zandecki M, Flactif M, Vanrumbeke M, Lepelley P et al. Myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia with 17p deletion. An entity characterized by specific dysgranulopoiesis and a high incidence of P53 mutations. *Leukemia*. 1995; 9(3): 370-381.
- 135-** Jary L, Mossafa H, Fourcade C, Genet P, Pulik M, Flandrin G. The 17p-syndrome: a distinct myelodysplastic syndrome entity? *Leukemia- Lymphoma*. 1997; 25(1-2): 163-168.
- 136-** Soenen V, Preudhomme C, Roumier C, Daudignon A, Lai JL, Fenaux P. 17p Deletion in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. Analysis of breakpoints and deleted segments by fluorescence in situ. *Blood*. 1998; 91(3): 1008-1015.

- 137-** Pintado T, Ferro MT, San Román C, Mayayo M, Laraña JG. Clinical correlations of the 3q21;q26 cytogenetic anomaly. A leukemic or myelodysplastic syndrome with preserved or increased platelet production and lack of response to cytotoxic drug therapy. *Cancer*.1985; 55(3): 535-541.
- 138-** Fonatsch C, Gudat H, Lengfelder E, Wandt H, Silling-Engelhardt G, Ludwig WD et al. Correlation of cytogenetic findings with clinical features in 18 patients with inv(3)(q21q26) or t(3;3)(q21;q26). *Leukemia*. 1994; 8(8): 1318-1326.
- 139-** Della Porta MG, Malcovati L. Myelodysplastic syndromes with bone marrow fibrosis. *Haematologica*. 2011; 96(2): 180-183.
- 140-** Gregg XT, Reddy V, Prchal JT. Copper deficiency masquerading as myelodysplastic syndrome. *Blood*. 2002; 100(4): 1493-1495.
- 141-** Sutton L, Vusirikala M, Chen W. Hematogone hyperplasia in copper deficiency. *American Journal of Clinical Pathology*. 2009; 132(2): 191-199.
- 142-** Huff JD, Keung YK, Thakuri M, Beaty MW, Hurd DD, Owen J et al. Copper deficiency causes reversible myelodysplasia. *American Journal of Hematology*. 2007; 82(7): 625-630.
- 143-** Kyle RA, Pease GL.. Hematologic aspects of arsenic intoxication. *New England Journal of Medicine*. 1965; 273: 18-23.
- 144-** Westhoff DD, Samaha RJ, Barnes A Jr. Arsenic intoxication as a cause of megaloblastic anemia. *Blood*. 1975; 45(2): 241-246.
- 145-** Brown KE, Young NS. Parvovirus B19 infection and hematopoiesis. *Blood Reviews*. 1995; 9(3): 176-182.
- 146-** Treacy M, Lai L, Costello C, Clark A. Peripheral blood and bone marrow abnormalities in patients with HIV related disease. *British Journal of Haematology*. 1987; 65(3): 289-294.
- 147-** Kaloutsis V, Kohlmeyer U, Maschek H, Nafe R, Choritz H, Amor A et al. Comparison of bone marrow and hematologic findings in patients with human immunodeficiency virus infection and those with myelodysplastic syndromes and infectious diseases. *American Journal of Clinical Pathology*. 1994; 101(2): 123-129.
- 148-** Schmitz LL, McClure JS, Litz CE, Dayton V, Weisdorf DJ, Parkin JL et al. Morphologic and quantitative changes in blood and marrow cells following growth factor therapy. *American Journal of Clinical Pathology*. 1994; 101(1): 67-75.
- 149-** Zipperer E, Pelz D, Nachtkamp K, Kuendgen A, Strupp C, Gattermann N et al. The hematopoietic stem cell transplantation comorbidity index is of prognostic relevance for patients with myelodysplastic syndrome. *Haematologica*. 2009; 94(5): 729-732.

- 150-** Germing U, Aul C, Niemeyer CM, Haas R, Bennett JM. Epidemiology, classification and prognosis of adults and children with myelodysplastic syndromes. *Annals of Hematology*. 2008; 87(9): 691-699.
- 151-** Bernasconi P, Klersy C, Boni M, Cavigliano PM, Calatroni S, Giardini I et al. World Health Organization classification in combination with cytogenetic markers improves the prognostic stratification of patients with de novo primary myelodysplastic syndromes. *British Journal of Haematology*. 2007; 137(3): 193-205.
- 152-** Greenberg PL, Tuechler H, Schanz J, Sanz G, Garcia-Manero G, Solé F et al. Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2012; 120(12): 2454-2465.
- 153-** Germing U, Hildebrandt B, Pfeilstöcker M, Nösslinger T, Valent P, Fonatsch C et al. Refinement of the international prognostic scoring system (IPSS) by including LDH as an additional prognostic variable to improve risk assessment in patients with primary myelodysplastic syndromes (MDS). *Leukemia*. 2005; 19(12): 2223-2231.
- 154-** Thiele J, Tefferi A, Barosi G. Primary Myelofibrosis. In: Swerdlow S ed. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. 4th ed. Lyon: IARC, 2008.
- 155-** Thiele J, Kvasnicka HM, Boeltken B, Zankovich R, Diehl V, Fischer R. Initial (prefibrotic) stages of idiopathic (primary) myelofibrosis (IMF) - a clinicopathological study. *Leukemia*. 1999; 13(11): 1741-1748.
- 156-** Castro-Malaspina H, Jhanwar SC. Properties of myelofibrosis-derived fibroblasts. *Progress in Clinical and Biological Research*. 1984; 154: 307-322.
- 157-** Tefferi A. Primary myelofibrosis: 2013 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *American Journal of Hematology*. 2013; 88(2): 141-150.
- 158-** Mesa RA, Hanson CA, Rajkumar SV, Schroeder G, Tefferi A. Evaluation and clinical correlations of bone marrow angiogenesis in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Blood*. 2000; 96: 3374-3380.
- 159-** Ho CL, Arora B, Hoyer JD, Wellik LE, Mesa RA, Tefferi A. Bone marrow expression of vascular endothelial growth factor in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *European Journal of Haematology*. 2005; 74(1): 35-39.
- 160-** Ho CL, Lasho TL, Butterfield JH, Tefferi A. Global cytokine analysis in myeloproliferative disorders. *Leukemia Research*. 2007; 31(10): 1389-1392.
- 161-** Elliott MA, Verstovsek S, Dingli D, Schwager SM, Mesa RA, Li CY et al. Monocytosis is an adverse prognostic factor for survival in younger patients with primary myelofibrosis. *Leukemia Research*. 2007; 31(11): 1503-1509.

- 162-** Milosevic JD, Kralovics R. Genetic and epigenetic alterations of myeloproliferative disorders. *International Journal of Hematology*. 2013; 97(2): 183-197.
- 163-** Hussein K, Huang J, Lasho T, Pardanani A, Mesa RA, Williamson C et al. Karyotype complements the International Prognostic Scoring System for primary myelofibrosis. *European Journal of Haematology*. 2009; 82: 255–259.
- 164-** Vaidya R, Caramazza D, Begna KH, Gangat N, Van Dyke DL, Hanson CA et al. Monosomal karyotype in primary myelofibrosis is detrimental to both overall and leukemia-free survival. *Blood*. 2011; 117(21): 5612-5615.
- 165-** Cross NC. Genetic and epigenetic complexity in myeloproliferative neoplasms. *Hematology American Society Hematology Education Program*. 2011; 2011: 208-214.
- 166-** Klampfl T, Gisslinger H, Harutyunyan AS et al. Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. *New England Journal of Medicine*. 2013; 369(25): 2379-2390.
- 167-** Gangat N, Caramazza D, Vaidya R, George G, K, Schwager S et al. DIPSS plus: a refined Dynamic International Prognostic Scoring System for primary myelofibrosis that incorporates prognostic information from karyotype, platelet count, and transfusion status. *Journal of Clinical Oncology*. 2011; 29(4): 392-397.
- 168-** Nowell PC, Hungerford DA. Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes. *Journal of National Cancer Institute*. 1960; 25: 85-109.
- 169-** Geary CG. The story of chronic myeloid leukaemia. *British Journal of Haematology*. 2000; 110(1): 2-11.
- 170-** O'Dwyer 2000- O'Dwyer ME, Druker BJ. STI571: an inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase for the treatment of chronic myelogenous leukaemia. *Lancet Oncology*. 2000; 1: 207-211.
- 171-** Hughes TP, Kaeda J, Branford S, Rudzki Z, Hochhaus A, Hensley ML et al. International Randomised Study of Interferon versus STI571 (IRIS) Study Group. Frequency of major molecular responses to imatinib or interferon alfa plus cytarabine in newly diagnosed chronic myeloid leukemia. *New England Journal of Medicine*. 2003; 349(15): 1423-1432.
- 172-** Goldman JM, Melo JV. Chronic myeloid leukemia--advances in biology and new approaches to treatment. *New England Journal of Medicine*. 2003; 349(15): 1451-1464.
- 173-** Tefferi A, Vardiman JW. Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: the 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms. *Leukemia*. 2008; 22(1): 14-22.

- 174-** James C, Ugo V, Le Couédic JP, Staerk J, Delhommeau F, Lacout C et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature*. 2005; 434(7037): 1144-1148.
- 175-** Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, East C, Fourouclas N, Swanton S et al. Cancer Genome Project. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet*. 2005; 365(9464): 1054-1061.
- 176-** Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, Teo SS, Tiedt R, Passweg JR et al. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *New England Journal of Medicine*. 2005; 352(17): 1779-1790.
- 177-** Levine RL, Wadleigh M, Cools J, Ebert BL, Wernig G, Huntly BJ et al. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell*. 2005; 7(4): 387-397.
- 178-** Campbell PJ, Baxter EJ, Beer PA, Scott LM, Bench AJ, Huntly BJP et al. Mutation of JAK2 in the myeloproliferative disorders: timing, clonality studies, cytogenetic associations and role in leukemic transformation. *Blood*. 2006; 108: 3548-3555.
- 179-** Skov V, Thomassen M, Riley CH, Jensen MK, Bjerrum OW, Kruse TA et al. Gene expression profiling with the principal component analysis depicts the biological continuum from essential thrombocythemia over polycythemia vera to myelofibrosis. *Experimental Hematology*, 2012; 40(9): 771–780.
- 180-** Lu X, Levine R, Tong W, Wernig G, Pikman Y, Zarnegar S et al. Expression of a homodimeric type I cytokine receptor is required for JAK2V617F-mediated transformation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 2005; 102 (52): 18962-18967.
- 181-** Vainchenker W, Delhommeau F, Constantinescu SN, Bernard OA. New mutations and pathogenesis of myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2011; 118(7): 1723-1735.
- 182-** Scott LM, Tong W, Levine RL, Scott MA, Beer PA, Stratton MR et al. JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis. *New England Journal of Medicine*. 2007; 356(5): 459-468.
- 183-** Levine RL, Pardanani A, Tefferi A, Gilliland DG. Role of JAK2 in the pathogenesis and therapy of myeloproliferative disorders. *National Review Cancer*. 2007; 7(9): 673-683.
- 184-** Schmidt MH, Dikic I. The Cbl interactome and its functions. *National Review Molecular Cell Biology*. 2005; 6(12): 907-918.
- 185-** Mor A, Philips MR. Compartmentalized Ras/MAPK signaling. *Annual Review of Immunology*. 2006; 24: 771-800.

- 186-** Pronier E, Almire C, Mokrani H, Vasanthakumar A, Simon A, da Costa Reis Monte Mor B et al. Inhibition of TET2-mediated conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine disturbs erythroid and granulomonocytic differentiation of human hematopoietic progenitors. *Blood*. 2011; 118(9): 2551-2555.
- 187-** Kohlmann A, Grossmann V, Klein HU, Schindela S, Weiss T, Kazak B et al. Next-generation sequencing technology reveals a characteristic pattern of molecular mutations in 72.8% of chronic myelomonocytic leukemia by detecting frequent alterations in TET2, CBL, RAS, and RUNX1. *Journal of Clinical Oncology*. 2010; 28(24): 3858-3865.
- 188-** Kosmider O, Gelsi-Boyer V, Ciudad M, Racoeur C, Jooste V, Vey N et al. TET2 gene mutation is a frequent and adverse event in chronic myelomonocytic leukemia. *Haematologica*. 2009; 94(12): 1676-1681.
- 189-** Smith AE, Mohamedali AM, Kulasekararaj A, Lim Z, Gäken J, Lea NC et al. Next-generation sequencing of the TET2 gene in 355 MDS and CMML patients reveals low-abundance mutant clones with early origins, but indicates no definite prognostic value. *Blood*. 2010; 116(19): 3923-3932.
- 190-** Braun T, Itzykson R, Renneville A, de Renzis B, Dreyfus F, Laribi K, et al. Molecular predictors of response to decitabine in advanced chronic myelomonocytic leukemia: a phase 2 trial. *Blood*. 2011; 118(14): 3824-3831.
- 191-** Figueroa ME, Abdel-Wahab O, Lu C, Ward PS, Patel J, Shih A et al. Leukemic IDH1 and IDH2 mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt TET2 function, and impair hematopoietic differentiation. *Cancer Cell*. 2010; 18(6): 553-567.
- 192-** Jankowska AM, Makishima H, Tiu RV, Szpurka H, Huang Y, Traina F et al. Mutational spectrum analysis of chronic myelomonocytic leukemia includes genes associated with epigenetic regulation: UTX, EZH2, and DNMT3A. *Blood*. 2011; 118(14): 3932-3941.
- 193-** Kuo MC, Liang DC, Huang CF, Shih YS, Wu JH, Lin TL et al. RUNX1 mutations are frequent in chronic myelomonocytic leukemia and mutations at the C-terminal region might predict acute myeloid leukemia transformation. *Leukemia*. 2009; 23: 1426-1431.
- 194-** Meggendorfer M, Roller A, Haferlach T, Eder C, Dicker F, Grossmann V et al. SRSF2 mutations in 275 cases with chronic myelomonocytic leukemia (CMML). *Blood*. 2012; 120(15): 3080-3088.
- 195-** Yoshida K, Sanada M, Shiraishi Y, Nowak D, Nagata Y, Yamamoto R et al. Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia. *Nature*. 2011; 478(7367): 64-69.

- 196-** Makishima H, Visconte V, Sakaguchi H, Jankowska AM, Abu Kar S, Jerez A et al. Mutations in the spliceosome machinery, a novel and ubiquitous pathway in leukemogenesis. *Blood*. 2012; 119(14): 3203-3210.
- 197-** Visconte V, Makishima H, Jankowska A, Szpurka H, Traina F, Jerez A et al. SF3B1, a splicing factor is frequently mutated in refractory anemia with ring sideroblasts. *Leukemia*. 2012; 26(3): 542-545.
- 198-** Abdel-Wahab O, Pardanani A, Patel J, Wadleigh M, Lasho T, Heguy A, Beran M, Gilliland DG, Levine RL, Tefferi A: Concomitant analysis of EZH2 and ASXL1 mutations in myelofibrosis, chronic myelomonocytic leukemia and blast-phase myeloproliferative neoplasms. *Leukemia* 2011; 25: 1200-1202.
- 199-** Kroeze LI, Nikoloski G, da Silva-Coelho P, van Hoogen P, Stevens-Linders E, Kuiper RP et al. Genetic defects in PRC2 components other than EZH2 are not common in myeloid malignancies. *Blood*. 2012; 119(5): 1318-1319.
- 200-** Score J, Hidalgo-Curtis C, Jones AV, Winkelmann N, Skinner A, Ward D et al. Inactivation of polycomb repressive complex 2 components in myeloproliferative and myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2012; 119(5): 1208-1213.
- 201-** Gaebler C, Stanzl-Tschegg S, Heinze G, Holper B, Milne, Berger G et al. Fatigue strength of locking screws and prototypes used in small-diameter tibial nails: a biomechanical study. *Journal of Trauma*. 1999; 47(2): 379–384.
- 202-** Fisher CL, Pineault N, Brookes C, Helgason CD, Ohta H, Bodner C et al. Loss-of-function Additional sex combs like 1 mutations disrupt hematopoiesis but do not cause severe myelodysplasia or leukemia. *Blood*. 2010; 115: 38-46.
- 203-** Beisel C, Paro R: Silencing chromatin: comparing modes and mechanisms. *National Review Genetics* 2011; 12: 123-135.
- 204-** Lee SW, Cho YS, Na JM, Park UH, Kang M, Kim EJ et al. ASXL1 represses retinoic acid receptor-mediated transcription through associating with HP1 and LSD1. *Journal of Biological Chemistry*. 2010; 285: 18-29.
- 205-** Dawson MA, Bannister AJ, Gottgens B, Foster SD, Bartke T, Green AR et al. JAK2 phosphorylates histone H3Y41 and excludes HP1alpha from chromatin. *Nature*. 2009; 461: 819-822.
- 206-** Abdel-Wahab O, Kilpivaara O, Patel J, Busque L, Levine RL. The most commonly reported variant in ASXL1 (c.1934dupG;p.Gly646TrpfsX12) is not a somatic alteration. *Leukemia*. 2010; 24(9): 1656-1657.

- 207-** Thol F, Friesen I, Damm F, Yun H, Weissinger EM, Krauter J et al. Prognostic significance of ASXL1 mutations in patients with myelodysplastic syndromes. *Journal of Clinical Oncology*. 2011; 29: 2499-2506.
- 208-** Gelsi-Boyer V, Trouplin V, Adélaïde J, Bonansea J, Cervera N, Carbuccion N et al. Mutations of polycomb-associated gene ASXL1 in myelodysplastic syndromes and chronic myelomonocytic leukaemia. *British Journal of Haematology*. 2009; 145(6): 788-800.
- 209-** Grossmann V, Kohlmann A, Eder C, Haferlach C, Kern W, Cross NC et al. Molecular profiling of chronic myelomonocytic leukemia reveals diverse mutations in > 80% of patients with TET2 and EZH2 being of high prognostic relevance. *Leukemia*. 2012; 25: 877-879.
- 210-** Shen Y, Zhu YM, Fan X, Shi JY, Wang Qr, Yan XJ et al. Gene mutation patterns and their prognostic impact in a cohort of 1185 patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 2011; 118(20): 5593-5603.
- 211-** Boultonwood J, Perry J, Pellagatti A, Fernandez Mercado M, Fernandez –Santamaria C, Calasanz MJ et al. Frequent mutation of polycomb- associated gene ASXL1 in the myelodysplastic syndromes and in acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2010; 24(5): 1062-1065.
- 212-** Pratcorona M, Abbas S, Sanders MA, Koenders JE, Kavelaars FG, Erpelinck-Verschueren CA, Zeilemakers A, Löwenberg B, Valk PJ. Acquired mutations in ASXL1 in acute myeloid leukemia: prevalence and prognostic value. *Haematologica*. 2012; 97(3): 388-392.
- 213-** Carbuccion N, Trouplin V, Gelsi-Boyer V, Murati A, Rocquain J, Adélaïde J et al. Mutual exclusion of ASXL1 and NPM1 mutations in a series of acute myeloid leukemias. *Leukemia*. 2010; 24: 469-473.
- 214-** Ricci C, Spinelli O, Salmoiraghi S, Finazzi G, Carobbio A, Rambaldi A. ASXL1 mutations in primary and secondary myelofibrosis. *British Journal of Haematology*. 2012; 156(3): 404-407.
- 215-** Stein BL, Williams DM, O'Keefe C, Rogers O, Ingersoll RG, Spivak JL et al. Disruption of the ASXL1 gene is frequent in primary, post-essential thrombocytosis and post-polycythemia vera myelofibrosis, but not essential thrombocytosis or polycythemia vera: analysis of molecular genetics and clinical phenotypes. *Haematologica*. 2011; 96(10): 1462-1469.
- 216-** Boultonwood J, Perry J, Zaman R, Fernandez-Santamaria C, Littlewood T, Kusec R et al. High-density single nucleotide polymorphism array analysis and ASXL1 gene mutation

screening in chronic myeloid leukemia during disease progression. *Leukemia*. 2010; 24: 1139-1145.

217- Sugimoto Y, Muramatsu H, Makishima H, Prince C, Jankowska AM, Yoshida N et al. Spectrum of molecular defects in juvenile myelomonocytic leukaemia includes ASXL1 mutations. *British Journal of Haematology*. 2010; 150: 83-87.

218- Rocquain J, Carbuccia N, Trouplin V, Raynaud S, Murati A, Nezri M et al. Combined mutations of ASXL1, CBL, FLT3, IDH1, IDH2, JAK2, KRAS, NPM1, NRAS, RUNX1, TET2 and WT1 genes in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemias. *BioMed Central Cancer*. 2010; 10: 401-407.

219- Brecqueville M, Rey J, Bertucci F, Coppin E, Finetti P, Carbuccia N et al. Mutation analysis of ASXL1, CBL, DNMT3A, IDH1, IDH2, JAK2, MPL, NF1, SF3B1, SUZ12 and TET2 in myeloproliferative neoplasms. *Genes Chromosome Cancer*. 2012; 51(8): 743-755.

220- Damm F, Kosmider O, Gelsi-Boyer V, Renneville A, Carbuccia N, Hidalgo-Curtis C et al. Mutations affecting mRNA splicing define distinct clinical phenotypes and correlate with patient outcome in myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2012; 119(14): 3211-3218.

221- Chou WC, Huang HH, Hou HA, Chen CY, Tang JL, Yao M et al. Distinct clinical and biological features of de novo acute myeloid leukemia with additional sex comblike 1 (ASXL1) mutations. *Blood*. 2011; 116: 4086-4094.

222- Metzeler KH, Becker H, Maharry K, Radmacher MD, Kohlschmidt J, Mrózek K et al. ASXL1 mutations identify a high-risk subgroup of older patients with primary cytogenetically normal AML within the ELN Favorable genetic category. *Blood*. 2011; 118: 6920-6929.

223- Guglielmelli P, Biamonte F, Score J, Hidalgo-Curtis C, Cervantes F, Maffioli M et al. EZH2 mutational status predicts poor survival in myelofibrosis. *Blood*. 2011; 118: 5227-5234.

224- Wolf B.C, Neiman, R.S. Myelofibrosis with myeloid metaplasia: pathophysiologic implications of the correlation between bone marrow changes and progression of splenomegaly. *Blood*. 1985; 65: 803–809.

225- Kroger N, Zabelina T, van Biezen A, Brand R, Niederwieser D, Martino R et al. Allogeneic stem cell transplantation for myelodysplastic syndromes with bone marrow fibrosis. *Haematologica* 2010; 96(2): 291-297.

226- Thiele J, Rompcik V, Wagner S, Fischer R. Vascular architecture and collagen type IV in primary myelofibrosis and polycythaemia vera: an immunomorphometric study on trephine biopsies of the bone marrow. *British Journal of Haematology* 1992; 80: 227-234.

- 227-** Kvasnicka HM, Thiele J. Bone marrow angiogenesis: methods of quantification and changes evolving in chronic myeloproliferative disorders. *Histology and Histopathology*. 2004; 19: 1245-1260.
- 228-** Arora B, Ho CL, Hoyer JD, Mesa RA, Tefferi A. Bone marrow angiogenesis and its clinical correlates in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Haematologica* 2004; 89: 1454-1458.
- 229-** Riccardi A, Giordano M, Giordano P, Cassano E, Cirino M, Cazzola M, et al. Prognostic parameters in myelodysplastic syndromes: a multiple regression analysis. *European Journal of Hematology*. 1988; 40: 158-162.
- 230-** Varela B.L, Chuan C, Wok J.E. & Bennet. J.M. Modifications in the classification of primary myelodysplastic syndromes: the addition of a score system. *Hematological Oncology*. 1985; 3: 55-63.
- 231-** Rios A, Carizo MC, Sanz MA, Vallespi T, Sanz G, Torrabadella M et al. Bone marrow biopsy in myelodysplastic syndromes: morphological characteristics and contribution to the study of prognostic factors. *British Journal of Haematology*, 1990; 75, 26-33.
- 232-** Breccia, M., Latagliata, R., Mengarelli, A., Biondo, F., Mandelli, F. & Alimena, G. Prognostic factors in myelodysplastic and myeloproliferative types of chronic myelomonocytic leukaemia: a retrospective analysis of 83 patients from a single institution. *Haematologica*. 2004; 89: 866–868.
- 233-** Torlakovic G, Langholm R, Torlakovic E. CD34/QBEND10 immunostaining in the bone marrow trephine biopsy: a study of CD34-positive mononuclear cells and megakaryocytes. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*. 2002; 126: 823–828.
- 234-** Tang G, Wangb S, Menona M, Dressera K, Wodaa B, Haoa S. High-level CD34 expression on megakaryocytes independently predicts an adverse outcome in patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia Research*. 2011; 35: 766–770
- 235-** Della Porta MG, Travaglini E, Boveri E, MPonzoni M, Malcovati L, Papaemmanuil E et al. Minimal morphological criteria for defining bone marrow dysplasia: a basis for clinical implementation of WHO classification of myelodysplastic syndromes. *Leukemia*. 2015; 29(1): 66-75.
- 236-** Bacher U, Haferlach T, Schnittger S, Kreipe H, Kroger N. Recent advances in diagnosis, molecular pathology and therapy of chronic myelomonocytic leukaemia. *British Journal of Haematology*. 2011; 153(2): 149-167.
- 237-** Carbuccia N, Murati A, Trouplin V, Brecqueville M, Adélaïde J, Rey J et al. Mutations of ASXL1 gene in myeloproliferative neoplasms. *Leukemia*. 2009; 23: 2183-2186.

- 238-** Chen TC, Hou HA, Chou WC, Tang JL, Kuo YY, Chen CY et al. Dynamics of ASXL1 mutation and other associated genetic alterations during disease progression in patients with primary myelodysplastic syndrome. *Blood Cancer Journal*. 2014; 4: e177.
- 239-** Patnaik MM, Itzykson R, Lasho TL, et al. ASXL1 and SETBP1 mutations and their prognostic contribution in chronic myelomonocytic leukemia: A two center study of 466 patients. *Leukemia*, 2014. 28: 2206–2212.
- 240-** Patnaik MM, Padron E, LaBorde RR, Lasho TL, Finke CM, Hanson CA et al. Mayo prognostic model for WHO-defined chronic myelomonocytic leukemia: ASXL1 and spliceosome component mutations and outcomes. *Leukemia*. 2013; 27: 1504–1510.
- 241-** Shivarov V, Gueorguieva R, Ivanova M, Tiu RV. ASXL1 mutations define a subgroup of AML patients with distinct gene expression profile and poor prognosis: a meta-analysis of 3311 adult AML patients. *Leukemia- Lymphoma*. 2014; 1–11.
- 242-** Vannucchi AM, Lasho TL, Guglielmelli P, Biamonte F, Pardanani A, Pereira A et al. Mutations and prognosis in primary myelofibrosis. *Leukemia*. 2013; 27: 1861–1869.
- 243-** Devillier R, Gelsi-Boyer V, Brecqueville M, Carbuccia N, Murati A, Vey N et al. Acute myeloid leukemia with myelodysplasia-related changes are characterized by a specific molecular pattern with high frequency of ASXL1 mutations. *American Journal of Hematology*. 2012; 87(7): 659-662.
- 244-** Schnittger S, Eder C, Jeromin S, Alpermann T, Fasan A, Grossmann V et al. ASXL1 exon 12 mutations are frequent in AML with intermediate risk karyotype and are independently associated with an adverse outcome. *Leukemia*. 2013; 27(1): 82-91.
- 245-** Jieyu Wang J, Ai X, Gale RP, Xu Z, Qin T, Fang L et al. TET2, ASXL1 and EZH2 mutations in Chinese with myelodysplastic syndromes. *Leukemia Research*. 2013; 37: 305-311.