

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

BCR-ABL (Ph KROMOZOMU) NEGATİF KRONİK
MYELOPROLİFERATİF NEOPLAZİLERDEKİ KEMİK İLİĞİ
MİKROÇEVRESİ ÖZELLİKLERİNİN BU NEOPLAZİLERİN
AYIRICI TANISINDAKİ ÖNEMİ

Dr. Yasemin YUYUCU KARABULUT

PATOLOJİ ANABİLİM DALI
TIPTA UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Işınsu KUZU

ANKARA
2011

KABUL VE ONAY

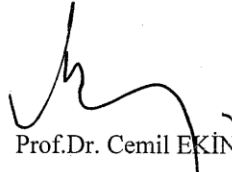
T.C.

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi

Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı

Tıpta Uzmanlık eğitimi çerçevesinde yürütülmüş olan “Bcr-ABL (Philladelphia kromozomu) negatif kronik myeloproliferatif neoplazilerdeki kemik iliği mikro çevresi özelliklerinin bu hastalıkların ayırıcı tanısındaki önemi” başlıklı, Dr.Yasemin YUYUCU KARABULUT’a ait bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından Tıpta Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 25.01.2011

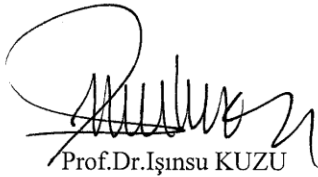


Prof.Dr. Cemil EKİNCİ

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi

Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı

Jüri Başkanı

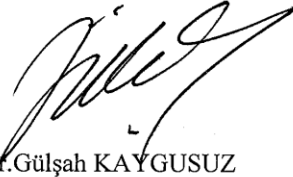


Prof.Dr. Işın KUZU

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi

Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı



Doç.Dr. Gülşah KAYGUSUZ

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi

Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı

Üye

ÖNSÖZ

Tezimin tüm aşamalarında desteğini ve yardımlarını hiç esirgemeyen Prof. Dr. Işinsu KUZU'ya, uzmanlık eğitimim süresince yetişmemde katkıları olan tüm değerli hocalarıma, çalıştığım tüm uzman arkadaşlarıma ve asistanlığım boyunca hep yanımda olan arkadaşlarım; Eda AKPINAR, Elçin KADAN, Pınar CELEPLİ, Banu İNCE, Seher YÜKSEL ve Ayşegül ŞAŞMAZ'a teşekkür ederim.

Ayrıca çalışmamın hazırlık aşamasındaki yardımlarından ötürü, Alahattin ALPTEKİN ve Yusuf ASLAN'a, H&E ve immünohistokimyasal kesitlerin hazırlanmasındaki emekleri için AÜTF İmmünohistoloji laboratuvarı çalışanlarına teşekkür ederim.

Tezimin sonuçlarının değerlendirilmesinde değerli katkıları için AÜTF Biyoistatistik Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Sn Atilla H Elhan 'a teşekkür ederim.

Asistanlığım ve tez dönemim süresince her zaman yanımda olan anne ve babama, manevi desteğim ve enerji kaynağım; eşim Halil, biricik oğlum Efe ve kardeşim Gül'e sonsuz teşekkür ederim.

Dr. Yasemin YUYUCU KARABULUT

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER	iii
KISALTMALAR DİZİNİ	v
TABLolar DİZİNİ	vi
RESİMLER DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. KEMİK İLİĞİ	2
2.1.1. kemik iliği histolojisi	2
2.1.2. Kemik İliği Sellüleritesi	3
2.1.3. Hematopoetik Hücreler	5
2.2. ERİTROPOEZ	5
2.2.1. Sitoloji	5
2.2.2. Histoloji	6
2.3. GRANULOPOEZ	7
2.3.1. Sitoloji	7
2.3.2. Histoloji	8
2.4. MONOSİTOPOEZ	9
2.4.1. Sitoloji	9
2.4.2. Histoloji	10
2.5. MEGAKARYOPOEZ VE TROMBOPOEZ	10
2.5.1. Sitoloji	10
2.5.2. Histoloji	12
2.6. MAST HÜCRELERİ	13
2.6.1. Sitoloji	13
2.6.2. Histoloji	13
2.7. OSTEOLASTLAR VE OSTEOKLASTLAR	13
2.7.1. Sitoloji	13
2.7.2. Histoloji	14
2.8. YAĞ HÜCRELERİ	14
2.8.1. Sitoloji	14
2.8.2. Histoloji	15

2.9. LENFOPOEZ.....	15
2.9.1. Lenfositler	15
2.9.2. Sitoloji	15
2.9.3. Histoloji.....	15
2.10. PLAZMA HÜCRELERİ.....	16
2.10.1. Sitoloji	16
2.10.2. Histoloji.....	16
2.11. MYELOPROLİFERATİF NEOPLAZİLERE GENEL BAKIŞ.....	16
2.11.1. Polistemia Vera	20
2.11.2. Esansiyel Trombositemi	27
2.11.3. Primer Miyelofibrozis	31
2.11.4. MPN’lerde karşılaştırmalı Morfolojik Değerlendirme.....	36
2.12. ÇALIŞMADA KULLANILAN İMMÜNHİSTOKİMYASAL BELİRTEÇLER	37
2.12.1. CD105 (Endoglin)	37
2.12.2. CD146	37
2.12.3. CD34	38
3. MATERYAL VE METOD	39
3.1 OLGU SEÇİMİ.....	39
3.2. HİSTOPATOLOJİK İNCELEME	39
3.2.1. Histokimyasal Değerlendirmede Kullanılan Kriterler	40
3.3. KEMİK İLİĞİ STROMAL DEĞİŞİKLİKLERİ	41
3.4. İMMÜNHİSTOKİMYASAL İNCELEME	42
3.4.1. Kullanılan Antikorların Özellikleri	42
3.4.2. Kullanılan Antikorların Değerlendirilmesi	43
3.5. İSTATİSTİK.....	43
4. BULGULAR	44
5. TARTIŞMA.....	64
6. SONUÇLAR.....	80
7. ÖZET	82
8. SUMMARY	83
9. KAYNAKLAR.....	84

KISALTMALAR DİZİNİ

MPN	: Miyeloproliferatif neoplaziler
KML	: Kronik miyeloid lösemi
PV	: Polistemia vera
ET	: Esansiyel trombositemi
PMF	: Primer miyelofibrozis
JAK2	: Janus kinaz 2
AML	: Akut Miyeloblastik Lösemi
MDS	: Miyelodisplastik sendrom
KMML	: Kronik miyelomonositer lösemi
FISH	: Floresan in situ hibridizasyon
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
Epo	: Eritropoietin
TPO	: Trombopoietin
DNA	: Deoksiribonükleik asit
TGF	: Transforming growth factor
RT	: Reaktif trombositoz
BFU-E	: Burst forming unit-eritroid
CFU-E	: Colony forming unit-eritroid
Ph	: Philedelphia
DSÖ	: DSÖ
PVSG	: Polistemia vera çalışma gurubu
VWH	: von Willebrand hastalığı
32P	: Radyoaktif fosfor
IFN- α	: İnterferon-alfa
MCV	: kırmızı hücre hacmi
PO	: Per oral
allo-HKHN	: Allojenik hematopoietik kök hücre nakli
STAT	: Signal Transducers and Activators of Transcription
TYK2	: Tirozin kinaz
EDTA	: Etilendiamin tetra asetik asit
Htc	: Hematokrit
BK	: Lökosit sayısı
HM	: Hepatomegali
HT	: Hipertansiyon

TABLÖLAR DİZİNİ

- Tablo 3.1.** Megakaryositer serinin morfolojik değerlendirilmesinde kullanılan morfolojik parametreler
- Tablo 3.2.** Granülositer serinin morfolojik değerlendirilmesinde kullanılan morfolojik parametreler
- Tablo 3.3.** Eritroid serinin morfolojik değerlendirilmesinde kullanılan morfolojik parametreler
- Tablo 3.4.** Stromal değişikliklerin değerlendirilmesinde kullanılan morfolojik kriterler
- Tablo 3.5.** Stromal retikülin lif varlığı değerlendirilmesi
- Tablo 3.6.** Çalışmada Kullanılan Antikorların İsimleri, Dilüsyonları ve Ticari Kaynakları
- Tablo 4.1.** Tanılara göre yaş ve cinsiyet dağılımı
- Tablo 4.2.** Tanı ile laboratuvar bulguları arasındaki ilişki
- Tablo 4.3.** Tanı ile klinik parametrelerden splenomegali ve JAK2 mutasyonu arasındaki ilişki
- Tablo 4.4.** Tanı ile sellülarite arasındaki ilişki
- Tablo 4.5.** Kemik iliği sellülaritesi ile stromal retikülin lif artışı arasındaki ilişki
- Tablo 4.6.** Tanı ile kemik iliği aralığına hakim hücreler arasındaki ilişki
- Tablo 4.7.** Tanı ile kemik iliği aralığındaki myeloid/ eritroid seri oranı arasındaki ilişki
- Tablo 4.8.** Tanı ve stromal retikülin lif varlığı ve artışı arasındaki ilişki
- Tablo 4.9.** Tanı ve diğer stromal değişiklikler arasındaki ilişki
- Tablo 4.10.** Tanı ile megakaryosit morfolojisi arasındaki ilişki
- Tablo 4.11.** Tanı ile granülositer seri morfolojisi arasındaki ilişki
- Tablo 4.12.** Tanı eritroid seri morfolojisi arasındaki ilişki
- Tablo 4.13.** Tanı ile immünohistokimyasal olarak elde edilen damar sayısı ve matürasyonunu belirlemek amacıyla kullanılan parametreler arasındaki ilişki

- Tablo 4.14.** Stromal retikülin lif varlığı ile vasküler yapıların sayısı ve olgunluğunu belirleyen immünohistokimyasal parametreler arasındaki ilişki
- Tablo 4.15.** Hakim hücre klinik parametre tablosu
- Tablo 4.16.** Hakim hücre stromal retikülin lif artışı ilişkisi
- Tablo 4.17.** Hakim hücre stromal değişiklikler arasındaki ilişki
- Tablo 4.18.** İmmünohistokimyasal parametreler ile kemik iliği stromal değişiklikleri arasındaki ilişki

RESİMLER DİZİNİ

- Resim 1** (p.08764.08)- ET olgusunda izlenen normosellüler kemik iliği biyopsi örneği granülositer seri artışı
- Resim 3** (p.9542.09)- PV olgusunda izlenen eritroid seri artışına bağlı M/E oranda azalma
- Resim 4a** (p.04031.08)- ET olgusunda grade I retikülin lif artışı
- Resim 4b** (p.05661.07)- ET olgusunda grade II retikülin lif artışı
- Resim 4c** (p.33713.05)- PMF olgusunda grade III retikülin lif artışı ve kollajen varlığı
- Resim 5** (p.33177.05)- PV olgusunda izlenen genişlemiş sinüzoidler ve komşuluğunda artmış megakaryositler
- Resim 6** (P.12814.07)- ET olgusunda izlenen lenfoid nodül
- Resim 7** a(p.03848.07)- PMF olgusunda artmış vasküler yapılar ve genişlemiş kemik trabekülleri
- Resim 7b** (p.18207.06)- PMF olgusuna ait biyopsi örneğinde artmış displastik megakaryositler ve genişlemiş kemik trabekülleri
- Resim 7c** (p.05129.07)- PMF olgusunda izlenen yeni kemik oluşumu, osteoblastik aktivite artışı göstergesi kalın kemik trabekülleri ve artmış vasküler yapılar
- Resim 8a** (p.01320.07)- ET olgusunda izlenen hiperlobüle megakaryositler ve geyik boynuzu şeklinde dev megakaryosit (ok)
- Resim 8b** (p.8764.08)- ET olgusunda izlenen granülositer serinin genç formları ve hiperlobüle dev megakaryosit
- Resim 8c** (P.15821.07)- ET tanılı hastanın kemik iliği biyopsisinde izlenen artmış büyük megakaryositler
- Resim 9a** (p.3695.07)- PMF olgusuna ait biyopsi örneğinde paratrabeküler alanlara yaklaşmış sıkı kümeler oluşturan megakaryositler
- Resim 9b** (p.04031.08)- ET olgusunda izlenen artmış megakaryositler
- Resim 10a** (p.13070.08)- ET tanılı olguya ait gevşek kümelenme yapan megakaryositler
- Resim 10b** (P.3695.07) PMF tanılı hastanın biyopsi örneğinde sıkı kümeler yapmış megakaryositler
- Resim 11a** (P.33177.05)- PV olgusuna ait kemik iliği biyopsi örneğinde hiperlobüle megakaryositler (ok)

- Resim 11b** (P.08028.08)- PMF tanılı hastanın biyopsi örneğinde izlenen immatüri displastik megakaryositler
- Resim 11c** (P.08623.08)- PMF olgusuna ait biyopsi örneğinde izlenen displastik megakaryositler (ok- çıplak megakaryositler)
- Resim 12** (p.18403.07)- ET olgusuna ait biyopsi örneğinde izlenen artmış eozinofil lökositler
- Resim 13a** (p.06672.08) ET olgusunda CD34 ile boyanan genişlemiş sinüzoidler
- Resim 13b** (P.21005.05) CD105 ile boyanan genç damarlar
- Resim 13c** (P.23906.05) PV olgusunda CD146 ile matür damar duvarlarında boyanma
- Resim 14a** (P.06672.08)- ileri evre PMF olgusunda izlenen CD146 pozitif vasküler yapılar
- Resim 14b** (p.03695.07)- PMF olgusunda izlenen artmış ve genişlemiş vasküler yapılar

ŞEKİLLER DİZİNİ

- Şekil 3.1.** a. Displastik megakaryositler, b. Megakaryositlerde sıkı ve gevşek kümelenme
- Şekil 5.1.** MPN gurubu neoplazilerin morfolojilerine göre sınıflandırılması.
- Şekil 7.1:** Ph Negatif MPN grubu üç hastalıkta patogeneze, süreç ve sonuç ilişkili hipotez şeması

1. GİRİŞ VE AMAÇ

DSÖ 2008 sınıflamasında myeloproliferatif neoplaziler (MPN) olarak ayrılan neoplaziler sırasıyla: kronik myeloid lösemi, polistemia vera, esansiyel trombositemi, primer myelofibrozis, kronik nötrofilik lösemi, kronik eozinofilik lösemi NOS (CEL, NOS), mastositozlar ve sınıflandırılmayan MPN şeklindedir. Bu neoplaziler arasında KML dışındakiler Ph (-) MPN gurubu neoplaziler şeklinde gruplanırlar. Ph (-) MPN içinde yer alan PV, ET ve PMF'nin patogezinde JAK2 mutasyonunun rolü olduğunu destekleyen bulgular gösterilmiştir. Her üç hastalık gurubu da klinik, laboratuvar, morfolojik ve sitogenetik açıdan kısmen farklı kısmen örtüşen özellikler bulundurmakta ve benzer fibrotik süreçler ile son döneme ilerlemektedir. Ancak tanı sürecinde belirgin prognostik ve tedavi farklılıkları bulunması nedeniyle bu grup neoplazilerin birbirinden ayrılması gereklidir. Geçmişte yapılan çalışmalarda Ph (-) MPN lerden PV, ET ve PMF nin kemik iliği biyopsilerinde tanımlanan morfolojik parametreler ile birbirlerinden ayırımının mümkün olduğu bildirilmiştir. Ancak tanımlanan morfolojik parametreler hastalığa özgü değildir ve bunların yorumunda patolojiler arası uyumsuzluk oranı yüksektir.

Çalışmamızda Ph (-) MPN gurubu neoplazilerden Polistemia Vera (PV), Esansiyel trombositemi (ET) ve Primer Myelofibrozis (PMF) tanısı almış hastalarda klinik parametreler, JAK2 mutasyonları ve morfolojik tanımlanan özellikler ile kemik iliğinde hastalığın ilerlemesiyle ilişkili olabilecek stromal değişikliklerin karşılaştırılması ve bu değerlendirilen özelliklerin tanı gruplarını belirlemede özgünlüğünün araştırılması amaçlanmıştır

2. GENEL BİLGİLER

2.1. KEMİK İLİĞİ

2.1.1. Kemik iliği histolojisi

Kemik trabekülleri ve kortikal kemiğin iç yüzeyi osteojenik hücreler, yani osteoblastlar ve osteoklastlar ile döşelidir. Osteoblastlar ve osteositler mezenkimal orijinli, osteoklastlar ise hematopoetik kök hücre orijinlidir ve monositik seri hücrelerinin füzyonu sonucu oluşurlar. Kemik iliğinin hematopoetik hücreleri medulladaki intertrabeküler mesafeleri kaplayan bir bağ dokusu stroması içine gömülüdür. Stroma, yağ hücreleri ve kan damarları ağı, fibroblastlar, makrofajlar, nadir myelinli ve myelinsiz sinir lifleri ve az miktarda retikülin liflerinden ibarettir. Stromal hücreler arasında ayrıca retikulum ya da retiküler hücreler şeklinde tanımlanan hücreler de bulunur. Bu tanım muhtemelen farklı orijinli iki hücre tipini kapsamaktadır. Fagositik retikulum hücreleri makrofajlardır ve bir hematopoetik progenitörden gelişirler (1). Non-fagositik retikulum hücreleri ya da retiküler hücreler ise, fibroblastlar, sinuzoidlerin adventisyal hücreleri ve muhtemelen de osteoblastlar ve kondrositler de dahil olmak üzere diğer stromal hücrelerle yakın ilişkide olan hücrelerdir. Fagositik retikulum hücrelerinden temel farkları çoğunun alkalin fosfataz pozitif olmasıdır. Hematopoetik hücreler ile mikroçevrelerindeki bu hücreler arasında çok yakın bir ilişki söz konusudur, bir kompartmandaki değişiklikler diğerini etkiler.

Uzun kemiklerde kemik iliğinin damarlanmasını sağlayan santral besleyici arter, diafiz ortalarından girer ve iki longitudinal santral artere dallanır (2). Yassı ve küboidal kemikler de benzer damarlarla beslenir. Periosttan kemiğe giren kortikal kapillerler ise ek bir besleyici ağ oluştururlar. Santral arterlerin dallarından ayrılan arteriol ve kapillerler endosteuma doğru uzanarak kemiğe girerler, daha sonra tekrar ilik mesafesine girmek üzere geri dönerler ve ince duvarlı bir sinuzoid ağına açılırlar (2). Kapillerlerin yalnızca küçük bir kısmı öncelikle kemiği beslemeden direkt olarak sinuzoidlerde sonlanır.

Sinuzoidler besleyici artere komşuluk eden santral venöz sinuzoidler boşalırlar. Sinuzoidler takip esnasında kollapsa gittikleri için genellikle histolojik kesitlerde görülemeyen ince duvarlı geniş damarlardır ve matürasyonunu henüz tamamlamış hematopoetik hücreler sinuzoidal endotelial hücrelerden transsellüler yolla geçerek dolaşıma katılırlar (2). İlikte sklerozisin olduğu durumlarda ise bu damarlar açık kalır ve belirgin olarak görüntülenir. Morfolojik değerlendirmede PMF olgularında izlenen genişlemiş sinuzoidler bu durumun güzel bir örneğidir. Sinuzoidlerin duvarlarını oluşturan endotel hücreleri üst üste binen birleşme bölgeleriyle tam bir örtü oluştururlar ve altta inkomplet bir bazal membran yer alır. En dışta ise adventisyel hücreler perivasküler mesafeye dallanarak, hematopoetik hücreler, makrofajlar ve mast hücrelerine yataklık yapar. Adventisyel hücrelerin fibroblastlardan geliştiğine inanılmaktadır ve retikülin boyasıyla boyanan ince ekstrasellüler fibrillerden oluşan bir ağ ile ilişkilidirler. Retikülin fibrilleri damarların çevresinde ve paratrabeküler bölgede yoğunlaşırlar. Hem adventisyel hücrelerin hem de fibroblastların retikülin sentezlediği düşünülmektedir. Hematopoetik hücreler interstisyumda yerleşirler, bazen patolojik durumlarda sinuzoidlerin içinde hematopoez gelişebilir. İlik yağ içeriği hematopoetik doku miktarı ile ters orantılıdır. Yaş ilerledikçe kemik kaybıyla birlikte yağ içeriği artar. İlik yağı fizyolojik olarak subkutan yağdan farklıdır. Sarı iliğin yağı açlıkta en son olarak kaybedilen yağdır. Hematopoetik doku çok hızlı olarak kaybedildiğinde öncelikle interstisyel mürin ile yer değiştirir, daha sonra yağ dokusu mürinin yerini alır.

2.1.2. Kemik İliği Sellülaritesi

Kemik iliği sellülaritesi, aspirasyon yaymalarındaki doku fragmanlarında, iğne ya da açık biyopsi materyallerinde veya otopsi örneklerinde değerlendirilebilir. Sellülarite, en iyi histolojik kesitlerde değerlendirilebilir ve yaş ile örneğin alındığı bölgeye bağlı olarak farklılıklar göstermektedir. Histolojik kesitlerde sellülarite, komputarize görüntü analizi ve histomorfometri gibi yöntemlerle daha net olarak değerlendirilebilirse de, subjektif olarak gözle tahmin sonuçları diğer objektif yöntemlere yakın sonuçlar vermektedir (3,4,5).

Yenidoğanlarda kemik iliği sellülaritesi **%100**'dür ve yağ hücreleri yok denecek kadar azdır (6). İlk dekad boyunca çocuklarda kemik iliğinin **%80-90**'ı hematopoetik doku, kalan **%10-20**'si yağ doku olup, oranı 4:1'dir. Erişkinlerde yaşa bağlı olarak **%70 ile %30** arasında değişir. Sellülarite, yaş arttıkça sabit bir ivme ile azalır, 30 yaş civarında hematopoetik:yağ doku oranı 1:1'dir ve 70 yaş üzerinde bu ivmede bir artış izlenir ve oran 1:4 olarak tersine döner (5, 7, 8). İlik kavitesinde hematopoetik dokunun tuttuğu alanın yüzdesindeki bu azalma, hem hematopoetik dokunun miktarındaki gerçek azalmaya, hem de yaşla ilerleyen kemik doku kaybı sonucu daha da genişlemiş olan ilik kavitesini doldurmak üzere yağ dokusunun artmasına bağlıdır. Kemhastalığı bulunmayan hematolojik olarak da normal olan bireylerde iliak krestten alınan biyopsiler incelendiğinde, hematopoetik hücrelerin ilik alanına oranı ikinci dekada **%64**, sekizinci dekada **%29** (5); 20 yaşında **%85**, 60 yaşında **%40** (7); sternal biyopsilerde 20 yaşta **%66**, 80 yaşta **%30** (8) olarak bildirilmiştir. Sellülarite konusunda kesin oranlar verilmesi olanaksızdır, ancak özetlemek olursa, **ileri derecede yaşlılar dışında %20 ve altındaki sellülarite hipoplazi, 20 yaşın altındakiler dışında %80 ve üzerindeki sellülarite hiperplazi** lehinedir. Aspirasyon yaymalarında sellülarite tayini yaparken doku fragmanlarının sellülaritesi esas alınmalıdır ve **%25-75** arası bir sellülarite genç ve ileri yaş olgular dışında normal kabul edilir.

Bir intertrabeküler aralık ile komşu intertrabeküler aralık arasında sellülarite değişken olduğu için az sayıda fragman aspire edildiğinde ya da biyopsi yetersiz büyüklükteyse sellülaritenin değerlendirilmesi olanaksızdır. Az miktarda subkortikal ilik alanını içeren küçük biyopsilerde, özellikle de yaşlılarda, bu mesafede sellülarite genellikle düşük olduğu için ve kemik iliğinin genelini yansıtmadığı için değerlendirme yapılmamalıdır. Ayrıca stromal hemoraji ve artefakt alanları değerlendirme dışı bırakılmalıdır. En az beş ya da altı intertrabeküler mesafe içeren biyopsilerde sellülarite değerlendirmesi olanaklıdır. Ayrıca fokal ilik infiltrasyonlarının değerlendirilmesi için de en az bu boyutlara ulaşan bir biyopsinin alınması gereklidir, bu da 20-30 mm'lik bir biyopsi örneğinde mümkündür (3).

Kemik iliğinin tamamıyla yağ dokusu ile yer değiştirmesi **aplastik ilik** olarak tanımlanır, jeneralize veya fokal olabilir. Akut löseminin kemoterapi ile indüksiyonu,

seröz yağ atrofi, hipoproliferatif durumlar ve fibrozis durumlarında sellülaritenin azalmasına paralel olarak yağ dokusu artmaz, dolayısıyla bu durumlar gerçek aplaziden ziyade hiposellülarite durumudur.

2.1.3. Hematopoetik Hücreler

Multipotent kök hücrenin kaynaklık ettiğı hematopoetik kemik iliğı hücreleri; eritrositler, granulositler, makrofajlar, monositler, mast hücreleri ve megakaryositler ile bunların öncü hücreleridir. Normal bir kemik iliğinde hematopoetik hücrelere ek olarak lenfoid hücreler ve plazma hücreleri ile daha önce tanımlanan stromal hücreler de bulunur.

2.2. ERİTROPOEZ

2.2.1. Sitoloji

Eritrosit öncü hücrelerine eritroblast denir. Normoblast terimi ise daha dar anlamlıdır, “**eritroblast**” terimi tüm eritroid prekürsörlerini tanımlarken, “**normoblast**” terimi eritropoezin normal olduğı durumlarla sınırlı olarak kullanılır. Eritroblastlar evrimlerini tamamlarken bir makrofaj ile yakın ilişkidirler ve makrofajın sitoplazmik uzantıları eritroblastların arasında ve onları sararak uzanır. Birkaç eritroblast jenerasyonu tek bir makrofaj ile ilişkidir ve grup olarak **eritroblastik ada** şeklinde tanımlanır. Eritroblastik adalar bazen aspirasyon yaymalarında da görülebilir. Eritroblastlar morfolojik açıdan klasik olarak dört gruba ayrılır: **proeritroblastlar** ve **erken, intermedier ve geç eritroblastlar**. Alternatif olarak kullanılan bir başka terminoloji de: **proeritroblast, basofilik eritroblast, erken polikromatofilik eritroblast** ve **geç polikromatofilik eritroblast**. Yaygın olarak kullanılmış olan ve matur eritrositlerle aynı boyanma özelliğı gösteren yani asidofilik boyanan anlamına gelen **ortokromatik eritroblast** terminolojisi, çoğı matür eritroblastın sadece eritropoezin anormal olduğı durumlarda ortokromatik boyanma göstermesi nedeniyle günümüzde tercih edilmemektedir.

Geç eritroblastlar nukleuslarını dışarı atarak **polikromatofilik eritrositleri** oluşturur. Bu hücreler matür eritrositlerden bir miktar büyüktür ve retikülin boyası ile boyanmaları nedeniyle **retikülositler** olarak tanımlanırlar. Hematopoez normal olduğunda üç günlük ömürlerinin iki gününü kemik iliğinde geçirirler. Normal eritroblastların az bir kısmı düzensiz nukleuslar, çift nukleuslar ve komşu eritroblastlar arasında sitoplazmik köprüleşme gibi atipik morfolojik özellikler gösterebilirler (9).

2.2.2. Histoloji

Eritroblastik adalar, bir makrofajı çevreleyen bir ya da daha fazla konsantrik halka oluşturan eritroblastların oluşturduğu hücre kümeleri şeklinde izlenir. Makrofaja daha yakın olan eritroblastlar, periferdekilere kıyasla daha immatürdür. Merkezde yer alan makrofaj her eritroblastı saracak tarzda ince uzantılar verir. Makrofaj defektif eritroblastları ve atılan eritroblast nukleuslarını fagosite eder, dolayısıyla, sitoplazmada nukleer ve hücrel debris görülebilir ve Perls boyası gibi özel boyalarla hemosiderinin varlığı gösterilebilir. Eritropoez ilik sinuzoidlerine yakın bir lokalizasyonda gerçekleşir.

Erken eritroblastlar görece dar sitoplazmalı ve kromatini dağılmış iri nukleuslu ve nukleer membran üzerinde yerleşmiş çok sayıda küçük düzensiz nukleoller içeren büyük hücrelerdir. Nukleusları myeloblastlardan daha yuvarlaktır, ancak aspirasyondaki erken eritroblastlara kıyasla nukleuslar daha oval veya hafif düzensiz kontürlüdür. Daha matür eritroid hücrelerde nukleer kromatin yoğunlaşmıştır ve sitoplazma daha az bazofiliktir.

Eritroblast nukleusundaki kromatin düzgün dağılım gösterir ve kromatin kondansasyonu geliştikçe de düzgün dağılım paterni korunur.

Eritroid öncü hücrelerinin kemik iliğindeki diğer hücrelerden ayırt edilmesinde başlıca dört özellik yardımcıdır (1). Farklı boyut ve matürasyondaki değişik hücre matürasyon aşamalarını içeren belirgin eritroblastik adalar halinde izlenirler.

Eritroblastlar birbirine sıkıca yapışmış olarak izlenir. Nukleusları yuvarlaktır. Geç eritroblastlarda kromatin düzgün bir yoğunlaşma gösterirken, küçük lenfositlerin nukleuslarındaki kromatin kaba kümelenmeler gösterir. Giemsa boyamasında eritroblastların sitoplazmaları koyu bazofiliktir ve nukleusa komşu boya almayan Golgi zonu da belirgindir. Parafine gömülü örneklerde geç eritroblastlarda sitoplazmanın artifisyel büzüşmesi de lenfositlerden ayırıcı tanıda yardımcı bir özelliktir. Kemik iliğinin hızla rejenere olduğu veya eritropoezin anormal olduğu durumlarda eritroid adaların hepsi aynı matürasyon dönemindeki hücrelerden oluşabilir. Bunun sonucu olarak da sadece immatür elemanlardan oluşan bazı adalar görülebilir ve benzer patern gösteren myelodisplazi gibi eritroblastların intramedüller ölümünün gerçekleştiği tablolardan ayırıcı tanıda güçlük yaratabilir. Anormal eritroblastların tanınması normal eritroblastik adaların tanınmasından daha güçtür ve eritroid prekürsörlerin görülmediği durumlarda sitokimyasal ve immünohistokimyasal yöntemlere başvurulabilir.

2.3. GRANULOPOEZ

2.3.1. Sitoloji

Tanınabilen ilk granulopoetik hücre myeloblasttır. Proeritroblasta benzer boyutta, yaklaşık 12-20 µm çapındadır. Proeritroblasta göre daha düzensiz şekilli, sitoplazması orta derecede bazofiliktir. Kromatin paterni diffüzdür ve birkaç adet nukleol içerir. Myeloblastlar genellikle granül içermeyen hücreler olarak tanımlanırlar, ancak akut myeloid lösemi (AML) ve myelodisplastik sendrom (MDS) gibi anormal myelopoezin olduğu durumlarda granüllü primitif hücreler de myeloblast olarak kabul edilebilir. Myeloblastlar bölünebilen hücrelerdir ve promyelositlere diferansiasyon gösterirler.

Promyelositler nukleollü, hafif kıvrımlı nukleuslara sahiptir ve sitoplazmalarında Golgi zonu ile Romanowsky boyaları ile kırmızı-mor boyanan primer ya da azurofilik granüller içerirler. Promyelositler myeloblastlardan daha iridir, genellikle 15-25 µm çapındadır ve sitoplazmaları genellikle daha bazofiliktir. Her üç

granulositik serinin promyelositlerinin birbirlerinden ayrımı yalnızca elektron mikroskopik düzeyde mümkündür. Promyelositler de bölünebilen hücrelerdir ve myelositlere matürasyon gösterirler.

Myelositler promyelositlerden daha küçük hücrelerdir ve boyutları 10-20 µm arasında değişir. Nukleuslarında bir miktar kromatin kondansasyonu vardır ve nukleol içermezler. Sitoplazmaları promyelositlere göre daha az bazofiliktir ve spesifik granülleri ışık mikroskop düzeyinde ayırt edilebilir Metamyelositler 10-12 µm çapında belirgin olarak çentiklenme gösteren, böbrek ya da U şeklinde nukleusa sahip olan, bölünemeyen hücrelerdir ve çomaklara diferansiye olurlar.

Çomaklar bant şeklinde nukleuslara sahiptir ve segmente nukleus ile spesifik nötrofilik, eosinofilik ya da bazofilik granüllere sahip olan polimorf nüveli lökositlere matürasyon gösterirler. Kemik iliği matür nötrofillerin deposudur.

2.3.2. Histoloji

Myeloblastlar histolojik olarak görüntülenebilen en erken granulosit öncü hücresidir. Az sayıdadırlar ve en sık olarak kemik iliğinin trabeküler yüzeyleri boyunca ya da arteriollere komşu olarak izlenirler. Yuvarlak veya oval nukleuslu, bir ile beş arası küçük nukleollere sahip oldukça iri hücrelerdir. Kromatin kümelenmesi yoktur. Görece dar sitoplazmalıdır. Lenfoid hücrelerden kromatin kümelenmesinin olmayışı ve nukleollerinin varlığı ile ayırt edilebilirler. Normal iliklerde promyelositler ve myelositler myeloblastlara kıyasla çok daha yüksek oranda izlenirler ve özellikle plastiğe gömülü kesitlerde granülleriyle ayırt edilebilirler. Primer ve nötrofilik granüller, özellikle plastiğe gömülü materyelde, iyi boyanmış H&E kesitlerde soluk eosinofilik boyanır, ancak Giemsa boyalı kesitlerde daha iyi görülebilirler. Eosinofilik granüller iri, ışığı çift kıran, daha koyu eosinofilik granüllerdir ve hem plastiğe, hem de parafine gömülü örneklerde, hem H&E, hem de Giemsa boyalı kesitlerde rahatlıkla ayırt edilebilirler. Bazofilik granüller suda çözündükleri için ve biyopsiler sulu fiksatiflerle tesbitlendikleri için, genellikle kesitlerde ayırt edilemezler. Matürasyon aşamalarındaki granulositik öncü hücreler

hematopoetik hücre kordonlarının daha derin kısımlarına doğru ilerlerler, ancak sinuzoidlerden yine de uzakta yer alırlar. Metamyelosit evresinde sinuzoidlere ulaşırlar ve polimorf nüveli lökosit evresinde sinuzoid duvarını aşarak dolaşıma katılırlar. Gerekğinde granulositik serinin tanınması immünohistokimya ile kolaylaştırılabilir.

2.4. MONOSİTOPOEZ

2.4.1. Sitoloji

Monositler morfolojik olarak ayırt edilemeyen ortak bir granulositik-monositik öncü hücreden gelişirler. En erken tanınabilen öncü hücre ise monoblasttır. Monoblastlar, myelositten daha büyük, değişken bazofili gösteren geniş sitoplazmalı, yuvarlak ya da lobüle iri nukleuslu hücrelerdir. Monoblastlar bölünebilirler ve promyelositlerle benzer büyüklükteki promonositlere matürasyon gösterirler. Promonositler sitoplazmik granüller içerirler ve genellikle bir dereceye kadar nukleer lobülasyon gösterirler. Promonositler hızla periferik kana göç eden monositlere diferansiye olurlar. Monositler 12-20 µm çaplı, lobule nukleuslu ve soluk bazofilik geniş sitoplazmalı hücrelerdir. Sitoplazma ince azurofilik granüller içerebilir ve sıklıkla lenfositlerin berrak sitoplazmasından farklı olarak buzlu cam görünümündedir. Monositler kemik iliği ve diğer dokularda makrofajlara matürasyon gösterirler. Makrofajlar 20-30 µm çaplı, düzensiz şekilli, düşük nukleus:sitoplazma oranına sahip ve çok soluk bazofilik geniş sitoplazmalı iri hücrelerdir. Daha immatür olanlarda nukleus oval olup, oldukça diffüz kromatin paternine sahiptir. Daha matür olan hücrelerde ise nukleus daha küçük ve kondansedir, sitoplazma lipid tanecikleri, dejenere hücreler ve amorf debri içerebilir ve demir boyası sıklıkla hemosiderinin varlığını ortaya koyar. Kemik iliğinde makrofaj ya da histiositler kolaylıkla görülebilirken, monositler ve öncü hücreleri oldukça nadirdir, matür nötrofillerden farklı olarak kemik iliğinde biriktirilmeden hızla periferik kan dolaşımına atılırlar.

2.4.2. Histoloji

Histolojik kesitlerde monosit öncüleri ayırt edilemezler, ancak monositler nötrofillerden daha iri, lobüle nükleuslu hücreler olarak izlenirler ve normal koşullarda az sayıdadırlar. Genellikle arterioller civarında, hematopoetik kordonların merkezinde yer alırlar.

Makrofajlar ise kemik iliğinde düzensiz dağılım gösteren, küçük nükleuslu, geniş sitoplazmalı oldukça iri hücrelerdir. İnce kesitlerde yalnızca sitoplazmaları görülebilir. Sitoplazmalarında fagosite edilmiş debri görülebilir. Bazıları eritrositler (eritroblastik adalar), plazma hücreleri veya lenfoid nodüllerle ilişkilidir. İmmünohistokimya ile stromada dağılım gösteren dendritik makrofaj ağı görüntülenebilir.

2.5. MEGAKARYOPOEZ VE TROMBOPOEZ

2.5.1. Sitoloji

Normal ilikte megakaryosit dizisinde morfolojik olarak ilk görülen hücre megakaryositin kendisidir. Hematopoezin anormal olduğu durumlarda bazen myeloblasta benzer boyut ve morfolojide bir megakaryosit öncü hücresi görülebilir. Megakaryositler olgunlaştıkça endo reduplikasyona giderler ve sonuçta hem nükleer DNA içeriği (ploidi) hem de nükleus boyutu açısından belirgin derecede heterojenite gösteren iri bir hücre (30-160 µm) ortaya çıkar. Megakaryositler ploidi düzeylerine göre sınıflandırılabilirler. Normal bir kemik iliğinde 4N (tetraploid) ile 32N arasında değişken DNA içerikleri izlenir, ancak hücrelerin çoğunluğunda hakim olan ploidi 16N'dir. Megakaryositler ayrıca nükleer ve daha da önemlisi sitoplazmik özelliklerine göre üç matürasyon dönemine ayrılabilirler (10). Grup I megakaryositler koyu bazofilik sitoplazma ve çok yüksek nükleus: sitoplazma oranı gösterirler. Grup II megakaryositler daha düşük nükleus: sitoplazma oranı ve bazı azurofilik granüller içeren daha az bazofilik sitoplazmaya sahiptirler. Grup III megakaryositler ise yoğun azurofilik granüller içeren geniş soluk bazofilik

sitoplazmalı hücrelerdir ve hücre sınırlarındaki sitoplazma agranülerdir. Grup III megakaryositler matür hücrelerdir ve trombosit yaparlar, ancak artık DNA sentezlemezler. Matürasyonun üç dönemi ile ploidi düzeyi arasında bir miktar korelasyon vardır. Tüm matürasyon dönemleri 8N, 16N ve 32N'lik megakaryositleri kapsar, ancak 4N megakaryositler grup I'de ve 32N megakaryositler grup III'de daha yoğundur. Normal poliploid megakaryositlerin çoğunluğunun nukleusu kromatin bantları ile bağlanan düzensiz loblardan oluşmaktadır. Az bir kısmında ise lobülasyon göstermeyen bir nukleus ya da birden fazla nukleus bulunur. Megakaryosit matürasyonunun son döneminde ise belli belirsiz, ince bir sitoplazma ile çevrili çıplak nukleus izlenir, sitoplazmanın büyük bir kısmı trombositler olarak dökülmüştür. Trombosit gereksiniminin arttığı hallerde, örneğin periferik destrüksiyon söz konusu olduğunda, ploidi düzeyi ve hücre boyutu artar ve bu da yaymalarda sitoplazma volümünde artış ve iri, genellikle lobülasyon gösteren nukleuslar tarzında izlenir. Özellikle bilinmesi gereken bir nokta da megakaryositlerin trombosit döküyor olarak görülüp görülmemesinin, yapılan trombosit sayımı ile çok az korelasyon göstermesidir.

Trombositozlu olgularda, özellikle esansiyel trombositemide sıklıkla çok sayıda trombosit döken megakaryositler bulunurken, otoimmün trombositopenide de trombosit yapımı çok artmıştır, ancak trombosit döken megakaryositler nadirdir. Morfolojileri kadar megakaryositlerin sayısının da değerlendirilmesi önemlidir. Aspirasyon yaymalarında bu subjektif bir değerlendirmedir ve megakaryositler azalmış, normal ya da artmış olarak tanımlanabilir. Aspire fragmanların ya da biyopsilerin histolojik kesitlerinde daha kesin bir değerlendirme söz konusudur. Doku fragmanlarında bu büyük hücreler diğer ilik hücreleri kadar kolay aspire edilemediği için, biyopsilere göre megakaryosit sayısı daha az olabilir.

Megakaryositler lenfositler, eritrositler, eritroblastlar, granulositler ve öncü hücreleri gibi bir kısım hücreyi sitoplazma içine alabilirler ve bu olaya emperipolezis ya da psödofagositoz adı verilir. Bu olayın fagositozdan farkı yutulan hücrelerin fagositten ziyade, bir demarkasyon membran sistemi içindeki genişlemiş kavitelerde bulunmasıdır ve yaymalarda megakaryositler içindeki hücrelerin morfolojik olarak normal ve intakt oluşudur.

2.5.2. Histoloji

Megakaryositler geniş sitoplazmaları, genellikle lobule nukleusları ve iri boyutları ile ilik hücreleri arasında küçük büyütme ile ayırt edilirler. Giemsa boyamasında sitoplazmada trombositler net olarak görülür. Genellikle kemik trabeküllerinden uzak, sinuzoidlerle ilişkili olarak izlenir. Paratrabeküler yerleşimleri yalnızca anormal hematopoez durumlarında söz konusudur. Seri kesitlerde normal iliklerde tüm megakaryositlerin sinuzoidlerle ilişkili olduğu görülmektedir (11). Megakaryositler hemen sinuzoid dışında yer alır ve endotelyal hücreler arasından sitoplazmik uzantılarını verirler ve bunların parçalanması sonucu trombositler serbestleşir. Histolojik kesitler ve yaymalarda hemen tüm sitoplazmalarını bu şekilde salmış olan bu hücreler “çıplak nukleuslar” olarak izlenir.

Megakaryositlerin morfolojileri değerlendirilirken çok büyük hücreler oldukları ve sadece bir kesit yüzeylerinin incelenemediği akıldan çıkarılmamalıdır. Dolayısıyla tek megakaryosite bakarak boyutu ve nukleer lobülasyonun derecesini belirlemek olanaksızdır. Çok sayıda hücrenin incelenmesi ile ortalama megakaryosit boyutu, ortalama lobülasyon derecesi, hipolobüle ya da mikromegakaryositlerin varlığı hakkında bir fikir sahibi olunabilir. Hematopoez normal olduğunda megakaryositler iki ya da üç hücreden daha fazla kümelenme oluşturmazlar. Daha fazla hücre içeren megakaryosit kümeleri kemoterapi ve kemik iliği transplantasyonu ardından rejenere olan kemik iliğinde, MPN’lerin bazı alt tiplerinde görülür ve ayrıca değişik patolojik durumlarda tanıya yardımcı olur. Megakaryositler alan birimine sayıları hesaplanarak ya da subjektif olarak artmış, normal ve azalmış şeklinde değerlendirilebilir. Takip işlemi ve boyama tekniğine bağlı olarak ilikteki ortalama megakaryosit sayısı 7-15/mm² arasında değişir (12). İmmünohistokimyasal teknikler uygulandığında ise daha küçük megakaryositler ve megakaryosit öncüleri de tanınabildiği için bu sayı 25/mm²’ye ulaşır.

2.6. MAST HÜCRELERİ

2.6.1. Sitoloji

Mast hücreleri multipotent myeloid kök hücreden gelişir. Kemik iliği yaymalarında mast hücreleri oval ya da elonge 5-25 µm arasında farklı boyutlarda hücrelerdir. Nukleus santral yerleşimli, küçük, yuvarlak ya da ovaldır. Sitoplazma Romanowsky boyaları ile koyu mor boyanan granüllerle doludur. Mast hücreleri bazofillerden nukleuslarının lobülasyon göstermemesi ve kromatinin daha az kümelenme göstermesi, ayrıca granüllerin nukleusu örtmemesi ile ayırt edilebilir.

2.6.2. Histoloji

Mast hücreleri normal ilikte nadir olarak izlenir. H&E boyalı kesitlerde granülleri boyanmadığı için tanınmaları güçtür. Giemsa boyamasında ise metakromatik boyanan granülleri mor renklenme ile mast hücrelerini belirginleştirir. Mast hücre granülleri klorasetat esteraz ile pozitif reaksiyon verir, PAS pozitifler, toluidine blue ile belirgin metakromatik boyanma verirler. Mast hücreleri medüller kavitede düzensiz dağılım gösterirler, ancak endosteal ve periosteal yüzeylerde, küçük damar adventisyalarda ve lenfoid nodüller ile kümelenmelerin çevresinde daha sık olarak izlenir (13). Ortalama 12 µm çaplı eliptik ya da elonge hücrelerdir. Sitoplazmik uzantıları diğer hematopoetik hücreler arasında uzanır. Dağılımları ve sitolojik özellikleri immünohistokimya ile gösterilebilir.

2.7. OSTEOLASTLAR VE OSTEOKLASTLAR

2.7.1. Sitoloji

Osteoblastlar 20-50 mikrometre çapında mononukleer hücrelerdir. Nukleusları ekzantrik yerleşim gösterir, sitoplazmaları orta derecede bazofilik olup, nükleer membrana komşuluk göstermeyen bir Golgi zon içerirler. Nukleus bir miktar

kromatin kondansasyonu gösterir ve küçük bir nukleol izlenir. Osteoblastlar yüzeyel olarak plazma hücrelerini andırırsalar da, kromatin kondansasyonunun daha az derecede oluşu ve Golgi zonunun nukleustan ayrı oluşu ile ayırt edilirler. Osteoblastlar sağlıklı erişkinlerin kemik iliğinde çok nadir olarak izlenir, ancak bulunduklarında genellikle küçük kümeler halindedir. Çocukların kemik iliği aspirasyonlarında ise daha sık olarak izlenirler.

Osteoklastlar 30-100 mikrometre çapında multinukleer dev hücrelerdir. Nukleusları birbirinden ayrı, uniform, hafif oval olup, tek leylak rengi boyanan nukleol içerirler. Sitoplazmaları oldukça geniş olup, megakaryositlerinkinden daha kaba görümlü çok sayıda azurofilik granül içerir. Osteoklastlar da erişkin kemik iliklerinde çok nadirdir, genellikle çocuklarda görülür.

2.7.2. Histoloji

Osteositler, osteoblastlar ve osteoklastlar histolojik kesitlerde yerleşimleri ve morfolojik özellikleri ile ayırt edilirler. Osteositler kemikte lakünler içerisinde, osteoblastlar kemik trabekülü ya da osteoid tabakası boyunca, osteoklastlar ise Howship lakünleri içerisinde yer alır.

2.8. YAĞ HÜCRELERİ

2.8.1. Sitoloji

Stromal yağ hücreleri aspire edilen fragmanlarda izlenir. Takip sırasında yağ eridiği için sitoplazmalar boştur. Nukleuslar oval, periferik ya da santral yerleşimlidir.

2.8.2. Histoloji

Kesitlerde yağ hücreleri hematopoetik doku ile birbirinden ayrılan kümeler halindedir. Özellikle trabekül komşuluğunda belirgindir. Yağ hücreleri bir kenarında oval nukleuslar içeren boşluklar tarzındadır.

2.9. LENFOPOEZ

2.9.1. Lenfositler

Hem B, hem de T lenfositler diğer myeloid hücrelerle benzer şekilde pluripotent kök hücreden köken alır. Prekürsör hücrelerde B fenotipe, matür hücreler içinde ise T hücrelere daha sık olarak rastlanır.

2.9.2. Sitoloji

Kemik iliği lenfositleri yüksek nukleus: sitoplazma oranına sahip, dar hafif bazofilik sitoplazmalı küçük hücrelerdir. Kromatin bir miktar kondansasyon gösterir, ancak genellikle periferik kan lenfositlerine göre daha diffüzdür. Lenfositler yaşamın ilk günlerinde az miktardadırlar, fakat bunun dışında yenidoğanlarda kemik iliğinin nukleuslu hücrelerinin yaklaşık 1/3-1/2'sini kapsarlar (14). Çocukluk çağında sayıları azalır ve erişkinlerde kemik iliği aspirasyonu periferik kanla dilue olmadıysa nukleuslu hücrelerin genellikle %15-25'sinden azını, ortalama %10'unu oluştururlar. Çocuklarda kemik iliğinde hematogon adı verilen, B lenfosit prekürsörleri olan, sitolojik olarak lösemik lenfoblastları andıran immatür hücreler görülebilir.

2.9.3. Histoloji

Normal ilik interstisyel dağılım gösteren lenfositler ve bazen de lenfoid nodüller ve folliküller içerir. Histolojik kesitlerde lenfosit sayısı aspirasyonlara göre daha az

olup, yaklaşık %10 civarındadır ve T:B lenfosit oranı 6:1'dir (15). Normal kemik iliğindeki lenfositlerin çoğu CD8 pozitif T lenfositlerdir. Lenfositler hematopoetik kordonların merkezinde arterler etrafında yoğunlaşırlar. Normal ilikte lenfoid folliküllerin ortasında küçük kan damarları izlenir, birkaç makrofaj ve çevrelerinde mast hücreleri ile plazma hücreleri bulunabilir.

2.10. PLAZMA HÜCRELERİ

2.10.1. Sitoloji

Plazma hücreleri normal ilikte nukleuslu hücrelerin %1'den azını oluşturacak kadar nadirdir (16). Çapları 15-20 µm arasında, ekzantrik nukleuslu, orta derecede bazofilik sitoplazmalı ve belirgin paranukleer Golgi zon içeren hücrelerdir. Saat kadranı kromatin paterni histolojik kesitlerde daha belirgindir, yaymada nükleer kromatin belirgin kaba kümelenmeler gösterir. Nadiren normal plazma hücreleri iki yada daha fazla nukleus içerebilir. Plazma hücreleri küçük kümeler yapabilir, ilik fragmanlarında ve kapillerler çevresinde bu kümelenmeler görülebilir.

2.10.2. Histoloji

Normal ilikte az sayıda interstisyel dağılım gösteren plazma hücreleri bulunur, makrofajlarla ilişkili olabilirler ve daha çok kapillerler çevresinde yer alırlar. Histolojik kesitlerdeki tipik plazma hücreleri nukleuslarının ekzantrik yerleşimi ve belirgin golgi zonları ile kolaylıkla tanınabilirler. Giemsa boyalı kesitlerde golgi zonu dışında sitoplazma koyu bazofiliktir.

2.11. MYELOPROLİFERATİF NEOPLAZİLERE GENEL BAKIŞ

Hematopoetik pluripotent kök hücre kendini yenileme ve farklılaşma yetilerine sahiptir. Efektif hematopoez için büyüme faktörleri ve reseptör etkileşimlerinin

sağlıklı olduğu bir mikroçevreye gereksinim vardır (17). Hematolojik kökenli malign neoplaziler hücre kökenine göre lenfoid ve miyeloid, kemik iliğindeki blast (immatür prekürsör hücre) oranına göre akut ve kronik olmak üzere sınıflandırılır. Kemik iliğinde % 20'den fazla miyeloblast izlenmesi durumunda akut miyeloblastik lösemiden (AML) bahsedilir. Kronik miyeloid neoplaziler ise, efektif veya inefektif hematopoez sergileme durumlarına göre miyelodisplastik sendromlar (MDS) ve miyeloproliferatif neoplaziler (MPN) olarak tanımlanır (18). MDS kemik iliğinde displazi ve hiperplazi (nadiren hipoplazi) ile periferik kanda monositozun eşlik edebildiği sitopeniler olarak tanımlanmaktadır (19).

Miyeloproliferatif neoplaziler (MPN) MDS'lerin aksine periferik kanda farklılaşmanın son aşamasında miyeloid hücre artışı ile karakterize olup, polistemia vera (PV), esansiyel trombositemi (ET), primer miyelofibrozis (PMF) ve kronik miyeloid lösemi (KML) klasik MPN'leri oluşturur şeklinde bir bilgiye sahipken DSÖ'nün 2008 sınıflamasında kronik nötrofilik lösemi, kronik eozinofilik lösemi sınıflandırılmayan, mastositoz ve myeloproliferatif neoplazm sınıflandırılmayan şeklinde yeni bazı tanımlar sınıflamaya dahil edilmiştir (20,21). X kromozomu inaktivasyonuna bağlı genetik ve enzim temelli çalışmalar gerek MDS, gerekse MPN'lerin multipotent progenitor hücre kökenli klonal neoplaziler olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte güncel metodlarla yapılan X kromozomuna bağlı DNA analizlerinde bazı sağlıklı yaşlı kadınlarda monoklonal hematopoez, bazı ET hastalarında ise poliklonal hematopoez izlenmiştir (22). Poliklonal ET hastalarında JAK2V617F mutasyonunun saptanması ise X kromozom temelli analizlerin bir kısım hasta için yeterli olmayacağını düşündürmektedir (23). Ailesel geçişli PV, ET ve PMF olguları için JAK2 mutasyonu predispozan faktör olarak görünmemektedir (24). Sporadik olduğu düşünülen 458 olgunun incelendiği bir araştırmada sırasıyla PV, ET ve PMF gruplarında ailesel ilişki % 8,7, % 6 ve % 8 oranlarında saptanmıştır (24).

Miyeloproliferatif neoplaziler bu grup neoplaziler içerisinde yer alan KML 9 ve 22 numaralı kromozomlar arasında karşılıklı parça değişimi t(9;22) ile karakterizedir. Bu değişimin ortaya koyduğu kısalmış 22'nci kromozom (philadelphia kromozomu) olguların % 90-95'inde izlenir (25). Geride kalan olgularda ise floresan in situ

hibridizasyon (FISH) veya ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yardımıyla t(9;22) gösterilebilir (26). Bu gruptaki diğer neoplaziler olan PV, ET ve PMF, kronik eozinofilik lösemi sınıflandırılmayan ve kronik nötrofilik lösemi, ise BCR/ABL negatif miyeloid bozukluklar olarak bilinmektedir (27). PV olgularının hemen tamamında, ET ve PMF olgularının ise yaklaşık %50'sinde saptanan JAK2 mutasyonunun keşfi ile klasik MPN'lerin tanısal kriterlerinde güncelleme yapılmıştır (28,29). JAK2 mutasyonu mevcudiyeti ve azalmış eritropoietin (Epo) seviyelerinin eşlik ettiği yüksek hematokrit değeri olan olgular PV tanısı alır (30). ET, bir dışlama teşhisi olup, PV, KML, MDS veya PMF olarak tanımlanamayan bir olgudaki otonom, klonal trombositozu temsil etmektedir. PMF ise diğer bir MPN ile ilişkilendirilemeyen kemik iliği fibrozisi ile karakterizedir (31).

MPN'ler içerisinde artmış eritrosit kitlesi PV için spesifik olsa da, KML ve MDS olgularının, ET tanısı düşündürülen izole trombositoz veya PMF ile karışabilecek izole miyolefibroz ile prezente olmaları mümkündür. Sonuç olarak MPN tanısı düşünülen tüm hastalarda t(9;22) varlığını dışlamaya yönelik sitogenetik inceleme, KML ve MDS ayırıcı tanısı için kemik iliği morfolojik incelemesi yapılmalıdır (32). Klonal değişim ve malign dönüşüm MPN'ler için fatal bir komplikasyondur. AML'ye dönüşüm sıklığı MPN alt grupları arasında farklılık göstermektedir. Etketif tedavi yokluğunda KML hastaları için malign dönüşüm sıklığı %90 ve üzerinde saptanırken, ET için bu oran %5'in altındadır (23). Miyelofibrotik evreye dönüşüm MPN'lerin bir başka komplikasyonu olup, PV hastalarında 10 yıllık izlemde yaklaşık %10 risk mevcuttur (33,34). Trombohemorajik komplikasyonlar ise özellikle PV ve ET açısından belirgin risk oluşturan sorunlardır (35). Hemorajik episodlar genellikle hafif seyirli olup, spontan hemorajiler özellikle yüksek trombosit sayıları olan hastada olmaktadır. Çünkü kalitatif trombosit bozuklukları tabloya eşlik eder. Trombotik komplikasyonlar arteriyel ve venöz trombozlar olabileceği gibi görme bozukluğu, nörolojik semptomlar ve eritromelalji gibi mikrodolaşım bozuklukları şeklinde de oluşabilir (35). Eritromelalji mikrovasküler sahada trombus oluşumları ve trombosit tüketimi ile ilişkili bir tablodur. Aspirin kullanımı ile semptomatik iyileşme ve kısalmış olan trombosit ömründe uzama sağlanır. Aspirinin sağladığı bu düzelmenin kumadin veya heparin ile elde edilememesi prostaglandin sentez ürünlerinin patogeneizde rolü olduğunu düşündürür (36). Blastik transformasyon ve

tromboz ilişkili ölüm risklerinin MPN alt gruplarında farklılık göstermesi nedeniyle ortalama yaşam beklentisi ET hastalarında normale yakın iken, PMF için beş seneden azdır (37).

Hemoraji, tromboz, AML'ye dönüşüm gibi major komplikasyonların yanı sıra MPN'ler hastaların yaşam kalitesini kısıtlayan semptomlara yol açmaktadır. 1179 hastayı kapsayan internet temelli semptom sorgulamasının sonuçlarına göre; halsizlik % 81, kaşıntı % 52, gece terlemesi % 49, kemik ağrıları % 44, ateş % 14, kilo kaybı % 13 hastada mevcuttur (38). MPN'lerde hematopoietik büyüme faktörlerinin klonal prosesin gelişimine katkısı gösterilmemiştir. Sonuç olarak; MPN'ler spontan (büyüme faktörüne gereksinimi olmayan) hematopoietik koloni oluşumu ile karakterizedir (39). PV hastalarında Epo seviyeleri belirgin olarak azalmıştır ve moleküler çalışmalar Epo reseptörü ile ilgili mutasyon ortaya koymamıştır. Bununla birlikte PV'de eritroid öncülerinde bcl-x (bir apoptoz inhibitörü) aşırı ekspresyonunun gösterilmesi bu hücrelerin Epo yokluğundaki otonom çoğalmalarına açıklama getirebilmektedir (40).

ET'de gerek TPO, gerekse TPO reseptörü (c-MPL) için klonal prosesin TPO'dan bağımsız olduğunu işaret eden moleküler lezyonlar tanımlanabilmiş değildir (41). Bununla birlikte ET hastalarında serum TPO konsantrasyonlarının normal ya da normalden yüksek seviyede bulunması feedback mekanizma bozukluğu düşündürmektedir (42). Bu gözlemle uyumlu olarak ET olgularında trombosit ve megakaryositlerde TPO reseptör ekspresyonu azalmıştır. Trombosit ve megakaryositlerde TPO reseptör ekspresyonu PV'da da belirgin olarak azalmıştır. Yani bu hastalıkta da trombosit çoğalması ET'de olduğu gibi TPO'dan bağımsızdır (42). Büyüme faktörleri neoplastik gelişimde etkili olmamakla birlikte, MPN ilişkili miyelofibroza katkıda bulunmaktadır. Fareler üzerinde yapılan bir araştırmada ölümcül dozda irradilyasyonu takiben murine TPO cDNA taşıyan retrovirus ile infekte greftler kemik iliğine yerleştirilmiştir (43). Başlangıçta trombosit ve beyaz küre artışları görülmekte ancak bu dönemin ardından miyelofibroz, ekstremiteler hematopoez, anemi ve lösemik dönüşüm gelişmektedir (44). PMF benzeri bu hastalığın insan miyelofibrozu da işaret edilmiş olan megakaryosit kökenli aşırı

miktarda transforming growth factor (TGF)-beta üretimine bağlı olduğu düşünülmektedir (45).

2.11.1. Polistemia Vera

2.11.1.1. Epidemiyoloji

Polistemia vera (PV) başta kırmızı kan hücreleri olmak üzere her üç hematopoietik hücre serisinin aşırı üretimi ile karakterize, kazanılmış miyeloproliferatif bir neoplazidir (24). Hastalığa neden olan mutasyon sonucu dönüşüme uğramış hematopoietik kök hücre zamanla baskın miyeloid öncül hücre haline gelmektedir (45). PV, klinik olarak diğer miyeloproliferatif neoplazilerden (MPN), kırmızı hücre kitlesindeki belirgin artış ile ayrılır. Ancak kırmızı hücre kitlesindeki artış tek başına PV tanısı için yeterli değildir, çünkü bu bulgu kronik hipoksi ile ilişkili olan birçok durum ve nadiren de Epo salgılayan tümörlerin varlığında da gözlenir (45). PV olgularının kemik iliği örneklerinden elde edilen kolonilerde normal Epo duyarlılığı olan “burst forming unit-eritroid” (BFU-E) kolonilerinin yanı sıra Epo olmadan çoğalan koloniler de gösterilmiştir. Bununla birlikte PV olgularında trombositlerde TPO reseptör seviyesinde azalma, Bcl-x (bir apoptoz inhibitörü) regülasyon bozukluğu, eritrosit öncülerinde (BFU-E, CFU-E) protein tirozin fosfataz ekspresyonu artışı, periferik kan granulositlerinde polistemia rubra vera (PRV)-1 geni aşırı ekspresyonu (46,47), 9p kromozomunda heterozigosite kaybı gibi anormallikler de tanımlanmıştır (45). Son yıllarda Philedelphia kromozomu negatif [Ph (-)] kronik MPN’lerde JAK2 V617F mutasyonunun tanımlanması PV patogenezi açısından önemli bir keşif olmuştur. Hastalığın progresyonu ile kemik iliğinde gözlenen fibroblast birikimi ise anormal klonun bir parçası olmayıp, muhtemelen çoğalan megakaryositlerin ürettiği “trombosit derived fibroblast growth factor (PDGF)” etkisine bağlıdır (45). PV genellikle altıncı dekatta ortaya çıkan sinsli bir hastalıktır. Hastaların yaklaşık olarak %60’ı erkektir. Minnesotada yapılan bir çalışmada PV insidansı 1,9 olgu/100.000 popülasyon/yıl olarak bildirilmiştir (46). Ortalama yaşam beklentisi tedavi edilmeyen olgularda 6-18 ay, tedavi ile 11-15 yıl olarak saptanmıştır (47).

2.11.1.2. Tanı

Revize edilmiş DSÖ (DSÖ) kriterleri günümüzde ilk olarak önerilen tanı sistemidir. Buna göre, majör kriterlerden ikisi birden ve bir minör kriter veya majör kriterlerden ilki ve iki minör kriterin eklenmesi PV tanısı için yeterlidir (21).

Majör kriterler:

1. Artmış kırmızı hücre kitlesi: Ortalama değerden % 25 fazla veya erkekte hemoglobin >18,5 g/dL, kadında >16,5g/dL veya yaş, cinsiyet ve yaşanan irtifaya göre hesaplanmış referans aralığının % 99'undan büyük hemoglobin değeri.
2. JAK2 V617F mutasyonu ve fonksiyonel olarak benzer JAK2 ekzon 12 mutasyonunun gösterilmesi

Minör kriterler:

1. Kemik iliğinde her üç seride(eritroid, granülositik, megakaryositik) belirgin proliferasyon (panmyelozis)
2. Serum eritropoietin seviyesinin normal referans değerlerinin altında olması
3. Endojenez in vitro eritroid koloni formasyonu

PV tanısı için yaygın olarak kullanılan bir sınıflama da PV çalışma gurubu (PVSG) tarafından hazırlanmış olandır. Bu sınıflama sistemine göre her üç majör kriterin, ya da ilk iki majör kriter ile birlikte herhangi iki tane minör kriterin bir olguda bulunması PV tanısını doğrulamaktadır.

Majör kriterler:

1. Artmış kırmızı hücre kitlesi (erkekte ≥ 36 mL/kg, kadında ≥ 32 mL/kg)
2. Arteriyel oksijen saturasyonu $\geq$ % 92
3. Splenomegali

Minör kriterler:

1. Trombosit sayısı $> 400,000/\mu\text{L}$
2. Beyaz küre sayısı $> 12,000/\mu\text{L}$
3. Lökosit alkalen fosfataz skoru >100
4. Serum vitamin B12 seviyesi $>900 \text{ pg/mL}$ veya serum serbest B12 bağlama kapasitesi $>2,200 \text{ pg/mL}$

2.11.1.3. Klinik Özellikler

Baş ağrısı, halsizlik, kaşıntı, baş dönmesi, kulak çınlaması, terleme PV’de sık karşılaşılan yakınmalardır. Bunun yanında bazı PV hastaları asemptomatik olup, herhangi bir nedenle tam kan sayımı yapıldığında rastlantısal olarak hematokrit yüksekliği saptanması sonrasında tanı alır. 2810 PV’de ortalama üç olgudan birinde gözlenen trombotik olaylar bu hastalar için major mortalite ve morbidite nedenidir(45). Trombotik olayların bu denli sık olması artmış serum viskozitesi ve trombositoz ile ilgilidir. Daha çok arteriyel olmakla beraber venöz sistemde de görülen trombotik olaylar sıklık sırasına göre; inme, geçici iskemik atak, miyokard enfarktüsü, derin ven trombozu, pulmoner tromboemboli ve Budd-Chiari sendromudur.(48,49) Hiperviskoziteye bağlı gelişebilen anjina pectoris ve nörolojik bulguların sorgulanması önemlidir. Tromboz ile çelişkili gibi görünmekle birlikte, kalitatif trombosit bozukluğu ve peptik ülser hastalığının artmış insidansı PV olgularında gastrointestinal hemoraji ile kliniğe yansıyabilmektedir (45). Bazı hastalar için özellikle sıcak bir banyodan sonrası görülen kaşıntı ön plandaki semptom olabilir. Hastaların yaklaşık olarak % 40 kadarında kaşıntı yakınması mevcuttur. Bu durumun sebebi olarak bazofil sayısındaki artışa ikincil histamin salınımı öne sürülmektedir. Kaşıntı patogenezinde “kutanöz mast hücre degranulasyonu” (histamin) yanı sıra, fibrinolitik faktörler, katekolaminler ve prostaglandinlerin de rol oynadığı düşünülmektedir. El ve ayaklarda kızarıklık ve morarmanın eşlik ettiği ağrı ve yanma hissi olarak tanımlanan ve vazomotor bir

bozukluk olan eritromelalji ET seyrinde daha sık karşılaşılan bir klinik bulgu olmakla birlikte, özellikle trombosit sayısının yüksek seyrettiği PV olgularında da görülebilmektedir (45). PV’de sık karşılaşılan fizik muayene bulguları olarak plethora, splenomegali ve hepatomegali dikkati çeker. Sırasıyla bu üç bulgu, PV çalışma gurubunun (PVSG) verilerine göre % 70, % 67 ve % 40 oranlarında izlenmektedir. Serum viskozitesindeki artış kan basıncında yükselmelere neden olabilir. Daha az rastlanan bulgular ise kaşıntı nedeniyle deride oluşan eksskoriyasyonlar, eski trombotik olaylara bağlı olan deri üzerindeki lekelenmeler, optik fundus venlerinde tıkanmalar ve gut artriti olarak bildirilmektedir. Miyelofibrozis, splenomegali ve anemi PV olgularında hastalığın postpolisitemik miyeloid metaplazi döneminde olduğunu gösterir. Geçmişte flebotomi gereksinimi olan olguların transfüzyona bağımlı hale gelebildiği bu dönem, PV’nin terminal bir komplikasyonudur. PV’de akut lösemiye transformasyon riski (lösemik faz) artmıştır. Bu risk postpolisitemik miyeloid metaplazi fazındaki olgularda çok daha yüksektir. Dönüşüm sıklıkla AML ve MDS, nadiren de KML şeklinde gerçekleşir. AML’ye transforme olgular tedaviye dirençlidir (45). PV’nin en temel laboratuvar bulgusu artmış hemoglobin ve eritrosit sayısıdır. Geçmişte PVSG tarafından major tanı kriterleri içerisinde gösterilen artmış eritrosit kitlesi, pahalı ve standardizasyonu zor bir işlem olması nedeni ile güncel pratikte yerini hemoglobin artışına bırakmıştır. Hemoglobin değeri 16,5 mg/dl’den fazla olan (hematokrit >% 50) kadınlar ve 18,5 mg/dl’den fazla olan (hematokrit >% 56) erkekler için eritrosit kitlesinin arttığı gösterildiği için, klinik pratikte bu değerlerin üzerindeki ölçümler saptandığında eritrosit kitlesi artmış olarak kabul edilmelidir.

PV’de eritrosit morfolojisi normaldir. Bununla birlikte demir eksikliğinin eşlik ettiği olgularda hipokromi, mikrositoz ve poikilositoz izlenir. Demir eksikliği demirin artmış eritrosit kitlesine transferi, gastrointestinal sistemden kronik kan kaybı ve hiperviskozite nedeniyle uygulanan flebotomilere ikincildir. Serum demir ve ferritin seviyeleri azalmış, demir bağlama kapasitesi artmış olarak saptanır. Postpolisitemik miyeloid metaplazi fazında ise belirgin anizopoikilositoz ve gözyaşı damlası şeklinde eritrositler gözlenir.

Kemik iliği incelemesi DSÖ kriterlerinde belirtildiği gibi, megakaryositler başta olmak üzere, her üç seri elemanlarının arttığı panhiperplazi gösterir. Değişken derecelerde retikülin artışı bulunabilir. Kemik iliği demir depoları tükenmiştir. PV’de nötrofili hastaların çoğunda mevcut olup, lökosit sayısı genellikle 10-20 x10³/μL aralığındadır. Beyaz küre morfolojisi sıklıkla normal olmakla birlikte seyrek olarak gözlenen miyelosit ve metamiyelositlere hastalığın ileri safhalarında daha çok rastlanır.

Lökosit alkalin fosfataz düzeyi artmıştır (45). Lökositozun PV ilişkili tromboz için önemli bir faktör olduğunu vurgulanmıştır. Bazofili ve eosinofili genellikle mevcuttur. Hastaların yarısında değişken derecelerde trombositoz bulunur ve bazen bir milyon/μL değerlerini aşabilir. Trombosit morfolojisi normaldir. Kazanılmış von Willebrand hastalığı (VWH) PV ve diğer miyeloproliferatif bozukluklarda gözlenebilen kalitatif bir trombosit bozukluğu olarak bildirilmektedir (45). Bu hastalarda kongenital tip2 VWH’dekine benzer şekilde von Willebrand faktör multimerlerinin kaybı söz konusudur.

Kazanılmış VWH trombositozun derecesi ile ilişkili olup, trombosit sitoreduksiyonu ile ortadan kalkar. TPO reseptör bozukluğu, trombositlerin epinefrine yanıtının azalması, trombosit membran glikoproteinlerinde anormallikler kalitatif trombosit bozukluğunun diğer bazı nedenleridir.

PV’de hücre döngüsünden ileri gelen hiperürisemi gut hastalığı yatkınlığına neden olabilir. Serum vitamin B12 seviyesi PV’de belirgin olarak yükselebilir. Bunun nedeni kaynağı lökositler olan transkobalamin III (B12 bağlayıcısı) düzeyindeki artıştır (45).

2.11.1.4. JAK2 Mutasyonları

Yapılan araştırmalar JAK2 V617F ekzon 14 mutasyonunun sağlıklı kişiler ve sekonder polistemisi olan kişilerde bulunmamakla birlikte, PV tanısı olan kişilerde % 95- 97 oranında saptandığını ortaya koymuştur (59,60). JAK2 V617F mutasyon

analizi sekonder polistemiler ile PV arasında net bir ayırım yapmaya olanak sağlar, ancak bu testin maliyeti ve erişilebilirliği henüz istenilen uygunlukta değildir. Diğer taraftan mutasyon PV'ye spesifik olmayıp ET ve PMF hastalarının yaklaşık olarak yarısında saptanabilmektedir.

Dikkat çekici bir başka nokta ise yüksek mutasyon seviyeleri ile yüksek granulosit sayıları arasında saptanan ilişkidir (61). Bu bulgu lökositozu olan hastalardaki yüksek tromboz sıklığını açıklamaya yardım edebilir.⁴²

PV tanısı olan 63 hastanın ekzon 14 mutasyonu açısından incelendiği bir çalışmada mutasyona 58 hastada (% 92) rastlanırken, mutant olan bu hastaların 13'ünde (% 22) mutasyonun homozigot olduğu gözlenmiştir.⁵⁵ Homozigot olguların geriye kalan 45 heterozigot olguyla karşılaştırıldığında, bu olgularda kaşıntı yakınmasının daha sık, hemoglobin seviyelerinin daha yüksek, fibrozis gelişim oranının artmış ve periferik kandaki granulositlerde PRV-1 transkript seviyelerinin daha yüksek olduğu görülmüştür. Bununla birlikte homozigot ve heterozigot hastalar arasında hastalık süresi, tromboz ve kanama insidansları arasında anlamlı fark bulunmamıştır. Başka bir çalışmada JAK2 V617F mutasyonu periferik kandaki granulositler yerine BFU-E hücrelerinde incelendiğinde, 17 hastanın tamamında mutasyonun homozigot olduğu, ET tanısı olan 15 hastanın ise hiçbirisinde homozigot mutasyonun bulunmadığı görülmüştür.⁶³ PV tanısı olan 114 hastanın incelendiği bir çalışmada ise 111 hastada (%97) V617F ekzon 14 mutasyonu müsbet iken, geriye kalan 3 hastada ise ekzon 12 mutasyonu izlenmiştir. Bunun sonucunda tüm PV hastalarının kromozom 9p24 bölgesinde lokalize olan JAK2 geninde ekzon 14 veya 12 olmak üzere mutasyon varlığının olabileceği öne sürülmüştür.¹⁴ Ekzon 14 V617F mutasyonu pozitif olan hastalarda ekzon 12 mutasyonuna rastlanamamıştır (60).

2.11.1.5. Prognoz

PV tanısı olan ve tedavi edilmeyen semptomatik hastaların ortalama sağkalım süresi 6 ile 18 ay arasında kabul edilirken, tedavi ile bu süre 10 yılın üzerine çıkmaktadır. Ölüm sebepleri arasında tromboz % 29 ile ilk sırada bulunurken, hematolojik

malignansiler % 23, hematolojik olmayan malignansiler % 16 hemorajiler % 7 ve miyelofibroz gelişimi % 3 olarak kaydedilmiştir (45).

PV'de hastalığın miyeloid metaplazili miyelobroza veya lösemiye (AML veya MDS) dönüşümü olası bir mortalite nedenidir. Mevcut iki klinik çalışmanın sonuçları ileri yaşın (> 70 yıl) ve hidroksiüre dışındaki sitoredüktif ilaçlarla tedavi edilmiş olmanın akut lösemi ya da MDS gelişimi için anlamlı risk oluşturduğuna işaret etmektedir (49,61).

Sekonder miyelofibroz gelişimi için ise ileri yaş (> 60 yıl) ve hastalığın süresi risk oluşturmaktadır (49,62). Hastalık süresinin 10 yılı aşması durumunda miyelofibroz gelişimi için relatif risk 15,2 olarak gösterilmektedir (63).

2.11.1.6. Tedavi

PV'de tedavi uygulanırken hastanın semptomlarının ortadan kaldırılması, uzun dönem komplikasyonların (trombotik olaylar, kanama, miyelofibroz, akut lösemi ve diğer maligniteler) önlenmesi amaçlanır (62). Uygulanacak miyelosupresif tedavide ilk hedef, trombotik komplikasyonların önünü almak ve flebotomi ihtiyacını ortadan kaldırmak olmalıdır. Flebotomi hiperviskoziteyi azaltmak amacıyla aralıklı olarak kullanılabilir ancak tek başına flebotominin trombotik komplikasyonlardan yeterince korumadığı görülmüştür (45). Bunun yanında radyoaktif fosfor (32P) ve busulfan gibi miyelosupresif ilaç kullanımı uzun dönemde lösemik dönüşüm ve miyelofibroz gelişimi riskini artırmaktadır. PVSG verilerine göre flebotomi ile tedavi edilen hastalarda AML gelişimi % 1,5 iken, flebotominin 32P ile kombine edildiği grupta % 10 ve busulfan kullanılan hastalarda % 13'dür. Hidroksiürenin kullanıma girmesinden sonra, lökomojenik etkileri nedeniyle, başta busulfan olmak üzere diğer miyelosupresiflerin kullanımı önerilmemektedir. Daha sonraki PVSG protokollerinde tromboz riskini azaltmak için flebotomi koluna aspirin ve dipiridamol eklenmiş, lökomojenik etkiyi azaltmak amacı ile diğer kolda hidroksiüre kullanılmıştır (45).

2.11.2. Esansiyel Trombositemi

2.11.2.1. Epidemiyoloji

Esansiyel trombositemi (ET), reaktif trombositoz (RT) ve kronik miyeloid bozuklukların varlığının dışlanması ile doğrulanabilir bir tanıdır (27).

Gerek trombopoietinin (TPO), gerek trombopoietin reseptörünün (c-Mpl) ET patogeneziye katkısı gösterilebilmiş değildir (64). Buna karşın ailesel otozomal dominant ET’de TPO veya c-Mpl genlerindeki aktive edici mutasyonlar TPO ilişkili trombositozu neden olmaktadır. ET hastalarında serum TPO seviyeleri beklenmedik şekilde normal veya yüksek izlenmiştir (65). Kemik iliğindeki stromal üretim artışının bu duruma açıklık getirebilmesi olasıdır (66). Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enzim temelli çalışmalar ET’nin tıpkı PV gibi klonal bir hastalık olduğunu göstermiştir. Buna rağmen X kromozomuna bağlı klonalite çalışmalarında yaşlı kadın hastaların yarısında monoklonal hematopoez, yarısında ise poliklonal hematopoez saptanmıştır.

Epidemiyolojik çalışmalarda ET’nin yıllık insidansı 100,000 populasyonda 2,5 yeni vaka olarak saptanmıştır (67). Ortalama tanı yaşı 60 olup kadın hastaların sayısı erkek olanlardan yaklaşık iki kat daha fazladır (68). On yıllık sağ kalım süresi % 61-84 olarak belirtilmiştir ki bu da normal veya normale yakın bir yaşam beklentisi demektir (69,70).

2.11.2.2. Tanı

ET diğer kronik miyeloproliferatif bozukluklardan farklı olacak şekilde bir dışlama teşhisi olarak dikkati çeker. Öyle ki reaktif veya klonal bir nedeni bulunamayan persistan trombositoz varlığında ET’den bahsetmek mümkün olabilmektedir (27). Bu anlamda, ET’den mutlaka ayrımı yapılması gereken durumlar KML, PV, PMF, MDS ve RT olarak sıralanabilir (27,28).

ET tanısı için polistemia vera çalışma grubu (PVSG) tarafından oluşturulmuş ve modernize edilmiş tanısal kriterler mevcuttur ve tanı için bütün kriterlerin sağlanması gerekli görülmektedir (71). DSÖ tarafından yayınlanan kriterler de benzer özellikler içermektedir.

1. Trombosit sayısının $>450,000/\mu\text{L}$ olması ve sürekli yüksek seyretmesi
2. Kemik iliği aspirasyon veya biyopsisinde megakaryositik hiperplazi
3. Rutin sitogenetik çalışmada Ph kromozomunun, ya da sitogenetik olarak maskelenmiş KML olguları için BCR/ABL füzyon geni bulunmaması, PV, PMF, MDS ve diğer myeloid neoplazmlardan herhangi biri ile örtüşen tanı kriterlerinden herhangi birini içermemesi.
4. JAK2 mutasyonu olması veya JAK2 mutasyonu bulunmaması durumunda enfeksiyon, enflamasyon ve diğer reaktif trombositoz nedenlerinin bulunmaması

ET’de klonal sitogenetik anormalliklerin insiansı yaklaşık % 5’dir ve bu anormalliklerin hiçbirisi ET için tanısal özelliğe sahip değildir (72). Periferik kandaki granulositlerde PRV-1 geni aşırı ekspresyonu PV ve ET’de için bildirilmiş olup, sekonder eritrositozda ise gösterilmemiştir (73). Serum TPO seviyeleri ise ET ve RT’de genellikle yüksek saptanacağından ayırım açısından önem arz etmez.

2.11.2.3. Klinik Özellikler

ET hastalarının yaklaşık yarısı asemptomatik iken diğer yarısı vazomotor semptomlar veya trombohemorajik komplikasyonlar sergilemektedir. Vazomotor semptomlar; baş ağrısı, baş dönmesi, senkop, atipik göğüs ağrısı, akral pareteziler, livedo retikularis, eritromelalji ve geçici vizuel bozukluklar olarak sayılabilir (28). ET’de trombosit sayısı artışı ve buna eşlik eden kalitatif trombosit bozuklukları tromboz veya kanama komplikasyonlarına neden olur (74). ET’de miyeloid metaplazili myelofibroza ve polistemia veraya dönüşebilir.

PMF'ye dönüşüm insidansı daha yüksektir (75). AML'ye dönüşüm de olasıdır.

Retrospektif çalışmalarda 3-7 yıllık izlemde % 0,6-5 oranında lösemik dönüşüm rapor edilmiştir (28,75). Bu hastaların büyük çoğunluğunda birden fazla ajanla sitoredüktif tedavi uygulanma öyküsü dikkati çekmektedir.

ET'nin en önemli fizik muayene bulgusu hastaların % 25-48'inde saptanan palpabl splenomegalidir (28). PMF'ye dönüşüm durumunda ise splenomegali kaçınılmazdır. Hepatomegali ve lenfadenopati nadir bulgulardır.

2.11.2.4. JAK2 Mutasyonları

Yapılan araştırmalar ET tanılı hastaların yaklaşık % 50 kadarında JAK2 V617F mutasyonunun varlığını ortaya koymuştur (31,76). Trombositozu olan bir olguda bu mutasyonun gösterilmesi miyeloproliferatif bozukluk ilişkili trombositoz ile reaktif trombositozun (RT) ayırımı için oldukça değerli bir veri olmakla birlikte ET, PV ve PMF arasındaki bir ayırımı katkıda bulunamaz.

Bu mutasyonun varlığı ile ET'nin klinik seyri ve laboratuvar bulguları arasında çok net bir ilişki gösterilebilmiş değildir.

2.11.2.5. Prognoz

ET tanısı olan hastaların çoğu hastalık ilişkili komplikasyonlar olmaksızın normal bir yaşam beklentisine sahiptir (77). AML veya miyelofibroz gelişimi nadir bir durumdur. Örneğin 435 hastanın dahil edildiği retrospektif bir çalışmada ET'de tromboz gelişimi ve AML veya PMF'ye klonal dönüşüm için 15 yıllık kümülatif risk oranları sırası ile % 17, % 2 ve % 4 olarak bulunmuştur. Sağkalım değerlendirmesinin yapıldığı bir çalışmada ET tanısı olan 605 hasta 7 yıl süre ile takip edilmiştir. Bu süre zarfındaki mortalite oranı % 26 olup, lösemik dönüşüm için risk faktörleri; düşük hemoglobin seviyesi, ileri yaş, lökositoz, sigara kullanımı,

diyabetes mellitus ve venöz tromboz öyküsü olarak saptanmıştır (76). Bunlar içinde ileri yaş ve lökositoz en belirleyici olanlarıdır. Bu çalışmada sitoredüktif tedavi kullanımı ve JAK2 mutasyonu varlığı lösemik dönüşüm riskini etkilememiştir.

ET için trombotik komplikasyonlar hemorajik komplikasyonlardan çok daha önemlidir. Vaka-kontrol tasarımlı bir çalışmada trombotik olaylar ET hastalarında % 6,6/hasta-yıl, kontrol grubunda ise % 1,2/hasta-yıl olarak saptanmıştır (78). Bu hasta grubunda tromboz için risk faktörleri 60 yaşın üzerinde olmak, tromboz öyküsü ve uzun süreli trombositozdur. Hastalığın tüm klinik seyri sırasında majör kanama gelişimi % 5'in altındadır ve trombosit sayıları 1 milyon/ μ L'nin altında seyrettiği sürece düşük doz aspirin (81 mg/gün) kullanımı bu riski artırmamaktadır (78,79). Lökositozun trombotik komplikasyonlar için bağımsız bir risk faktörü olduğu da vurgulanmaktadır (80).

ET hastalarının büyük çoğunluğu normal bir yaşam beklentisine sahiptir. Bununla birlikte, oluşabilecek bazı komplikasyonlar tedavi endikasyonu oluşturur. En sık vazomotor komplikasyonlar görülür ve bunların çoğu düşük doz aspirin (40-81 mg/gün PO) kullanımı ile kontrol altına alınabilir (81). ET hastalarının % 20 kadarının trombotik olaylar ile prezente olduğunu göstermektedir (81,82). Düşük risk grubundaki hastalarda trombotik olaylarla çok nadiren karşılaşılır, bu nedenle potansiyel zararları bulunan ilaçların kullanımı sakıncalı görülmektedir (82).

2.11.2.6. Tedavi

ET için düşük doz aspirin (75-325 mg/gün) kullanımının sitoredüktif tedavi altında olmayan hastalarda trombotik komplikasyonları azalttığı ve vazomotor komplikasyonları (eritromelalji, paresteziler) önlediği gösterilmiştir. Ayrıca hidroksiüre ve anegralid de tercih edilebilen ilaç seçenekleridir (28).

2.11.3. Primer Miyelofibrozis

2.11.3.1. Epidemiyoloji

Primer miyelofibrozis (eski adı ile agnojenik miyeloid metaplazi) DSÖ tarafından kronik idiyopatik miyelofibrozis olarak isimlendirilmiştir (83).Primer myelofibrozis (PMF) miyeloid hücrelerin değişken morfolojik maturasyonu ve klonal proliferasyonu ile karakterize bir myeloproliferatif neoplazidir (84). PMF, MPN'ler arasında en nadir rastlanılanı olup, Minnesota'da yapılan bir çalışmada sıklığı 100,000'de 1,5 vaka/yıl olarak bildirilmiştir. Genellikle orta yaş üzeri erkeklerde görülen bir hastalıktır. Yaklaşık olarak 40 yaş öncesi tanı alanlar hastaların %5'ini, 50 yaş öncesi tanı alanlar ise %17'sini oluşturur (85).

2.11.3.2. Tanı

PMF tanısında fibrozisin gösterilmesi ve malignitenin dışlanması için kemik iliği biyopsisi yapılmalıdır (30). Biyopsi ile kemik iliğindeki fibrozis gösterildikten sonra PMF tanısının doğrulanması için kemik iliği fibrozisine yol açabilecek ikincil nedenler dışlanmalıdır. Bu nedenler arasında kronik miyeloproliferatif neoplaziler, MDS, akut lösemiler, lenfoid neoplaziler, metastatik kanserler, bağ doku neoplazileri, enfeksiyonlar, D vitamini eksikliği sayılabilir.

PMF tanısal kriterleri (DSÖ) (21)

Majör kriterler:

1. Megakaryositik proliferasyon ve atipi bulgularına retikülin ve/veya kollajen fibrozisin eşlik etmesi veya fibrozis olmaksızın megakaryositik değişikliklere granulositer seride artış eritroid seride azalmanın belirgin olduğu hipersellüler kemik iliği(prefibrotik sellüler faz)
2. KML, PV, MDS ve diğer myeloid neoplazmların DSÖ kriterleri ile örtüşen kriterlere sahip olmaması

3. JAK2 mutasyonunun gösterilmesi veya mutasyonun olmaması durumunda kemik iliğindeki fibrozisin enfeksiyona, otoimmün hastalığa veya herhangi bir maligniteye bağlı olmadığını gösterilmesi.

Minör Kriterler:

1. Lökoeitroblastosiz
2. Serum LDH seviyelerinde artış
3. Anemi
4. Splenomegali

Tanı için her üç majör kriter ile birlikte herhangi iki minör kriterin birlikteliği gereklidir.

2.11.3.3. Klinik Özellikler

PMF’de en sık rastlanan semptom hastaların % 50-70’inde görülen şiddetli Halsizliktir (85,87). Olguların % 25-30 kadarı asemptomatiktir. Bazı hastalar ise (%5-20), kilo kaybı, ateş ve gece terlemesi gibi hipermetabolik duruma işaret eden semptomlara sahiptir (87). Asemptomatik olgular genellikle splenomegali, hepatomegali veya anormal kan sayımı nedeniyle incelenirken tanı almaktadır. PMF’deki karaciğer ve dalak büyümesine ekstramedüller hematopoez yol açar. Splenomegali PMF’nin en önemli klinik bulgusu olarak karşımıza çıkar ve hastaların % 90’dan fazlasında mevcuttur (85). Dalak bazı olgularda pelvik bölgeye kadar uzanım gösterecek oranda büyüyebilir. Splenomegali splanknik akım artışına, ekstramedüller hematopoez ise intrahepatik obstruksiyona neden olarak portal hipertansiyona yol açabilir. Assit, özofageal ve gastrik varisler, gastrointestinal kanama, hepatik ensefalopati ve portal venöz tromboz portal hipertansiyonun komplikasyonları olarak sayılabilir. Hepatomegali ise hastaların % 40-70’inde mevcuttur. PMF’de hemen her organda ekstramedüller hematopoez odakları gelişebilir. Organ tutulumları, splenomegali, hepatomegali, lenfadenopati, plevral, perikardiyal veya abdominal efüzyonlar veya dizüri ve solunum sıkıntısı gibi

semptom ve bulgulara yol açan genitoüriner ve akciğer tutulumları şeklinde olabilmektedir (88). Merkezi sinir sistemi tutulması durumunda intrakraniyal basınç artışı ve sensorimotor kayıplar gelişmesi olasıdır. Cilt tutulumu ise eritematöz plaklar, nodüller, ülser ve bülle şeklinde izlenebilen nadir bir tablodur (89). PMF'ye iskelet sistemi değişiklikleri eşlik edebilir. Bu bozukluklar asemptomatik olabileceği gibi, ağrılı kemik ve eklem tutulumları, özellikle de alt ekstremitelerde ağrı, hassasiyet, ısı artışı semptomları bulunabilir. Osteoskleroz radyografilerde difüz veya yama tarzında dansite artışı şeklindedir. Metastatik karsinom ile karışabilen görünüm olabilmektedir. Ürik asitin aşırı üretimine bağlı gelişen gut akut monoartiküler ya da kronik poliartriküler artrit neden olabilir. Anemi PMF'nin en önemli laboratuvar bulgusu olarak ortaya çıkar. Hastaların yaklaşık yarısında hemoglobin 10g/dl'nin altındadır (85). Anemi sebepleri arasında; kemik iliğindeki eritropoietik alanların azalması, inefektif eritropoez, dolaşımdaki eritrositlerin dalaktaki sekestrasyonu, trombositopeniye veya portal hipertansiyona bağlı gelişen kanamalar, otoimmün hemoliz, dilusyonel anemi, trombopoietin mutasyonlarının (MPL) etkisi gibi durumlar sayılabilir (90). Anemi başlangıcından sonra hastaların birçoğunda tekrarlayan eritrosit transfüzyonlarına gereksinim ortaya çıkar. Periferik kan yaymasında anizositoz, poikilositoz, gözyaşı hücreleri (dakrositler) görülmektedir (30).

PMF'de tanı anında belirgin lökositoz ($>30,000/\mu\text{L}$) ve trombositoz (trombosit sayısı $>500,000/\mu\text{L}$) olabileceği gibi, lökopeni ve trombositopeni de görülebilir (85).

Lökoeritroblastik kan tablosuna bağlı olarak nötrofilik serinin immatür hücreleri periferik yaymada izlenir. Miyeloblast sayısı genellikle toplam lökosit sayısının % 5'inden azdır. Hastalığın progresyonu ile trombositopeni belirginleşir. Trombosit fonksiyon bozuklukluğu olabilir ancak genellikle kanamaya yol açmaz (30).

Tedavi altında olmayan hastalar için PMF'nin diğer Ph negatif kronik MPB'lerden ayırımında CD34+ hücre sayımı %98 pozitif prediktif değere ve % 85 negatif prediktif değere sahip olduğu gösterilmiştir. Hastalık şiddeti ile birlikte CD34 (+) hücre sayılarının da arttığı, CD34 sayımı 300 hücre/ μL 'den fazla olan hastalarda ortalama sağ kalım ve blast krizine gidiş süresinin kısaldığı saptanmıştır (91).

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

Megakaryositlerde morfolojik bozukluklar, nötrofillerde hiperlobulasyon görülür (30). Kemik iliği biopsisi fibrozisin gösterilmesi için gereklidir. Fibroz atipik megakaryositik hiperplazi ile ilişkilidir. Retikülin lifler gümüş boyamaya, matür kollagen trikrom boyamadan daha çok yanıt verir. Kemik iliği sinuzoidleri genişlemiştir ve intravasküler hematopoiezis mevcuttur. Kemik trabeküler yapısında düzensizlik ve kalınlaşma (osteosklerozis) meydana gelir. Bazı hastalarda kemik iliği incelemesi fibrozis olmaksızın belirgin hipersellüler yapı gösterir. Akut lösemi daha önce alkileyici ajanlar veya radyasyon ile tedavi uygulanmamış PMF hastalarının çok az bir kısmında gelişen terminal bir komplikasyondur. Lösemik dönüşümlerin hemen tamamı miyeloid olsa da nadiren lenfoid, eritroid, megakaryositik dönüşümler olabilmektedir. Lösemik blastların fokal odaklar oluşturması da (kloroma veya granulositik sarkom) mümkündür (92).

2.11.3.4. JAK2 Mutasyonları

Birçok yayında PMF hastalarının % 40-50’sinde JAK2 gen mutasyonu gösterilmiştir (30,31). PMF’de mutasyon varlığının ve allel yükünün, klinik özellikler, toplam sağ kalım ve lösemik dönüşüm ile ne derecede ilişkili olduğu henüz tam olarak ortaya konamamıştır (30,31). Mutasyonun varlığı veya yokluğunun gösterilmesi PMF’nin PV veya ET ile olan ayırıcı teşhisine pek katkı yapamasa da tedavi sonrası minimal rezidüel hastalığın saptanmasına faydalı olabilir.

2.11.3.5. Prognoz

PMF hastalarının çoğu anemi, belirgin splenomegali, erken doyma halsizlik, ateş, gece terlemesi ve kilo kaybı gibi hiperkatabolik semptomlarla başvurur. Klinik seyirde hastaların çoğunda sık eritrosit transfüzyonu gerektiren şiddetli anemi ortaya çıkar. Gerek masif splenomegali, gerekse intrahepatik obstruksiyona bağlı portal hipertansiyon gelişebilir. Bazı hastalarda spinal kolon etrafında, plevral ve peritoneal alanda ekstramedüller hematopoez gelişimi kord basısı, plörezi ve assite yol açabilir. Epidemiyolojik bir çalışmada üç yıllık sağ kalım oranı % 52 olarak saptanmıştır. Sağ kalımı azaltan risk faktörleri, ileri yaş (>60 yıl), hepatomegali, kilo kaybı, anemi (hemoglobin< 10 g/dl), lökositoz (>30.000/ μ L), lökopeni (<4000/ μ L), dolaşımdaki blastların artışı (>% 2), trombositopeni (< 150.000/ μ L) ve anormal karyotip olarak saptanırken, splenomegali ve kemik iliğindeki fibrozis derecesinin sağ kalımı olumsuz etkilediği görülmemiştir (93). Bu bulgulara göre; aşağıdaki iki risk faktörüne de sahip olan hastalar lösemik dönüşüm, tromboz ve kanama açılarından yüksek riskli, bir risk faktörü olanlar orta riskli ve risk faktörü bulunmayanlar ise düşük riskli kabul edilirler (93,94).

1. Serum hemoglobin değeri <10 g/dl
2. lökositoz (> 30.000/ μ L) veya lökopeni (< 4000/ μ L) varlığı

2.11.3.6. Tedavi

Günümüzde PMF için küratif potansiyeli olan tek tedavi modalitesi allojenik hematopoietik kök hücre naklidir (allo-HKHN). Diğer faydalı tedavi uygulamaları ise androjenler, kemoterapi, hidroksiüre, anebralide, splenektomi, dalağa radyasyon tedavisi uygulaması ve talidomididir.

2.11.4. MPN'lerde karşılaştırmalı Morfolojik Değerlendirme

Morfolojik değerlendirme sırasında bazı morfolojik parametreler MPN subtiplendirmesinde yardımcı olmakla beraber morfolojik bulgular genellikle örtüşür özelliklerdir. Temel olarak megakaryositer seri, granulositik seri ve eritroid seride artışın hangi serilerde daha belirgin olduğu, displazinin varlığı, retikülin lif artışı ve kollajen varlığı, trabeküler yeni kemik yapımı, vasküler proliferasyon, stromada lenfoid nodüllerin varlığı gibi parametreler değerlendirilerek ve klinikle korele edilerek subtiplendirme yoluna gidilmeye çalışılır.

Polisitemia vera'da tanı verebilmek için izlenen morfolojik bulguların klinik ve laboratuvar bulguları ile korele olması gerekir. Örneğin erken prepolisitemik fazda izlenen morfolojik bulgular sekonder polisitemilerle ve MPN'lerin diğer subtipleri ile benzer özellikler sergiler. Pre-polisitemik fazda kemik iliğinde özellikle eritroid ve megakaryositik seride olmak üzere her üç seride proliferasyon dikkati çeker ki bu morfoloji ET ve PMF erken dönemleri için de benzer şekildedir. Dikkat çekici bir nokta PV ve ET da izlenen megakaryositer seride ki belirgin şekil ve boyut farklılıkları, PMF da izlenen displazi derecesine ulaşmaz. Benzer şekilde ET ve PV da izlenen artmış megakaryositler kemik iliği trabeküllerine yaklaşarak gevşek kümeler oluştururken PMF da izlenen artmış ve displastik megakaryositler sıkı kümeler oluştururlar. Post polisitemik miyelofibroz fazında ise durum değişir ve fibrotik hiposellüler ilikte displastik megakaryositler izlenebilir. Morfolojik değerlendirmede sorun yaratabilecek bir başka nokta prefibrotik fazda tek bulgu olarak izlenebilen belirgin tombozitozun ET olarak değerlendirilme olasılığıdır. Ancak bu olgularda kemik iliğinde vasküler proliferasyon, yaklaşık %20-30 oranında lenfoid nodüllerin varlığı patoloğu prefibrotik- PMF yönünde uyarıcı olmalıdır. ET da izlenen megakaryositler, PV ve PMF'dakilerden farklı olarak daha büyük olma eğilimindedir. Retikülin varlığının değerlendirilmesi de MPN'lerin subtiplendirilmesinde yardımcı bir kriterdir. ET'da hafif retikülin lif artışı olabilir. Belirgin retikülin artışı veya kollajen varlığında ET ekarte edilir. Retikülin lif artışı ve fibrozis PMF ve PV da daha çok beklenen bir bulgudur.

2.12. ÇALIŞMADA KULLANILAN İMMÜNHİSTOKİMYASAL BELİRTEÇLER

2.12.1. CD105 (Endoglin)

Endoglin (CD105) 180 kDa ağırlığında hücre membran glikoproteini olup, IGF-Beta reseptör kompleksinin komponentidir. Neovaskularizasyonu saptamada önemli bir belirteç olan CD105, tümör anjiogenezinde önemlidir(95). CD105 seviyesinde artışın meme ve kolorektal karsinomda kötü prognozla ilişkili olduğu saptanmıştır. (95). CD105'in kültürde yüksek proliferasyon gösteren kan damarlarında endotelial hücrelerde ekspresyonu artar. Hematopoetik progenitor hücrelerde, fibroblastlarda, stromal ve vasküler düz kas hücrelerinde ise zayıf ve fokal ekspresyon gösterir (95). İlginç olarak CD105'in immatür morfoloji ve fenotipik karakteristikler gösteren lösemik hücrelerde, normal hematopoetik progenitörlere oranla daha fazla eksprese olduğu saptanmış.

CD105 IGF-Beta 1'e yüksek afinite gösteren IGF-Beta reseptör kompleksinin bir komponentidir (95). Çalışmada CD105 kemik iliği stromasındaki yeni damar oluşumunu değerlendirme amaçlı kullanılmıştır.

2.12.2. CD146

Kemik iliği stromal hücrelerinde ve klonojenik kemik iliği osteoprogenitorlerinde eksprese edilen antikor kemik iliği mikroçevresinde önemli bir role sahiptir (96,97). CD146 kemik iliğinde subendotelial hücrelerde gösterilmiş ve mikrodamar oluşumunda anjiopoietin-1 ve onun endotelial hücreler üzerinde Tie 2 reseptörü ile etkileşimi gösterilmiş (97). CD146 kemik iliğinde damarların abluminal yüzünde hematopoetik hücreler içine dendritik uzantılar oluşturan hücrelerde pozitif boyama gösterir. Erken evre myelofibrosis olarak tanımlanan grade 0 ve 1 olgularda kontrol grubu ile benzer oranlarda çok minimal ekspresyon gösterirken, ileri evre olgularda subendotelial hücrelerde belirgin ekspresyon izlenir (98). Çalışmada olgun vasküler yapıları belirlemek amacıyla kullanılmıştır.

2.12.3. CD34

110 kDalton ağırlığında monomerik hücre yüzey glikoproteinidir. Hücre- hücre adezyonunda etkilidir (99). Kemik iliğinde hematopoetik progenitör hücrelerde ve vasküler endotelde, mast hücrelerinde, dendritik hücre subpopülasyonunda, deride adneksiyal yapılar etrafında, dermatofibrosarkoma protuberans, gastrointestinal stromal tümörde, periferik sinir kılıfı tümörlerinde pozitiflik gösterir. CD34 tümörlerde vasküler dansiteyi gösterir ve aynı zamanda vasküler endotel belirteci olarak da kullanılır (99). Çalışmamızda kemik iliği aralığındaki tüm vasküler yapıları göstermek ve blastik dönüşüm varsa bu hücreleri ortaya koymak amacıyla kullanılmıştır.

3. MATERYAL VE METOD

3.1. OLGU SEÇİMİ

Bu çalışmada 2000-2010 yılları arasında Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda raporlanmış Ph (-) kronik myeloproliferatif neoplaziler arasında, esansiyel trombositemi (ET), polisitemia vera (PV), primer myelofibrozis (PMF) tanısı alan olgular çalışmaya dahil edilmiştir. Hastane bilgi sisteminden ve hastane dosya arşivinden çalışmaya dahil edilen olguların yaş, cinsiyet, tanı, Jak-2 mutasyon analizi sonuçları, tanı anındaki laboratuvar bulguları, splenomegali varlığı bilgileri elde edilmiştir. Klinik bulgular ve histopatolojik parametreler tablo halinde kaydedilmiştir. Kemik iliği biyopsilerinin H.E kesitleri ışık mikroskopik olarak yeniden Tablo 3.1-3.8 de tanımlanan histopatolojik inceleme parametreleri ile değerlendirilmiştir.

3.2. HİSTOPATOLOJİK İNCELEME

Hematoksilen eozin boyalı preparatların değerlendirilmesinde dikkat edilen parametreler ve değerlendirme ölçütleri:

Kemik iliği sellülaritesi, kemik iliğindeki hematopoetik hücrelerin fibrozisten bağımsız olarak yağ hücrelerine oranı değerlendirilmiş ve yüzde olarak belirlenmiştir. Kemik iliğinde hakim hücrelerin hangi seri hücreleri olduğu belirlenmiş ve her biyopsi için kaydedilmiştir. Megakaryositlerin morfolojik özellikleri, mikromegakaryosit varlığı bu hücrelerde olgunlaşma durumunun değerlendirilmesi için megakaryosit çekirdek lobülasyonu, boyutlarının durumu kaydedilmiştir. Ayrıca Megakaryositlerin kemik iliğinde yerleşim yerleri, kümelenme yapıp yapmadıkları ve kümelerin gevşek veya sıkı kalabalık gruplar oluşturması değerlendirilmiştir. Granülositer serinin olgunlaşma özellikleri, kemik iliğinde dağılımının bulunup bulunmadığı, eozinofil öncülerinin varlığı değerlendirilmiştir. Eritroid serinin kümeler halinde bulunup bulunmadığı, kemik iliğinde yerleşim özellikleri, olgunlaşma durumu değerlendirilmiş ve

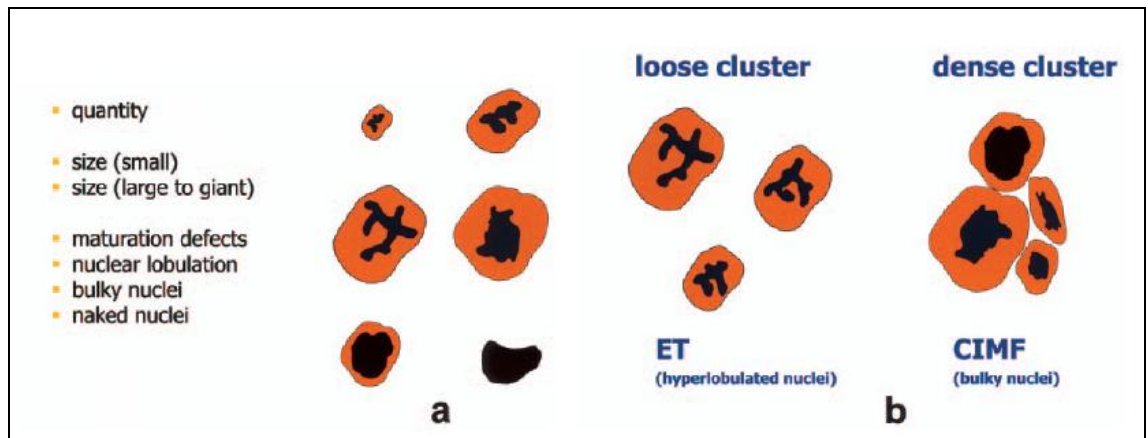
derecelendirilmiştir. kemik iliği mikroçevresinde gözlenen stromal değişiklikler arasında; damarların sayısı, damar genişlemelerinin varlığı, perivasküler plazma hücrelerinin varlığı değerlendirilmiştir. Tabeküler genişleme yeni kemik yapımı, osteoblast artışı, lenfoid nodüllerin varlığı değerlendirilmiştir. kemik iliği fibrozisi için retikülin histokimyasal boyası ile stromal retikülin lif varlığı 4 derece üzerinden değerlendirilmiştir.

3.2.1. Histokimyasal Değerlendirmede Kullanılan Kriterler

Işık mikroskopik incelemede kullanılan kriterler her seri için aşağıdaki tablolarda belirtildiği gibidir.

Tablo 3.1. Megakaryositler serinin morfolojik değerlendirilmesinde kullanılan morfolojik parametreler

Boyut	büyük	küçük
Maturasyon defekti	yok	var
Nükleer özellikler	hipolobule	hiperlobule
Lokalizasyon	paratrabeküler	intertrabeküler/ parasinüzoidal
Kümelenme	yok	var sıkı / gevşek



Şekil 3.1. a. Displastik megakaryositler, b. Megakaryositlerde sıkı ve gevşek kümelenme (J. Thiele, H.M. Vasnicka and V.Diehl. Histol.Histopathol. 2005; 20:633-644)

Tablo 3.2. Granülositer serinin morfolojik değerlendirilmesinde kullanılan morfolojik parametreler

Olgunluk	olgun	Genç
Lokalizasyon	paratrabeküler	intertrabeküler
Eozinofil lökositler	normal	artmış

Tablo 3.3. Eritroid serinin morfolojik değerlendirilmesinde kullanılan morfolojik parametreler

Kümelenme	Yok	Var
Olgunluk	olgun	genç
Lokalizasyon	paratrabeküler	intertrabeküler

3.3. KEMİK İLİĞİ STROMAL DEĞİŞİKLİKLERİ

Tablo 3.4. Stromal değişikliklerin değerlendirilmesinde kullanılan morfolojik kriterler

Damarlar	Damar sayısı	Normal/Artmış
	Damar alanı	Normal/ Genişlemiş
Lenfoid nodül	Yok/Var	
Perivasküler Plazma Hücreleri	Yok/Var	
Kemik trabekül genişlemesi-yeni kemik yapımı	Yok /Var	
Kemik trabeküllerinde osteoblast artışı	Yok/Var	

Tablo 3.5. Stromal retikülin lif varlığı değerlendirilmesi

0	Hiçbir retikülin lif varlığının bulunmaması
1	Tek tek nadir ince fibriller ve ince bir fibril ağı odağı
2	Kesitin büyük bir kısmında ince fibril ağı, kalın fibriller yok
3	Arada kalın kaba fibriller içeren, fakat matür kollajen bulundurmayan diffüz fibril ağı
4	Diffüz, genellikle kalın fibril ağı ve eşlik eden kollajenizasyon alanlar

0: Retikülin lif artışı yok, 1:Grade I, 2:Grade II, 3:Grade III, 4:Grade IV

3.4. İMMÜNHİSTOKİMYASAL İNCELEME

Kemik iliği aralığındaki vasküler yapıların değerlendirilmesi amacıyla CD34, CD105, CD146 belirteçleri kullanılmıştır.

3.4.1. Kullanılan Antikorların Özellikleri

Tablo 3.6. Çalışmada Kullanılan Antikorların İsimleri, Dilüsyonları ve Ticari Kaynakları

ANTİKOR	KLON	DİLÜSYON ORANI	TİCARİ KAYNAK
CD34	QBEEnd-10	1/150	Neobelirteçs
CD105	SN6h	1/20	Dako
CD146	N1238	1/50	ABCAM

3.4.2. Kullanılan Antikorların Değerlendirilmesi

CD34, CD105 ve CD146 antikorları ile mikrovasküler yoğunluğun değerlendirilmesinde; kesitler 400 ve 1000 büyütme ile taranarak, en yoğun vasküler yapının olduğu 10 alanda 400 büyütme ile bu belirteçleri bulunduran damarlar sayılmıştır. Sayım yapılırken lümen varlığı şartı olmaksızın, pozitif boyanma gösteren endotelial hücreler veya mikrovasküler yapılar değerlendirilmiştir. Preparattan elde edilen 10 alandaki mikrovasküler yapıların sayısı elde edildikten sonra bu sayının ortalaması alınarak bu biyopsi örneği için damar sayısı değeri elde edilmiştir.

3.5. İSTATİSTİK

Örneklemlerin değerlendirilmesinden elde edilen sonuçlar bilgisayar ortamına aktararak sayısallaştırılmıştır. Gerekli hata kontrolleri ve düzeltmeler yapılmıştır. Kategorik verilerin karşılaştırılmasında Ki-kare ve Fisher'in kesin Ki-kare testi kullanılmıştır. Üç ve üzeri gruplarda normal dağılmayan sürekli değişkenler ya da sıralı değişkenler için Kruskal Wallis testi, ikili gruplarda normal dağılmayan sürekli değişkenler ya da sıralı değişkenler için Mann Withney testi kullanılmıştır. Değişkenler arasındaki ilişkinin yönü ve gücünün belirlenmesinde Spearman'ın korelasyon katsayısı kullanılmıştır. İstatistiksel kararlarda $p < 0.05$ değeri anlamlı farklılığın göstergesi olarak kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

Çalışmamıza dahil edilen vakalarda yaş ortalaması 52.4, ortanca 51 (ss $\pm$ 14.8) bulunmuştur. ET tanılı hastalarda ortalama yaş 56.3, ortanca 61 (ss $\pm$ 47.7), PV tanılı hastalarda ortalama yaş 57.3, ortanca 53 (ss $\pm$ 13.3) ve PMF tanılı hastalarda ortalama yaş 48.3, ortanca 49 (ss $\pm$ 12.3) olarak bulunmuştur (Tablo 4.1). Tanı ile yaş arasındaki ilişki istatistiksel olarak araştırıldığında Annova testi (0.156) ile istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık olmadığı saptanmıştır.

Çalışmada ET tanılı hastaların %52'si kadın, %48'i erkek, PV tanılı hastaların %53.3'ü kadın, %46.7'si erkek ve PMF tanılı hastaların %70.4'ü kadın, %29.6'sı erkektir. Hastalık gruplarının istatistiksel olarak anlamlı bir cinsiyet dağılımı göstermediği izlenmiştir (p=0.354) (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. Tanılara göre yaş ve cinsiyet dağılımı

TANI (n)	YAŞ ORTALAMASI	CİNSİYET
	(YIL)	K/E
ET (23)	56.3	12/11
PV (15)	57.3	8/7
PMF (27)	48.3	19/8
TOPLAM (65)	52.4	39/26
P değerleri	0.156	0.354

Çalışmaya dahil edilen vakalarda tanı ile tanı biyopsisi alındığı sırasındaki kan beyaz küre, hemoglobin ve trombosit düzeyleri arasındaki ilişki araştırıldığında (Tablo 4.2), hemoglobin ve beyaz küre ile tanı grupları arasında anlamlı bir farklılık bulunmazken, ET ve PV tanılı olgularda trombosit değerlerinin PMF tanılı olgulara göre artmış olduğu izlenmiş ve sonuçlar sırasıyla Ki- kare testi ile (p<0.001), (p=0.001) anlamlı bulunmuştur.

Tablo 4.2. Tanı ile laboratuvar bulguları arasındaki ilişki

TANI		Beyaz küre	HB	Trombosit
ET	Ortalama	12.7	11.6	807
	Ortanca (ss)	12.2($\pm$ 6.5)	12.4($\pm$ 3.2)	733($\pm$ 482.2)
PV	Ortalama	16.1	13.2	599
	Ortanca	11.3($\pm$ 13.2)	13($\pm$ 2.1)	599($\pm$ 218)
PMF	Ortalama	11.4	11.1	356
	Ortanca	9.2($\pm$ 8.4)	11.3($\pm$ 3)	310($\pm$ 310)

Çalışmaya dahil edilen vakalarda tanı ile splenomegali varlığı arasındaki ilişki araştırıldığında, her üç hasta gurubunda da splenomegali oranlarının yüksek olduğu ancak PMF tanılı olgularda splenomegali görülme oranının %77.8 şeklinde daha yüksek olduğu görülmüş, ancak bu oran artışının Ki-kare testi ile istatistiksel açıdan gruplar arasında anlamlı olmadığı görülmüştür ($p= 0.422$) (Tablo 4.3). Tanı grupları ile JAK-2 mutasyonları arasındaki ilişki araştırıldığında JAK-2 mutasyonu tanılar içinde %66.7 gibi bir değer ile en fazla PV olgularında bulunurken, %6 değeri ile en düşük ET olgularında saptanmıştır (Tablo 4.3). Jak mutasyonu görülmesinin gruplar arasında Ki-kare testi ile istatistiksel açıdan anlamlı bir ilişki izlenmemiştir ($p=0.054$).

Tablo 4.3. Tanı ile klinik parametrelerden splenomegali ve JAK2 mutasyonu arasındaki ilişki

TANI(n)	SPLENOMEGALİ VARLIĞI	JAK2 MUTASYONU VARLIĞI
ET(23)	14 (%60.9)	6 (%27.3)
PV(15)	10 (%66.7)	10 (%66.7)
PMF(27)	21 (%77.8)	10 (%38.5)
TOPLAM(65)	45 (%69.2)	26 (%41.3)
P Değerleri	0.422	0.054

Çalışmaya dahil edilen olgularda kemik iliği sellülaritesi ile tanılar arasındaki ilişki araştırılmış, kemik iliği sellülaritesinin en düşük %85.65 oranında ET tanılı olgularda saptanmıştır (resim 1) (Tablo 4.4). PV ve PMF olgularında ET olgularına göre sellülarite belirgin artmış bulunmuştur. Kruskal- Wallis testi ile istatistiksel olarak ET- PV arasında ($p=0.045$) ve ET-PMF için arasında sellularitenin anlamlı arttığı bulunmuştur ($p=0.002$). PV-PMF arasında sellülarite farkının istatistiksel ($p=0.420$) anlamlı olmadığı bulunmamıştır.

Sellülarite açısından bu iki tanı gurubunun benzer özellikte olduğu izlenmiştir.

Tablo 4.4. Tanı ile sellülarite arasındaki ilişki

TANI	KEMİK İLİĞİ SELLÜLARİTESİ	
	Ortalama	Ortanca(ss)
ET	85.65	90 (± 10.2)
PV	92.67	90 (± 6.77)
PMF	93.89	100 (± 8.80)
TOPLAM	90.69	90 (± 9.59)

Çalışmaya dahil edilen olgularda kemik iliği sellülaritesi ile stromal retikülin lif artışı arasındaki ilişki araştırılmış ve GR2 ve GR4 olgularda retikülin lif varlığı arttıkça bu iki grup arasında sellülaritenin de arttığı izlenmiştir. Kruskal- Wallis testi ile istatistiksel olarak sonuçlar anlamlı bulunmuştur ($p=0.006$) (Tablo 4.5). Ayrıca GR1 ve GR4 arasında da istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte retikülin lif artışı ile sellülarite arasında doğru orantı izlenmiştir.

Tablo 4.5. Kemik iliği sellülaritesi ile stromal retikülün lif artışı arasındaki ilişki

RETİKÜLİN	KEMİK İLİĞİ SELLÜLARİTESİ		
	Ortalama	Std dev	Ortanca
YOK	80	.	80
GR 1	90	11.04	90
GR 2	88.48	8.84	90
GR 3	88.33	9.83	90
GR 4	95.56	7.83	100
TOPLAM	90.69	9.59	90

Çalışmaya dahil edilen vakalarda tanı ile kemik iliği aralığına hakim hücre arasındaki ilişki araştırılmış ve her üç hasta grubu genel olarak değerlendirildiğinde kemik iliği aralığına hakim hücrelerin başta granülositer seri olmak üzere granülositer seri ve megakaryositer seri olduğu görülmüş (resim 2), megakaryositer seri tek başına değerlendirildiğinde PMF olgularında %18.5 en yüksek değere ulaştığı izlenmiştir (Tablo 4.6). Ki-kare testi ile tanılarına göre hakim hücre dağılımlarının istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulunmuştur ($p=0.358$).

Tablo 4.6. Tanı ile kemik iliği aralığına hakim hücreler arasındaki ilişki

TANI(n)	G+M	M+G	M+E	G+E	G+E+M	G	M	E
ET (23)	10 (%43.5)	3 (%13.0)	2 (%8.7)	0 (%0)	0 (%0)	8 (%34.8)	0 (%0)	0 (%0)
PV (15)	8 (%53.3)	1 (%6.7)	0 (%0)	1 (%6.7)	1 (%6.7)	3 (%20)	1 (%6.7)	0 (%0)
PMF (27)	8 (%29.6)	3 (%11.1)	1 (%3.7)	2 (%7.4)	0 (%0)	7 (%25.9)	5 (%18.5)	1 (%3.7)
TOPLAM (65)	26 (%40)	7 (%10.8)	3 (%4.6)	3 (%4.6)	1 (%1.5)	18 (%27.7)	6 (%9.2)	1 (%1.5)

Tanı ile kemik iliği aralığındaki myeloid/ eritroid seri oranı durumu araştırıldığında, ET ve PMF olgularında myeloid/ eritroid seri oranının (normal: 1,5-3) arttığı ve PV olgularında ise oranın eritroid seride belirgin artışa bağlı olarak azaldığı saptanmıştır (resim 3) (Tablo 4.7). Saptanan bu değişikliklerin tanı grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır ($p < 0.00$).

Tablo 4.7. Tanı ile kemik iliği aralığındaki myeloid/ eritroid seri oranı arasındaki ilişki

TANI (n)	MYELOİD/ ERİTROİD ORANI	
	ARTMIŞ	AZALMIŞ
ET (23)	17 (%73.9)	6 (%26.1)
PV (15)	1 (%6.7)	14 (%93.3)
PMF (27)	21 (%77.8)	6 (%22.2)
TOPLAM (65)	39 (%60)	26 (%40)

Hastalık gruplarına göre retikülin dağılım oranları tabloda verilmiştir (Tablo 4.8). Buna göre tanı ve stromal retikülin lif varlığı ve artışı arasındaki ilişki araştırıldığında MPN olgularının genel olarak %72.3'ünde grade 2 ve üzeri retikülin lif varlığı saptanmış ve olguların %27.7'sinde ileri fibrozisin göstergesi kollajen varlığı tesbit edilmiştir. Retikülin lif artışı en az ET tanı gurubunda izlenmiştir (resim 4a,b,c)Ancak retikülin ile tanı grupları arasında istatistiksel açıdan anlamlı birilişki bulunmamıştır ($p=0.275$).

Tablo 4.8. Tanı ve stromal retikülin lif varlığı ve artışı arasındaki ilişki

TANI (n)	STROMAL RETİKÜLİN LİF VARLIĞI				
	YOK	GR 1	GR 2	GR 3	GR 4
ET (23)	1 (%4.3)	7 (%30.4)	9(%39.1)	3 (%13)	3 (%13)
PV (15)	0 (%0)	6 (%40)	5(%33.3)	0 (%0)	4(%26.7)
PMF (27)	0(%0)	4(%14.8)	9(%33.3)	3(%11.1)	11(%40.7)
TOPLAM (65)	1 (%1.5)	17(%26.2)	23(%35.4)	6 (%9.2)	18(%27.7)

Çalışmaya dahil edilen vakalarda tanı ile HE ile boyalı kesitlerde saptanan damar sayısı arasındaki ilişki araştırıldığında, her üç tanı grubunda da damar sayısında genel olarak artış saptanmakla birlikte artışın en fazla PMF olgularında olduğu görülmüş ancak bu durum istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p= 0.247$) (Tablo 4.9). Tanı grupları ve stromal değişikliklerden damar alanı arasındaki ilişki araştırılmış ve ET da damar alanı normal sınırlarda izlenirken PMF ve PV olgularında damar alanında belirgin genişleme dikkati çekmiştir (resim 5) (Tablo 4.9). Sonuçlar istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamakla birlikte sınırlı hasta sayısının sonuçları olumsuz yönde etkilediği düşünülmüştür ($p=0.680$). Vakalarda tanı ve stromal lenfoid nodülü varlığı arasındaki ilişki araştırıldığında stromal lenfoid nodülü MPN olgularında çok nadir izlenmekle birlikte, %21.7 gibi bir orandaki hastada en fazla ET olgularında görülmüştür (resim 6) (Tablo 4.9). Bu bulgular istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0.135$). Vakalarda tanı ve perivasküler plazma hücreleri varlığı arasındaki ilişki araştırıldığında ise perivasküler plazma hücrelerinin MPN olgularında genel olarak normal sınırlarda olduğu, belirgin bir artış göstermediği görülmüş (Tablo 4.9) ve sonuçlar) istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır ($p=0.982$).

Tanı gruplarında kemik trabeküllerinde genişleme araştırılmış ve her üç tanı grubunda da kemik trabeküllerinin genel olarak normal olduğu izlenmiştir (Tablo 4.9). Ancak PMF olgularında hafif de olsa trabekül genişlemesi tesbit edilmiştir (resim 7a,b,c). Sonuçlar ($p=0.157$) istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır. Tanı ve osteoblast varlığı arasındaki ilişkinin de ($p=0.617$) istatistiksel açıdan anlamlı olmadığı saptanmıştır (Tablo 4.9).

Tablo 4.9. Tanı ve diğer stromal değişiklikler arasındaki ilişki

TANI (n)	Damar Artışı (%)	Sinüslerde Genişleme (%)	Lenfoid nodül (%)	Perivasküler plazma hücresi (%)	Trabeküler Genişleme (%)	Osteoblast artışı (%)
ET (23)	10 (43.5)	8 (34.8)	5 (21.7)	3 (13)	3 (13)	5(21.7)
PV (15)	9 (60)	9 (60)	3 (20)	2 (13.3)	4(26.7)	5(33.3)
PMF (27)	18 (66.7)	18 (66.7)	1 (3.7)	4 (14.8)	10(37)	9(33.3)
TOPLAM (65)	37 (56.9)	35 (53.8)	9 (13.8)	9 (13.8)	17(26)	19(29)
P Değerleri	0.247	0.680	0.135	0.982	0.157	0.617

Çalışmaya dahil edilen vakalarda tanı ile kemik iliği aralığındaki megakaryositlerin boyutu arasındaki ilişki araştırıldığında ET ve PMF olgularında büyük megakaryositlerin hakim olduğu izlenirken, PV olgularında megakaryositlerin daha küçük boyutta olduğu saptanmış ancak bu dağılım Ki-kare testi ile istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır ($p=0.858$) (resim 8a,b,c) (Tablo 4.10). Vakalarda tanı ile kemik iliği aralığındaki megakaryositlerin lokalizasyonu arasındaki ilişki araştırılmış ancak herhangi bir guruba özgü olarak değerlendirilebilecek şekilde istatistiksel anlamlı bulunmamıştır ($p=0.323$) (resim 9a,b) (Tablo 4.10). Tanı ile kemik iliği aralığındaki megakaryositlerin kümelenmesi arasındaki ilişki araştırılmış, gevşek kümelenme %73.3 gibi bir oranla PV'de en fazla izlenirken sıkı kümelenme PMF olgularında daha belirgin olarak izlenmiştir (resim 10a,b). Bu megakaryosit organizasyonunun dağılımı istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur ($p=0.046$) (Tablo 4.10).

Çalışmaya dahil edilen vakalarda tanı ile kemik iliği aralığındaki megakaryositlerin matüritesi arasındaki ilişki araştırıldığında PMF olgularında daha belirgin olmak üzere, PMF ve PV olgularında genç megakaryositlerde artış izlenirken, ET olgularında matür megakaryosit formlarının hakim olduğu görülmüş sonuçlar Ki-kare testi ile istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır ($p=0.089$) (Tablo 4.10).

Çalışmaya dahil edilen vakalarda tanı ile kemik iliği aralığındaki megakaryositlerin nükleer lobülasyonu arasındaki ilişki araştırılmış ve genel olarak değerlendirildiğinde PV'de daha belirgin olmak üzere her üç hasta grubunda da hiperlobüle megakaryositlerin daha fazla olduğu saptanmıştır (resim 11a,b,c). Sonuçlar Ki-kare testi ile istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır ($p=0.076$) (Tablo 4.10).

Tablo 4.10. Tanı ile megakaryosit morfolojisi arasındaki ilişki

TANI (n)	Boyut		Lokalizasyon		Kümelenme		Olgunluk		Nükleer lobülasyon	
	Büyük (%)	Küçük (%)	P (%)	İ (%)	S (%)	G (%)	O (%)	G (%)	Hipo (%)	Hiper (%)
ET (23)	12 (52)	11 (47)	1 (4.3)	22 (95.7)	4 (14)	12 (52)	13 (56)	10 (43.5)	4 (17)	19 (82)
PV (15)	7 (46)	8 (53)	0	15 (10)	1 (6.7)	11 (73)	6 (40)	9 (60)	2 (13)	13 (86)
PMF (27)	15 (55)	12 (44)	3 (11.1)	24 (88.9)	12 (44.4)	11 (40)	7 (25)	20 (74.1)	11 (40)	16 (59)
TOPLAM (65)	34 (52)	31 (47)	4 (6.2)	61 (93.8)	17 (26.2)	34 (52)	26 (40)	39 (60)	17 (26)	48 (73)
P Değeri	0.858		0.323		0.046		0.089		0.076	

P- paratrabeküler, İ-intertrabeküler, S-sıkı, G-gevşek, O- olgun, G- genç

Çalışmaya dahil edilen vakalarda tanı ile granülositer serinin kemik iliği aralığındaki lokalizasyonu arasındaki ilişki araştırıldığında her üç tanı gurubunda da granülositer serinin büyük oranda intertrabeküler lokalizasyonda olduğu izlenmiş ve sonuçlar ($p=0.020$) istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Tablo 4.11). Çalışmaya dahil edilen vakalarda tanı ile granülositer serideki olgunluk arasındaki ilişki araştırılmış ve genel olarak değerlendirildiğinde ET ve PMF olgularında genç formların hakim olduğu ancak PV olgularında matür granülositer seri elemanlarının tabloya hakim olduğu izlenmiştir ve sonuçlar istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır (Tablo 4.11). Tanı ile kemik iliği aralığındaki eozinofil lökosit artışı arasındaki ilişki araştırılmış, her üç tanı gurubunda da genel olarak belirgin bir eozinofil lökosit artışı izlenmemekle beraber, en fazla ET olgularında eozinofil lökosit görülmüştür (resim 12). Bu haliyle sonuçlar ($p=0.326$) istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır. (Tablo 4.11).

Tablo 4.11. Tanı ile granülositer seri morfolojisi arasındaki ilişki

TANI (n)	LOKALİZASYON		OLGUNLUK		EOZİNOFİL ARTIŞI (%)
	P (%)	İ (%)	OLGUN (%)	GENÇ (%)	
ET (23)	3 (13)	20 (87)	10(43.5)	13(56.5)	10(43.5)
PV (15)	0	15 (100)	10(66.7)	5 (33.3)	3(20)
PMF (27)	9(33.3)	18 (66.7)	11(40.7)	16(59.3)	10(37)
TOPLAM(65)	12 (18.5)	53 (81.5)	31(47.7)	34(52.3)	23 (35.4)
P Değeri	0.020		0.056		0.326

P- paratrabeküler, İ-intertrabeküler

Çalışmaya dahil edilen vakalarda tanı ile eritroid serinin kemik iliği aralığındaki lokalizasyonu arasındaki ilişki araştırıldığında her üç hastalık gurubunda da kemik iliği aralığında eritroid serinin ağırlıklı olarak intertrabeküler lokalizasyonda olduğu görülmüş ancak sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0.336$) (Tablo 4.12). Tanı ile eritroid seride kümelenme arasındaki ilişki araştırılmış ve genel olarak bakıldığında her üç hastalık gurubunda da eritroid seride kümelenmenin baskın olduğu görülmüştür. Sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0.903$) (Tablo 4.12). Tanı ile kemik iliği aralığındaki eritroid seride olgunluk arasındaki ilişki araştırıldığında her üç tanı gurubunda da matür eritroid seri elemanlarının genç formlardan daha fazla olduğu saptanmış, sonuçlar istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır ($p=0.159$) (Tablo 4.12).

Tablo 4.12. Tanı eritroid seri morfolojisi arasındaki ilişki

TANI (n)	LOKALİSAZYON		KÜMELENME		OLGUNLUK	
	P (%)	İ (%)	YOK (%)	VAR (%)	OLGUN (%)	GENÇ (%)
ET (23)	3 (13)	20 (87)	7 (30.4)	16(69.6)	17(73.9)	6(26.1)
PV (15)	0	15 (100)	4 (26.7)	11(73.3)	13(86.7)	2(13.3)
PMF (27)	2 (7.4)	25(92.6)	9 (33.3)	18(66.7)	16(59.3)	11(40.7)
TOPLAM	5 (7.7)	60(92.3)	20(30.8)	45(69.2)	46(70.8)	19(29.2)

P Değeri	0.336	0.903	0.159
----------	-------	-------	-------

P- paratrabeküler, İ- intertrabeküler

Çalışmaya dahil edilen vakalar arasında tanılar ve stromal değişikliklerin yansıması olan damar sayısı ve olgunluğunun kantitatif sonuçları değerlendirildiğinde CD105 ile saptanan genç, CD146 ile saptanan matür ve CD34 ile saptanan toplam damar sayısının en fazla PMF olgularında olduğu izlenmiştir (Tablo 4.13). Genel olarak her üç tanı grubunda da genç damarların görece fazla oldukları saptanmıştır (resim 13 a,b,c).

Tablo 4.13. Tanı ile immünohistokimyasal olarak elde edilen damar sayısı ve matürasyonunu belirlemek amacıyla kullanılan parametreler arasındaki ilişki

TANI (n)		CD34	CD105	CD146
ET (23)	Ortalama	162.1	57.4	50.9
PV (15)	Ortalama	147.8	61.4	60.8
PMF (27)	Ortalama	194.1	79.5	65.2
TOPLAM(65)	Ortalama	172	67.5	59.1

Çalışmaya dahil edilen vakalarda stromal retikülün lif varlığı ile vasküler yapıların sayısı ve olgunluğunu belirleyen immünohistokimyasal parametreler karşılaştırıldığında toplam damar sayısını değerlendirmek için kullanılan CD34 ile grade 1, grade 2 retikülün lif varlığı arasında p:0.068 değeri ile ve grade 1, grade 3+4 retikülün lif varlığı p=0.006 değeri ile istatistiksel olarak anlamlı bulunmuş, grade 2, grade 3+4 arasında ise p=0.292 değeri ile istatistiksel anlam saptanmamıştır (Tablo 4.14). Genç damarları değerlendirmemizi sağlayan CD105 sonuçları ile grade1, grade 3+4 retikülün lif varlığı p=0.016 ve grade 2, grade 3+4 p= 0.009 değerleri istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Grade 1, grade 2 retikülün lif varlığı ise p=980 değeri ile istatistiksel açıdan anlam ifade etmemiştir. Matür damar belirteci olan CD146 sonuçları ile grade 1, grade 3+4 retikülün artışı (p=0.005) değeri ile,

grade 2, grade 3+4 ($p=0.006$) değerleri ile istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuş (resim 14a,b) grade 1, grade 2 retikülin lif artışı ise $p=0.749$ değeri ile anlam ifade etmemiştir.

Tablo 4.14. Stromal retikülin lif varlığı ile vasküler yapıların sayısı ve olgunluğunu belirleyen immünohistokimyasal parametreler arasındaki ilişki

RETİKÜLİN	CD34	CD105	CD146
YOK	217	41	105
GR 1	122.7	55.1	42.3
GR 2	186.7	61.7	51.6
GR 3+4	191.2	82.9	76.4
Total	172.1	67.5	59.1

Kemik iliğinde vasküler yapıların değerlendirilmesinde kullanılan immünohistokimyasal parametreler ile çalışmaya dahil edilen vakalarda splenomegali varlığı, yaş, cinsiyet, laboratuvar bulguları, JAK2 mutasyonu, hakim hücre, megakaryositer, granülositer ve eritroid seriye ait morfolojik değişiklikler, stromal değişiklikler ve vasküler yapıları değerlendirmede kullanılan immünohistokimyasal parametreler arasında anlamlı istatistiksel sonuçlara ulaşılamamıştır.

Megakaryosit hakimiyeti gösteren olgular ile laboratuvar parametreleri karşılaştırıldığında kemik iliği aralığında megakaryosit hakimiyeti ile trombosit seviyelerinde artışın paralel olduğu saptanmış ancak sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Tablo 4.15). Megakaryosit hakimiyeti gösteren olgular ile immünohistokimyasal parametreler karşılaştırıldığında kemik iliği aralığında megakaryosit hakimiyeti ile stromal damarları değerlendirmek için kullanılan immünohistokimyasal parametrelerle saptanan damar sayısında artışın paralel olduğu saptanmış, ancak sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Tablo 4.15). Megakaryosit hakimiyeti gösteren olgular ile splenomegali arasındaki ilişki araştırıldığında splenomegalisi olan olgularda megakaryosit hakimiyeti dikkat çekici bulunmuştur. Ki- kare testi ile sonuçlar ($p=0.787$) istatistiksel olarak anlamlı

bulunmamıştır (Tablo 4.15). Granülosit hakimiyeti gösteren olgular ile laboratuvar parametreleri karşılaştırıldığında kemik iliği aralığında granülosit hakimiyeti ile laboratuvar parametrelerinden beyaz küre ve trombositlerin daha belirgin artış gösterdiği izlenmiş ancak sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Tablo 4.15). Granülosit hakimiyeti gösteren olgular ile immünohistokimyasal parametreler karşılaştırıldığında, sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Tablo 4.15). Granülosit hakimiyeti gösteren olgular splenomegali ile karşılaştırıldığında sonuçlar anlamlı bulunmamış ancak granülosit hakimiyeti gösteren olguların 2/3'ünden fazlasında splenomegali saptanmıştır (Tablo 4.15). Eritroid seri hakimiyeti gösteren olgular ile laboratuvar parametreleri karşılaştırıldığında kemik iliği aralığında eritroid seri hakimiyeti ile hemoglobin arasında paralellik izlenmiş, sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Tablo 4.15). Eritroid seri hakimiyeti gösteren olgular ile immünohistokimyasal parametreler karşılaştırıldığında kemik iliği aralığında eritroid seri hakimiyeti ile her üç parametre arasında ters ilişki izlenmiş, sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Tablo 4.15). Eritroid seri hakimiyeti gösteren olgularda splenomegali araştırıldığında sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Tablo 4.15).

Tablo 4.15. Hakim hücre klinik parametre tablosu

HAKİM HÜCRE		BK	HB	PLT	SM (%)	CD34	CD105	CD146
M	ortalama	11.2	12.02	646.97	30 (71.4)	188.9	72.16	62.29
	ortanca (ss)	10.25 (±5.6)	12.4 (±3.16)	549 (±464.1)				
G	ortalama	13.66	11.73	566.92	36 (66.7)	168.72	69.92	59.43
	Ortanca (ss)	10.85 (±9.95)	11.75 (±3.14)	482.5 (±413.2)				
E	ortalama	9.45	12.91	493.42	4 (57.1)	146	51.2	41.57
	Ortanca (ss)	9.4 (±1.47)	12.5 (±2.43)	514 (±311.07)				

M- megakaryositer seri, G- granülositer seri, E- eritroid seri

Megakaryosit, granülosit ve eritroid hakimiyeti gösteren olgular ayrı ayrı kemik iliğinde retikülin lif varlığı ile karşılaştırıldığında Ki- kare testi ile sonuçlar ($p=0.283$), ($p=0.592$), ($p=0.665$) istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Tablo 4.16).

Tablo 4.16. Hakim hücre stromal retikülin lif artışı ilişkisi

HAKİM HÜCRE	RETİKÜLİN LİF VARLIĞI			
	GR 1 (%)	GR 2 (%)	GR 3 (%)	GR 4 (%)
MEGAKARYOSİT	8 (19.5)	15(36.6)	5 (12.2)	13 (31.7)
GRANÜLOSİT	16(30.2)	18(34)	5 (9.4)	14(26.4)
ERİTROSİT	3 (42.9)	2 (28.6)	0	2 (28.6)

Megakaryosit, granülosit ve eritroid seri hakimiyeti gösteren olgular sırasıyla kemik iliği stromasındaki HE kesitlerde saptanan damar sayısı ile karşılaştırıldığında Ki-kare testi ile sonuçlar ($p=0.881$),($p=0.122$), ($p=1000$) istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Tablo 4.17).Megakaryosit, granülosit ve eritroid seri hakimiyeti gösteren olgular sırasıyla kemik iliği stromasındaki damar alanı ile karşılaştırıldığında megakaryosit hakimiyeti olan olgularda damar alanının daha geniş olduğu saptanmış, Ki- kare testi ile sonuçlar tanı gruplarında sırasıyla ($p=0.283$), ($p=1000$), ($p=0.692$) istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Tablo 4.17).

Megakaryosit, granülosit ve eritroid seri hakimiyeti gösteren olgular kemik trabeküllerinde kalınlaşma ile karşılaştırıldığında Ki- kare testi ile sonuçlar ($p=0.926$), ($p=1000$), ($p=0.664$) istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Tablo 4.17).

Benzer şekilde tüm seriler sırasıyla osteoblastik aktivite artışı ile karşılaştırıldığında sonuçlar ($p=0.398$), ($p=1000$), ($p=1000$) istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Tablo 4.17. Hakim hücre stromal değişiklikler arasındaki ilişki

HAKİM HÜCRE	DAMAR ARTIŞI (%)	GENİŞ SİNÜSLER (%)	GENİŞ TRABEKÜL (%)	OSTEOBLAST ARTIŞI (%)
MEGAKARYOSİT	24 (57.1)	25 (59.5)	11 (26.2)	11 (26.2)
GRANÜLOSİT	29 (53.7)	3 (42.9)	14(25.9)	16(29.6)
ERİTROSİT	4 (57.1)	18 (66.7)	1(14.3)	2(28.6)

Çalışmaya dahil edilen olgularda kemik iliği aralığındaki stromal değişikliklerden olan damar alanı ile immünohistokimyasal parametreler arasındaki ilişki araştırılmış damar alanı genişledikçe CD105 ile saptanan genç damar sayısının azaldığı, CD146 ile saptanan matür damarların sayısının ise arttığı saptanmıştır. Mann-Whitney testi ile (CD105 için $p = 0.031$, CD146 için $p= 0.073$) sonuçlar anlamlı bulunmuştur. CD34 ile ise istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte yine damar alanı genişlemesi ile korele olarak CD34 ile sayılan damar sayısının artış gösterdiği izlenmiştir (Resim 13a,b,c) (Tablo 4.18). Kemik trabekül genişlemesi ile immünohistokimyasal parametreler arasındaki ilişki araştırıldığında kemik trabeküllerindeki genişlemeye paralel olarak CD105 ile saptanan damar sayısının yani genç damar sayısının ve CD146 ile saptanan matür damarların sayısının arttığı saptanmış ve Mann-Whitney testi ile (CD105 için $p= 0.011$, CD146 için $p= 0.046$) sonuçlar anlamlı bulunmuştur (Tablo 4.18). CD34 ile ise istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte yine kemik trabekül genişlemesi ile korele olarak CD34 ile sayılan damar sayısının artış gösterdiği izlenmiştir.

Olgularda osteoblastik aktivite ile immünohistokimyasal parametreler arasındaki ilişki araştırılmış ve osteoblastik aktivite artışı ile paralel olarak CD105 ile saptanan damar sayısının yani genç damar sayısının arttığı saptanmıştır. Mann-Whitney testi ile

CD105 için sonuçlar anlamlı bulunmuştur ($p=0.035$). CD146 ile ise istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte benzer şekilde osteoblastik aktivite artışı ile paralel olarak CD146 ile sayılan damar sayısının artış gösterdiği izlenmiştir ($p=0.252$). CD34 ile saptanan damar sayısı osteoblastik aktivite artışı ile ilişkili bulunmamıştır (Tablo 4.18).

Tablo 4.18. İmmünohistokimyasal parametreler ile kemik iliği stromal değişiklikleri arasındaki ilişki

ANTİKOR	GENİŞ SİNÜZOİDLER		KEMİK TRABEKÜLLERİ		OSTEOBLASTİK AKTİVİTE ARTIŞI	
	NORMAL	GENİŞ	NORMAL	GENİŞ	NORMAL	ARTMIŞ
CD34	158.73	183.6	167.87	184.11	176.39	161.78
CD105	58.20	75.54	61.02	85.94	62.23	80.36
CD146	53.06	63.71	51.74	78.64	53.64	71.31

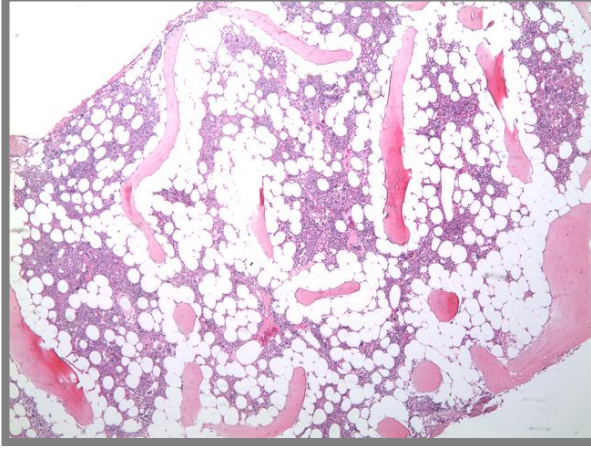
Çalışmaya dahil edilen vakalarda JAK2 mutasyonu ile hastaların yaş ($p=0.855$), cinsiyet ($p=0.491$), splenomegali varlığı ($p=0.491$), tanı biyopsileri sırasındaki kan beyaz küre, hemoglobin ve trombosit düzeyleri, kullanılan immünohistokimyasal parametreler, hakim hücre arasındaki ilişki araştırılmış ($p=0.816$) ve sonuçlar istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır

Ayrıca vakalarda JAK2 mutasyonu ile megakaryosit boyutu ($p=0.987$), megakaryosit maturasyonu ($p=0.491$), megakaryositlerde nükleer lobülasyon ($p=0.245$), megakaryosit lokalizasyonu ($p=0.637$), megakaryositlerdeki kümelenme ($p=0.493$) arasında istatistiksel açıdan ilişki bulunmamıştır.

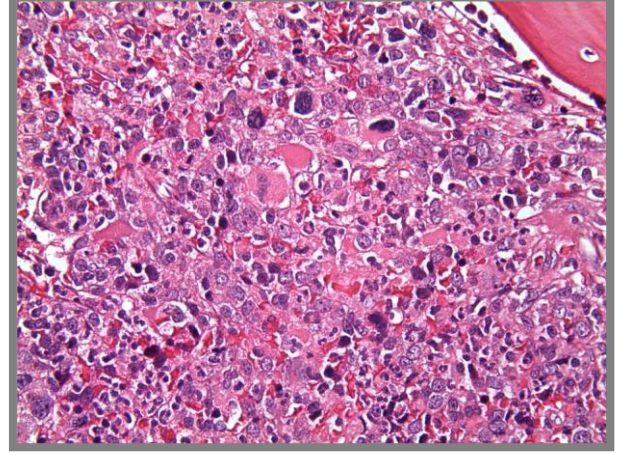
Vakalarda JAK2 mutasyonu ile granülositer serideki olgunluk ($p=0.120$), granülositer seride lokalizasyon ($p=0.746$), eozinofil lökosit artışı ($p=0.264$) araştırılmış ve yine istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır.

Vakalarda JAK2 mutasyonu ile eritroid serideki olgunluk ($p=0.929$), eritroid serinin kemik iliği aralığındaki lokalizasyonu ($p=0.394$) ve eritroid seride kümelenme ($p=0.639$) arasında istatistiksel açıdan anlamlı ilişki bulunmamıştır.

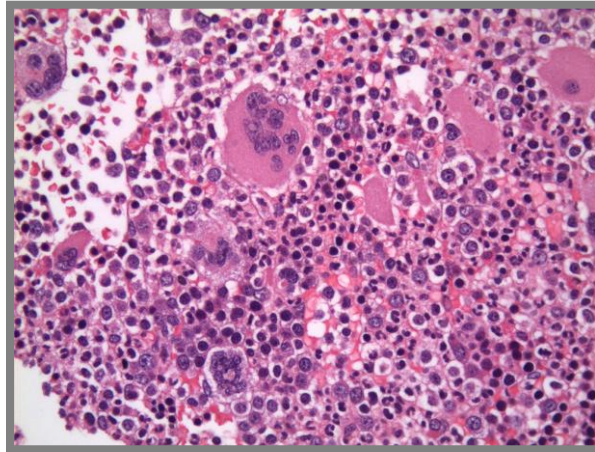
Mutasyonun aynı zamanda stromal değişiklikler ile karşılaştırılmasında da anlamlı sonuçlar elde edilememiştir.



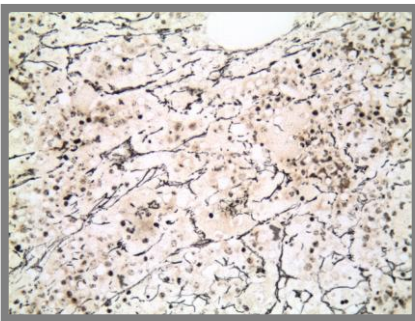
Resim 1 (p.08764.08)- ET olgusunda izlenen normosellüler kemik iliği biyopsi örneği



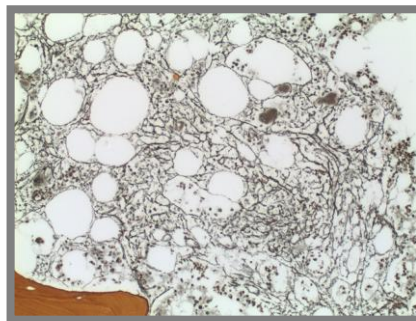
Resim 2(p.3695.07)- PMF olgusunda genç granülositer seri artışı



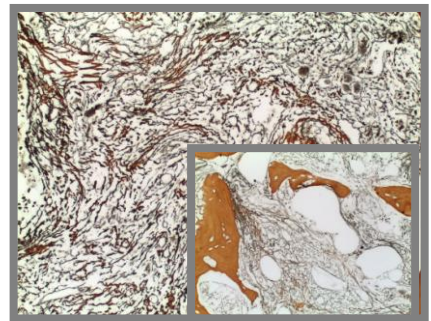
Resim 3 (p.9542.09)- PV olgusunda izlenen eritroid seri artışına bağlı M/E oranda azalma



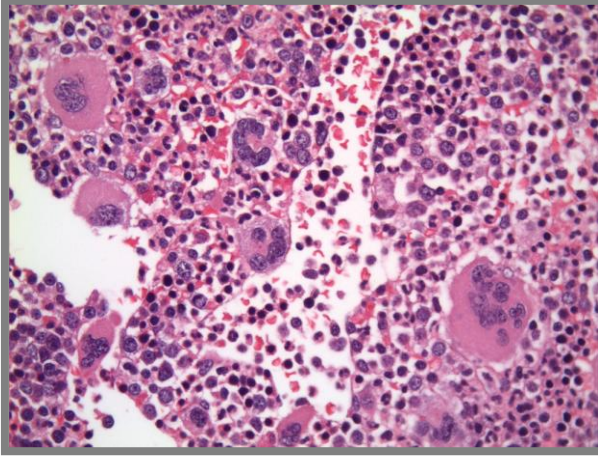
Resim 4a (p.04031.08)- ET olgusunda grade I retikülin lif artışı



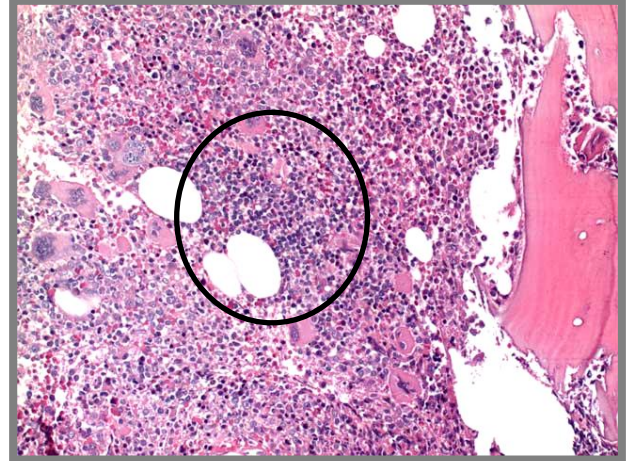
Resim 4b (p.05661.07)- ET olgusunda grade II retikülin lif artışı



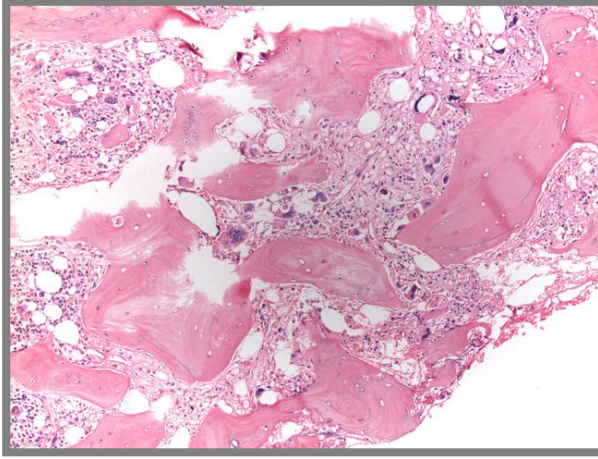
Resim 4c (p.33713.05)- PMF olgusunda grade III retikülin lif artışı ve kollajen varlığı



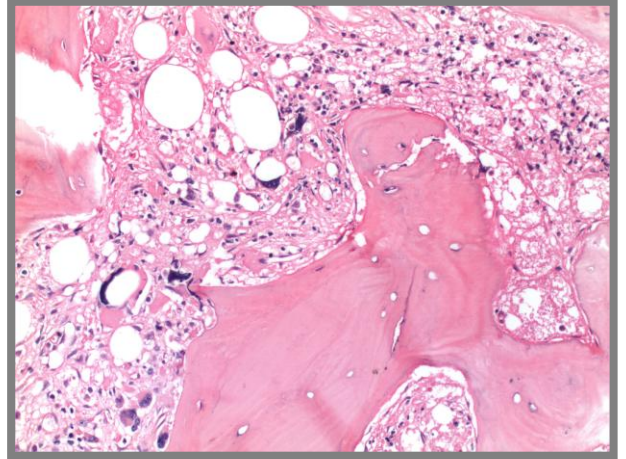
Resim 5(p.33177.05)- PV olgusunda izlenen genişlemiş sinüzoidler ve komşuluğunda artmış megakaryositler



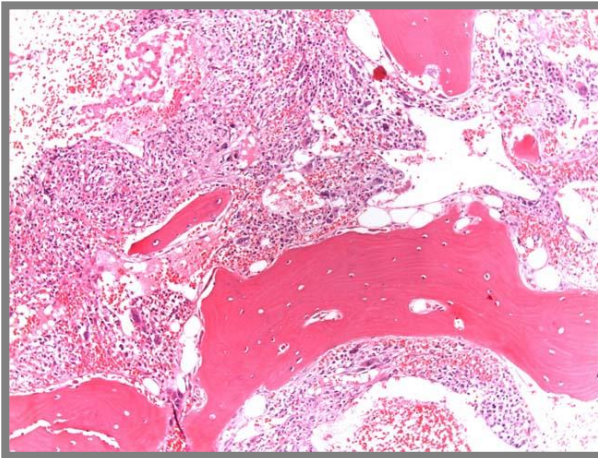
Resim 6 (P.12814.07)- ET olgusunda izlenen lenfoid nodül



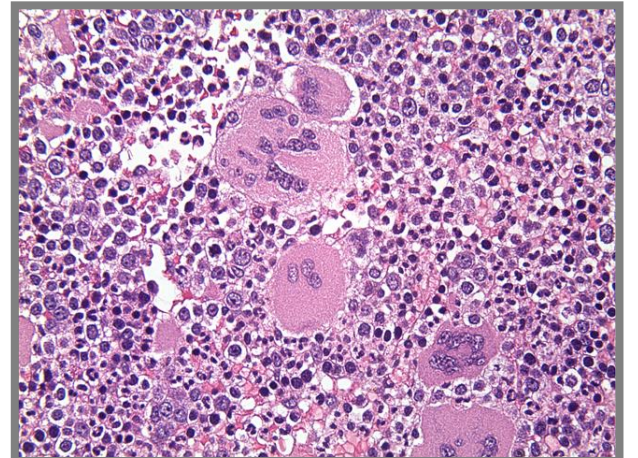
Resim 7a(p.03848.07)- PMF olgusunda artmış vasküler yapılar ve genişlemiş kemik trabekülleri



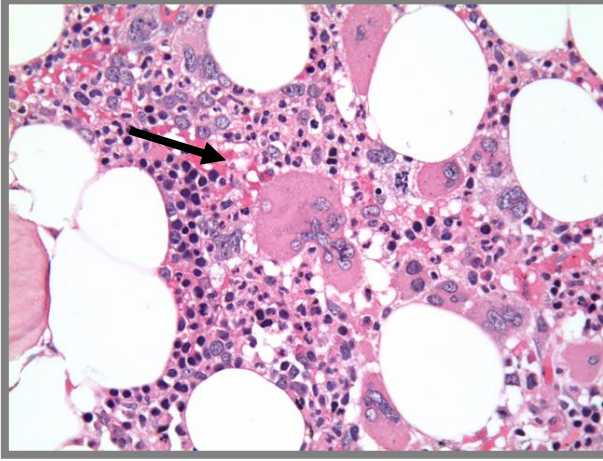
Resim 7b (p.18207.06)- PMF olgusuna ait biyopsi örneğinde artmış displastik megakaryositler ve genişlemiş kemik trabekülleri



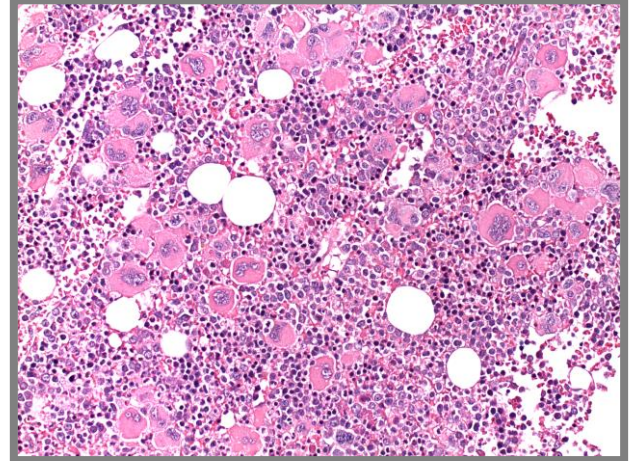
Resim 7c (p.05129.07)- PMF olgusunda izlenen yeni kemik oluşumu, osteoblastik aktivite artışı göstergesi kalın kemik trabekülleri ve artmış vasküler yapılar



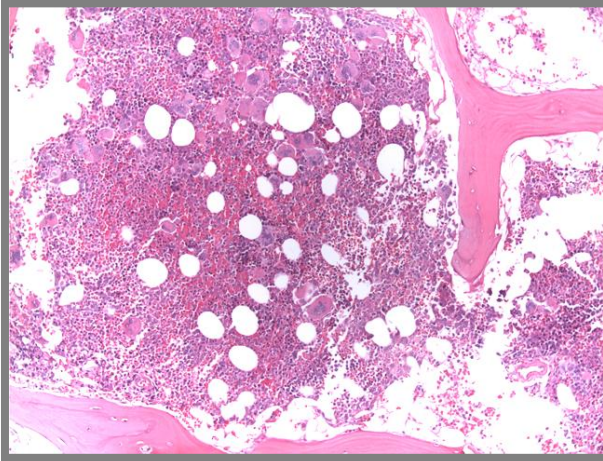
Resim 8a (p.01320.07)- ET olgusunda izlenen hiperlobüle megakaryositler ve geyik boynuzu şeklinde dev megakaryosit (ok)



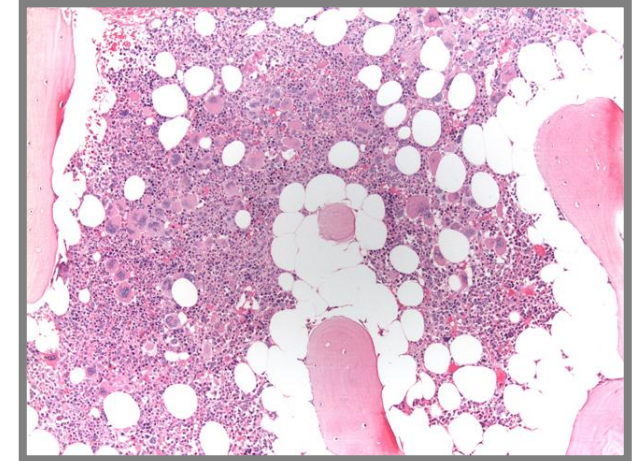
Resim 8b (p.8764.08)- ET olgusunda izlenen granülositer serinin genç formları ve hiperlobüle dev megakaryosit



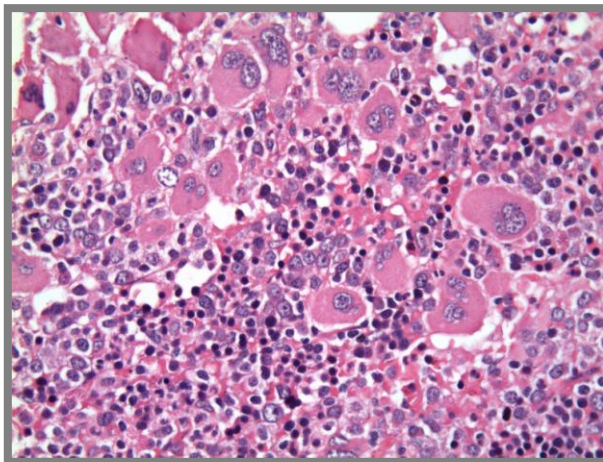
Resim 8c (P.15821.07)- ET tanılı hastanın kemik iliği biyopsisinde izlenen armış büyük megakaryositler



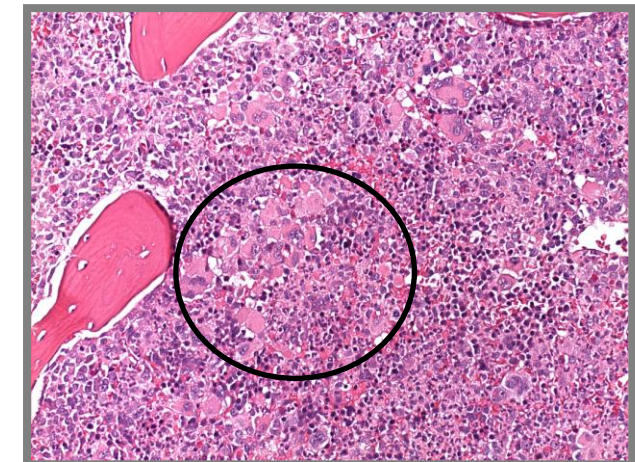
Resim 9a (p.3695.07)- PMF olgusuna ait biyopsi örneğinde paratrabeküler alanlara yaklaşmış sıkı kümeler oluşturan megakaryositler



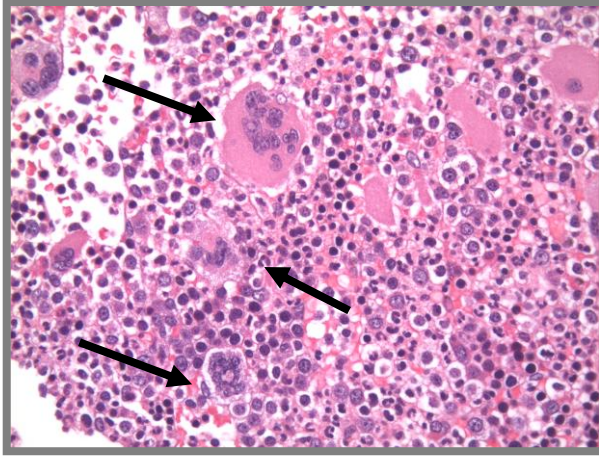
Resim 9b (p.04031.08)- ET olgusunda izlenen artmış megakaryositler



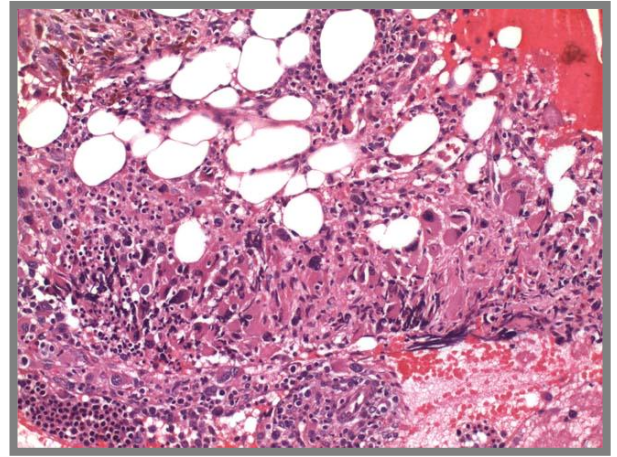
Resim 10a (p.13070.08)- ET tanılı olguya ait gevşek kümelenme yapan megakaryositler



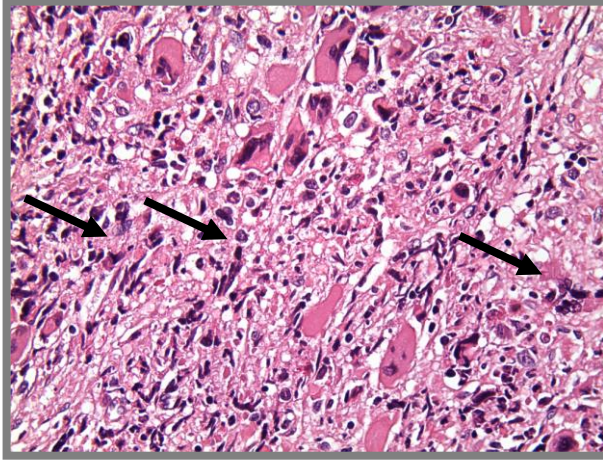
Resim 10b (P.3695.07) PMF tanılı hastanın biyopsi örneğinde sıkı kümeler yapmış megakaryositler



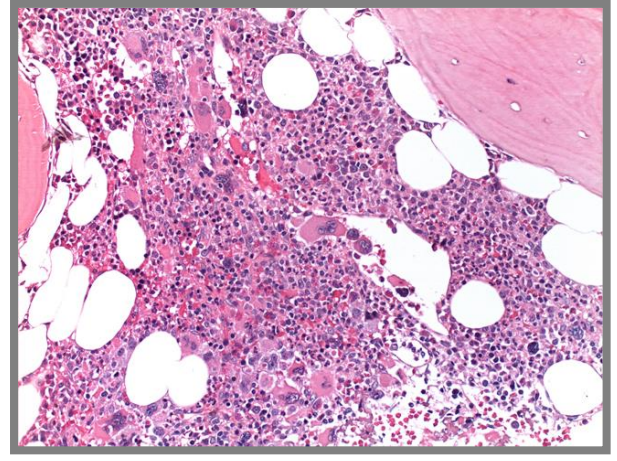
Resim 11a (P.33177.05)- PV olgusuna ait kemik iliği biyopsi örneğinde hiperlobüle megakaryositler (ok)



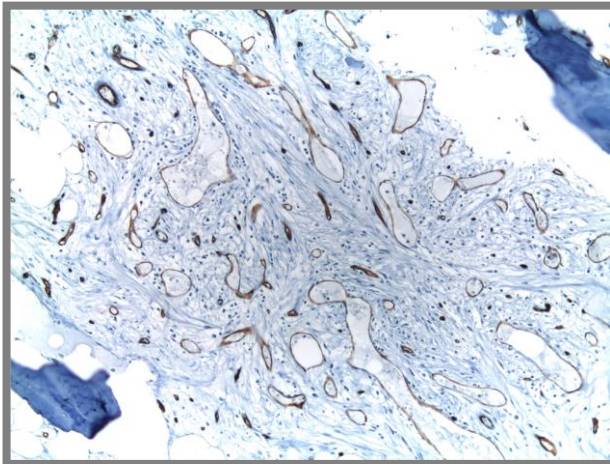
Resim 11b (P.08028.08)- PMF tanılı hastanın biyopsi örneğinde izlenen immatürü displastik megakaryositler



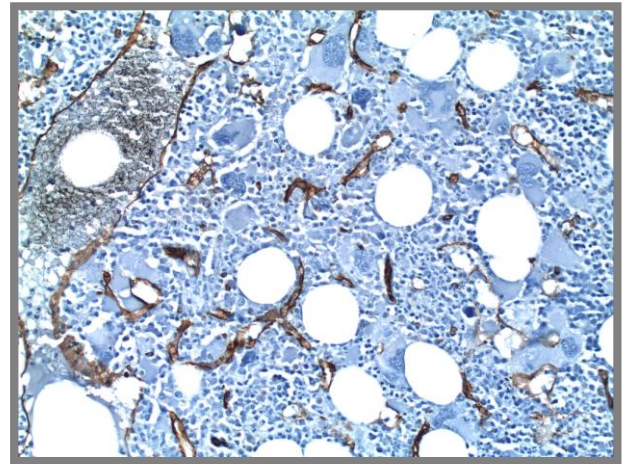
Resim 11c (P.08623.08)- PMF olgusuna ait biyopsi örneğinde izlenen displastik megakaryositler (ok-çıplak megakaryositler)



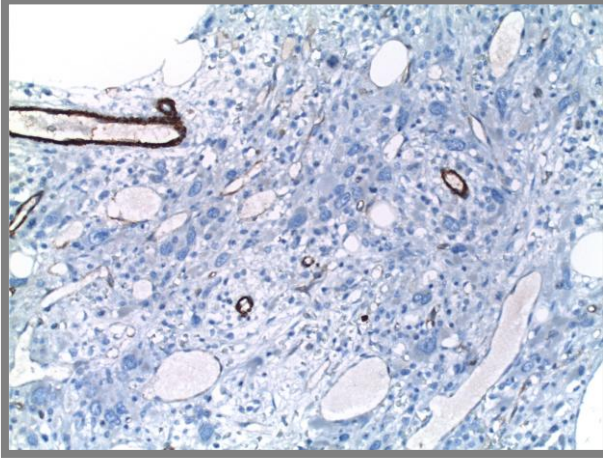
Resim 12 (p.18403.07)- ET olgusuna ait biyopsi örneğinde izlenen artmış eozinofil lökositler



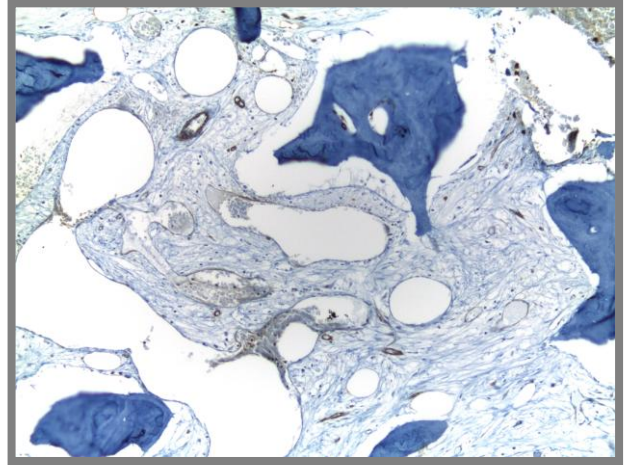
Resim 13a (p.06672.08) ET olgusunda CD34 ile boyanan genişlemiş sinüzoidler



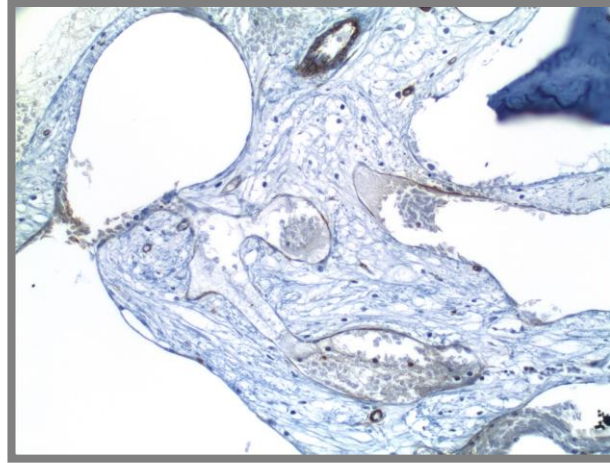
Resim 13b (P.21005.05) CD 105 ile boyanan genç damarlar



Resim 13c (P.23906.05) PV olgusunda CD146 ile matür damar duvarlarında boyanma



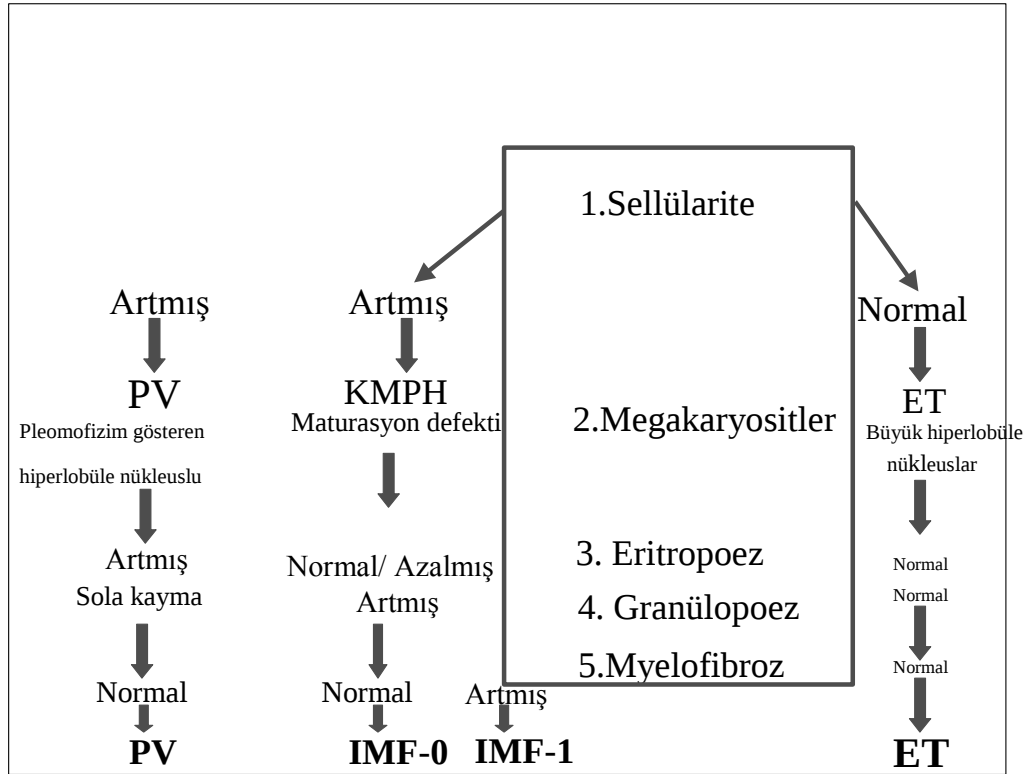
Resim 14a (P.06672.08)- ileri evre PMF olgusunda izlenen CD 146 pozitif vasküler yapılar



Resim 14b(p.03695.07)- PMF olgusunda izlenen artmış ve genişlemiş vasküler yapılar

5. TARTIŞMA

Bcr Abl negatif kronik miyeloproliferatif neoplaziler multipotent kök hücrelerin bir veya birkaç kan hücre serisine farklılaşarak çoğalması ile karakterli neoplazilerdir. Bu grup neoplaziler içinde en sık gözlenen polisitemia vera (PV), esansiyel trombositemi (ET) ve primer miyelofibrozis olmak üzere üç ana başlık altındaki neoplazilerde histopatolojik ve klinik örtüşen özellikler göstermektedir (57).



Şekil 5.1. MPN gurubu neoplazilerin morfolojilerine göre sınıflandırılması. (Kvashnicka H. M, Thiele J. 2007;74:63-71)

Polisitemia vera çalışma gurubu (PSVG) tarafından belirlenen kriterler ET olgularını, trombositemi ile ilişkili erken evre PV ve prefibrotik PMF olgularından ayırmak için yeterli değildir. PSVG klinik kriterleri ileri evre PV olguları için tanısal anlam taşımaktadır. DSÖ'nün (DSÖ) MPN gurubu neoplaziler için belirledikleri kemik iliği

morfolojik kriterleri ET, PV, prefibrotik ve fibrotik PMF için tanısal açıdan oldukça gelişmiş kriterlerdir. Bu iki kriter gurubunun da yetersiz kaldığı olgular bulunduğundan yenilenmiş biyolojik ve moleküler belirteçleri de değerlendirme kapsamında bulunduran Avrupa Klinik ve Patolojik (ECP) kriterleri gündeme gelmiştir. ECP kriterleri ile gerçek ET olgularının erken evre PV olgularından ayrımı, ET olgularının trombositemi ile prezente olabilen PMF olgularından ayrımının mümkün olabileceği savunulmuştur (100)

Ancak sonuç olarak tüm bu ölçütlerin değerlendirilmesi ile bile klinik, laboratuvar, morfolojik ve moleküler olarak çok fazla benzerlik gösteren ve örtüşen MPN gurubu neoplazilerin ayrımı günümüzde hala güçlük yaratmaktadır. Bu nedenle kronik myeloproliferatif neoplazilerin gerek alt tiplendirmesinin yapılması ve gerekse reaktif granülositik, eritroid ve megakaryositik hiperplaziden ayırmak amacıyla moleküler değerlendirmelerin yanı sıra morfolojik kriterler tanımlanmıştır (101). Ancak tanımlanan bu morfolojik parametreler tanısal neoplazilere özgün değildir. Megakaryosit morfolojisi, dağılımı diğer serilerin olgunluk dereceleri ve lokalizasyonları, stromal değişiklikler gibi parametrelerin klinik bilgilerle birleştirilerek alt tiplendirme daha doğrudur. Bu hastalık süreçlerinde kemik iliği aralığı mikroçevre değişiklikleri veya stromal değişikliklerin, tanısal açıdan önemini araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla tüm klinik ve patolojik parametreler ile mikroçevrede özellikle vasküler yapıların ilişkisi araştırılmıştır.

Çalışmaya dahil edilen 12 K, 11 E ve ortalama yaşı 56.3 olan toplam 23 ET, 8 K, 7 E ve ortalama yaşı 57,3 olan toplam 15 PV ve 19 K, 8 E ortalama yaşı 48.3 olan toplam 27 PMF olgusu arasında gerek tanı ve yaş, gerekse tanı ve cinsiyet arasında anlamlı bir farklılık bulunmamakla birlikte PMF için yaş ortalamasının diğer iki hastalık gurubuna oranla biraz daha küçük olduğu saptanmıştır. Mevcut literatür ve kaynak kitaplarda da benzer şekilde ph negatif MPN gurubu hastaların yaş ve cinsiyetleri ile tanıları arasında anlamlı bir ilişkiden bahsedilmemektedir. ET diğer ph negatif MPN'lerden farklı olarak belirgin artmış trombosit seviyeleri ile karakterlidir. ET tanıli olgularda ağırlıklı olarak izlenen tromboz ve hemoraji gibi komplikasyonların nedeni de budur. Tanımlanan komplikasyonlar özellikle trombosit seviyesi $500 \times 10^9 / l$ üzeri 9 / l seviyesinin üzerindeyken görülmektedir (102,103,104). Bizim

çalışmamızda da ET olgularında izlenen trombosit seviyesi ortalama değeri 807 olarak bulunmuş, PV ve PMF olgularına göre istatistiksel olarak da anlamlı trombosit artışı saptanmıştır. Sonuçlarımız trombosit seviyeleri ile ilgili mevcut literatür bilgileri ile örtüşmektedir. Ancak unutulmaması gereken bir nokta artmış trombosit seviyelerinin erken evre PV ve prefibrotik PMF olgularında da izlenebileceği gerçeğidir.

Ph (-) neoplaziler gurubunda özellikle 2004 yılından sonra JAK2 mutasyonu varlığı gündeme gelmiştir. Yapılan çalışmalarda JAK2 V617F mutasyonunda kalitatif ve kantitatif değişikliklerin myeloproliferatif hastalığın fenotipi ile ilişkili olabildiği ve homozigot JAK2V617F mutant eritroid seri kolonilerinin PV hastalarının büyük kısmında izlendiği ancak düşük JAK2 V617F allelinin ET hastalarında görüldüğü saptanmıştır (105). JAK2'deki bu fonksiyon kazanımlı nokta mutasyonu PV hastalarının % 90-95'inde, ET hastalarının % 30-40'inde, PMF hastalarının % 40-50'sinde gösterilmiştir (106,107). Özellikle PV hastaları olmak üzere ET ve PMF gibi MPN'lerin büyük çoğunluğu JAK2V617F (+) olmakla birlikte MPN olgularının bir kısmı JAK2V617F (-) de olabildiği bilinmektedir (108,109). Çalışmamızda MPN hasta gruplarında JAK2 mutasyonu varlığı açısından istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmamakla birlikte bu sonucun sınırlı hasta sayısına bağlı olduğu yorumu yapılmıştır. JAK-2 mutasyonu tanılar içinde %66.7 gibi bir değer ile en fazla PV olgularında bulunurken, %6 değeri ile en düşük ET olgularında saptanmıştır. Bu oranların literatür bilgilerine göre düşük olmasının, olgulara ait JAK2 mutasyon sonuçlarının hastalara ait dosya arşivlerinden edinilmiş olması ve buna bağlı incelemelerin farklı zaman dilimlerinde neoplazilerin farklı aşamalarında ve kısmen tedavi altında iken yapılmış olması, değerlendirilmelerinde farklı yöntemlerin kullanılması, bağlı olduğu düşünülmüştür. Bu testlerin yeniden bu materyal ile duyarlı yöntemler kullanılarak incelenmesinin bu oranı değiştireceği öngörülmektedir. JAK2 pozitif ve negatif MPN vakaları arasında yapılan laboratuvar ve klinik parametrelerin karşılaştırıldığı büyük kohort çalışmalarında çok da anlamlı farklar olmadığı saptanmış ve bu sonuç araştırmacıları JAK2 (-) MPN hastalarında mevcut bazı somatik mutasyonların JAK2 sinyalini aktive ettiği ve JAK2 (+) benzeri tabloları ortaya çıkardığı hipotezi yönünde düşünmeye sevk etmiştir (110). JAK2 mutasyonunun klinik olarak MPN hastalarında tromboz, myelofibroz ve lösemik

transformasyonla ilişkisi bilinmemekle birlikte, yakın zamanda yapılan çalışmalar göstermiştir ki; lökositöz MPN hastalarında tromboz için önemli bir risk faktörüdür (111,112). JAK2 V617F + ET hastalarında belirgin nötrofil artışının izlenmesi nedeniyle JAK2 V617F mutasyonu ile nötrofil aktivasyonu ve dolayısıyla tromboz arasında ilişki bulunmaktadır (113). Çalışmamızda JAK2 mutasyonu ile laboratuvar parametreleri arasındaki karşılaştırmada istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar elde edilememekle birlikte literatüre benzer şekilde lökosit düzeylerinde artış saptanmış ancak trombosit seviyeleri ile ilgili benzer sonuca ulaşamamıştır. Dokuzuncu kromozomun kısa kolunda (9p) bulunan sitoplazmik tirozin kinaz Janus kinaz 2 (JAK2) genine yönelik bir çalışma ile MPN'lerde hematopoietik progenitör hücrelerin büyüme faktörleri ve diğer sitokinlere olan aşırı duyarlılığı açıklanabilmektedir (114,115). JAK2 genindeki bir mutasyonun fare modellerinde sürekli tirozin fosforilasyon aktivitesine yol açarak sitokinlere aşırı duyarlılık ve eritrositozu indüklediği gösterilmiştir (115). JAK2 mutasyonu varlığında miyeloid ve eritroid hücreler de çok belirgindir (115).

B hücresi, T hücresi ve NK hücresi (lenfoid hücreler) serilerinde mutasyon varlığı ise halen bir tartışma konusudur (111,116). Çalışmamızda literatüre benzer şekilde JAK2 pozitif olgularda myeloid seri artışı belirginken, literatüre aykırı olarak eritroid seride artışa raslanmamıştır. MPN tanısı olan 115 hastanın dahil edildiği bir çalışmada JAK2 mutasyonu megakaryositlerde granulositlerden bir miktar daha yüksek saptanmıştır (117).

Mutasyonun Epo'dan bağımsız çoğalan eritroid kolonilerde bulunması büyüme faktörü aşırı duyarlılığı ile ilişkisini ortaya koymaktadır (59). JAK2 V617F mutasyonunun KML, MDS, kronik miyelomonositik lösemi, sistemik mastositoz, kronik nötrofilik lösemi gibi diğer kronik miyeloid bozukluklarda çok nadir olmakla birlikte, MPN sonrası ortaya çıkan AML hastalarında bulunabilmesi mutasyon ile klasik BCR/ABL negatif MPN'ler arasında spesifik bir bağlantıya işaret eder (118). Sonuç olarak bu mutasyonun varlığı ve yokluğunun gösterilmesi PV ile sekonder polisitemi, ET ile reaktif trombositoz (RT) ayrımı açısından değerlidir (106). PV tanısı olan 63 hastanın ekzon 14 mutasyonu açısından incelendiği bir çalışmada mutasyona 58 hastada (% 92) rastlanırken, mutant olan bu hastaların 13'ünde (% 22)

mutasyonun homozigot olduğu gözlenmiştir (119). Homozigot olgular geriye kalan 45 heterozigot olguyla karşılaştırıldığında, bu olgularda kaşıntı yakınmasının daha sık, hemoglobin seviyelerinin daha yüksek, fibrozis gelişim oranının artmış ve periferik kandaki granulositlerde PRV-1 transkript seviyelerinin daha yüksek olduğu görülmüştür. Bununla birlikte homozigot ve heterozigot hastalar arasında hastalık süresi, tromboz ve kanama insidansları arasında anlamlı fark bulunmamıştır. Bunun sonucunda tüm PV hastalarının kromozom 9p24 bölgesinde lokalize olan JAK2 geninde ekzon 14 veya 12 olmak üzere mutasyon varlığının olabileceği öne sürülmüştür (120). Başka bir çalışmada JAK2 V617F mutasyonu periferik kandaki granulositler yerine BFU-E hücrelerinde incelendiğinde, PV tanısı olan 17 hastanın tamamında mutasyonun homozigot olduğu, ET tanısı olan 15 hastanın ise hiçbirinde homozigot mutasyonun bulunmadığı görülmüştür (121). PV tanısı olan 114 hastanın incelendiği bir çalışmada ise 111 hastada (%97) V617F ekzon 14 mutasyonu pozitif iken, geriye kalan 3 hastada ise ekzon 12 mutasyonu izlenmiştir.

Çalışmamızda JAK2 mutasyonu saptanan hastalarda klinik, laboratuvar parametreler ve morfolojik özellikler karşılaştırılmıştır. Jak mutasyonu varlığı ile yaş, cinsiyet, splenomegali arasında istatistiksel olarak anlamlı bir dağılım bulunmamıştır. Ancak genel olarak splenomegalisi olan olguların %68.3 kadarında JAK2 mutasyonunun da eşlik ettiği dikkati çekmiştir. Bu sonuç JAK2 mutasyonunun en az görüldüğü MPN grubu olan ET olgularında splenomegalinin de çok fazla beklenen bir tablo olmaması ile de uyumludur. Çalışmamızda ayrıca megakaryositlerde nükleer lobülasyon, lokalizasyon, matürite ve kümelenme, granulositer seri ve eritroid seride olgunluk, matürite ve lokalizasyon gibi morfolojik parametreler ile JAK2 mutasyonu arasındaki ilişki araştırılmış ve anlamlı bulunmamıştır. Damar sayısı ve damar alanı ile JAK2 mutasyonu arasında ilişki bulunmamakla birlikte genel olarak damarlarda genişlemenin JAK2 mutasyonu negatif olgularda daha fazla olduğu saptanmıştır. Perivasküler plazma hücreleri ve reaktif lenfoid nodül varlığı ile JAK2 mutasyonu arasında ilişki bulunmamıştır. JAK2 mutasyonu ve çalışmamızda vasküler yapıları değerlendirmek amacıyla kullanılan immünohistokimyasal belirteçler olan CD34, CD105 ve CD146 ile elde edilen damar oranları arasında anlamlı bir ilişki izlenmemiştir. Stefan ve arkadaşlarının PMF olguları üzerinde yaptıkları bir çalışmada JAK2 pozitif ve negatif tüm PMF olgularında splenomegali ve fibrosis

derecesinin benzer olduğunu saptanmıştır (121). Bu çalışma sonuçları bizim çalışmamızın sonuçlarını da desteklemektedir. JAK2 mutasyonu varlığının bu neoplazilerde belirgin bir morfolojik parametre ile ilişkili olmadığı anlaşılmaktadır.

MPN gurubu hastalarda splenomegali nedeninin ekstramedüller hematopoez olduğu bilinmektedir. Ekstramedüller hematopoez kemik iliği fibrozisi ile artış gösterir. Klinik olarak splenomegali takibinin hastalık ilerlemesinin değerlendirilmesi veya tedaviye yanıtın değerlendirilmesi için de kullanılması kısmen mümkündür. Bu bilgiler eşliğinde çalışmamızda PMF tanı gurubunda daha belirgin olmak üzere her üç tanı gurubunda da splenomegali izlenmiş olması neoplazilerin biyolojileri ile uyumludur.

Çalışmaya dahil edilen vakalarda splenomegali varlığı ve kemik iliği aralığına hakim hücreler arasındaki ilişki araştırıldığında sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmakla birlikte genel olarak değerlendirildiğinde splenomegalisi olan vakalarda kemik iliği aralığındaki hakim hücrenin granülositer ve megakaryositer seriyeye ait olduğu saptanmıştır. Splenomegalinin en fazla PMF olgularında izlenmesi ve bu tanı gurubunda hakim hücre olarak megakaryositer ve granülositer serinin bulunması gerçeği, bu sonuçlar ile örtüşür niteliktedir. Bu özellikler splenomegalinin bu neoplazilerde gelişim sebebi ile ilişkilendirildiğinde, en çok ve en hızlı kemik iliği fibrozisinin bulunduğu grupta görülmesinin yüksek olması beklenen bir durumdur. Kemik iliği fibrozisinin en fazla görüldüğü durumlarda da buna megakaryosit artışı eşlik etmektedir. Dolayısıyla megakaryosit ve granülosit artışı ile splenomegali ilişkisi beklenen bir durumdur. Ayrıca splenomegalili hastalarda kemik iliği sellüleritesinin, splenomegalisi olmayan olgulardakine oranla artmış olduğu saptanmıştır.

Olgularda splenomegali varlığının, megakaryosit matüritesi, nükleer lobulasyonu, kümelenmesi ve lokalizasyonu gibi morfolojik parametrelerle arasındaki ilişki araştırılarda, splenomegalisi olan vakalarda daha çok genç megakaryositer seri elemanlarının hakim olduğu görülmüş, splenomegalisi olan ve olmayan vakalarda megakaryositer seride nükleusların daha çok hiperlobüle olduğu ve büyük oranda intertrabeküler yerleşimli olduğu saptanmıştır. Splenomegalisi olan olgularda

megakaryositlerde belirgin kümelenme artışı saptanmıştır. Splenomegalinin PV ve PMF olgularında daha sıklıkla görüldüğü gerçeği göz önünde bulundurulduğunda sonuçların çok da şaşırtıcı olmadığı düşünülmüştür.

Splenomegalisi olan olgularda stromal değişiklikler değerlendirildiğinde ise damar sayısında artış ve damar alanında genişleme saptanmış, stromal lenfoid nodül varlığı ve perivasküler plazma hücrelerinde artışın splenomegali ile ilişkisiz olduğu sonucuna varılmıştır. Splenomegalisi olan olgularda retikülin lif varlığı değerlendirildiğinde ise splenomegalisi olmayan olgularda grade 1 ve 2 retikülin lif artışı izlenirken, splenomegali saptanan olgularda grade 2 ve 4 lif artışının belirgin olduğu tespit edilmiştir. Yani splenomegalisi olan olgularda artmış retikülin lif varlığı saptanmıştır. Kemik trabeküllerinde kalınlaşma, yeni kemik yapımı ve osteoblastik aktivite artışı, splenomegali ile ilişkilendirilememiş, laboratuvar parametreleri ve Thiele çalışmasında kemik iliği stroması ile ilgili olarak retikülin lif varlığını değerlendirmiş ve retikülin lif artışının geç dönem PMF olgularında belirgin olduğunu saptamıştır. Tüm bu bulgular kemik iliği fibrozisi ve artan ekstramedüller hematopoez nedeniyle gözlenen splenomegalinin kemik iliğindeki fibrozis ile ilişkili parametrelerle uyum bulundurmasını açıklamaktadır.

Kemik iliği sellülaritesi ile retikülin lif artışı, damar sayısı, damar alanı gibi stromal değişiklikler, hematopoetik seriye ait elemanların her biri ve laboratuvar parametreleri arasındaki ilişki değerlendirildiğinde ET tanılı olgularda kemik iliği sellülaritesi %85.65 değeri ile en düşük olarak saptanmış, ET-PV ve ET-PMF arasında esansiyel trombositimde az olmak üzere sellülarite açısından belirgin farklılık izlenmiştir. PV-PMF olgularında benzer sellülarite değerleri saptanmıştır. Sonuçlar literatürde tanımlanan ET olgularında genel olarak sellülaritenin normal olması ve bunun tanısal açıdan oldukça önemli olduğu bilgisine (128) paraleldir. Retikülin lif varlığı sellülarite açısından özellikle grade 2 ve grade 4 fibrozis gösteren vakalar arasında anlamlı farklılık göstermektedir. Bu iki grup arasında retikülin artışı ile sellülaritenin de arttığı izlenmiştir. Ayrıca GR1 ve GR4 arasında da istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte retikülin lif artışı ile sellülarite arasında doğru orantı görülmüştür.

Kemik iliği mikroçevresi hematopoetik hücrelerin proliferasyonu ve diferansiasyonunda oldukça önemli bir role sahiptir. Mikroçevre nonhematopoetik mezenşimal orijinli stromal hücreler, ekstraselüler matriks komponentleri ve hematopoetik büyüme faktörlerinin sentezinde etkili stromal makrofajları da içeren kompleks bir sistemdir (129). Bu gibi nedenlerle kemik iliği mikroçevresi daha ileri incelemeyi hak etmektedir. Thiele 46 vakalılık PMF olgusu üzerinde yaptığı ve stromal değişiklikleri de değerlendirdiği bir çalışmada perivasküler plazma hücreleri, reaktif lenfoid nodüller, damar dansitesi, retikülin lif varlığı ve osteosklerotik değişiklikler gibi stromal değişiklikleri değerlendirmiştir(130). Bu çalışmada perivasküler plazma hücrelerini hafif artmış olarak saptamış, benzer şekilde reaktif lenfoid folikülleri hafif artmış olarak bulmuş ve sadece 1 vakada çok belirgin lenfoid nodül izlemiştir. Retikülin lif varlığı değerlendirmesinde ise olguların yarısından fazlasında grade 1 retikülin lif artışı izlemiş ve daha az oranda grade 2 ve 3 retikülin lif varlığı tesbit etmiştir. Osteosklerotik değişiklikler açısından yaptığı morfolojik değerlendirmede ise 46 olgunun sadece 12 kadarında hafif trabekül kalınlaşması saptamış, olguların büyük kısmında kemik trabeküllerinin normal morfolojide olduğunu izlemiştir. Damar dansitesi ile ilgili belirgin değişiklik izlememekle birlikte olguların 19 kadarında hafif ve orta şiddette dansite artışı saptamıştır (130). Bizim çalışmamızda damar sayısı ve damar alanı ayrı ayrı değerlendirilmiş ve gerek damar alanı gerekse damar sayısında artışın istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte PMF olgularında daha fazla olduğu saptanmıştır. Çalışmamızda stromal lenfoid nodül MPN olgularında çok nadir izlenmiş literatürde belirtildiği gibi PMF olgularında belirgin bir farklılık göstermemiştir. Perivasküler plazma hücreleri çalışmamızda genel olarak normal sınırlarda izlenmiş, PMF olgularında minimal farkla her üç olgu gurubunda da çok hafif artış saptanmıştır. Thiele'nin çalışmasına benzer şekilde bizim vakalarımızda da stromal retikülin varlığının PMF olgularında büyük oranda grade 2 ve üzerinde olduğu saptanmıştır. Çalışmamızda her üç tanı gurubunda da kemik trabeküllerinin genel olarak normal olduğu izlenmiş ancak PMF olgularında hafif de olsa trabekül genişlemesi tesbit edilmiştir. Çalışmamızda ayrıca osteoblast artışı da değerlendirilmiş ve PMF ve PV olgularında benzer oranlarla ET olgularından görece fazla osteoblast varlığı tesbit

edilmiştir. Bu sonuçlar PV ve özellikle PMF olgularında izlenen artmış retikülin lif varlığının sonucunda beklenebilecek stromal değişikliklerdendir.

Çalışmaya dahil edilen vakalarda tanıdan bağımsız olarak stromal retikülin lif varlığı ile vasküler yapıların sayısı ve olgunluğunu belirleyen immünohistokimyasal parametreler karşılaştırıldığında her üç immünohistokimyasal belirteç ile artmış retikülin lif varlığı ilişkili bulunmuş . Retikülin lif artışı ile damar sayısı ve genişliğinin korele olduğu izlenmiştir. Retikülin lif varlığı, damar sayısı ve alanı arasındaki ilişki literatürde bu her iki stromal değişikliği de bünyesinde bulunduran bir MPN tanısı gurubu olan PMF üzerinde çalışılmıştır. PMF lökoeritroblastozis, gözyaşı damlası şeklinde kırmızı kan hücreleri, kemik iliğinde ve periferde değişik derecelerde artmış fibrozis, splenomegali ve ekstraselüler hematopoez ile karakterize Ph (-) MPN gurubu bir hastalıktır (131,132). Tek küratif tedavi şekli kök hücre transplantasyonudur (133). PMF olgularında sayıca artmış ve anormal morfolojide megakaryositlerin varlığı tanısal açıdan oldukça önemlidir. Megakaryosit artışının biyolojik temelleri henüz açıklanamamıştır ancak bilinen bir nokta vardır ki o da megakaryositlerin lokal olarak salgıladıkları bir takım sitokinlerle kemik iliği fibrozisine ve anjiogeneze neden oldukları gerçeğidir (134). TGF-beta ekstraselüler matriks yapımı, anjiogenez ve fibrozis gelişiminde oldukça önemli bir sitokindir (135). PDGF, basic FGF ve VEGF artmış damar dansitesi ve fibrozisin diğer aracı sitokinleridir (136). Görüldüğü üzere sonuçlar stromal retikülin lif miktarı, damar sayısı ve genişliği arasında uyumlu görünümündedir.

Kronik myeloproliferatif neoplazilerin gerek alt tiplendirmesinin yapılması ve gerekse reaktif granülositik, eritroid ve megakaryositik hiperplaziden ayırmak amacıyla sitogenetik değerlendirmelerin yanı sıra bazı morfolojik kriterlere gereksinim duyulmuş ve MPN gurubu neoplazilerde hastalığa spesifik karakteristik paternler yaratmak amacıyla kemik iliği morfolojik özelliklerini standardize etmek için genel bir eğilim oluşmaya başlamış ve bu tekniğin yeni geliştirilen ilaçların etkisini yansıtan diğer özellikler gibi tedavi ilişkili etkileri tespit etmek için de uygun olduğu sonucuna varılmıştır (137). Bu kapsamda fibrosis varlığı da mutlaka değerlendirilmelidir (138,139,140). Literatürde kemik iliği sellülaritesinin yaşa bağlı olarak değişiklikler gösterdiği vurgulanmış ve (141,142) selülarite yanı sıra

granülositopoez ve eritropoezdeki sola kayma ve matürasyon defektleri, megakaryopoez ve myeloid stromada yani kemik iliği stromasındaki retiküler liflerin varlığı, lenfoid nodüller ve demir depozitlerinin MPN gurubu neoplazilerin ayırımında göz önünde bulundurulması gereken morfolojik özellikler olduğu saptanmıştır (101).

Thiele ve arkadaşlarının çalışmasında selülarite normal, hafif artmış, orta derecede artmış, çok artmış, hafif azalmış, orta derecede azalmış, çok azalmış şeklinde değerlendirilmiş ve böylece değerlendiriciler arası farklılıklar en aza indirilmeye çalışılmış (101). Bahsedilen çalışmada megakaryopoez değerlendirilirken megakaryositlerin boyutu, matürasyon defekti, nükleer lobulasyon ve nükleusun küçülüp kompakt hal alması gibi parametreler göz önünde bulundurulmuştur (101). Thiele ph negatif MPN hastalık gurubunda yaptığı morfolojik değerlendirme ve standardizasyon çalışmasında alt tiplerden bağımsız olarak yaptığı ilk değerlendirmesinde hastaların büyük çoğunluğunda sellülaritede hafif artış izlemiş, bizim çalışmamızda sellülarite ET tanı gurubunda daha az olmak üzere tüm olgularda sellülarite artışı tesbit edilmiştir. PV ve PMF olgularındaki sellülarite artışı benzer oranlardadır. Thiele megakaryosit değerlendirmesinde sıkı ve gevşek kümelenmede hafif artış, mikro ve dev megakaryositlerde her ikisinde de hafif artış ve maturasyon defektinde hafif artış izlerken, nükleer lobulasyonda azalma tesbit etmiştir. Granülositer seride genel olarak maturasyon defekti izlememiş, hafif sola kayma tesbit etmiştir. Eritroid seride ise maturasyon defekti ve sola kayma izlememiştir. Yine stromal değişiklikler üzerindeki morfolojik değerlendirmesinde Thiele retikülin lif artışı, lenfoid nodül veya demir depozitleri artışı açısından anlamlı sonuçlara ulaşamamıştır (101).

Thiele alt tipleri referans alarak yaptığı değerlendirmesinde ise, megakaryositer seride matürasyon defektlerini ağırlıklı olarak PMF olgularında izlemiş, nükleer lobulasyon artışını ise PV ve ET olgularında saptamıştır. Bizim çalışmamızda da benzer şekilde maturasyon defekti PMF olgularında izlenmiş ve nükleer lobulasyon artışı ise PV ve ET olgularında saptanmıştır. Ayrıca megakaryositleri boyut açısından değerlendirdiğinde ET dışındaki MPN olgularında megakaryositlerin küçük boyutlu olduğunu saptamıştır. Bizim çalışmamızda ise genel olarak MPN olgularında %52,3

oranı ile megakaryosit boyutunda hafif artış izlenmiş alt tipler göz önünde bulundurulduğunda ise PMF olgularında megakaryosit boyutunda artışın en fazla oluşu, PV olgularında küçük boyutlu megakaryositlerin hakim olduğu izlenmiş ve ET tanılı hastalarda ise megakaryosit boyutunda anlamlı bir farklılık bulunmadığı saptanmıştır. Bizim çalışmamızda da Thiele'nin değerlendirmesine benzer şekilde megakaryositer seri PMF olgularında belirgin olarak artmış bulunmuştur. Bizim çalışmamızda ayrıca megakaryositlerin lokalizasyonu üzerinde de değerlendirme yapılmış ve megakaryositleri intertrabeküler veya paratrabeküler yerleşimleri açısından da değerlendirilmiştir. Sonuçta megakaryositlerin çok büyük oranda intertrabeküler yerleşim gösterdiğini gözlemlenmiş ve istatistiksel açıdan anlamlı olmamakla birlikte PMF olgularında paratrabeküler lokalizasyonun daha fazla olduğu saptanmıştır (101).

Thiele çalışmasında granülositer seride sadece sola kaymayı değerlendirmiş ve PV olguları ile PMF erken döneminde sola kaymanın bulunduğunu, ET olgularında ise sola kayma bulunmadığını saptamıştır. Bizim çalışmamızda granülositer seri ile ilgili olgunluk, lokalizasyon, matürite ve eozinofil miktarı olmak üzere çok sayıda parametre üzerinde çalışılmış ve olgunluk açısından değerlendirildiğinde başta PMF olmak üzere PMF ve ET olgularında genç formların daha fazla olduğu ancak PV olgularında matur granülositer seri elemanlarının artmış olduğu saptanmıştır. Granülositer seride lokalizasyon açısından yaptığımız değerlendirmede ise genel olarak tüm alt tiplerin intertrabeküler yerleşim gösterdiği izlenmiş, PMF olgularında paratrabeküler lokalizasyonda görece artış saptanmıştır. Eozinofil lökositlerin miktar olarak değerlendirilmesinde istatistiksel açıdan anlamlı olmamakla birlikte ET olgularında %43.5 gibi bir oranla eozinofil lökosit artışı bulunmuştur(101). Thiele çalışmasında eritroid seri ile ilgili olarak sola kayma ve kantiteyi değerlendirmiş ve her iki parametrenin de PV olgularında belirgin olduğunu saptamıştır. Bizim çalışmamızda yine eritroid seride lokalizasyon, olgunluk ve kümelenme gibi çok sayıda parametre üzerinde çalışılmıştır. Eritroid seride olgunluk en fazla PV olgularında izlenmiş, lokalizasyon açısından her üç grupta farklılık bulunmamakta olup eritroid serinin ağırlıklı olarak intertrabeküler yerleşim gösterdiği izlenmiştir. Kümelenme açısından bakıldığında ise PV başta olmak üzere her üç grupta da eritroid seride belirgin kümelenme izlenmiştir (101). Çalışmamızda hakim hücreler

megakaryositer seri, granülositer seri ve eritroid seri olarak yeniden toplam değerler alınarak hesaplanmış ve her serinin hakim olduğu vakalarda retikülin lif artışı, damar sayısı, damar alanı gibi stromal değişiklikler, splenomegali, JAK2 mutasyonu, laboratuvar ve immünohistokimyasal parametrelerin her biri ile karşılaştırılmış ve anlamlılık değerleri üzerinde durulmuştur. Bu şekliyle megakaryosit hakimiyeti gösteren olgularda kemik iliğinde grade 2 ve üzeri retikülin lif varlığı izlenmiş, damar alanında artış saptanmış, damar sayısı, osteoblastik aktivite artışı ve yeni kemik yapımı gibi parametrelerle megakaryosit hakimiyeti arasında istatistiksel açıdan anlamlı olmamakla birlikte hafif de olsa pozitif korelasyon izlenmiştir. Megakaryositer seri hakimiyeti gösteren olgularda periferik kanda trombosit artışı izlenmiş ve stromal damarları değerlendirmek için kullanılan immünohistokimyasal parametrelerle saptanan damar sayısında artış saptanmıştır. Literatürde tanımlandığı şekliyle ET histolojik özellikler açısından oldukça heterojen bir tanı grubudur. Bu nedenle reaktif trombositemi nedenleriyle ve diğer Ph (-) MPN neoplaziler grubu ile sıklıkla ayırıcı tanıya girer. Sellülaritesinin genelde normal olması uyarıcı bir özelliğidir. Megakaryosit artışı ve displazi göstermeyen büyük megakaryositlerin gevşek kümeler oluşturması, trombositeminin belirgin olması gibi nedenlerle özellikle erken dönem PMF ile sıklıkla karışır (128). Thiele ve arkadaşlarının 272 vakalık ET tanılı hasta grubu ile yaptıkları çalışmada, vakaların tekrar değerlendirilmesinde sadece 98'inin gerçek ET olgusu olduğu, 136 vakanın erken dönem, 38 vakanın ise ileri dönem PMF olgusu olduğu sonucuna varılmıştır. Ekip çalışmada özellikle retikülin fibrillerinin varlığı ve megakaryositlerde displazi kriterlerini (hipolobüle bulut benzeri nükleus, çok artmış nükleer lobülasyon, naked nükleus) esas almıştır. Aslında ET tanısı sitolojik ve morfolojik olarak net kriterleri olmayan, trombositemiye neden olan reaktif trombositozların ve diğer MPN grubu neoplazilerin ekarte edilmesi ile verilebilecek bir tanıdır (59). Çalışmamızda da ET olgularında izlenen megakaryositlerin büyük ve matür oldukları, gevşek kümelenmeler yaptıkları ve matürasyon anomalisi göstermedikleri saptanmış, genel olarak grade 1 ve 2 retikülin lif varlığı gösterdikleri izlenmiştir. Bu şekli ile çalışma sonuçlarımız ET olgularına ait literatürde belirtilen özellikler ile uyumludur. Megakaryositik seri PMF olgularında tanısal açıdan anahtar rol oynamaktadır. Displastik megakaryositler en belirgin ve egzajere şekli ile bu tanı grubunda izlenir

(143). Çalışmamızda da PMF olgularında megakaryositer serinin büyük, immatür, sıkı kümeler oluşturur özellikte olduğu ve diğer tanı gruplarına göre paratrabeküler lokalizasyonun daha belirgin olduğu saptanmıştır. PV olguları ile ilgili literatürde megakaryositer serinin morfolojik olarak heterojen özellikte olduğu, irili ufaklı, gevşek kümelenme gösteren artmış megakaryositler bulundurduğu ve bunların bir kısmının displastik özellikte olabildiği vurgulanmıştır. Yine literatürde post-polisitemik dönemde PV olgularının belirgin retikülin lif artışı gösterebildiği bildirilmektedir (101). Çalışmamızda ise PV olgularında megakaryositlerin irili ufaklı benzer boyutlarda olduğu, immatür ve hiperlobüle formların hakim olduğu ve genel olarak gevşek kümelenme gösterdikleri izlenmiştir. Displastik formlar PMF olgularındaki kadar fazla değildir. Retikülin lif artışı açısından değerlendirildiğinde ise grade 2 ve 4 retikülin lif artışı dikkati çekmektedir.

Granülositer seri hakimiyeti gösteren olgularda retikülin lif varlığı, kemik trabekül genişlemesi ve yeni kemik yapımı, osteoblastik aktivite, stromal retikülin lif artışı arasında ilişki saptanmamış, bu olgularda damar sayısında artış ve damar alanında genişleme tesbit edilmiştir. Kemik iliği aralığında granülosit hakimiyeti ile laboratuvar parametrelerinden beyaz küre ve trombositlerin daha belirgin artış gösterdiği izlenmiş ayrıca granülosit hakimiyeti ile CD105 arasında korelasyon izlenmiştir.

Eritroid seri hakimiyeti gösteren olgularda retikülin lif varlığı, splenomegali, kemik trabekül genişlemesi ve yeni kemik yapımı, osteoblastik aktivite, stromal retikülin lif artışı ve damar alanı arasında ilişki saptanmamış, kemik iliği aralığında eritroid seri hakimiyeti ile hemogloblin değerleri arasında pozitif korelasyon izlenmiştir. İmmünohistokimyasal parametreler ile eritroid seri hakimiyeti arasında ters ilişki izlenmiştir. Bu durum damar sayısı ve artışının çok fazla beklenmediği ET olguları için çok da şaşırtıcı bulunmamıştır.

Endoglin (CD105) 180 kDa ağırlığında hücre membran glikoproteini olup, IGF-Beta reseptör kompleksinin komponentidir. Neovaskularizasyonu saptamada önemli bir belirteç olan CD105, tümör anjiogenezinde önemlidir (95). CD105'in kültürde yüksek proliferasyon gösteren kan damarlarında endotelial hücrelerde ekspresyonu artar. Hematopoetik progenitor hücrelerde, fibroblastlarda, stromal ve vasküler düz

kas hücrelerinde ise zayıf ve fokal ekspresyon gösterir (95). İlginç olarak CD105'in immatür morfoloji ve fenotipik karakteristikler gösteren lösemik hücrelerde, normal hematopoetik progenitörlere oranla daha fazla eksprese olduğu saptanmıştır. Luana ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada serum soluble CD105 düzeylerinin MPN vakalarında sağlıklı kontrol grubuna göre belirgin artmış olduğu saptanmıştır. Bu artışın blast sayısı veya beyaz küre ile ilişkisinin olmadığı bulunmuştur. Soluble CD105 seviyelerinde en belirgin artış MPN hastalarından KML de saptanmıştır. ET olgularında sCD105 düzeyleri sağlıklı kontrol grubu ile benzer bulunmuş. Çalışmada sCD105'in AML ve KML hastalarında belirgin artış göstermesi sCD105'in myeloid hematopoetik hücrelerde; özellikle subtiplerin hücre membranlarında belirgin ekspresyon gösterdiğini ortaya koymuştur.(122). Çalışmamızda CD105 miktarı (57.4) ET olgularında, CD34 ile saptanan damar oranına (162.1) göre oldukça düşük seviyelerdedir. Sağlıklı kontrol gurubumuz olmadığından CD105 değerlerinin çalışmamızda sağlıklı insanlardaki düzeyi ile ilgili yorum yapamamakla birlikte mevcut bilgiler eşliğinde ET olgularında diğer ph negatif MPN olgularına oranla damar oranlarında artışın düşük seviyelerde olduğu bilinmektedir. Mevcut çalışmalarda CD105 İmmünohistokimyasal olarak kemik iliğinde çalışılmamış sadece AML ve MPN vakalarında soluble düzeylerine bakılmıştır. Bu bilgiler eşliğinde CD105 ile ilgili daha ileri yorum yapmak mümkün olmamıştır.

PMF philedelphia kromozomu negatif myeloid ve megakaryositik popülasyonun klonal proliferasyonu ile karakterli, kemik iliğinde diğer KMN lere göre daha hızla retikülin artışı ve kollajen fibrozisi ile giden hematopoetik kök hücre neoplazisidir. Fibrojenik natürü yüzünden kemik iliği yetmezliğine gidişin hızlı olduğu, kötü prognozlu bir neoplazidir (123). Hematopoetik hücre serilerinde proliferasyonun yanı sıra kemik iliğinde stromal reaksiyonun da hastalığın patogenezinde önemli olduğu bilinmekte. Hastalığın değişik fazlarında yeni damar oluşumu ve ilerlemiş fazında kemik yapımı (osteosklerozis) izlenmektedir (101). Bu hastalık gurubunun değerlendirilebilmesi amacıyla özellikle yardımcı immünohistokimyasal belirleyici CD146 gibi görünmektedir. Öyle ki son dönemde kemik iliği stromal niçesi ve sellüler içeriği ilgi uyandırmış ve CD146 (MCAM) antikoru çekici kılmıştır. Kemik iliği stromal hücrelerinde ve clonogenic kemik iliği osteoprogenitörlerinde eksprese edilen antikor kemik iliği mikroçevresinde önemli bir role sahiptir. CD146

kemik iliğinde subendotelyal hücrelerde gösterilmiş ve mikro damar oluşumunda anjiopoietin-1 ve CD146'nın endotelyal hücreler üzerinde Tie 2 reseptörü ile etkileşimi gösterilmiştir (96,97). CD146 kemik iliğinde damarların abluminal yüzünde hematopoetik hücreler içine dendirik uzantılar oluşturan hücrelerde pozitif boyama gösterir ve erken evre PMF olarak tanımlanan grade 0 ve 1 olgularda kontrol grubu ile benzer oranlarda çok minimal ekspresyon gösterirken, ileri evre olgularda subendotelyal hücrelerde belirgin ekspresyon izlenir (98). Claudio ve arkadaşlarının 32 PMF vakası üzerinde yaptıkları çalışmada CD146 pozitif hücre sayısı ve kemik iliği stromasındaki fibrozisin derecesi arasında kuvvetli bir ilişki bulunmuş. CD146 pozitif hücre sayısı ve fibrozis derecesinin birlikte aynı zamanda düşük hemoglobin ve trombosit sayıları ile ilişkisi saptanmıştır (98). Fibrozis yaygınlığının istatistiksel olarak anlamı olmamakla birlikte CD146 (+) hücre sayısının PMF tanısında diagnostik risk faktörü olarak kullanılabileceği vurgulanmış. Sonuç olarak CD146 ileri evre PMF'da subepitelyal retiküler hücrelerde eksprese olan bir antikordur. Hem klonojenik osteoprogenitör hücreler üzerine olan etkisi ile fibrozis ve yeni kemik yapımında hem de anjiopoietin-1 /Tie-2 yolu ile kemik iliğinde yeni damar oluşumunda etkili bir antikordur (124). Bizim çalışmamızda da CD146 en yüksek ortalama değer (65.2) ile PMF olgularında bulunmuştur. Yine benzer şekilde retikülin lif artışı ile CD146 arasındaki ilişki p:0.005 ve p:0.006 değerleri ile istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Bu bulgular ve çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar, CD146 pozitif artan damar varlığının neoplazilerin ileri evreleri ile ilişkilendirilebileceğini desteklemektedir.

Endotelyal hücrelerin endotelyal progenitör hücrelerden köken aldığı (EPC)s bilinmekle birlikte bazı çalışmalarda monositlerin endotelyal hücre benzeri hücrelerin orjini olduğu ve bu hücrelerin endotelyal benzeri hücreler olarak adlandırıldığı bilinmektedir (125). Monosit derive multipotansiyel hücreler (MOMC) olarak adlandırılan CD 14(+), CD45 (+) ve CD34(+) monosit sub populasyonlarının endotelyal hücrelerle birçok özelliği benzeyen ELC'nin kaynağı olduğu belirlenmiştir (126). Çalışmamızda CD34 ortalama değerinin diğer bir endotelyal belirteç olan ve daha çok yeni oluşan damarların değerlendirilmesini sağlayan CD105'ten daha yüksek olduğu izlenmiş ve PMF olgularında bu farkın diğer hastalık gruplarına göre daha fazla olduğu saptanmıştır. Kemik iliği mikroçevresi

hematopoetik hücrelerin proliferasyon ve diferansiasyonunda çok önemli bir role sahiptir. Mikroçevre nonhematopoetik stromal hücreleri içerir. Kemik iliğinde hematopoetik progenitör hücreler ve stromal elemanlar sıkı bir ilişki halindedir(127).

Damar sayısı ve matüritesini değerlendirmek amacıyla yapılan immünohistokimyasal parametreler ile retikülin lif artışı, damar sayısı, damar alanı gibi stromal değişiklikler, hematopoetik seriye ait elemanların her biri ve laboratuvar parametreleri arasındaki ilişki değerlendirildiğinde damar alanı genişledikçe CD105 ile saptanan damar sayısının yani genç damar sayısının azaldığı, CD146 ile saptanan matür damarların sayısının ise arttığı saptanmıştır. CD34 ile ise istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte yine damar alanı genişlemesi ile korele olarak CD34 ile sayılan damar sayısının artış gösterdiği izlenmiştir. CD34 ile saptanan damar sayısının osteoblastik aktivite artışı ile korelasyon göstermediği saptanmıştır.

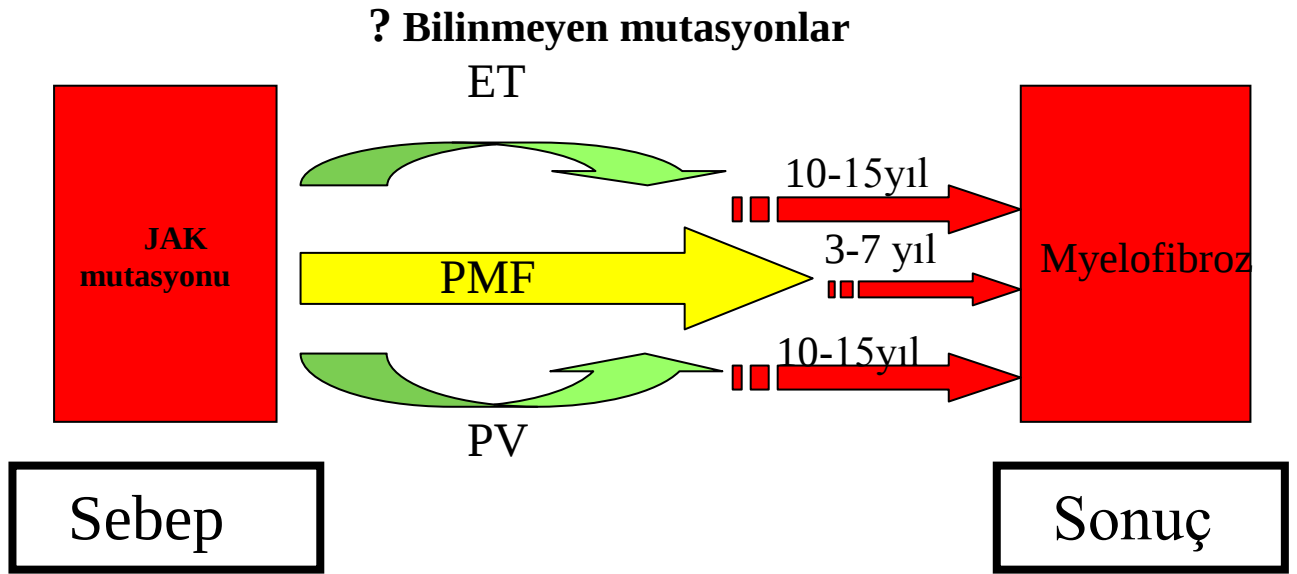
Damar sayısı ile immünohistokimyasal parametreler arasında beklenen doğru orantı izlenmemiştir. Kemik trabeküllerindeki genişlemeye paralel olarak CD105 ile saptanan damar sayısının yani genç damar sayısının ve CD146 ile saptanan matür damarların sayısının arttığı saptanmıştır. CD34 ile ise istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte yine kemik trabekül genişlemesi ile korele olarak CD34 ile sayılan damar sayısının artış gösterdiği izlenmiştir. Osteoblastik aktivite artışı ile paralel olarak CD105 ile saptanan damar sayısının yani genç damar sayısının arttığı saptanmış, CD146 ile ise istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte benzer şekilde osteoblastik aktivite artışı ile korele olarak CD146 ile sayılan damar sayısının artış gösterdiği izlenmiştir. Bulgular karşılaştırmalı olarak değerlendirildiğinde damar sayısındaki artış ve damar alanındaki genişleme, kemik trabeküllerinde kalınlaşma özellikle PMF da görülebilecek özelliklerdir ve yine çalışmamızda immünohistokimyasal her üç belirteç için de en yüksek ortalama değerler PMF olgularında izlenmiştir. Sonuçlar morfoloji ve immünohistokimyanın uyumluluğunu yansıtmaktadır.

6. SONUÇLAR

- 1- Çalışmamızda MPN hasta gruplarında JAK2 mutasyonu varlığı açısından istatistiksel açıdan anlamlı değildir. JAK2 mutasyonu dağılımı hastalık gruplarında benzerlik gösterse de oransal olarak literatürden az bulunmuştur. Bu mutasyonun gerçek dağılımının anlaşılması için mutasyon testlerinin eş zamanlı bu materyallerden yapılması daha sağlıklı bilgi verecektir.
- 2- Splenomegali görülme sıklığı neoplazilerle ilişkili bulunmasa da morfolojik fibrotik değişiklikler ve stromal değişiklikler olan damar sayısı, damar alanı ve yeni kemik yapımı gibi parametrelerle doğru orantılı olarak artış göstermiştir.
- 3- Çalışmamızda laboratuvar bulgularından trombosit düzeyleri hastalık gruplarından ET ile ilişkili bulunmuştur.
- 4- Kemik iliği mikroçevresinde fibrozis arttıkça CD146 pozitif olgun damar oranı artmaktadır.
- 5- Kemik iliği mikroçevresinde MPN lerde gerek damar alanı gerekse damar sayısında artış istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte PMF olgularında daha fazladır.
- 6- Kemik iliği mikroçevresi değişikliklerine sebep olan damar sayısı artışı, damar alanında genişleme ve yeni kemik yapımı gibi parametreler tanıdan bağımsız olarak splenomegali ile ilişkilidir.
- 5- Kemik iliği fibrozis düzeyi artışı ile kemik iliği mikroçevresinde vasküler artış, olgun ve genç damar artışı paralellik göstermektedir.
- 6- Megakaryositer seri hakimiyeti gösteren olgularda periferik kanda trombosit artışı ve kemik iliği stromal değişiklikleri arasındaki vasküler yapıların artışı paralellik göstermesi, kemik iliği mikroçevresini en fazla etkileyen hücrelerin megakaryositler olduğunu desteklemektedir.
- 7- Megakaryosit morfolojik değişiklikleri literatürde tanımlandığı şekilde hastalık grupları ile genellikle uyum gösterdiği için değerlendirmede faydalıdır. Ancak hiçbir hastalık grubuna özgü değildir.
- 8- Kemik iliği aralığında granülosit hakimiyeti ile mikroçevrede artış gösteren CD105 pozitif yeni damar oluşumu ilişkilidir. Bu durum granülositer seri

artışının kemik iliği mikroçevresi şekillenmesinde önemi olduğunu desteklemektedir.

- 9- Eritroid seri hücreleri kemik iliği mikroçevresi üzerine en az etkisi olan hücrelerdir.
- 10- Damar alanı genişlemesi ve CD146 ile saptanan olgun damar sayısı artışı. kemik iliğinde fibrozisin ilerlemesini yansıtan bulgulardır.
- 11- Serimizde ET için sellülaritenin düşük olması diğer ph negatif MPN grubu neoplazilerin ayırıcı tanısında önemli belirteçlerdendir.
- 12- Mevcut araştırmalar ve çalışmamızdan çıkardığımız sonuçlar, philadelphia negatif MPN gurubu bu üç neoplazinin aslında aynı hastalığın farklı dönemlerine ait klinik ve morfolojik yansımaları olabileceği konusunda ciddi şüpheler doğurmuştur. Bunun anlaşılması için JAK2 mutasyonu profili ve başka bilinmeyen mutasyonların incelenmesinin yararlı olacağı sonucuna varılmıştır.



Şekil 7.1: Ph Negatif MPN grubu üç hastalıkta patogenezi, süreç ve sonuç ilişkili hipotez şeması

7. ÖZET

Bcr-abl (Ph kromozomu) negatif kronik myeloproliferatif neoplazilerdeki kemik iliği mikroçevresi özelliklerinin bu neoplazilerin ayırıcı tanısındaki önemi

AMAÇ: Çalışmada klinik, laboratuvar , morfolojik ve sitogenetik olarak örtüşen Ph (-) MPN gurubu neoplazilerde ayırıcı tanıya sadece morfolojik bulgularla gitmenin mümkün olmadığını, klinik, laboratuvar parametrelerin ve sitogenetik verilerin, granülositik, megakaryositik ve eritroid seriyi ilgilendiren morfolojik özellikler ve damar sayısı, damar alanı, lenfoid nodül varlığı, stromal retikülün lif varlığı, perivasküler plazma hücreleri gibi stromal değişikliklerle birlikte değerlendirilmesinin alt tiplendirme amacıyla ne derece faydalı olabileceğini araştırmak amaçlanmıştır.

MATERYAL- METOD: 2000-2010 yılları arasında Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda raporlanmış Ph (-) kronik myeloproliferatif neoplaziler arasında, 23 esansiyel trombositemi (ET), 15 polisitemia vera (PV) ve 27 primer myelofibrozis (PMF) tanısı alan toplam 65 olgu çalışmaya dahil edilmiştir. Hastane bilgi sisteminden ve dosya arşivinden çalışmaya dahil edilen olguların yaş, cinsiyet, tanı, Jak-2 mutasyon analizi sonuçları, tanı anındaki laboratuvar bulguları, splenomegali varlığı bilgileri elde edilmiştir. Kemik iliği biyopsi örneklerinin H.E kesitleri belirlenen morfolojik kriterler eşliğinde ışık mikroskopik olarak yeniden değerlendirilmiş ve biyopsi örneklerine immünohistokimyasal olarak CD34, CD105 ve CD146 antikorları uygulanmıştır.

SONUÇ VE YORUM: Klinik, laboratuvar, morfolojik ve moleküler olarak çok fazla benzerlik gösteren ve örtüşen Ph negatif MPN gurubu neoplazilerden PV, ET ve PMF ayırımında güçlük bulunmaktadır. Morfolojik ve mikroçevre ile ilgili parametreler tek başına yeterli değildir. İncelediğimiz pek çok parametrenin tanısal belirleyici olmaması, philadelphia negatif MPN gurubu bu üç neoplazinin aslında aynı hastalığın farklı dönemlerine ait klinik ve morfolojik yansımaları olabileceği konusunda ciddi şüpheler doğurmuştur. Mevcut düşüncenin desteklenmesi amacıyla daha ileri morfolojik ve sitogenetik çalışmalar planlanmaktadır.

Anahtar Kelimeler: MPN, Bcr-abl, JAK2 mutasyonu, morfolojik parametreler, mikroçevre

8. SUMMARY

The signature of bone marrow microenvironment for differential diagnosis in Bcr-abl negative myeloproliferative neoplasms

PURPOSE: The value of vascular and other microenvironment characteristics of bone marrow on differential diagnosis of Philadelphia chromosome negative myeloproliferative neoplasies including PV, ET and PMF was the main aim of this study.

MATERIALS AND METHODS: 23 ET, 15 PV and 27 PMF total of 65 Philadelphia chromosome negative myeloproliferative neoplasm cases diagnosed in Ankara University, Faculty of Medicine, Department of Pathology, between 2000-2010 have been included in the study. The cases of the study's age, sex, diagnosis, JAK2 mutation analyses, laboratory findings and splenomegaly parameters were taken from hospital information system. The bone marrow H.E sections were re-examined with some morphologic parameters. The biopsy specimens were stained by CD34, CD105 and CD146.

RESULTS AND CONCLUSION: The Ph (-) MPN such as ET, PV and PMF with overlapping clinical and molecular characteristics can not be differentiated by the morphologic and bone marrow microenvironment parameters. The difficulty on describing a characteristic diagnostic parameter for ET, PMF and PV can be clarified by the hypothesis of considering the Philadelphia chromosome negative MPN as a spectrum of one disease. To prove this hypothesis more detailed further molecular examinations are essential.

Key Words: MPN, Bcr-abl chromosome, JAK2 mutation, morphologic parameters, microenvironment

9. KAYNAKLAR

1. Bain B, Clark DM, Lampert IA, Wilkins BS. *Bone Marrow Pathology*. Oxford, UK: Blackwell Science, 2001: 1-50.
2. De Bruyn PPH. Structural substrates of bone marrow function. *Semin Hematol* 1981; 18: 179-193.
3. Kerndrup G, Pallesen Gi Melsen F, Mosekilde L. Histomorphometric determination of bone marrow cellularity in iliac crest biopsies. *Scan J Haematol* 1980; 24: 110-114.
4. Al-Adhahd AN, Cavill I. Assessment of cellularity in bone marrow fragments. *J Clin Pathol* 1983; 36: 176-179.
5. Hartsock RJ, Smith EB, Petty CS. Normal variations with ageing of the amount of hematopoietic tissue in bone marrow from the anterior iliac crest; a study made from 177 cases of sudden death examined by necropsy. *Am J Clin Pathol* 1965; 43: 326-331.
6. James D. Cotelingam. Bone marrow biopsy: Interpretive guidelines for the surgical pathologist. *Adv Anat Pathol* 2003; 10: 8-26.
7. Meunier P, Aaron J, Edouard C, Vignon G. Osteoporosis and the replacement of cell populations of the marrow by adipose tissue. *Clin Orthop* 1971; 80: 147-154.
8. Byron PA, Gentilhomme O, Fiere D. Étude histologique quantitative du volume et de l'hétérogénéité des adipocytes dans les insuffisance myéloïdes globales. *Pathol Biol (Paris)* 1979; 27: 209-213.
9. Bain BJ. The bone marrow aspirate in healthy subjects. *Br J Haematol* 1996; 94: 206-209.

10. Queisser U, Queisser W, Spiertz B. Polyploidization of megakaryocytes in normal humans and patients with idiopathic thrombocytopenia and with pernicious anaemia. *Br J Haematol* 1971; 20: 489-501.
11. Tavassoli M, Aoki M. Localization of megakaryocytes in the bone marrow. *Blood Cells* 1989; 15: 3-14.
12. Thiele J, Fischer R. Megakaryocytopoiesis in human disorders: diagnostic features of bone marrow biopsies. An overview. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1991; 418: 87-97.
13. Ohnstone JM. The appearance and significance of tissue mast cells in the human marrow. *J Clin Pathol* 1954; 7: 275-280.
14. Rosse C, Kraemer MJ, Dillon TL, McFarland R, Smith NJ. Bone marrow cell populations of normal infants: the predominance of lymphocytes. *J Lab Clin Med* 1977; 89: 1225-1240.
15. Thaler J, Greil R, Dietze O, Huber H. Immunohistology for quantification of normal bone marrow lymphocyte subsets. *Br J Haematol* 1989; 73: 576-577.
16. Steiner ML, Pearson HA. Bone plasmacytic values in children. *J Pediatr* 1966; 68: 562-568.
17. McCulloch EA. Stem cell renewal and determination during clonal expansion in normal and leukaemic haemopoiesis. *Cell Prolif* 1993; 26:399-425.
18. Tefferi A. Chronic myeloid disorders: Classification and treatment overview. *Semin Hematol* 2001; 38:1-4.
19. Kouides PA, Bennett JM. Morphology and classification of the myelodysplastic syndromes and their pathologic variants. *Semin Hematol* 1996; 33:95-110.

20. Raza A, Alvi S, Broady-Robinson L et al. Cell cycle kinetic studies in 68 patients with myelodysplastic syndromes following intravenous iodo- and/or bromodeoxyuridine. *Exp Hematol* 1997; 25:530-535.
21. Uptodate; Last literature review version 16.1. Overview of myeloproliferative disorders.

Eriřim:www.utdol.com/online/content/image.do;jsessionid=1280D9CD9E6694EB912AE0AD28533ABF.1004?imageKey=hema_pix/organiza.htm&title=Organization heme malignancies; Eriřim tarihi: 14.10.2008.
22. Dickstein JI, Vardiman JW. Hematopathologic findings in the myeloproliferative disorders. *Semin Oncol* 1995; 22:355-373.
23. Champion KM, Gilbert JG, Asimakopoulos FA et al. Clonal haemopoiesis in normal elderly women: Implications for the myeloproliferative disorders and myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol* 1997; 97:920-926.
24. Levine RL, Belisle C, Wadleigh M et al. X-inactivation-based clonality analysis and quantitative JAK2V617F assessment reveal a strong association between clonality and JAK2V617F in PV but not ET/MMM, and identifies a subset of JAK2V617F-negative ET and MMM patients with clonal hematopoiesis. *Blood* 2006; 107: 4139-4141.
25. Rumi E, Passamonti F, Della Porta MG et al. Familial chronic myeloproliferative disorders: clinical phenotype and evidence of disease anticipation. *J Clin Oncol* 2007; 25:5630-5635.
26. Faderl S, Kantarjian HM, Talpaz M. Chronic myelogenous leukemia: *update on biology and treatment. Oncology (Williston Park)*. 1999;13:169-180.
27. Lichtman MA, Liesveld JL. Chronic myelogenous leukemia and related disorders. In: Lichtman MA, Beutler E, Kipps TJ, Seligshon U, Kaushansky K, Prchal JT, Eds. *Williams Hematology*, New York: McGraw-Hill; 2006:1237-1294.

28. Harrison CN. Current trends in essential thrombocythaemia. *Br J Haematol* 2002; 117:796-808.
29. Schafer AI. Essential Thrombocythemia and Thrombocytosis. In: Lichtman MA, Beutler E, Kipps TJ, Seligshon U, Kaushansky K, Prchal JT, Eds. *Williams Hematology*, New York: McGraw-Hill, 2006: 1785-1794.
30. Pietra D, Li S, Brisci A, et al. Somatic mutations of JAK2 ekzon 12 in patients with JAK2 (V617F)- negative myeloproliferative disorders. *Blood* 2008; 111:1686-1689. 52
31. Lichtman MA, Idiopathic Myelofibrosis (Myelofibrosos with Myeloid Metaplasia. In: Lichtman MA, Beutler E, Kipps TJ, Seligshon U, Kaushansky K, Prchal JT, Eds. *Williams Hematology*, New York: McGraw-Hill, 2006; 1295-1313.
32. Tefferi A, Thiele J, Orazi A et al. Proposals and rationale for revision of the World Health Organization diagnostic criteria for polycythemia vera, essential thrombocythemia, and primary myelofibrosis: recommendations from an ad hoc international expert panel. *Blood* 2007; 110:1092-1097.
33. Tefferi A, Pardanani A. Evaluation of "increased" hemoglobin in the JAK2 mutations era: A diagnostic algorithm based on genetic tests. *Mayo Clin Proc* 2007; 82:599-604.
34. Najean Y, Rain JD. The very long-term evolution of polycythemia vera — an analysis of 318 patients initially treated by phlebotomy or P-32 between 1969 and 1981. *Semin Hematol* 1997; 34:6-16.
35. Landolfi R, Marchioli R, Patrono C. Mechanisms of bleeding and thrombosis in myeloproliferative disorders. *Thromb Haemost* 1997; 78:617-621.
36. Van Genderen PJ, Lucas IS, van Strik R et al. Erythromelalgia in essential thrombocythemia is characterized by platelet activation and endothelial cell damage but not by thrombin generation. *Thromb Haemost* 1996; 76:333-338.

37. Rozman C, Giralt M, Feliu E et al. Life expectancy of patients with chronic nonleukemic myeloproliferative disorders. *Cancer* 1991; 67:2658-2663.
38. Mesa RA, Niblack J, Wadleigh M et al. The burden of fatigue and quality of life in myeloproliferative disorders (MPDs): an international internet-based survey of 1179 MPD patients. *Cancer* 2007; 109:68-76.
39. Siitonen T, Zheng A, Savolainen ER, Koistinen P. Spontaneous granulocyte-macrophage colony growth by peripheral blood mononuclear cells in myeloproliferative disorders. *Leuk Res* 1996; 20:187- 195.
40. Silva M, Richard C, Benito A et al. Expression of Bcl-x in erythroid precursors from patients with polycythemia vera. *N Engl J Med* 1998; 338:564-571.
41. Kiladjian JJ, Elkassar N, Hetet G et al. Study of the thrombopoietin receptor in essential thrombocythemia. *Leukemia* 1997; 11:1821-1826.
42. Pitcher L, Taylor K, Nichol J et al. Thrombopoietin measurement in thrombocytosis: Dysregulation and lack of feedback inhibition in essential thrombocythemia. *Br J Haematol* 1997; 99:929-932.
43. Prchal JT, Beutler E. Primary and Secondary Polycythemias (Erythrocytosis). In: Lichtman MA, Beutler E, Kipps TJ, Seligshon U, Kaushansky K, Prchal JT, Eds. *Williams Hematology*, New York: McGraw-Hill, 2006:779-802.
44. Villeval JL, Cohensolal K, Tulliez M et al. High thrombopoietin production by hematopoietic cells induces a fatal myeloproliferative syndrome in mice. *Blood* 1997; 90:4369-4383.
45. Martyre MC. TGF-beta and megakaryocytes in the pathogenesis of myelofibrosis in myeloproliferative disorders. *Leuk Lymphoma* 1995; 20:39-44.
46. Teofili L, Martini M, Luongo M et al. Overexpression of the polycythemia rubra vera-1 gene in essential thrombocythemia. *J Clin Oncol* 2002; 20:4249-4254.

48. Ania BJ, Suman VJ, Sobell JL et al. Trends in the incidence of polycythemia vera among Olmsted county, Minnesota residents, 1935-1989. *Am J Hematol* 1994; 47:89-93.
49. Berk PD, Goldberg JD, Donovan PB et al. Therapeutic recommendations in polycythemia vera based on Polycythemia Vera Study Group protocols. *Semin Hematol* 1986; 23:132-143.
50. Spivak JL, Silver RT. The revised World Health Organization diagnostic criteria for polycythemia vera, essential thrombocytosis, and primary myelofibrosis: an alternative proposal. *Blood* 2008; 112: 231-239.
51. Acharya J, Westwood AJ, Sawyer BM, et al. Identification of latent myeloproliferative disease in patients with Budd-Chiari syndrome using X-chromosome inactivation patterns and in vitro erythroid colony formation. *Eur J Haematol* 1995; 55:315-321.
52. Michiels JJ, van Genderen PJ, Jansen PH, Koudstaal PJ. Atypical transient ischemic attacks in thrombocythemia of various myeloproliferative disorders. *Leuk Lymphoma* 1996; 1 65-70.
53. Steinman HK, Kobza-Black A, Lotti TM, et al. Polycythaemia rubra vera and water-induced pruritus: Blood histamine levels and cutaneous fibrinolytic activity before and after water challenge. *Br J Dermatol* 1987; 116:329-333.
54. Jackson N, Burt D, Crocker J, Boughton B. Skin mast cells in polycythaemia vera: Relationship to the pathogenesis and treatment of pruritus. *Br J Dermatol* 1987; 116:21-29.
55. Sirhan S, Fairbanks VF, Tefferi A. Red cell mass and plasma volume measurements in polycythemia: evaluation of performance and practical utility. *Cancer* 2005; 104:213-215.
56. Michiels JJ, Juvonen E. Proposal for revised diagnostic criteria of essential thrombocythemia and polycythemia vera by the thrombocythemia vera study group. *Semin Thromb Hemost* 1997; 23: 339- 347.

57. Thiele JM, Kvasnicka HM. Diagnosis of polycythemia vera based on bone marrow pathology. *Curr Hematol Rep* 2005; 4:218-223.
58. Landolfi R, Di Gennaro L, Barbui T, De Stefano V, Finazzi G, Marfisi R, Tognoni G, Marchioli R. European Collaboration on Low-Dose Aspirin in Polycythemia Vera (ECLAP): Leukocytosis as a major thrombotic risk factor in patients with polycythemia vera. *Blood* 2007;109:2446-2452.
59. Tefferi A, Spivak JL. Polycythemia vera: scientific advances and current practice. *Semin Hematol* 2005; 42:206-220.
60. Tefferi A, Lasho TL, Schwager SM et al. The clinical phenotype of wild-type, heterozygous, and homozygous JAK2V617F in polycythemia vera. *Cancer* 2006; 106:631-635.
61. Finazzi G, Caruso V, Marchioli R, et al. Acute leukemia in polycythemia vera: an analysis of 1638 patients enrolled in a prospective observational study. *Blood* 2005; 105:2664-2670.
62. Gangat N, Strand J, Li CY, et al. Leucocytosis in polycythaemia vera predicts both inferior survival and leukaemic transformation. *Br J Haematol*, 2007; 138:354-358.
63. Gangat N, Strand J, Li CY, et al. Leucocytosis in polycythaemia vera predicts both inferior survival and leukaemic transformation. *Br J Haematol*, 2007; 138:354-358.
64. Pardanani AD, Levine RL, Lasho T, et al. MPL515 mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: a study of 1182 patients. *Blood* 2006; 108:3472-3476.
65. El-Kassar N, Hetet G, Briere J, Grandchamp B. Clonality analysis of hematopoiesis and thrombopoietin levels in patients with essential thrombocythemia. *Leuk Lymphoma* 1998; 30:181-188.

66. Hirayama Y, Sakamaki S, Matsunaga T, et al. Concentrations of thrombopoietin in bone marrow in normal subjects and in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura, aplastic anemia, and essential thrombocythemia correlate with its mRNA expression of bone marrow stromal cells. *Blood* 1998; 92:46-52.
67. Mesa RA, Silverstein MN, Jacobsen, SJ et al. Population-based incidence and survival figures in essential thrombocythemia and agnogenic myeloid metaplasia: an Olmsted County Study, 1976-1995. *Am J Hematol* 1999; 61:10-15.
68. Fenaux P, Simon M, Caulier MT et al. Clinical course of essential thrombocythemia in 147 cases. *Cancer* 1990; 66:549-556.
69. Rozman C, Giralt M, Feliu E, et al. Life expectancy of patients with chronic nonleukemic myeloproliferative disorders. *Cancer* 1991; 67:2658-2663.
70. Tefferi A, Fonseca R, Pereira DL, Hoagland HC. A long-term retrospective study of young women with essential thrombocythemia. *Mayo Clin Proc* 2001; 76:22-28.
71. Iland H, Laszlo J, Murphy S. Essential thrombocythemia. In: Wasserman LR, Berk PD, Berlin NI, Eds. *Polycythemia Vera and the Myeloproliferative Disorders*, Philadelphia: Saunders, 1995:292.
72. Teofili L, Martini M, Luongo M, et al. Overexpression of the polycythemia rubra vera-1 gene in essential thrombocythemia. *J Clin Oncol* 2002; 20:4249-4254.
73. Tefferi A, Lasho TL, Wolanskyj AP, Mesa RA. Neutrophil PRV-1 expression across the chronic myeloproliferative disorders and in secondary or spurious polycythemia. *Blood* 2004; 103:3547-3548.
74. Schafer AI. Molecular basis of the diagnosis and treatment of polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Blood* 2006; 107:4214-4222.

75. Gangat N, Wolanskyj AP, Schwager SM et al. Estrogen-based hormone therapy and thrombosis risk in women with essential thrombocythemia. *Cancer* 2006; 106:2406-2411.
76. Gangat N, Wolanskyj AP, McClure RF et al. Risk stratification for survival and leukemic transformation in essential thrombocythemia: a single institutional study of 605 patients. *Leukemia* 2007; 21:270-276.
77. Passamonti F, Rumi E, Pungolino E et al. Life expectancy and prognostic factors for survival in patients with polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Am J Med* 2004; 117:755-761.
78. Cortelazzo S, Viero P, Finazzi G, D'Emilio A, Rodeghiero F, Barbui T. Incidence and risk factors for thrombotic complications in a historical cohort of 100 patients with essential thrombocythemia. *J Clin Oncol.* 1990; 8:556-62.
79. Tefferi A. Risk-based management in essential thrombocythemia. ASH Education Program Book. *Hematology* 1999; :172.
80. Carobbio A, Finazzi G, Guerini V et al. Leukocytosis is a risk factor for thrombosis in essential thrombocythemia: interaction
81. Michiels JJ, Koudstaal PJ, Mulder AH et al. Transient neurologic and ocular manifestations in primary thrombocythemia. *Neurology* 1993; 43:1107-1110.
82. Randi ML, Fabris F, Cella G et al. Cerebral vascular accidents in young patients with essential thrombocythemia: relation with other known cardiovascular risk factors. *Angiology* 1998; 49:477-481.
83. Mesa RA, Verstovsek S, Cervantes F et al. Primary myelofibrosis (PMF), post polycythemia vera myelofibrosis (post-PV MF), post essential thrombocythemia myelofibrosis (post-ET MF), blast phase PMF (PMF-BP): Consensus on terminology by the international working group for myelofibrosis research and treatment (IWG-MRT). *Leuk Res* 2007; 31:737-740.

84. Tefferi A. Myelofibrosis with myeloid metaplasia. *N Engl J Med* 2000; 342:1255-1265.
85. Visani G, Finelli C, Castelli U et al. Myelofibrosis with myeloid metaplasia: Clinical and hematological parameters predicting survival in a series of 133 patients. *Br J Haematol* 1990; 75:4-9.
86. Barosi G, Ambrosetti A, Finelli C, Grossi A, Leoni P, Liberato NL, Petti MC; Pogliani E, Ricetti M, Rupoli S, Visani G, Tura S. The Italian Consensus Conference on Diagnostic Criteria for Myelofibrosis with Myeloid Metaplasia
87. Smith RE, Chelmowski MK, Szabo EJ. Myelofibrosis: A review of clinical and pathologic features and treatment. *Crit Rev Oncol Hematol* 1990; 10:305-314.
88. Bartlett RP, Greipp PR, Tefferi A et al. Extramedullary hematopoiesis manifesting as a symptomatic pleural effusion. *Mayo Clin Proc* 1995; 70:1161-1164.
89. Loewy G, Mathew A, Distenfeld A. Skin manifestation of agnogenic myeloid metaplasia. *Am J Hematol* 1994; 45:167-170.
90. Guglielmelli P, Pancrazzi A, Bergamaschi G et al. Anaemia characterises patients with myelofibrosis harbouring Mpl(W515L/K) mutation. *Br J Haematol* 2007; 137:244-247.
91. Barosi G, Viarengo G, Pecci A, Rosti V. Diagnostic and clinical relevance of the number of circulating CD34(+) cells in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Blood* 2001; 98:3249-3255.
92. Mesa RA, Li CY, Ketterling RP et al. Leukemic transformation in myelofibrosis with myeloid metaplasia: a single-institution experience with 91 cases. *Blood* 2005; 105:973-977.

93. Dupriez B, Morel P, Demory JL et al. Prognostic factors in agnogenic myeloid metaplasia: A report on 195 cases with a new scoring system. *Blood* 1996; 88:1013-1018.
94. Cervantes F, Barosi G, Demory JL, Reilly J, Guarnone R, Dupriez B, Pereira A, Montserrat E. Myelofibrosis with myeloid metaplasia in young individuals: disease characteristics, prognostic factors and identification of risk groups. *Br J Haematol.* 1998;102:684-690.
95. Haruta and Seon, 1986; Gaugos and Letarte, 1988; Burrows et al.,1995 (kumar et al.,1999; Takahashi et al., 2001
96. Sacchetti B, Funari A, Michienzi S, Di cesare S, Piersanti S, Saggio I, self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment. *Cell* 2007, 131:324-36
97. Sorrentino A, Ferracin M, Castelli G, Biffoni M, Tomaselli G, Baiocchi M, isolation and characterzation of CD146 + multipotent mesenchymal stromal cells. *Exp Hematol* 2008; 36:1035-46 7.
98. Claudio T, Adrea D, Maria P, Carlo G, CD146 bone marrow osteoprogenitors increase in the advanced stages of primary myelofibrosis. *Hematologica* 2009; 94:127-130
99. Selçuk Sözer, Takefumi İshii, Maria Isabel Fiel Wei Zhang Human CD34 positive cells are capable of generating normal and JAK2V617F positive emdothelial like cells in vivo. *Blood cells, Molecules AND Disease* 43 2009; 304-312.
100. J. J. Michiels, Z. Bernema, D. Van Bockstaele, H. De Raeve, W. Schroyens. Current dianostic criteria for the chronic myeloproliferative disorders (MPD) essential thrombocythemia (ET), polycythemia vera (PV), and chronic idiopathic myelofibrosis (CIMF) *Science Direct* 2007; 55:92-104

101. Thiele J, Kvasnicka HM. Hemathopathologic findings in chronic idiopathic myelofibrosis. *Semin oncal* 2005; 32:380-94
102. Michiels J.J. and Thiele J. Clinical and pathological criteria for the diagnosis of essential thrombocythemia, polycythemia vera, and idiopathic myelofibrosis. *Int.J. Hemathol* 2002; 76, 133-145.
103. Thiele and Kvasnicka H.M. Chronic myeloproliferative disorders with thrombocythemia: a comparative study of two classification systems (PVSG, DSÖ) on 839 patients. *Ann. Hematol* 2003; 82, 148-152.
104. Florena A.M., Tripodo C., Iannitto E., Porcasi R., Ingrao S. And Franco V. Value of bone marrow biopsy in the diagnosis of essential thrombocythemia. *Haematologica* 2004; 89, 911-919.
105. Acharya J, Westwood AJ, Sawyer BM, et al. Identification of latent myeloproliferative disease in patients with Budd-Chiari syndrome using X-chromosome inactivation patterns and in vitro erythroid colony formation. *Eur J Haematol* 1995; 55:315-321
106. Levine RL, Pardanani A, Tefferi A, Gilliland DG. Role of JAK2 in the pathogenesis and therapy of myeloproliferative disorders. *Nat Rev Cancer* 2007; 7:673-83.
107. Speletas M, Katodritou E, Daiou C, Mandala E, Papadakis E, Kioumi A, Ritis K, Korantzis I. Correlations of JAK2-V617F mutation with clinical and laboratory findings in patients with myeloproliferative disorders. *Leuk Res.* 2007; 31:1053-62
108. Pitcher L, Taylor K, Nichol J et al. Thrombopoietin measurement in thrombocytosis: Dysregulation and lack of feedback inhibition in essential thrombocythemia. *Br J Haematol* 1997; 99:929-932.
109. Scott LM, Tong W, Levine RL et al. JAK2 ekzon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis. *N Engl J Med* 2007; 356:459-468.

110. Gruppo Italiano Studio Policitemia. Polycythemia vera: the natural history of 1213 patients followed for 20 years. *Ann Intern Med* 1995; 123:656-664.
111. Pardanani AD, Levine RL, Lasho T, et al. MPL515 mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: a study of 1182 patients. *Blood* 2006; 108:3472-3476.
112. El-Kassar N, Hetet G, Briere J, Grandchamp B. Clonality analysis of hematopoiesis and thrombopoietin levels in patients with essential thrombocythemia. *Leuk Lymphoma* 1998; 30:181-188.
113. Hirayama Y, Sakamaki S, Matsunaga T, et al. Concentrations of thrombopoietin in bone marrow in normal subjects and in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura, aplastic anemia, and essential thrombocythemia correlate with its mRNA expression of bone marrow stromal cells. *Blood* 1998; 92:46-52.
114. Dai CH, Krantz SB, Dessypris EN et al. Polycythemia vera. II. Hypersensitivity of bone marrow erythroid, granulocyte-macrophage, and megakaryocyte progenitor cells to interleukin-3 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 1992; 80:891-899.
115. James C, Ugo V, Le Couedic JP et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature* 2005; 434:1144-1148
116. Ishii T, Bruno E, Hoffman R, Xu M. Involvement of various hematopoietic cell lineages by the JAK2V617F mutation in polycythemia vera. *Blood* 2006; 108:3128-3134.
117. Toyama K, Karasawa M, Yamane A et al. JAK2-V617F mutation analysis of granulocytes and platelets from patients with chronic myeloproliferative disorders: advantage of studying platelets. *Br J Haematol* 2007; 139:64-69.
118. Steensma DP, Dewald GW, Lasho TL et al. The JAK2 V617F activating tyrosine kinase mutation is an infrequent event in both "atypical"

- myeloproliferative disorders and myelodysplastic syndromes. *Blood* 2005; 106:1207-1209
119. Sirhan S, Fairbanks VF, Tefferi A. Red cell mass and plasma volume measurements in polycythemia: evaluation of performance and practical utility. *Cancer* 2005; 104:213-215..
 120. Pietra D, Li S, Brisci A, et al. Somatic mutations of JAK2 ekzon 12 in patients with JAK2 (V617F) negative myeloproliferative disorders. *Blood* 2008; 111:1686-1689.
 121. Stefan O. Ciurea, Delwin Merchant Nadim Mahmud, Takefumi Ishii, Yan Zhao. Pivotal contributions of megakaryocytes to the biology of idiopathic myelofibrosis. *Am Society of Hematology*. 2007;110: 986-993
 122. Luana C, Ester F, Giacoma B, J. *Cell Physiol* 2002; 194:171-175
 123. Tefferi A, Vardiman JW, Classification and diagnosis of myeloproliferatif neoplasms: the 2008 Worl Health Organization criteria and and point of care diagnostic algorithms. *Leukemia* 2008;22:14-22
 124. Gianelli J, Vener C, Ravielli FR, Savi F, Somalvico F, Calori R. VEGF expression corralates with microvessel density in philadelphia chromosome negative chronic myeloproliferative disorders. *Am J Clin Pathol* 2007; 128:966-73
 125. T.Asahara, T.Murahara, A.Sullivan isolation of putatie progenitor endothelial progenitor cell trafficking in patients with myeloproliferative diseases, *Hematologica* 91 2006; 1465-1472
 126. M.Kuwara, Y.Okazaki, H.Kodama, T:Sotoh, Y.Kawakami, Y.Ikeda. endothelial differantiation potential of human monocyte derived multipotential cells, *stemcells n* 2006; 24: 2733-2743

127. Cashman J, Eaves AC, Eaves CJ: regulated proliferation of primitive hematopoietic progenitors in long –term human marrow cultures. *Blood* 1985; 66:1002- 1009
- 128 J. Thiele and H.M. Kvasnicka. Diagnostic differentiation of essential thrombocythemia with chronic idiopathic yelofibrosis by discriminate analysis of bone marrow features- a clinicopathological study on 272 patients. *Histol histopathol* 2003; 18:93-102.
129. Cashman J. Eaves A.C, Eaves C.J: Regulated proliferation of primitive mematopoetic progenitors in long-term human marrow cultures. *Blood* 1985; 66:1002,
130. J. Thiele,H.M. Kvasnica, G. Zerhusen..Acute panmyelosis with myelofibrosis: a clinicopathological study on 46 patients including histochemistry of bone marrow biopsies and follow-up. *Ann Hematol* 2004; 83:513-521
131. Heuck G., Zwei Falle von Leukemia mit eigen-thumlichen Blutreps. Knochenmarksbefund. *Arch Pathol Anat Physiol Virchows*.1879;78:475-596
132. Hoffman R., Baker K. R., Prchal J. T., *The Polysitemias* . Churchill Livinstone. 2004: 1209–1245
133. Rondelli D., Barsi G, Bacigalupo A.Allogenic hematopoietic stem-cell transplantation wiht reduced-intensity conditioning in intermediate or high risk patients with myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Blood*.2005;105:4115-4119
134. Rameshwar P, Denny T. N, Stein D, Monosyt adhesion in patients with bone marrow fibrosis is required for the production of fibrogenic cytokines:potential role of interleukin- 1 and TGF- beta. *J Immunol*. 1994;153:2819-2830
135. Bertolino P, Deckers M, Lebrin F, Dijke P. Transforming growth factor beta signal transduction in angiogenesis and vascular disorders. *Chest*. 2005; 128:585-590

136. Bock O, Loch G, Busche G, Wasielewski R, Schlue J, Kreipe H. Aberrant expression of platelet derived growth factor (PDGF) and PDGF receptor- α is associated with advanced bone marrow fibrosis in idiopathic myelofibrosis. *Haematologica*. 2005;90:133-134
137. Thiele J, Kvasnicka H.M., Werden C., Zankovich R., Diehl V. And Fischer R. Idiopathic primary osteo-myelofibrosis: a clinicopathological study on 208 patients with special emphasis. *Virchows Arch.(A)* 1996; 413: 407-417
138. Baverman D.E. Quantitation of bone marrow reticulin- a normal range. *Am.J.Clin Pathol*. 1971; 56: 24-31
139. Manoharan A., Horsley R. and Pitney W.R The reticulin content of bone marrow in acute leukemia in adults. *Br.J.Haematol*. 1979; 43:185-190
140. Beckman E.N and Brown A.W.Jr . Normal reticulin level in iliac bone marrow. *Arch.Pathol. Lab..Med*. 1990; 114:1241-1243
141. Hartsock R.J., Smith E.B. and Petty C.S. normal variations with aging of the amount of hematopoietic tissue in bone marrow from the anterior iliac crest. A study made from 177 cases of sudden death examined by necropsy. *Am.J.Clin.Pathol*. 1965; 43: 326-331
142. Frisch B., Bartl R. and Burkhardt R.. Bone marrow biopsy in clinical medicine : an overview. *Haematologica(Budap)*. 1982; 15: 245-285
143. J.Thiele, H. M. Kvasnicka, R. Zankovich, Volker Diehl. Clinical and morphological criteria for the diagnosis of prefibrotic idiopathic (primary) myelofibrosis. *Ann Hematol* 2001; 80:160-165.