

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



**ESANSİYEL TROMBOSİTEMİ VE PRİMER  
MİYELOFİBROZİS OLGULARINDA ASXL1, IDH1,  
IDH2 GEN MUTASYONLARI VE JAK2V617F ALLEL  
YÜKÜ İLE KLİNİK SEYİR ARASINDAKİ İLİŞKİ**

**Yan Dal Uzmanlık Tezi**

**Dr. İpek YÖNAL**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Fatma Deniz Sargın**

**İSTANBUL-2013**

Bu tez çalışması İstanbul Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir.

Proje No 30427

## TEŞEKKÜR

*Hematoloji yan dal uzmanlık eğitimim sürecinde bilgi ve deneyimleriyle yetişmeme katkıda bulunan Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Şükrü Palanduz'a, Hematoloji Bilim Dalı'nda görevli başta bilim dalı başkanım ve tez çalışmam sırasında yardımlarını esirgemeyen tez danışmanım Prof.Dr.Fatma Deniz Sargın'a, Prof.Dr.Meliha Nalçacı'ya, Prof.Dr.Sevgi Kalayoğlu Beşışık'a, Prof.Dr.Melih Aktaş'a, Prof.Dr.Akif Selim Yavuz'a, Prof.Dr.Mustafa Nuri Yenerel'e, Prof.Dr.Reyhan Diz Küçükçaya'ya ve tüm hocalarıma en içten teşekkürlerimi sunarım.*

*Tez çalışmam sırasında yardımlarını esirgemeyen Hematoloji Bilim Dalı'ndan Aynur Dağlar Aday'a, Ayşegül Başak Akadam'a, Ceylan Yılmaz'a, Özlem Yılmaz Paşa'ya, Melek Toker'e, Ferihan Terzi'ye, Kemik iliği, Özel Hematoloji ve Hematoloji servis ve poliklinik çalışanlarına teşekkür ederim.*

*Tanımaktan ve birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen tüm çalışma arkadaşlarıma ve hastane çalışanlarına teşekkür ederim.*

*Eğitimim ve tez çalışmam sırasında beni her zaman destekleyen aileme ayrıca teşekkür ederim.*

# İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR .....	iii
TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ.....	viii
KISALTMALAR .....	xiv
ÖZET.....	xvii
SUMMARY .....	xxiv
<b>1. GİRİŞ VE AMAÇ .....</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER .....</b>	<b>6</b>
2.1. Myeloid Neoplaziler .....	6
2.2. Miyeloproliferatif Neoplaziler.....	8
2.2.1. Polisitemia Vera .....	9
2.2.1.1. Epidemiyoloji.....	9
2.2.1.2. Patogenez .....	10
2.2.1.3. Tanı .....	11
2.2.1.4. Klinik Özellikler .....	12
2.2.1.5. Tedavi .....	17
2.2.1.6. Seyir ve Prognoz .....	21
2.2.2. Esansiyel Trombositemi .....	22
2.2.2.1. Epidemiyoloji.....	22
2.2.2.2. Patogenez .....	23
2.2.2.3. Tanı .....	24
2.2.2.4. Klinik Özellikler .....	26
2.2.2.5. Tedavi .....	27
2.2.2.6. Seyir ve Prognoz .....	31
2.2.3. Primer Miyelofibrozis .....	33

2.2.3.1.	Epidemiyoloji.....	33
2.2.3.2.	Patogenez .....	34
2.2.3.3.	Tanı .....	37
2.2.3.4.	Klinik Özellikler .....	39
2.2.3.5.	Tedavi .....	41
2.2.3.6.	Seyir ve Prognoz .....	48
2.3.	Miyeloproliferatif Neoplazilerde Mutasyonlar.....	49
2.3.1.	JAK2V617F Mutasyonu .....	49
2.3.2.	JAK2 ekzon 12 mutasyonu .....	52
2.3.3.	MPL mutasyonu .....	53
2.3.4.	LNK mutasyonu .....	54
2.3.5.	Casitas B-hücreli Lenfoma Mutasyonu .....	55
2.3.6.	CHEK2 gen Mutasyonu .....	55
2.3.7.	IKZF Delesyon Mutasyonu.....	56
2.3.8.	EZH2 Mutasyonu .....	56
2.3.9.	RAS Mutasyonları.....	57
2.3.10.	Tp53 Mutasyonu.....	57
2.3.11.	RUNX1 Mutasyonu.....	57
2.3.12.	TET2 Mutasyonu.....	58
2.3.13.	DNMT3a Mutasyonu.....	59
2.3.14.	ASXL1 Mutasyonu.....	59
2.3.15.	IDH1/IDH2 Mutasyonları.....	63
<b>3.</b>	<b>MATERYAL VE METOD.....</b>	<b>66</b>
3.1.	Olgular .....	66
3.2.	Metod.....	67
3.2.1.	Periferik Kandan DNA İzolasyonu .....	67

3.2.1.1.	DNA İzolasyonu .....	67
3.2.1.2.	Elde Edilen DNA'nın Konsantrasyon ve Kalitesinin Tayini .....	68
3.2.2.	JAK2V617F Mutasyonunun Gerçek zamanlı Semi-Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Analizi .....	68
3.2.3.	ASXL1 Mutasyon Analizi.....	69
3.2.4.	IDH1 ve IDH2 Mutasyon Analizleri .....	72
3.3.	İstatistiksel Analiz .....	76
<b>4.</b>	<b>BULGULAR.....</b>	<b>77</b>
4.1.	OLGULAR .....	77
4.1.1.	ET grubu.....	77
4.1.2.	PMF grubu.....	79
4.1.3.	ET ile PMF grubunun karşılaştırılması: .....	90
4.2.	ASXL1 (EKZON 12) MUTASYON SONUÇLARI.....	94
4.2.1.	ASXL1 mutasyonunu taşıyan ile taşımayan ET olgularının karşılaştırılması ...	94
4.2.2.	ASXL1 mutasyonunu taşıyan ile taşımayan PMF olgularının karşılaştırılması 100	
4.3.	IDH (EKZON 4) MUTASYON SONUÇLARI .....	107
4.3.1.	ET olgularında IDH mutasyonu .....	107
4.3.2.	IDH mutasyonunu taşıyan ile taşımayan PMF olgularının karşılaştırılması....	108
4.4.	JAK2V617F MUTASYON SONUÇLARI .....	115
4.4.1.	JAK2V617F mutasyonunu taşıyan ile taşımayan ET olgularının karşılaştırılması 115	
4.4.2.	JAK2V617F mutasyonunu taşıyan ile taşımayan PMF olgularının karşılaştırılması .....	120
4.5.	JAK2V617F ALLEL YÜKÜ SONUÇLARI.....	126
4.5.1.	ET olgularının JAK2V617F allel yüküne göre karşılaştırılması.....	126
4.5.2.	PMF olgularının JAK2V617F allel yüküne göre karşılaştırılması.....	133

4.6.	YAŞAM EĞRİLERİ.....	139
4.6.1.	ET olgularında yaşam eğrileri.....	139
4.6.2.	PMF olgularında yaşam eğrileri.....	143
4.6.3.	PMF’de lösemi ilişkisiz sağkalım eğrileri.....	147
<b>5.</b>	<b>TARTIŞMA.....</b>	<b>152</b>
<b>6.</b>	<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>178</b>

# TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ

## TABLULAR

Tablo I. Myeloid neoplazmların 2008 Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) sınıflandırma şeması.....	7
Tablo II. Miyeloproliferatif neoplazilerin (MPN) 2008 Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) sınıflandırma şeması.....	9
Tablo III. DSÖ 2008 PV tanı kriterleri .....	12
Tablo IV. PV’da başvuru semptomları .....	16
Tablo V. PV’da laboratuvar bulguları.....	16
Tablo VI. Polisitemia veranın klinik sonuçları .....	16
Tablo VII. PV’da risk kategorileri ve tedavi yönetimi.....	20
Tablo VIII. Polisitemia vera tedavisi .....	22
Tablo IX. DSÖ 2008 ET sınıflandırma kriterleri .....	25
Tablo X. Reaktif trombositoz nedenleri.....	25
Tablo XI. ET’de risk kategorileri.....	31
Tablo XII. DSÖ 2008 PMF sınıflandırma kriterleri.....	38
Tablo XIII. Kemik iliği fibrozisi ile ilişkili hastalıklar .....	38
Tablo XIV. PMF’de başvuru semptomları ve fizik muayene bulguları.....	41
Tablo XV. Primer Miyelofibrozis IPSS risk skorlaması.....	47
Tablo XVI. Primer Miyelofibrozis DIPSS risk skorlaması.....	47
Tablo XVII. Primer Miyelofibrozis DIPSS-plus risk skorlaması .....	47
Tablo XVIII. Polisitemia vera, esansiyel trombositemi ve primer miyelofibrozisde JAK2V617F mutasyon sıklığı.....	52
Tablo XIX. JAK2V617F analizi için hazırlanan PZR karışımının bileşenleri .....	69
Tablo XX. JAK2V617F analizinde kullanılan Gerçek zamanlı Semi-kantitatif PZR koşulları .....	69
Tablo XXI. ASXL1 Ekzon 12 gen bölgesinin çoğaltılması için gerekli PZR koşulları .....	70



Tablo XXII. IDH1 ve IDH2'nin YÇM PZR reaksiyonu için gerekli profil şartları.....	73
Tablo XXIII. ET ve PMF tanılı olguların klinik ve laboratuvar bulguları.....	82
Tablo XXIV. ET ve PMF tanılı olguların klinik ve laboratuvar bulguları (devam) .....	83
Tablo XXV. ET ve PMF tanılı olguların klinik ve laboratuvar bulguları (devam) .....	84
Tablo XXVI. IDH mutasyonu taşıyan ET tanılı olgularda klinik ve moleküler özellikler .....	85
Tablo XXVII. ASXL1 mutasyonu taşıyan ET tanılı olgularda klinik ve moleküler özellikler	85
Tablo XXVIII. IDH mutasyonu taşıyan PMF tanılı olgularda klinik ve moleküler özellikler	88
Tablo XXIX. ASXL1 mutasyonu taşıyan PMF tanılı olgularda klinik ve moleküler özellikler .....	89
Tablo XXX. ASXL1 mutasyonunu taşıyan ve taşımayan ET tanılı olguların klinik ve laboratuvar bulguları .....	97
Tablo XXXI. ASXL1 mutasyonunu taşıyan ve taşımayan ET tanılı olguların klinik ve laboratuvar bulguları (devam).....	98
Tablo XXXII. ASXL1 mutasyonunu taşıyan ve taşımayan ET tanılı olguların klinik ve laboratuvar bulguları (devam).....	99
Tablo XXXIII. ASXL1 mutasyonunu taşıyan ve taşımayan PMF tanılı olguların klinik ve laboratuvar bulguları .....	104
Tablo XXXIV. ASXL1 mutasyonunu taşıyan ve taşımayan PMF tanılı olguların klinik ve laboratuvar bulguları (devam).....	105
Tablo XXXV. ASXL1 mutasyonunu taşıyan ve taşımayan PMF tanılı olguların klinik ve laboratuvar bulguları (devam).....	106
Tablo XXXVI. ASXL1 mutasyonunu taşıyan ve ASXL1 mutasyonu olmayan PMF olgularının kemik iliği sitogenetik ve 'DIPSS-plus' kriterlerine göre karşılaştırılması.....	107
Tablo XXXVII. IDH mutasyonunu taşıyan ve taşımayan PMF tanılı olguların klinik ve laboratuvar bulguları .....	112
Tablo XXXVIII. IDH mutasyonunu taşıyan ve taşımayan PMF tanılı olguların klinik ve laboratuvar bulguları (devam).....	113
Tablo XXXIX. IDH mutasyonunu taşıyan ve taşımayan PMF tanılı olguların klinik ve laboratuvar bulguları (devam).....	114

Tablo XL. IDH mutasyonunu taşıyan ve taşımayan PMF olgularının kemik iliği sitogenetik ve ‘DIPSS-plus’ kriterlerine göre karşılaştırılması .....	115
Tablo XLI. JAK2V617F mutasyonunu taşıyan ve taşımayan ET tanılı olguların klinik ve laboratuvar bulguları .....	118
Tablo XLII. JAK2V617F mutasyonunu taşıyan ve taşımayan ET tanılı olguların klinik ve laboratuvar bulguları (devam).....	119
Tablo XLIII. JAK2V617F mutasyonunu taşıyan ve taşımayan ET tanılı olguların klinik ve laboratuvar bulguları (devam).....	120
Tablo XLIV. JAK2V617F mutasyonunu taşıyan ve taşımayan PMF tanılı olguların klinik ve laboratuvar bulguları .....	123
Tablo XLV. JAK2V617F mutasyonunu taşıyan ve taşımayan PMF tanılı olguların klinik ve laboratuvar bulguları (devam).....	124
Tablo XLVI. JAK2V617F mutasyonunu taşıyan ve taşımayan PMF tanılı olguların klinik ve laboratuvar bulguları (devam).....	125
Tablo XLVII. JAK2V617F mutasyonunu taşıyan ile taşımayan PMF olgularının kemik iliği sitogenetik ve ‘DIPSS-plus’ kriterlerine göre karşılaştırılması.....	125
Tablo XLVIII. JAK2V617F mutasyonunu taşımayan, düşük JAK2V617F allel yüküne sahip ve yüksek JAK2V617F allel yüküne sahip ET tanılı olguların klinik ve laboratuvar bulguları .....	130
Tablo XLIX. JAK2V617F mutasyonunu taşımayan, düşük JAK2V617F allel yüküne sahip ve yüksek JAK2V617F allel yüküne sahip ET tanılı olguların klinik ve laboratuvar bulguları (devam).....	131
Tablo L. JAK2V617F mutasyonunu taşımayan, düşük JAK2V617F allel yüküne sahip ve yüksek JAK2V617F allel yüküne sahip ET tanılı olguların klinik ve laboratuvar bulguları (devam).....	132
Tablo LI. JAK2V617F mutasyonunu taşımayan, düşük JAK2V617F allel yüküne sahip ve yüksek JAK2V617F allel yüküne sahip PMF tanılı olguların klinik ve laboratuvar bulguları	136
Tablo LII. JAK2V617F mutasyonunu taşımayan, düşük JAK2V617F allel yüküne sahip ve yüksek JAK2V617F allel yüküne sahip PMF tanılı olguların klinik ve laboratuvar bulguları (devam).....	137

Tablo LIII. JAK2V617F mutasyonunu taşımayan, düşük JAK2V617F allel yüküne sahip ve yüksek JAK2V617F allel yüküne sahip PMF tanılı olguların klinik ve laboratuvar bulguları (devam).....	138
Tablo LIV. JAK2V617F mutasyonunu taşımayan, düşük JAK2V617F allel yüküne sahip ve yüksek JAK2V617F allel yüküne sahip PMF olgularının kemik iliği sitogenetik ve ‘DIPSS-plus’ kriterlerine göre karşılaştırılması .....	139

## ŞEKİLLER

Şekil I. Miyeloproliferatif hastalıklarda JAK2V617F sinyal mekanizması.....	51
Şekil II. Memelilerde ASXL proteininin korunmuş bölgeleri ve ASXL1’in olası fonksiyonları. ....	62
Şekil III. IDH tarafından normal reaksiyonların ve mutasyon sonucunda kazanılan yeni reaksiyonların katalize edilmesi. ....	65
Şekil IV. ASXL1 (Ekzon 12) bölgesinin PZR ürününün jeldeki görüntüsü.....	70
Şekil V. Olgularımızda en sık saptadığımız mutasyon varyantı olan c.1934dupG’nin (p.G646TrpfsX12) sekans kromatogramındaki görünümü .....	71
Şekil VI. Ph-negatif MPN tanılı olgu grubumuzda 2.sıklıkta saptadığımız c.1954G>A (p.G652S) adlı bir missense mutasyona ait sekans kromatogramı görülmektedir.....	71
Şekil VII. Ph-negatif MPN tanılı olgu grubumuzda 3.sıklıkta saptanan mutasyon varyantı olan c.1900_1922del’in (p.Glu635ArgfsX15) sekans kromatogramındaki görünümü .....	71
Şekil VIII. c.1817G>A mutasyonu (p.Arg606Gln) saptanan ET tanılı bir olgumuzun sekans kromatogramının görünümü.....	72
Şekil IX. Bir nonsense mutasyon olan c.1773C>G (p.Tyr591X) adlı mutasyonun sekans kromatogramındaki görünümü.....	72
Şekil X. IDH1 R132’nin normalize ve düzenlenmiş melting eğrileri ve normalize ve sıcaklıkla düzenlenmiş difference plot grafiği.....	74
Şekil XI. IDH2 R140 normalize ve düzenlenmiş melting eğrileri ve normalize ve sıcaklıkla düzenlenmiş difference plot grafiği.....	75

Şekil XII. IDH2 R172'nin normalize melting eğrileri ve sıcaklıkla düzenlenmiş difference plot grafiği.....	75
Şekil XIII. . ET ve PMF olgularında JAK2V617F allel yükünün dağılımı görülmektedir.....	86
Şekil XIV. PMF olgularında karyotip anormalliklerin dağılımı görülmektedir .....	86
Şekil XV. PMF olgularında karyotip anormalliklerin dağılımı görülmektedir.....	87
Şekil XVI. 'DIPSS-plus' kriterlerine göre PMF olgularının dağılımı görülmektedir.....	88
Şekil XVII. ET ve PMF tanılı olgularda ASXL1 mutasyon tiplerinin dağılımı görülmektedir .....	92
Şekil XVIII. ASXL1 mutasyon dağılımına bakıldığı zaman PMF'de nonsense mutasyon (çerçeve kayması mutasyonları dahil) sıklığı, ET grubuna göre anlamlı yüksek saptanmıştır (sırasıyla %18.2, %4.7; p=0.012).....	93
Şekil XIX. ET ve PMF olgularında OS'nin 'Kaplan-Meier' analizindeki görünümü.....	93
Şekil XX. ASXL1 mutant ve wild tip ET olgularında arteriyel tromboz sıklığı açısından fark saptanmamıştır (sırasıyla %33.3, %20.4; p=0.416) .....	96
Şekil XXI. ASXL1 mutasyonunu taşıyan ve taşımayan PMF olgularındaki kanama dağılımı görülmektedir .....	103
Şekil XXII. IDH mutasyonunu taşıyan ve taşımayan PMF olgularında kanama lokalizasyonu görülmektedir .....	111
Şekil XXIII. ET tanılı olguların JAK2V617F allel yüküne göre venöz tromboz yerleşimleri görülmektedir .....	128
Şekil XXIV. ET tanılı olguların JAK2V617F allel yüküne göre kanama lokalizasyonları görülmektedir .....	129
Şekil XXV. ET olgularında ASXL1 mutasyon varlığına göre OS'nin 'Kaplan-Meier' analizindeki görünümü.....	140
Şekil XXVI. ET olgularında ASXL1 mutasyon tipine göre OS'nin 'Kaplan-Meier' analizindeki görünümü.....	141
Şekil XXVII. ET olgularında IDH mutasyon varlığına göre OS'nin 'Kaplan-Meier' analizindeki görünümü.....	141

Şekil XXVIII. JAK2V617F mutasyon varlığına göre ET olgularında OS'nin 'Kaplan-Meier' analizindeki görünümü.....	142
Şekil XXIX. JAKV617F mutasyonunu taşımayan (n=43), JAK2V617F allel yükü düşük (n=59) ve JAK2V617F allel yükü yüksek (n=5) ET olgularında OS'nin karşılaştırılması. ..	142
Şekil XXX. PMF olgularında ASXL1 mutasyon varlığına göre OS'nin 'Kaplan-Meier' analizindeki görünümü.....	144
Şekil XXXI. Olgular mutasyon tiplerine göre gruplandırıldığı zaman nonsense mutasyon tipinde (çerçeve kayması mutasyonu dahil) OS'nin diğer guplara göre düşük olma eğiliminde olduğu görülmüştür (p=0.09). .....	145
Şekil XXXII. IDH mutasyon varlığına göre PMF olgularında OS'nin 'Kaplan-Meier' analizindeki görünümü.....	145
Şekil XXXIII. JAK2V617F mutasyon varlığına göre PMF olgularında OS'nin 'Kaplan-Meier' analizindeki görünümü.....	146
Şekil XXXIV. JAK2V617F allel yüküne göre PMF olgularında OS'nin 'Kaplan-Meier' analizindeki görünümü.....	146
Şekil XXXV. 'DIPSS-plus' kriterlerine göre PMF olgularında OS'nin 'Kaplan-Meier' analizindeki görünümü.....	147
Şekil XXXVI. PMF olgularında ASXL1 mutasyon varlığına göre LFS'in 'Kaplan-Meier' analizindeki görünümü.....	148
Şekil XXXVII. PMF olgularında ASXL1 mutasyon tipine göre LFS'in 'Kaplan-Meier' analizindeki görünümü.....	149
Şekil XXXVIII. IDH mutasyon varlığına göre PMF olgularında LFS'in 'Kaplan-Meier' analizindeki görünümü.....	149
Şekil XXXIX. JAK2V617F mutasyon varlığına göre PMF olgularında LFS'in 'Kaplan-Meier' analizindeki görünümü.....	150
Şekil XL. JAK2V617F allel yüküne göre PMF olgularında LFS'in 'Kaplan-Meier' analizindeki görünümü.....	150
Şekil XLI. 'DIPSS-plus' kriterlerine göre PMF olgularında LFS'in 'Kaplan-Meier' analizindeki görünümü.....	151

## KISALTMALAR

<b>aCGH</b>	: Karşılaştırılmalı genomik hibridizasyon
<b>AHKHN</b>	: Allogeneik hematopoetik kök hücre nakli
<b>AML</b>	: Akut myeloid lösemi
<b>Asx</b>	: Additional sex combs
<b>ASXH domaini</b>	: Amino-terminal homolog bölgesi
<b>ASXL1</b>	: Additional Sex Combs-Like 1
<b>Bcl-X<sub>L</sub></b>	: Çok büyük B hücre lenfoması
<b>CBL</b>	: Casitas B-hücresi lenfoma
<b>dHPLC</b>	: Denatüre edici yüksek performanslı liquid kromatografi
<b>DIPSS</b>	: Dinamik uluslararası prognostik skorlama sistemi
<b>DNMT</b>	: DNA metil transferaz
<b>dNTP</b>	: Deoksiribonükleotid trifosfat karışımı
<b>DSÖ</b>	: Dünya Sağlık Örgütü
<b>DVT</b>	: Derin ven trombozu
<b>EEC</b>	: Eritropoetin bağımsız koloni
<b>EPO</b>	: Eritropoetin
<b>EPOR</b>	: EPO reseptörü
<b>ERK</b>	: Ekstraselüler sinyal ilişkili kinaz
<b>ET</b>	: Esansiyel trombositemi
<b>EZH2</b>	: Enhancer of Zeste Homolog 2
<b>FKBP51</b>	: FK506 bağlayıcı protein 51
<b>G-6-PD</b>	: Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz
<b>GRB</b>	: Büyüme faktörü reseptörüne bağlı protein
<b>GTP</b>	: guanin trifosfat
<b>GVHH</b>	: Kronik graft versus host hastalığı
<b>HDAC</b>	: Histon deasetilaz inhibitörleri
<b>2-HG</b>	: 2-hidroksiglutarat
<b>Hgb</b>	Hemoglobin
<b>5hmC</b>	: 5-hidroksimetilsitozin
<b>Htc</b>	: Hematokrit
<b>IDH</b>	: İzositrat dehidrogenaz
<b>IDH1</b>	: İzositrat dehidrogenaz 1
<b>IDH2</b>	: İzositrat dehidrogenaz 2
<b>IDH3</b>	: İzositrat dehidrogenaz 3

<b>IGF-1</b>	: İnsülin-benzeri büyüme faktörü
<b>IKZF1</b>	: Ikaros Family Zinc Finger Protein
<b>IPSS</b>	: Uluslararası prognostik skorlama sistemi
<b>İTF</b>	: İstanbul Tıp Fakültesi
<b>JH2</b>	: JAK2 geninin psödokinaz domaini
<b>KML</b>	: Kronik miyeloid lösemi
<b>KMML</b>	: Kronik miyelomonositik lösemi
<b>LFS</b>	: Lösemi ilişkisiz sağkalım
<b>LNK</b>	: Lenfosit-spesifik adaptör protein
<b>LOH</b>	: Heterozigotluk kaybı
<b>5mC</b>	: 5-metilsitozin
<b>MDS</b>	: Miyelodisplastik sendrom
<b>MDS-U</b>	: MDS, sınıflanmamış
<b>MEK1</b>	: Karşılıklı hassas mitojen aktive protein kinaz 1
<b>Missense</b>	: Yanlış anlamlı
<b>MPL</b>	: Trombopoetin reseptörü
<b>MPN</b>	: Kronik miyeloproliferatif neoplaziler
<b>mTOR inhibitörleri</b>	: Rapamisin protein kompleksinin memeli hedefinin inhibitörleri
<b>NADP<sup>+</sup></b>	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
<b>NF</b>	: Nükleer faktör
<b>Nonsense</b>	: Anlamsız
<b>OS</b>	: Tüm yaşam süresi
<b>P</b>	: Fosfat
<b>PAN</b>	: Poliarteritis nodosa
<b>Pc-G</b>	: Polycomb-grup
<b>PDGF</b>	: Trombosit kökenli büyüme faktörü
<b>Ph</b>	: Philadelphia
<b>PHD domaini</b>	: C-terminal bitki homeodomaini
<b>PI3K</b>	: Fosfotidil 3-kinaz
<b>PIP2</b>	: Fosfotidil inositol bifosfat
<b>PIP3</b>	: Fosfotidil inositol trifosfat
<b>PMF</b>	: Primer miyelofibrozis
<b>PRC1</b>	: Polycomb Repressive kompleks 1
<b>PRC2</b>	: Polycomb Repressive kompleks 2
<b>PR-DUB</b>	: Polycomb-baskılayıcı deubiquitinaz kompleksi
<b>PRV-1</b>	: Polisitemia rubra vera-1

<b>PT-1</b>	: Primer trombositemi-1
<b>PV</b>	: Polisitemia vera
<b>PVSG</b>	: Polisitemia Vera Çalışma Grubu
<b>PZR</b>	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<b>RAEB-I</b>	: Artmış blastlı refrakter anemi I
<b>RAEB-II</b>	: Artmış blastlı refrakter anemi II
<b>RARS</b>	: Halka sideroblastlı refrakter anemi
<b>RARS-T</b>	: Halka sideroblastlı ve trombositozlu refrakter anemi
<b>RAS</b>	: Renin–angiotensin sistemi
<b>RCMD</b>	: Çoklu dizide displazili refrakter sitopeni
<b>RCUD</b>	: Tek dizide displazi ile seyreden refrakter sitopeniler
<b>RTK</b>	: Reseptör tirozin kinaz
<b>RUNX1</b>	: Runt transkripsiyon faktör 1
<b>SH2</b>	: Src homoloji 2
<b>SLE</b>	: Sistemik lupus eritematozus
<b>SNP</b>	: Tek nükleotid polimorfizmi
<b>SOCS</b>	: Sitokin sinyal baskılayıcısı
<b>SVO</b>	: Serebrovasküler olay
<b>STAT3</b>	: Transkripsiyon 3 sinyal aracı molekülü ve aktivatörü
<b>STAT5</b>	: Transkripsiyon 5 sinyal aracı molekülü ve aktivatörü
<b>TET</b>	: Ten-Eleven Translocation
<b>TET1</b>	: TET onkogen ailesi üyesi 1
<b>TET2</b>	: TET onkogen ailesi üyesi 2
<b>TET3</b>	: TET onkogen ailesi üyesi
<b>TIPS</b>	: Transjuguler intrahepatik portosistemik şant
<b>TPO</b>	: Trombopoetin
<b>TS</b>	: Takip süresi
<b>TXA<sub>2</sub></b>	: Tromboksan A <sub>2</sub>
<b>Tx-G</b>	: Trithorax-grup
<b>VEGF</b>	: Vasküler endotelyal büyüme faktörü
<b>vWF</b>	: Von Willebrand faktörü
<b>vWH</b>	: Von Willebrand hastalığı
<b>YÇM</b>	: Yüksek çözünürlüklü melting
<b>α-KG</b>	: α-ketoglutarat



## ÖZET

**Amaç:** Philadelphia-negatif (Ph-negatif) miyeloproliferatif neoplaziler (MPN), başlıca polisitemia vera (PV), esansiyel trombositemi (ET) ve primer miyelofibrozisten (PMF) oluşan kronik seyir ile karakterize bir grup hastalıktır. PV, başlıca eritrositoz ve ET, başlıca trombositoz ile karakterizedir. PMF, başlıca anormal sitokin ekspresyonu, kemik iliği fibrozisi, ekstramedüller hematopoez ve kısa yaşam süresi ile karakterizedir. 2005 yılında JAK2V617F mutasyonunun keşfi sonrasında PV'lı olguların %95'inden fazlasında ve ET veya PMF'li olguların yaklaşık %50-60'ından fazlasında temeldeki moleküler olay anlaşılmıştır. 2006 yılında ET ve PMF'de MPL mutasyonu ve 2007 yılında PV'da JAK2 ekzon 12'de ek bir mutasyon tanımlanmıştır. ET ve PMF olgularının yaklaşık %40'ında moleküler bir belirteç olmamasından yola çıkarak ek mutasyonların varlığı düşünülmüştür. Ph-negatif MPN'de 2009 yılında ASXL1 gen mutasyonu ve 2010 yılında IDH1/IDH2 gen mutasyonları tanımlanmıştır. Bazı çalışmalarda, yüksek JAK2V617F allel yükünün ET olgularında agresif fenotipe işaret eden hematolojik ve klinik göstergelerle ilişkili olduğu bildirilmiştir. Diğer yandan bazı çalışmalarda, PMF'de düşük allel yükünün kısa yaşam süresi ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. JAK2V617F allel yükünü araştıran çalışmaların kısıtlayıcı özellikleri, çoğunluğunun retrospektif olmasıdır. Bu çalışmada İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları ABD, Hematoloji BD'nda takip edilmekte olan 107 ET ve 77 PMF olgusunda ASXL1 ve IDH1/IDH2 gen mutasyonlarının klinik önemi, prevelansı ve potansiyel prognostik önemi araştırılmıştır. Ayrıca çalışmamızda ET ve PMF olgularında JAK2V617F mutasyonunun allel yükü ile komplikasyonlar ve tüm yaşam süresi (OS) arasındaki ilişki ve JAK2V617F allel yükü ile ASXL1 mutasyonu ve IDH1/IDH2 gen mutasyonları arasındaki ilişkinin araştırılması hedeflenmiştir.

**Gereç ve Yöntem:** Çalışmamıza 2008 Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) kriterleri esas alınarak Ph-negatif MPN tanısı konmuş olan 184 olgu (107 ET, 77 PMF) dahil edilmiştir. Olguların demografik özellikleri, klinik ve laboratuvar bilgilerine ek olarak OS taranmıştır. Venöz kandan DNA izolasyonu yapılarak ASXL1 (ekzon 12) mutasyonlarını tespit etmek için DNA çift taraflı olarak dizilenmiştir. IDH1 ve IDH2 mutasyonlarını (ekzon 4) tespit etmek için gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) cihazında yüksek çözünürlüklü melting (YÇM) yöntemine dayalı olarak örnekler gruplandırılmıştır. Sonuçlar çift yönlü DNA dizileme ile konfirme edilmiştir. Çalışmamızda ticari diagnostik kit kullanılarak gerçek zamanlı semi-kantitatif PZR metodu ile JAK2V617F mutasyon analizi gerçekleştirilmiş ve eş zamanlı olarak mutant allel yükü tespit edilmiştir. Klinik ve laboratuvar verileri içeren

parametreler SPSS istatistik programına (Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey, 2008) yüklenmiştir. p değeri <0.05 olan sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. ET ve PMF’de yaşam eğrileri, ‘Kaplan-Meier’ analizi kullanılarak OS’ni hesaplamak için oluşturulmuştur ve gruplar arası sağkalım oranlarının karşılaştırılması log rank testi ile yapılmıştır. Buna ek olarak PMF’de yaşam analizi, lösemi ilişkisiz sağkalımı (LFS) hesaplamak için yapılmıştır. Bağımsız değişkenler ile yaşam süresi arasındaki ilişkinin incelenmesi için Cox regresyon modeli kullanılarak çok değişkenli analiz yapılmış ve ölümün kümülatif riskini hesaplamak için odds ratio (OR) kullanılmıştır.

**Bulgular:** ET olgularının 58’i kadın, 49’u erkektir ve yaş ortalaması 56.3 (SD 14.5) bulunmuştur. PMF olgularının ise 43’ü kadın, 34’ü erkek olup yaş ortalaması 60.8’dir (SD 14.5). ET ve PMF olgularının tanıdan itibaren ortalama takip süresi (TS) sırasıyla 69.91 ay (SD 60.8) ve 45.61 ay (SD 47.52) olarak bulunmuştur. PMF tanılı 77 olgunun 19’unda (%24.7) ve ET tanılı 107 olgunun 9’unda (%8.4) ASXL1 mutasyonu (ekzon 12) saptanmıştır. PMF tanılı olgularda ASXL1 mutasyonu (ekzon 12) sıklığı, ET tanılı olgulara göre anlamlı derecede yüksek saptanmıştır (p=0.005). Çalışmamızda, 184 Ph-negatif MPN tanılı olgunun 28’inde (%15.2), toplam 29 ASXL1 mutasyonu saptanmıştır (bir PMF tanılı olgumuza çift ASXL1 mutasyonu eşlik etmiştir). Çalışma grubumuzun 19’unda (%10.3) nonsense mutasyonlar (çerçeve kayması mutasyonları dahil), 8’inde (%4.3) missense mutasyonlar ve birinde (%0.5) nonsense ve missense mutasyon birlikteliği görülmüştür. ET olgularının birinde (%0.9) ve PMF olgularının 4’ünde (%5.2) IDH1 mutasyonu tespit edilmiştir. ET tanılı bir olguda (%0.9) ve PMF tanılı bir olguda (%1.3) IDH2 mutasyonu saptanmıştır. Sonuç olarak toplam 2 ET (%1.9) ve 5 PMF (%6.5) olgusunda IDH mutasyonuna rastlanmıştır. ET tanılı IDH2 mutasyonu taşıyan olguya (R140Q), allel yükü %5 olan JAK2V617F mutasyonu eşlik etmiştir. Diğer IDH mutasyonu taşıyan ET tanılı olguda ise (IDH1 R132C) JAK2V617F mutasyonu saptanmamıştır. PMF’de 5 IDH mutasyonu taşıyan olgulardan 3’ünde (1 IDH1 R132C, 1 IDH1 R132S ve 1 R140Q), eş zamanlı JAK2V617F mutasyonu saptanmıştır (JAK2V617F allel yükü sırasıyla %31-50, %5-12.5 ve %31-50). IDH1 R132C mutasyonu taşıyan 2 PMF olgusunda ise JAK2V617F mutasyonu saptanmamıştır. ET ve PMF olgu grupları arasında IDH mutasyon sıklığı açısından anlamlı bir fark saptanmamıştır (p=0.131). PMF’de JAK2V617F mutasyon sıklığı, ET’ye göre anlamlı derecede yüksek saptanmıştır (sırasıyla %75.3, %59.8; p=0.028). Bunun yanında, PMF’de yüksek JAK2V617F allel yüküne sahip olgu sıklığı (allel yükü>%50), ET grubuna göre belirgin yüksek saptanmıştır (sırasıyla %23.4, %4.7; p=0.001). ET’de ASXL1 mutasyonunu taşıyan olgularda tanı sırasındaki yaşın ileri olma eğiliminde olduğu ve tanı sırasındaki ortalama lökosit değerinin yüksek olma

eğiliminde olduğu gösterilmiştir (sırasıyla  $p=0.073$ ;  $p=0.06$ ). ET’de ASXL1 mutasyonu varlığında kemik iliğinde ileri derecede fibrozis saptanmıştır ( $p=0.003$ ). ASXL1 mutasyonunu taşıyan ET tanılı olgularda total tromboz, arteriyel tromboz ve venöz tromboz sıklığında değişiklik saptanmazken ASXL1 mutasyonu taşıyan grupta SVO eğiliminin yüksek olduğu gösterilmiştir (sırasıyla  $p=0.73$ ;  $p=0.416$ ;  $p=1$  ve  $p=0.059$ ). ET’de ASXL1 mutasyonu OS üzerine etkisiz bulunmuştur ( $p=0.737$ ). ASXL1 mutasyonunu taşıyan PMF grubunda yaş ortalaması anlamlı derecede yüksek olmakla beraber, ASXL1 mutasyonu varlığında kanama komplikasyonunda artış gözlenmiştir (sırasıyla  $p=0.037$ ;  $p=0.008$ ). Ayrıca, ASXL1 mutasyonunu taşıyan PMF grubunda kanamanın hayati organlarda görülme sıklığının yüksek olduğu gösterilmiştir ( $p=0.001$ ). Korelasyon analizi sonucunda PMF olgu grubunda ASXL1 mutasyonu varlığı ile kanama sıklığı arasında pozitif yönde hafif dereceli bir ilişki saptanmıştır ( $r=0.327$ ). ASXL1 mutasyonunu taşıyan PMF olgularında ölüm oranı, ASXL1 mutasyonunu taşımayan PMF olgularına göre anlamlı derecede yüksek saptanmıştır (sırasıyla %42.1, %10.3;  $p=0.004$ ). JAK2V617F mutasyonu olan 58 PMF olgusunun 14’ünde (%24.1) ve JAK2V617F mutasyonunu taşımayan 19 PMF olgusunun 5’inde (%26.3) ASXL1 mutasyonu saptanmıştır ( $p=0.535$ ). JAK2V617F mutasyonunu taşıyan 64 ET olgusundaki ASXL1 sıklığı %9.4 ( $n=6$ ) iken JAK2V617F mutasyonunu taşımayan ET olgularındaki sıklığı %7 ( $n=3$ ) olarak bulunmuştur ( $p=0.738$ ). ASXL1 mutasyonunu taşıyan 19 PMF olgusunun 14’ünde (%73.7) ve ASXL1 mutasyonunu taşıyan 9 ET olgusunun 6’sında (%66.7) JAK2V617F mutasyonu saptanmıştır. Sonuç olarak ASXL1 mutasyonunu taşıyan PMF olguları ile taşımayan olgular arasında JAK2V617F mutasyon sıklığı açısından anlamlı bir fark saptanmamıştır ( $p=1$ ). Ayrıca, ASXL1 mutasyonunu taşıyan ve mutasyon olmayan ET olguları arasında JAK2V617F mutasyon sıklığı benzer bulunmuştur ( $p=0.738$ ). IDH mutasyonunu taşıyan PMF olgularında kadın cinsiyeti sıklığında artışa eğilim olduğu gösterilmiştir ( $p=0.063$ ). IDH mutasyonunu taşıyan PMF olgularında kanama sıklığının, mutasyon taşımayan gruba göre anlamlı derecede yüksek olduğu ve IDH mutasyonu olan olgularda kanamanın hayati organlarda görülme eğiliminin daha yüksek olduğu görülmüştür (sırasıyla  $p=0.048$ ;  $p=0.061$ ). Buna benzer şekilde, PMF olgu grubunda IDH mutasyonu ile kanama komplikasyonu arasında pozitif yönde zayıf bir ilişki saptanmıştır ( $r=0.27$ ). IDH mutasyonunu taşıyan PMF olgularında ölüm oranı, IDH mutasyonu olmayan PMF olgularına göre anlamlı derecede yüksek saptanmıştır (sırasıyla %60, %15.3;  $p=0.039$ ). IDH mutasyonunu taşıyan PMF olgularında lösemiye dönüşüm oranı, IDH mutasyonu olmayan olgulara göre yüksek olmakla beraber istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (sırasıyla %20, %4.2;  $p=0.24$ ). ASXL1 mutasyonunu taşıyan PMF grubunda IDH1 mutasyon

sıklığı, ASXL1 mutasyonunu taşımayan gruba göre belirgin yüksek saptanmıştır (sırasıyla %15.8, %1.7,  $p=0.044$ ). Fakat ASXL1 mutasyonu olan ile mutasyon taşımayan PMF grubu arasında IDH2 mutasyon sıklığı açısından anlamlı fark saptanmamıştır ( $p=1$ ). Sonuç olarak ASXL1 mutasyonu olan PMF grubunda mutasyon olmayan grup ile karşılaştırıldığında IDH mutasyon (IDH1 veya IDH2) sıklığı yüksek olma eğilimindedir (sırasıyla %15.8, %3.4;  $p=0.093$ ). PMF’de ASXL1 mutasyonu ile IDH mutasyonu arasında pozitif yönde zayıf bir ilişki saptanmıştır ( $r=0.216$ ). PMF’de ASXL1 mutasyonu ve IDH mutasyonu birlikteliği ile kanama komplikasyonu ve ölüm arasında pozitif yönde zayıf bir ilişki saptanmıştır (sırasıyla  $r=0.240$ ;  $r=0.255$ ). Çalışmamızda, JAK2V617F mutasyonunu taşıyan ET grubunda tanı sırasındaki Hgb ve Htc düzeyi anlamlı olarak yüksek saptanırken, ortalama trombosit değeri anlamlı olarak düşük saptanmıştır (sırasıyla  $p=0.001$ ;  $p=0.001$  ve  $p=0.043$ ). Ayrıca JAK2V617F mutasyonunu taşıyan ET olgularında masif splenomegali oranı belirgin yüksek saptanmıştır ( $p=0.044$ ). ET olgu grubunda JAK2V617F mutasyonu ile tanı sırasındaki lökosit ve Htc değerleri arasında pozitif yönde hafif dereceli bir ilişki saptanmıştır (sırasıyla  $r=0.324$ ;  $r=0.362$ ). Buna ek olarak ET’de JAK2V617F mutasyonu ve IDH mutasyonu birlikteliği ile venöz tromboz arasında pozitif yönde zayıf bir ilişki saptanmıştır ( $r=0.203$ ). ET tanılı olgular JAK2V617F mutasyonunu taşımayan ( $n=43$ ), düşük JAK2V617F allel yüküne sahip (allel yükü  $\leq 50\%$ ,  $n=59$ ) ve yüksek allel yüküne sahip grup (allel yükü  $>50\%$ ,  $n=5$ ) olarak üçe ayrılmıştır. ET’de yüksek JAK2V617F allel yüküne sahip olgu grubunda, diğer iki grup ile karşılaştırıldığında kanama sıklığında, ciddi kanama insidensinde, kan transfüzyon ihtiyacında ve masif splenomegali oranında artış saptanmıştır ( $p=0.003$ ;  $p=0.001$ ;  $p=0.022$  ve  $p=0.015$ ). Yüksek JAK2V617F allel yüküne sahip ET grubunda, düşük allel yükü olan gruba göre Hgb ve Htc düzeyleri anlamlı derecede düşük ve LDH düzeyi yüksek saptanmıştır (sırasıyla  $p=0.002$ ;  $p=0.011$  ve  $p=0.012$ ). ET olgularında JAK2V617F allel yükü ile tanı sırasındaki lökosit arasında pozitif yönde zayıf bir ilişki saptanmıştır ( $r=0.238$ ). Bunun yanında ET olgu grubunda JAK2V617F allel yükü ile kanama komplikasyonu ve venöz tromboz arasında pozitif yönde zayıf bir ilişki saptanmıştır (sırasıyla  $r=0.213$ ;  $r=0.201$ ). JAK2V617F mutasyonunu taşımayan PMF grubunda kadın cinsiyet oranı belirgin yüksek saptanmıştır ( $p=0.009$ ). JAK2V617F mutasyonunu taşıyan PMF grubunda ortalama Hgb, Htc düzeyi ve lökosit sayısı, mutasyonu taşımayan gruba göre anlamlı derecede yüksek saptanmıştır (sırasıyla  $p=0.005$ ;  $p=0.034$  ve  $p=0.046$ ). Ayrıca, JAK2V617F mutasyonunu taşıyan PMF grubunda kanamaya eğilim olduğu ve masif splenomegali oranının yüksek olma eğiliminde olduğu gösterilmiştir (sırasıyla  $p=0.098$  ve  $p=0.096$ ). PMF tanılı olgular JAK2V617F mutasyonunu taşımayan ( $n=19$ ), düşük JAK2V617F allel yüküne sahip ( $n=40$ ) ve yüksek allel

yüküne sahip grup (n=18) olarak üçe ayrılmıştır. Yüksek JAK2V617F allel yüküne sahip grupta, tanı sırasındaki ortalama lökosit değeri diğer 2 gruba göre anlamlı derecede yüksek saptanmıştır (p=0.001). Ayrıca, yüksek JAK2V617F allel yüküne sahip grupta mutasyon taşımayan grupla karşılaştırıldığı zaman tanı sırasındaki Hgb ve Htc değeri anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (sırasıyla p=0.001 ve p=0.002). Korelasyon analizi sonucunda PMF olgu grubunda JAK2V617F allel yükü ile tanı sırasındaki lökosit ve Htc değeri arasında pozitif yönde hafif dereceli bir ilişki saptanmıştır (sırasıyla r=0.396; r=0.318). ‘Kaplan-Meier’ analizinde ASXL1 mutasyonunu taşıyan PMF olgularında OS, taşımayan gruba göre anlamlı derecede kısa saptanmıştır (sırasıyla ortalama 108 ay; %95 CI: 62-153 ve 202 ay; %95 CI: 123-282; p=0.025). ASXL1 mutasyonunu taşıyan PMF olguları, mutasyon tiplerine göre gruplandırıldığı zaman nonsense mutasyon tipinde OS’nin diğer gruplara göre düşük olma eğiliminde olduğu görülmüştür (p=0.09). PMF olguları ‘DIPSS-plus’ kriterlerine göre düşük, orta-1, orta-2 ve yüksek riskli olarak gruplandırıldığı zaman yüksek riskli grupta diğerlerine göre OS anlamlı derecede kısa bulunmuştur (p=0.007). IDH mutasyonunu taşıyan ve IDH mutasyonu olmayan PMF olguları arasında ve JAK2V617F mutasyonunu taşıyan ve taşımayan PMF olguları arasında OS açısından anlamlı farklılık gözlenmemiştir (sırasıyla p=0.351 ve p=0.589). Bunun yanında PMF olgu grubunda JAK2V617F allel yükü ile OS arasında ilişki saptanmamıştır (p=0.857). Cox regresyon modeline yukarıda bahsedilen değişkenler dahil edilerek çok değişkenli yaşam analizi yapılmıştır. Bunun sonucunda, ‘DIPSS-plus’ kriterlerine göre yüksek riskli olan grubun ve ASXL1 mutasyonunun OS üzerindeki olumsuz etkisinin sürdüğü gösterilmiştir (sırasıyla OR: 3.19; %95 CI: 1.09-9.2; p=0.002 ve OR: 2.75; %95 CI:1.37-5.5; p=0.033). Sonuç olarak çok değişkenli analiz sonucunda bu iki faktörün bağımsız prognostik önemi ortaya konmuştur. Tek değişkenli analizde ASXL1 mutasyon tipine göre yapılan yaşam analizinde nonsense mutasyon varlığında OS’nin düşük olma eğiliminde olduğu görülmesine rağmen çok değişkenli analizde önemini yitirmiştir (sırasıyla p=0.09; p=0.131). Olgu sayısı az olmasına rağmen IDH mutasyonunu taşıyan PMF grubunda LFS, IDH mutasyonunu taşımayan gruba göre anlamlı derecede kısa saptanmıştır (sırasıyla ortalama 169 ay; %95 CI: 159-180 ve 214 ay; %95 CI: 95-332; p=0.024). Bunun yanında ‘DIPSS-plus’ kriterlerine göre yüksek riskli olan grupta LFS anlamlı derecede kısa bulunmuştur (p=0.032). ASXL1 mutasyonu ve JAK2V617F mutasyonu varlığında LFS’da farklılık gözlenmemiştir (sırasıyla p=0.207 ve p=0.934). Ayrıca PMF grubunda JAK2V617F allel yükü ile LFS arasında ilişki saptanmamıştır (p=0.997). ET olgularında ise ASXL1 mutasyonu, ASXL1 mutasyon tipi, IDH mutasyonu, JAK2V617F

mutasyonu ve JAK2V617F allel yükü ile OS arasında bir ilişki saptanmamıştır (sırasıyla  $p=0.737$ ;  $p=0.945$ ;  $p=0.845$ ;  $p=0.958$ ;  $p=0.249$ ).

**Tartışma:** Sonuç olarak çalışmamız, ASXL1 mutasyonunun PMF olgularında ET'ye göre daha sık görüldüğünü göstermiştir (sırasıyla %24.7 ve %8.4). Çalışmamızda JAK2V617F negatif ET olgularının %7'sinde ve JAK2V617F negatif PMF olgularının %26.3'ünde ASXL1 mutasyonu saptanmıştır. Bu bulgulara dayanarak ASXL1 gen analizinin yapılması sonucunda, ET olgularının %7'sinde ve PMF olgularının %26.3'ünde ek klonal moleküler gelişimin gösterilebileceği düşünülebilir. Çalışmamız sonucunda PMF olgularında JAK2V617F mutasyonu sonrasında görülen en sık ikinci genetik mutasyonun ASXL1 mutasyonu olduğu düşünülebilir. PMF'de ASXL1 mutasyonu varlığında ölüm oranında artış görülmüştür. Ayrıca, çalışmamız rölatif olarak büyük bir PMF kohortunda bu mutasyonun kısa OS ile ilişkili olduğunu desteklemektedir. Tüm bu gözlemler, ASXL1 mutasyonunun PMF patogenezinde kritik rol oynadığını, hastalığın değerlendirilmesine yardımcı olacağını ve belki de rutin pratikte bakılmasının gerekli olabileceğini desteklemektedir. Bu çalışmada ET olgularında yüksek JAK2V617F allel yükünün düşük Hgb, Htc değeri, yüksek LDH düzeyi, kanama sıklığında, ciddi kanama insidensinde, kan transfüzyon ihtiyacında ve masif splenomegali oranında artış ile ilişkisi gösterilmiştir. Buna ek olarak ET'de yüksek JAK2V617F allel yükü ile venöz tromboz arasında zayıf ilişki bulunmuştur. Ayrıca çalışmamız, PMF olgularında yüksek JAK2V617F allel yükünün yüksek Hgb, Htc ve lökosit değerleri ile ilişkisini ve düşük JAK2V617F allel yükünün kan transfüzyon ihtiyacında artış ile olan ilişkisini ortaya koymuştur. Böylelikle, iyi tanımlanmış ve kategorilere ayrılmış MPN olgularında JAK2V617F mutant allel yükünün kantitatif ölçümünün klinik hakkında önemli bir bilgi sağlayacağını düşünmekteyiz. Çalışmamız, hem IDH1 hem IDH2 mutasyonunun kronik faz ET veya PMF'de nadir de olsa görülebileceği göstermiştir (IDH sıklığı sırasıyla %1.9, %6.5). Çalışmamız, MPN'de IDH mutasyonlarının tespit edilmesinde YÇM analizinin, güvenilir, hızlı ve etkili bir tarama yöntemi olduğunu desteklemektedir. PMF olgularımızın 5'inde (%6.5'inde) IDH mutasyonu saptanmıştır (3 IDH1 R132C, 1 IDH1 R132S, 1 IDH2 R140Q). Kronik faz PMF'de IDH mutasyonu saptanan bir olguda seyir sırasında lösemik transformasyon gelişmiştir. Çalışmamızda, PMF'de IDH mutasyonu varlığında ölüm oranında artış gözlenmiştir. Ayrıca PMF'de IDH mutasyonu varlığında LFS'da kısalma görülmüştür. Bundan yola çıkarak PMF'de IDH mutasyonlarının, lösemik transformasyonun öngörülmesine neden olabileceği düşünülebilir. Günümüzde, MPN'de farklı IDH mutasyonlarının farklı prognostik anlamlarının olup olmadığı bilinmemektedir. Çalışmamızda IDH mutant olgu sayısı az olduğu için bu konu araştırılamamıştır. Bunun

yanında çalışmamızda kombine mutasyonların hastalık fenotipi ve seyri üzerine etkisi araştırıldığında PMF olgu grubunda ASXL1 mutasyonu ve IDH mutasyonu birlikteliği ile ölüm ve kanama komplikasyonu arasında ve JAK2V617F mutasyonu ve ASXL1 mutasyonu birlikteliği ile kanama komplikasyonu arasında bir ilişki gösterilmiştir. ET’de ise JAK2V617F mutasyonu ve IDH mutasyonu birlikteliği ile venöz tromboz arasında bir ilişki gözlenmiştir. Mutasyon kombinasyonlarının hastalık seyri ve komplikasyonlar üzerine net etkilerini ortaya koymak için ek çalışmalara ihtiyaç vardır. Çalışmamızda PMF’de JAK2V617F mutasyonu ve JAK2V617F allel yükü ile OS ve LFS arasında ilişki saptanmamıştır. Bu çalışmada diğer bir önemli özellik, PMF olgularında IDH mutasyonu varlığında anormal karyotip veya kötü karyotip anormalliklerinin eşlik etmemiş olmasıdır. IDH mutasyonunu taşıyan PMF olgularımızın hepsi normal karyotipe sahip olarak bulunmuştur. Buna ek olarak ASXL1 mutasyonunu taşıyan PMF olgularında kötü karyotip anormalliğinde artış saptanmamıştır. Buna rağmen çalışmamızda, ASXL1 mutasyonunun OS ve IDH mutasyonunun LFS ile ilişkisi gösterilmiştir. Bu verilere dayanarak ASXL1 ve IDH mutasyonlarının PMF olgularında bağımsız prognostik biyobelirteçler olduğu düşünülebilir. Çalışmamız, PMF olgu grubunda ASXL1 ve IDH mutasyonu gibi yüksek riskli mutasyon varlığında, orta-2 veya yüksek riskli hastalarda önerildiği gibi deneysel ilaç tedavisi veya allogeneik hematopoetik kök hücre naklinin (AHKHN) uygulanmasını desteklemektedir. Sonuç olarak, çalışmamızın sonuçları, önceki verilerle benzer şekilde MPN’de JAK-STAT sinyal yolağından ziyade epigenetik düzenlemeyi etkileyen mutasyonların prognostik önemine işaret etmektedir.

## SUMMARY

**Aims:** Philadelphia-negative (Ph-negative) myeloproliferative neoplasms (MPN) are a sub-category of MPN including polycythemia vera (PV), essential thrombocythemia (ET) and primary myelofibrosis (PMF). All three disorders show a chronic disease course. PV and ET are primarily characterized by erythrocytosis and thrombocytosis, respectively. PMF is primarily characterized by abnormal cytokine expression, bone marrow fibrosis, extramedullary hematopoiesis and shortened survival. After discovery of the JAK2V617F mutation in 2005, molecular basis was unleashed in >95% of PV patients and >50-60% of PMF patients. In 2006, MPL gene mutations have been described in ET and PMF followed by the definition of a mutation in exon 12 of JAK2 in PV one year later. The fact that almost 40% of ET or PMF patients lack a molecular marker strongly supports the involvement of additional mutations in pathogenesis. ASXL1 gene mutations were described in Ph-negative MPN in 2009. Mutations were described in IDH1/IDH2 in 2010. Several studies reported that presence of higher V617F allele burden in ET is associated with defined haematological and clinical markers indicative of a more aggressive behavior while, in PMF, low allele burden was reported to be associated with shortened survival. Most studies examining V617F allele burden have limitations due to retrospective nature. The purpose of this research is to determine ASXL1 and IDH1/IDH2 gene mutations and their clinical importance, prevalence and potential prognostic significance in 107 ET and 77 PMF patients under follow up in Istanbul University Istanbul Medical Faculty, Department of Internal Medicine, Division of Hematology. In addition, our study aimed at assessing the predictive value of burden of V617F allele on complications and overall survival (OS) of ET and PMF and the relationship with V617F allele burden and ASXL1 and IDH1/IDH2 gene mutations.

**Material and methods:** Our study group consisted of 184 patients (107 ET and 77 PMF) diagnosed as Ph-negative MPN according to the WHO criteria in 2008. Patients' demographic data, clinical, laboratory findings and OS were registered. Exon 12 of ASXL1 was amplified from genomic DNA and bidirectionally sequenced. High-resolution melting was performed using the LightCycler 480 real-time polymerase chain reaction (PCR) system for IDH1 mutations (R130) and IDH2 mutations (R140 and 172) followed by bidirectional sequencing confirmation. We used a real-time semiquantitative PCR with 'JAK2 MutaScreen kit' to screen JAK2V617 mutation and the mutant allele burden. All statistical analysis including clinical and laboratory parameters was performed using SPSS (Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey, 2008). All p-values<0.05 were considered statistically significant.



OS curves of ET and PMF were prepared by the ‘Kaplan-Meier’ method and compared by the long-rank test. In addition, leukemia free survival (LFS) in PMF patients was estimated using ‘Kaplan-Meier’ method. Multivariable analyses were conducted with the Cox proportional hazards regression model to determine the relationship between independent variables and OS. The odds ratio (OR) is used to estimate the relative risk of death.

**Results:** A total of 107 ET patients (54.2% female; mean age 56.3 [SD 14.5] and 77 PMF patients (55.8% female; mean age 60.8 [SD 14.5]) were included. The mean follow-up time of ET and PMF patients was 69.91 months (SD 60.8) and 45.61 months (SD 47.52), respectively. The frequency of ASXL1 mutations (exon 12) was significantly higher in PMF patients (19 of 77 patients, 24.7%) compared to ET (9 of 107 patients, 8.4%;  $p=0.005$ ). Our analysis identified 29 different mutations of ASXL1 in 28 out of a total 184 patients, (15.2%) (one PMF patient presented with two simultaneous mutations). Nonsense mutations, including frameshift mutations were detected in 19 patients (10.3%), 8 (4.3%) showed missense mutations and one (0.5%) showed concurrent missense and nonsense mutations. The frequency of IDH1 mutation for ET and PMF patients was 0.9% (1 out of 107 cases) and 5.2% (4 out of 77 cases), respectively. Mutant IDH2 was detected in 1 out of 107 ET patients (0.9%) and 1 out of 77 PMF patients (1.3%). Overall, 2 (1.9%) ET and 5 (6.5%) PMF patients displayed IDH mutations. The ET patient with IDH2 mutation (R140Q) harbored JAK2V617F mutation with an allele burden of 5% while the other patient with IDH1 mutation (R132C) did not harbor JAK2V617F mutation. 3 of 5 IDH mutated PMF patients (1 IDH1 R132C, 1 IDH1 R132S and 1 R140Q) concurrently carried JAK2V617F mutation with an allele burden of 31-50%, 5-12.5% and 31-50%, respectively. 3 of 5 IDH mutated PMF patients (1 IDH1 R132C, 1 IDH1 R132S and 1 R140Q) concurrently carried JAK2V617F mutation with an allele burden of 31-50%, 5-12.5% and 31-50%, respectively. The remaining 2 PMF patients (2 IDH1 R132C) did not carry JAK2V617F mutation. ET and PMF patients demonstrated no significant difference for the frequency of IDH mutation ( $p=0.131$ ). The frequency of JAK2V617F mutation was higher in PMF compared to ET patients (75.3%, 59.8%, respectively;  $p=0.028$ ). Moreover, the frequency of JAK2V617F positive patients with mutant allele burden in upper quartile ranges (allele burden  $>50\%$ ) was higher in PMF with respect to ET (23.4%, 4.7%, respectively;  $p=0.001$ ). There was a trend towards older age and higher leukocyte counts in ASXL1-mutated ET patients compared to wild-type patients ( $p=0.073$  and  $p=0.06$ , respectively). There was a trend towards older age at initial diagnosis and higher leukocyte counts in ASXL1-mutated ET patients compared to wild-type patients

( $p=0.073$  and  $p=0.06$ , respectively). ASXL1 mutated ET patients had significantly more severe bone marrow fibrosis ( $p=0.003$ ). Although the prevalence of total thrombosis, arterial thrombosis and venous thrombosis did not differ among ASXL1-mutated and wild-type ET patients, ASXL1-mutated patients showed a trend towards an increase in the incidence of cerebrovascular events ( $p=0.73$ ;  $p=0.416$ ;  $p=1$  and  $p=0.059$ , respectively). ASXL1 mutation did not predict OS in ET patients ( $p=0.737$ ). Among PMF patients, ASXL1 mutation was associated with older age and a higher incidence of bleeding complications ( $p=0.037$  and  $p=0.008$ , respectively). Also in PMF patients, the incidence of severe bleeding increased in the presence of ASXL1 mutation ( $p=0.001$ ). Similarly, in PMF, a mild positive correlation was observed between ASXL1 mutation and bleeding complications ( $r=0.327$ ). Higher incidence of death was observed in ASXL1-mutated PMF patients than in wild-type patients (42.1% and 10.3%, respectively;  $p=0.004$ ). ASXL1 mutation was detected in 14/58 JAK2V617F mutant (24.1%) and 5/19 JAK2 wild-type (26.3%) PMF patients ( $p=0.535$ ). ASXL1 mutation was present in 6/64 JAK2V617F mutant (9.4%) and 3/43 JAK2 wild-type (7%) ET patients ( $p=0.738$ ). Reciprocally, 73.7% (14/19) ASXL1-mutated PMF and 66.7% (6/9) ASXL1-mutated ET patients carried JAK2V617F mutations. In summary, ASXL1-mutant and wild-type PMF patients demonstrated no difference for the frequency of JAK2V617F mutation ( $p=1$ ). Also, the incidence of JAK2V617F mutation did not differ among ASXL1-mutated and wild-type ET patients ( $p=0.738$ ). IDH mutated PMF patients showed a trend towards female gender ( $p=0.063$ ). The incidence of bleeding complications was significantly higher for ASXL1-mutated PMF patients than wild-type patients ( $p=0.048$ ). Also, there was a trend towards severe bleeding in IDH mutated PMF patients as compared to wild-type patients ( $p=0.061$ ). Similarly, a weak positive correlation was observed between IDH mutation and bleeding complications ( $r=0.27$ ). The incidence of death was higher in PMF patients with IDH mutation (60% and 15.3%, respectively;  $p=0.039$ ). The incidence of leukemic transformation was higher in IDH mutated PMF patients than IDH wild-type patients but with no statistical significance (20% and 4.2%, respectively;  $p=0.24$ ). There was a higher incidence of IDH1 mutation in ASXL1-mutated PMF patients with respect to ASXL1 wild-type PMF patients (15.8% and 1.7%, respectively;  $p=0.044$ ). Yet, the incidence of IDH2 mutation among ASXL1-mutated and wild-type PMF patients showed no difference ( $p=1$ ). In conclusion, PMF patients with ASXL1 mutation showed a trend towards a higher frequency of IDH (IDH1 or IDH2) mutations (15.8%, 3.4%, respectively;  $p=0.093$ ). In PMF, a weak positive correlation was observed between ASXL1 mutation and IDH mutation ( $r=0.216$ ). In PMF patients, there was a weak positive correlation between bleeding

complications and the combined ASXL1 and IDH mutation ( $r=0.240$ ). Also, a weak positive correlation was observed between the combined ASXL1 and IDH mutation and death ( $r=0.255$ ). In our study, JAK2V617F mutation positive ET patients had significantly higher Hgb and Htc levels and lower platelet counts at initial diagnosis ( $p=0.001$ ;  $p=0.001$  and  $p=0.043$ , respectively). Also, massive splenomegaly was significantly more prevalent in JAK2V617F mutation positive ET patients ( $p=0.044$ ). There was a mild positive correlation between JAK2V617F mutation and leukocyte and Htc levels in ET ( $r=0.324$  and  $r=0.362$ , respectively). In addition, in ET, a weak positive correlation was observed between venous thrombosis and the combined JAK2V617F and IDH mutation ( $r=0.203$ ). ET patients with JAK2V617F allele burden data available were divided into three groups: JAK2V617F mutation negative ( $n=43$ ), V617F positive with mutant allele burden in the lower quartile (allele burden  $\leq 50\%$ ,  $n=59$ ) and upper quartile ranges (allele burden  $> 50\%$ ,  $n=5$ ). As compared to other groups, ET patients with upper quartile JAK2V617F allele burden had a significantly higher incidence of bleeding complications ( $p=0.003$ ), higher incidence of severe bleeding ( $p=0.001$ ), greater need for blood transfusions ( $p=0.022$ ) and a higher incidence of massive splenomegaly ( $p=0.015$ ). ET patients with upper quartile JAK2V617F allele burden had significantly lower Hgb levels ( $p=0.002$ ), lower Htc levels ( $p=0.011$ ) and higher LDH levels ( $p=0.012$ ) as compared to patients with lower quartile JAK2V617F allele burden. The load of JAK2V617F mutant allele in ET patients positively correlated with leukocyte count, bleeding complications and venous thrombosis ( $r=0.238$ ;  $r=0.213$  and  $r=0.201$ , respectively). JAK2V617 mutation negative PMF group consisted of a significantly higher number of female patients ( $p=0.009$ ). In PMF patients, the presence of JAK2V617F mutation was significantly associated with higher Hgb levels ( $p=0.005$ ), higher Htc levels ( $p=0.034$ ) and higher leukocyte counts ( $p=0.046$ ). Also, JAK2V617F positive PMF patients showed a trend towards an increase in the incidence of bleeding complications ( $p=0.098$ ) and massive splenomegaly ( $p=0.096$ ). With regard to the JAK2V617F status, PMF patients were divided into three groups: JAK2V617F mutation negative ( $n=19$ ), JAK2V617F positive with mutant allele burden in the lower quartile ( $n=40$ ) and upper quartile ranges ( $n=18$ ). Comparison across all three groups revealed significant associations between upper quartile allele burden and higher leukocyte counts ( $p=0.001$ ). Also, PMF patients with upper quartile JAK2V617F allele burden had significantly higher Hgb ( $p=0.001$ ) and Htc levels ( $p=0.002$ ) as compared to JAK2V617F wild-type patients. Likewise, in PMF patients, there was a mild positive correlation between the load of JAK2V617F mutant allele and leukocyte counts and Htc levels ( $r=0.396$  and  $r=0.318$ , respectively). ‘Kaplan-Meier’ plots revealed significantly

shortened OS in ASXL1-mutated PMF patients as compared to ASXL1 wild-type PMF patients (mean 108 months; 95% CI: 62-153 and 202 months; 95% CI: 123-282, respectively;  $p=0.025$ ). Also, univariate analysis revealed a trend towards shorter OS in the presence of ASXL1 nonsense sequence variations with respect to other sequence variations ( $p=0.09$ ). ‘DIPSS-plus’ with high risk group significantly predicted worse OS ( $p=0.007$ ). OS did not differ between IDH mutant and wild-type PMF patients and JAK2V617F mutant and wild-type PMF patients ( $p=0.351$  and  $p=0.589$ , respectively). Also, JAK2V617F allele burden in PMF did not predict OS ( $p=0.857$ ). A multivariate survival analysis using cox regression model included all aforementioned variables. This model confirmed independent prognostic value of ASXL1 mutations (OR: 2.75; %95 CI:1.37-5.5;  $p=0.033$ ) and ‘DIPSS-plus’ with high risk group (OR: 3.19; %95 CI: 1.09-9.2;  $p=0.002$ ). Prognostic significance was not sustained for ASXL1 nonsense sequence variations in multivariable analysis ( $p=0.131$ ). Although the number of IDH mutated PMF patients was small, we observed a significantly shorter LFS in IDH mutated patients as compared to IDH wild-type patients (mean 169 months; 95% CI: 159-180 and 214 months; 95% CI: 95-332, respectively;  $p=0.024$ ). In addition, LFS was significantly shorter in the high risk group as defined by ‘DIPSS-plus’ criteria ( $p=0.032$ ). In PMF patients, the presence of ASXL1 mutation and JAK2V617F mutation showed no difference in terms of LFS ( $p=0.207$  and  $p=0.934$ , respectively). Also, JAK2V617F allele burden in PMF did not predict LFS ( $p=0.997$ ). In ET patients, the presence of ASXL1, IDH, JAK2V617F mutations, ASXL1 sequence variations and JAK2V617F allele burden were not relevant to OS ( $p=0.737$ ;  $p=0.845$ ;  $p=0.958$ ;  $p=0.945$  and  $p=0.249$ , respectively).

**Conclusion:** In conclusion, our results demonstrate that the frequency of ASXL1 mutation was significantly higher in patients with PMF than ET (24.7% and 8.4%, respectively). In our study group, approximately 7% of JAK2V617F-negative ET (3/43) and 26.3% of PMF patients (5/19) showed the ASXL1 mutations. Based on our findings, it may be deduced that analysis of the ASXL1 genes provided an additional 7% increase in ET and a 26.3% increase in PMF patients with a detected molecular marker of clonality. Our findings implies that ASXL1 mutations seem to be the most prevalent genetic mutations in PMF after JAK2V617F mutation. In PMF, an increase in mortality has been demonstrated in presence of ASXL1 mutation. In our relatively large cohort of PMF patients, ASXL1 mutation was associated with shortened OS. The aforementioned findings support that ASXL1 mutations may be a key factor in the pathogenesis of PMF. Systematic detection of ASXL1 mutations could enable better disease assessment and should be considered to be included in routine

disease evaluation. We showed that the ET patients with upper quartile JAK2V617F allele burden is associated with lower Hgb and Htc levels, higher LDH levels, increased frequency and severity of bleeding complications and an increased frequency of massive splenomegaly. Also, a weak correlation between JAK2V617F allele burden and venous thrombosis was observed in ET patients. In PMF, our data demonstrated the association of upper quartile JAK2V617F allele burden with higher Hgb, Htc levels and leukocyte counts and lower quartile allele burden with increased transfusion requirement. Thus, our results support the contention quantification of JAK2V617F allele burden might reveal relevant clinical information in well-defined categories of MPN patients. This study showed that both IDH1 and IDH2 mutations can occur in chronic-phase ET or PMF, yet infrequently. The frequency of IDH mutations were 1.9% in ET and 6.5% in PMF patients. Our findings confirm high resolution melting (HRM) as a reliable, rapid and efficient screening tool for IDH1/IDH2 mutation detection in MPN. The mutant IDH was detected in 5 PMF patients (6.5%): 3 IDH1 R132C, 1 IDH1 R132S and 1 IDH2 R140Q. One of our chronic phase PMF patients harboring IDH mutations showed leukemic transformation. We observed an increase in mortality and a decrease in LFS in IDH mutated PMF patients. Thus, it can be suggested that IDH mutations may play a role in prediction of leukemic transformation. It has not been yet elucidated whether various IDH mutations portend different prognostic relevance in MPN. This issue was not addressed in our study due to our limited number of IDH mutant cases. Our study also addressed the relationship between combined mutations on disease phenotype and course. In PMF, death and bleeding complications were associated with combined ASXL1 and IDH mutations while combined JAK2V617F and ASXL1 mutation was associated with bleeding complications. In ET, a relationship between venous thrombosis and combined JAK2V617F and ASXL1 mutation was observed. Additional studies are needed to clearly assess the impact of mutation combinations on disease course and severity. According to our results, in PMF, OS and LFS had no relationship with JAK2V617F mutation and V617F allele burden. An important characteristic feature of IDH mutated PMF in this study was the paucity of abnormal or unfavorable karyotype. All IDH mutated PMF patients had normal karyotype. Also, ASXL1 mutated PMF patients did not show an increase in poor karyotype features. Yet, despite these observations, our study determined a relationship between ASXL1 mutation and OS and IDH mutation and LFS. Thus, it seems that ASXL1 mutations and IDH mutations represent independent prognostic biomarkers in PMF. This study implies that, in PMF, the use of an investigational drug therapy or allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (AHSCT) may be justified as proposed in the

management of intermediate-2 or high-risk disease in the presence of a mutationally high risk status such as ASXL1 and IDH mutations. In conclusion, in PMF, our findings support the previous observations that mutations affecting epigenetic regulation might be prognostically more relevant than those involving JAK-STAT signaling.

# 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kronik miyeloproliferatif neoplaziler (MPN), sıklıkla hiperselüler kemik iliği ile birlikte olan ve kanda bir veya daha fazla hücre tipinde artış ile karakterize bir grup klonal multipotansiyel hematopoetik kök hücre hastalığıdır. Bu grup hastalıkların başlangıcı sinsi olmakla beraber genellikle kronik seyir göstermektedir. Fakat değişik oranlarda kemik iliği yetersizliği ve akut lösemiye eğilim yaratabilmektedir (1). Bu hastalık grubunda yer alan kronik miyeloid lösemi (KML), Philadelphia (Ph) kromozomu veya BCR-ABL1 füzyon geni varlığı ile diğerlerinden ayrılan ve tıpta bir prototip halini almış olan bir hastalık grubudur. Çünkü bu hastalık, moleküler patogenezindeki yolakların (örn., ABL1 tirozin kinaz sinyalinin regülasyon kusuru) aydınlatılmasının, hastalık için hedef tedavilerin (örn., imatinib ve diğer tirozin kinaz inhibitörleri) gelişimine neden olabileceğinin önemli bir göstergesidir (2). Ph-negatif MPN, başlıca polisitemia vera (PV), esansiyel trombositemi (ET) ve primer miyelofibrozisten (PMF) oluşmaktadır. Bu üç hastalık multipotansiyel hematopoetik kök hücre kaynağı, klonal proliferasyon özelliği ve kronik seyri ile biyolojik olarak birbirleriyle ilişkilidir. Buna rağmen birbirlerine dönüşüm oldukça nadir olduğu için birbirlerinden ayrı özellikleri olduğuna inanılmaktadır. Hastalığın erken döneminde henüz karakteristik özellikler gelişmediği için zor tanı konabilmektedir. Ph-negatif MPN'lerdeki moleküler patogenezi araştıran çalışmalar, KML'ye benzer şekilde, en azından belirli derecelerde tirozin kinaz sinyalinde regülasyon kusurunu ortaya çıkarmıştır. Bu hastalarda tirozin kinazdaki mutasyon, JAK2 genindeki somatik tek nokta mutasyonu olan JAK2V617F mutasyonudur. Bu mutasyon Ph-negatif MPN olgularının %50-95'inde görülmektedir (3). Bu mutasyonun keşfi, tanı kriterlerinde önemli bir revizyona neden olmakla beraber, tek bir mutasyonun bu hastalıklardaki heterojen fenotipik özelliklerle nasıl ilişkili olduğu sorularını da beraberinde getirmiştir (4). Ayrıca JAK2V617F mutasyonunun keşfi henüz başarılı bir tedavi yaklaşımına neden olmamıştır (5). Bunun yerine klon büyüklüğü, mutasyon yükü ve klinik önemi olduğu düşünülen klonal olaylara dikkat çekmiştir (6). Diğer genlerdeki mutasyonların tespiti ek yolakların anlaşılmasına katkıda bulunabilir (7).

Üç klasik Ph-negatif MPN'de, 2005 yılında JAK2V617F mutasyonu keşfedilene kadar MPN'lerin temelindeki moleküler olay anlaşılmamıştır (8-11). İleri çalışmalar JAK2V617F mutasyonunun PV'da %95'den yüksek oranda ve ET veya PMF'de yaklaşık %50-60 oranında bulunduğunu göstermiştir (12-19). JAK2V617F allelini taşımayan PV'lı birkaç olguda 2007 yılında JAK2 ekzon 12'de ek bir mutasyon tanımlanmıştır (20). 2006 yılında ise ET ve PMF

tanılı olguların %3-8'inde, trombopoetin reseptörü olan MPL'nin 515.kodonunda mutasyonlar tanımlanmıştır (21-25). Bu mutant allellerin hepsi tirozin kinaz bağımlı hücrel sinyal yollarının, özellikle JAK-STAT yolağının aktivasyonuna bağlı olarak fonksiyonun kazanılmasına neden olmaktadır (26). Fakat JAK2 veya MPL mutasyonunu taşımayan olgularda da JAK-STAT yolağında aktivasyon olduğu kanıtlanmıştır. Bu kanıt, bu yolla ilişkili diğer genlerde halen bilinmeyen mutasyonlar olduğuna işaret etmektedir. Bunlardan biri olan lenfosit-spesifik adaptör protein (LNK), JAK-STAT sinyalinin negatif regülasyonunda görevli adaptör protein ailesinin bir üyesini kodlamaktadır.

JAK2 ve MPL mutasyonları, Ph-negatif MPN'lere neden olan onkogenik olaylar olmasına rağmen bu hastalıklardaki heterojeniteyi açıklamamaktadır. ET ve PMF olgularının yaklaşık %40'ında genetik kusurlar henüz tam olarak tanımlanmamıştır (26). Bundan yola çıkarak, MPN fenotipinde ek somatik genetik faktörlerin önemli rol oynadığı düşünülebilir. Sonuç olarak JAK2V617F mutasyonunu taşımayan MPN'lerin moleküler temeli net değildir. MPN'lerdeki genetik anormalliklerin spektrumu son 8 yıl içerisinde artış göstermiştir. JAK-STAT inhibitör adaptör proteini olan LNK'i kodlayan gendeki mutasyonlar yanında epigenomu etkileyen TET onkogen ailesi üyesi 2 (TET2), izositrat dehidrogenaz 1 (IDH1) ve izositrat dehidrogenaz 2 (IDH2), Enhancer of Zeste Homolog 2 (EZH2) ve Additional Sex Combs-Like 1 (ASXL1) mutasyonları tanımlanmıştır (27-31). Bu gelişmelere rağmen MPN gelişiminden sorumlu ilk genetik olaylar halen tam olarak anlaşılmış değildir.

ASXL1, 'Drosophila Additional sex combs'un (Asx) insan homologudur. Asx, Trithorax-grup (Tx-G) ve Polycomb-grup (Pc-G) gen fonksiyonlarını etkileyen bir proteindir (32). Memeli olmayan ve hematopoetik olmayan hücre ortamında ASXL1'in birkaç fonksiyonu tanımlanmasına rağmen memeli hematopoetik hücre fonksiyonları tam olarak anlaşılmamıştır. Tüm üç ASXL ailesi üyeleri amino-terminal homolog bölgesi (ASXH domaini), nükleer reseptörler için iki proksimal etkileşim bölgesi ve bir C-terminal bitki homeodomaininden (PHD domaini) oluşmaktadır. ASXL1 hakkındaki genetik veri, ASXL1 mutasyonlarının ağırlıklı olarak ekzon 12'de nonsense (anlamsız) ve çerçeve kayması mutasyonları şeklinde ortaya çıktığını desteklemektedir. Bu mutasyonların fonksiyon kazanımına mı yoksa kaybına mı neden olduğu tam olarak bilinmemektedir. Yakın zamanda yapılan somatik ASXL1 knock out fare modelinde hafif hematopoetik kusur saptanmıştır. Ancak homozigot mutasyonun varlığının tam penetrans göstermeyen perinatal ölüm ile ilişkili olması, ASXL1 kaybının hematopoez üzerindeki muhtemel gerçek etkisinin maskelenmesine neden olduğunu düşündürmüştür (33). ASXL1 mutasyonları, ilk kez 2009 yılında Gelsi-Boyer



V. ve arkadaşları tarafından miyelodisplastik sendromda (MDS) tanımlanmıştır (34). Bu çalışmada 35 MDS'lu hastanın 4'ünde (%11) ASXL1 mutasyonları saptanmıştır. ASXL1'in ileri sekans analizleri, MPN ve diğer myeloid hastalıklarda ASXL1 mutasyonlarının insidensinin belirlenmesini sağlamıştır. ASXL1 mutasyonları, MPN'de %10, akut myeloid lösemide (AML) %17 ve kronik miyelomonositik lösemide (KMML) %49 oranında bulunmuştur (31, 34, 35). ASXL1 mutasyonunun sıklığı PV'da %2-5, ET'de %5-10, PMF'de %13-26 ve post-PV/ET miyelofibroza %22-38.5 oranında bildirilmiştir (31, 36, 37). PMF'de ASXL1 mutasyonunun tüm yaşam süresinde (OS) kısalmaya neden olduğunu bildiren kısıtlı sayıda çalışma bulunmaktadır (31, 37, 38). Bugüne kadar yapılan çalışmalar çoğunlukla küçük hasta serilerini içermektedir (31, 37, 38). Son olarak büyük bir hasta serisini içeren bir çalışmada da PMF'de ASXL1 mutasyonu kötü prognozla ilişkili bulunmuştur (39). Sonuç olarak ASXL1 mutasyonunun prognostik öneminin olduğuna dair bulgular olmasına karşın tüm dünyada halen sınırlı sayıda çalışma mevcuttur. Bizim çalışmamız rölatif olarak büyük hasta grubunu içermekle beraber ülkemizde MPN'de bu mutasyonun sıklığını ve prognostik önemini araştıran hiçbir çalışma yapılmamıştır. Bildiğimiz kadarı ile bugüne kadar ASXL1 mutasyonunun araştırıldığı en geniş sayıda ET olgusunu içeren çalışma bizim çalışmamızdır.

IDH1, kromozom 2q33.3'de ve IDH2, kromozom 15q26.1'de yerleşmiştir. Bu iki gen sırasıyla IDH1 ve IDH2 enzimini kodlamaktadır. Bu enzimler, homodimerik nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADP<sup>+</sup>) bağımlı enzimlerdir. Sonuç olarak izositratın  $\alpha$ -ketoglutarata ( $\alpha$ -KG) oksidatif dekarboksilasyonunu katalize ederek NADP<sup>+</sup>den NADPH oluşumunu sağlar. IDH mutasyonları ekzon 4'de yer alırlar ve bir arginin kalıntısında tek aminoasit değişimini içermektedirler (40). Bu mutasyonlar, R132 (IDH1), R172 (IDH2) ve R140 (IDH2)'dan oluşan üç spesifik arginin kalıntısını etkilemektedir. IDH1 ve IDH2 somatik mutasyonları ilk olarak santral sinir sistemi tümörlerinde tanımlanmıştır (41, 42). AML'li hastalarda tüm genomu içeren sekans analizinde 188 hastanın 16'sında IDH1 mutasyonu saptanmıştır (43). IDH1/IDH2 mutasyonları, AML yanında lösemik transformasyon sırasındaki MPN'de ve nadiren MDS'lu hastalarda gösterilmiştir (36, 40, 44, 45). IDH mutasyonu, en büyük MPN hasta serisini içeren çalışmada ET'de %0.8, PV'da %1.9, PMF'de %4.1, post-ET/PV miyelofibroza %1, blastik faz ET'de %0, blastik faz PV'da %25 ve blastik faz PMF'de %25 oranında bildirilmiştir (40). AML'li hastalardan farklı olarak MPN'lerde IDH mutasyonlarının prognostik önemiyle ilgili bilgi kısıtlıdır (46). Tefferi A. ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada IDH mutasyonlarının PMF'de lösemik transformasyon için bağımsız risk faktörü olduğu ve JAK2V617F mutasyonu ile birlikte

lökogenik riski arttırdığı bildirilmiştir (46). Başka bir çalışmada IDH mutasyonları kronik faz PMF’de yaşam üzerine etkisiz bulunurken blastik faz PMF ve blastik faz MPN’de kısa yaşam süresi ile ilişkili bulunmuştur (40). Farklı IDH mutasyon varyantlarının PMF’de farklı biyolojik veya prognostik özellikler taşıyıp taşımadığı henüz bilinmemektedir. Sonuç olarak günümüzde IDH1/IDH2 mutasyonlarının prognostik önemini araştıran oldukça kısıtlı sayıda çalışma mevcuttur. Bizim çalışmamız rölatif olarak büyük hasta grubunu içermekle beraber ülkemizde MPN’de bu mutasyonun sıklığını ve prognostik önemini araştıran bir çalışma bulunmamaktadır.

MPN’de JAK2V617F mutasyonu ve allel yükünün prognostik önemi, gerek hayvan modelleri gerek insan çalışmalarıyla detaylı araştırma konusu olmuştur. JAK2V617F allel yükü ile ilişkili net bir görüş birliği olmamasına rağmen yüksek allel yükünün PV’ya benzer klinik fenotipe neden olduğu ile ilgili konsensüs vardır. Retrospektif kısıtlayıcı özelliklerine karşın bir çok çalışmada MPN’de JAK2V617F allel yükü ile hematolojik özellikler arasında korelasyon gösterilmiştir. Çalışmalar, PV’da en yüksek JAK2V617F allel yükü, ET’de en düşük allel yükü ve PMF’li olguların çoğunda orta-yüksek allel yükü varlığını ortaya koymuştur (47, 48). Retrospektif bir çalışmada PV ve ET olgularında tromboz sıklığı, JAK2V617F allel yükü ile ilişkili olarak artış göstermiştir (49). 2000’den fazla ET tanılı olguyu içeren üç bağımsız meta-analizde JAK2V617F mutasyon varlığının trombozdaki rolü tanımlanmıştır. 260 ET olgusunu içeren bir çalışmada JAK2V617F allel yükünün %25’den fazla olması özellikle arteriyel trombozla ilişkili bulunmuştur (50). PMF tanılı olguları içeren bir çalışmada JAK2V617F mutasyon yokluğunda bu mutasyonu taşımayan gruba göre anemi daha derin bulunmuştur (15). Tefferi A. ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada PMF’de düşük mutant yükü olan olgularda yüksek allel yükü olan veya mutasyon taşımayanlara göre OS daha düşük bulunmuştur (13). Başka bir çalışmada da düşük allel yükü olan olgularda OS ve anemiye progresyon zamanı daha kısa bulunmuştur (12). Sonuç olarak JAK2V617F mutasyonunun özgün hematolojik ve klinik özellikler ile ilişkisi gösterildikten sonra bu mutasyonun allel yükünün PV veya ET’de en önemli komplikasyonlar olan vasküler olaylarla ilişkisini, miyelofibroza veya akut lösemiye dönüşüm riskini ve PMF’de prognoz ve yaşam üzerine ilişkisini araştıran çalışmalar yapılmıştır. Çalışmalar çoğunlukla retrospektif olmasına, genotipleme yöntemleri farklı olmasına ve bulgular bazen çelişkili olmasına rağmen mutant allel yükünün MPN için tanımlanmış fenotipik özelliklerle korelasyon gösterdiği konusunda yeterli kanıt bulunmaktadır. Sonuç olarak iyi tanımlanmış kategorilere ayrılmış MPN olgularında JAK2V617F allel yükünün kantitatif ölçümü klinik hakkında aydınlatıcı bilgi

verebilir. Bundan yola çıkarak bizim çalışmamızda ET ve PMF olgularında JAK2V617F mutasyonunun allel yükünün kantitatif ölçümü sonucunda allel yükü ile komplikasyonlar ve OS arasındaki ilişki araştırılmıştır. Ayrıca JAK2V617F allel yükü ile ASXL1 mutasyonu ve IDH1 ve IDH2 gen mutasyonları arasındaki ilişkinin araştırılması hedeflenmiştir.

Bu çalışmanın amacı İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi (İTF) Hematoloji Polikliniği'nde takip edilmekte olan Ph-negatif MPN olgularında (ET, PMF) ASXL1, IDH1 ve IDH2 gen mutasyonlarının sıklığının belirlenmesidir. Ayrıca aynı olgu grubunda bu mutasyonlar ve JAK2V617F allel yükü ile klinik bulgular ve prognoz arasındaki ilişkinin araştırılması amaçlanmıştır. ASXL1, IDH1 ve IDH2 gen mutasyonları ve JAK2V617F mutasyonlarının araştırılması için öncelikle venöz kandan genomik DNA izolasyonu yapılmıştır. ASXL1 (ekzon 12) mutasyonlarını tespit etmek için DNA çift taraflı olarak dizilenmiştir. IDH1 ve IDH2 mutasyonlarını (ekzon 4) tespit etmek için gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) cihazında yüksek çözünürlüklü melting (YÇM) yöntemine dayalı olarak örnekler gruplandırılmıştır. Sonuçlar çift yönlü DNA dizileme ile konfirme edilmiştir. Çalışmamızda ticari diagnostik kit kullanılarak gerçek zamanlı semi-kantitatif PZR metodu ile JAK2V617F mutasyon analizi gerçekleştirilmiş ve eş zamanlı mutant allel yükü tespit edilmiştir ('JAK2 MutaScreen Assay' Ipsogen, Luminy Biotech, Marsilya, Fransa).

Sonuç olarak, MPN'lerde bu yeni genetik özelliklerin tanınmasının, hastalığın patogenezinin daha iyi anlaşılması yanında tedavide yeni özgül tanısal, prognostik ve terapötik yaklaşımların geliştirilmesine yol açacağını düşünmekteyiz.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Myeloid Neoplaziler

Klonal myeloid neoplaziler, multipotansiyel kök hücre veya çok erken öncül hücrelerdeki edinsel mutasyonlar sonucunda ortaya çıkar. Primer mutasyona neden olan kromozomal değişimi, bazen sitogenetik analizle göstermek mümkündür. Kromozomların translokasyonları, inversiyonları ve delesyonları sonucunda onkojenik füzyon proteinlerini kodlayan genlerin ekspresyonu gerçekleşir. Ayrıca hücre büyümesi, programlanmış hücre ölümü veya diğer düzenleyici yolların kontrolü için kritik önemi olan molekülleri kodlayan genlerin fazla veya az eksprese olmasına neden olur (51). Myeloid neoplaziler, 2008 Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından sınıflandırılmıştır (Tablo I). Akut myeloid lösemi (AML) ve miyelodisplastik sendromun (MDS) çoğunluğu, mutasyona uğramış multipotansiyel kök hücreden kaynak almaktadır. Kronik miyeloproliferatif neoplaziler (MPN), bir veya daha fazla myeloid seride, olgun hücrelere farklılaşabilen hücrelerin klonunun genişlemesi sonucunda ortaya çıkar. AML hücreleri ise proliferasyona devam eder ancak olgun hücrelere farklılaşamaz.

MPN'de yüzey membran ve nükleus arasındaki sinyal yolağında bir proteini kodlayan gende sıklıkla bir mutasyon vardır. Bu protein sıklıkla bir tirozin kinazdır ve mutasyon sonucunda aktive olur. Bunun sonucunda neoplastik hücreler, büyüme faktörlerine bağımlı olmadan çoğalıp farklılaşabilir. Aktive tirozin kinazlara örnek olarak kronik miyeloid lösemideki (KML) BCR-ABL1 füzyon geni ürünü verilebilir. Polisitemia veranın (PV) hemen hemen tamamında, esansiyel trombositemi (ET), primer miyelofibrozis (PMF), halka sideroblastlı ve trombositozlu refrakter anemi (RARS-T) olgularının bir kısmında ise başka bir aktive tirozin kinaz olan JAK2 genindeki mutasyon ürünü (JAK2V617F) bulunmaktadır (51).

MDS'da, onkogen ve tümör baskılayıcı genlerde ortaya çıkan genetik değişimler iyi anlaşılabilmiştir. Bu hastalık grubunda hücre proliferasyonuna rağmen inefektif hematopoezin varlığı bilinmektedir. Kemik iliğindeki hematopoetik hücrelerde apoptotik ölüm oranı artmakla beraber olgun hücrelerin yeterli miktarda üretimi duraklamaktadır. MDS'un spesifik sitogenetik anormallikle birlikte olan tek alt tipi 5q delesyonudur. MDS'da delesyona uğrayan genler arasında en ilişkili görüneni RPS14'dür (52). MDS'lu olguların bazılarında 17p13.1'deki TP53 tümör baskılayıcı gende delesyon ortaya çıkmaktadır.

**Tablo I. Myeloid neoplazmların 2008 Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) sınıflandırma şeması**

1. Akut myeloid lösemi (AML)
1.1 Tedavi ilişkili myeloid neoplaziler
1.2 Tekrarlayan sitogenetik/genetik anormalliklerle birlikte olan AML
1.3 Miyelodisplastik değişikliklerle birlikte olan AML
1.4 AML, başka şekilde sınıflandırılmamış
2. Miyelodisplastik sendromlar (MDS)
2.1 Tek dizide displazi ile seyreden refrakter sitopeniler (RCUD)
2.2 Halka sideroblastlı refrakter anemi (RARS)
2.3 Çoklu dizide displazili refrakter sitopeni (RCMD)
2.4 Artmış blastlı refrakter anemi I-II (RAEB-I, RAEB-II)
2.5 İzole delesyon 5q
2.6 MDS, sınıflanmamış (MDS-U)
2.7 Çocukluk çağında MDS
3. Miyeloproliferatif neoplaziler (MPN)
3.1 Kronik myeloid lösemi (BCR-ABL1 füzyon geni ile birlikte)
3.2 Polisitemia vera (genellikle JAK2 V617F mutasyonu vardır)
3.3 Esansiyal trombositemi (sıklıkla JAK2 V617F mutasyonu vardır)
3.4 Primer miyelofibrozis (sıklıkla JAK2 V617F mutasyonu vardır)
3.5 Kronik nötrofilik lösemi (nadiren JAK2 V617F mutasyonu ile birlikte)
3.6 Kronik eozinofilik lösemiler ve diğer kronik myeloid lösemiler (PDGFR- $\alpha$ , PDGFR- $\beta$ ve FGFR1 yeniden düzenlemeyle birliktelik gösteren myeloid neoplaziler)
3.7 Mast hücre hastalığı
3.7.1 Ürtikerya pigmentozayı içeren kutanöz mastositoz
3.7.2 Sistemik matositoz (genellikle KIT <sup>D816V</sup> mutasyonu ile ilişkili)
3.7.3 Mast hücreli lösemi
4. MDS/MPN
4.1 Kronik miyelomonositik lösemi (KMML)
4.2 Juvenil miyelomonositik lösemi (sıklıkla PTPN11 veya NF veya RAS mutasyonu ilişkili)
4.3 Atipik kronik miyeloid lösemi

## 2.2. Miyeloproliferatif Neoplaziler

MPN, tipik olarak kemik iliği hücreselliginde artış, hücre dizilerinde maturasyon ve organomegali ile karakterize klonal hematolojik hastalıklardır. Ayrıca hematopoezde artış ve değişken derecelerde kemik iliği fibrozisinin varlığı diğer ortak özelliklerdir.

Yaklaşık 10 yıl önce MPN ‘klasik’ ve ‘atipik’ olarak sınıflandırılmıştır. Klasik MPN grubunda olan KML, klasik morfolojik ve klinik bulguları yanında Philadelphia (Ph) kromozomu veya BCR-ABL1 füzyon geni varlığı ile diğerlerinden ayrılmaktadır. Klasik MPN grubundan olan PV, ET ve PMF, günümüzde Ph-negatif MPN olarak bilinmektedir. Atipik MPN grubunda ise, kronik nötrofilik lösemi, kronik miyelomonositik lösemi (KMML), juvenil miyelomonositik lösemi, kronik eozinofilik lösemi/hipereozinofilik sendrom, kronik bazofilik lösemi, sistemik mastositoz ve sınıflandırılmamış MPN yer alır (53).

Yaklaşık 60 yıl önce Polisitemia Vera Çalışma Grubu (PVSG), Ph kromozomu negatif miyeloproliferatif hastalıkların teşhis kriterlerini ve sınıflamasını tanımlamıştır. 2001 yılında ‘DSÖ’, tanı kriterlerine laboratuvar bulguları, görüntüleme ve kemik iliği incelemesi konusunda eklemeler yaparak yeni bir sınıflama önermiştir (54). 2008 yılında sitogenetik inceleme ve moleküler biyolojideki gelişmeler ışığında ‘DSÖ’ bu grup hastalıkları MPN olarak adlandırmıştır. Klinik davranış, morfolojik özellikler, sitogenetik ve moleküler değişiklikler göz önüne alınarak yeni gruplar sınıflamaya eklenmiştir (55). Tablo II’de MPN grubuna dahil edilen hastalıklar özetlenmektedir.

PMF ilk kez 1879 yılında ‘Heuck’ tarafından, PV, ilk kez 1892 yılında Fransız hekim ‘Vaquez’ tarafından ve ET ise 1934 yılında ‘Epstein ve Goedel’ tarafından tanımlanmıştır (56, 57). ‘William Dameshek’ tarafından 1951 yılında miyeloproliferatif bozukluklar ilk kez bir hastalık grubu olarak sınıflandırılmıştır (58). Bu hastalık grubunu oluşturan hastalıklar arasında KML, PV, PMF, ET, megakaryositik lösemi ve eritrolösemi (Di Guglielmo sendromu) vardır. Son 50 yıldaki gelişmeler sayesinde günümüzde Dameshek’in görüşlerini geliştirmek mümkün olmuştur. ‘DSÖ’, günümüzde, MPN terimini kullanmayı önermektedir. Bu gruptaki tüm hastalıklarda miyelofibroza dönüşüm ve değişken derecelerde AML’ye dönüşüm olabilmektedir. KML’de AML’ye transformasyon sık olmakla beraber diğer MPN grubunda daha nadirdir. Zaman içerisinde megakaryositik lösemi ve eritrolösemi, bu gruptan ayrılarak AML alt grubu altında akut megakaryoblastik lösemi ve akut eritroid lösemi olarak tekrar tanımlanmıştır. KML, PV, PMF, ET ise klasik MPN olarak adlandırılmıştır (54). 1960 yılında t(9;22) (p34; q11.2) translokasyonu olarak adlandırılan Ph kromozomu ve 1982 yılında BCR-ABL1 füzyon geninin keşfedilmesi sonrasında KML bu gruptan ayrılmıştır (59,

60). KML, pluripotent lenfoid-miyeloid hemopoietik kök hücresinde t(9;22) (p34; q11.2) translokasyonu sonucunda oluşan klasik kronik bir MPN'dir. Bunun sonucunda oluşan BCR-ABL1 füzyon geni aktive olmuş tirozin kinazı kodlamaktadır (55, 61). 2005 yılında, JAK2 genindeki nokta mutasyonu olan JAK2V617F mutasyonu tanımlanmıştır. Bu mutasyon, PV'lı hastaların hemen hemen hepsinde, ET ve PMF'lu hastaların yaklaşık yarısında bulunmaktadır (8, 10, 11, 62, 63). Trombopoetin reseptöründe (MPL) nokta mutasyonu olan MPL W515L mutasyonunun, ilk kez 2006 yılında miyeloproliferasyon, belirgin trombositoz, ekstramedüller hematopoeze bağlı ileri derecede splenomegali ve artmış retikülin fibrozisi ile ilişkisi gösterilmiştir (21). Sonraki çalışmalar, bu mutasyonun, ET ve PMF olgularında düşük oranda bulunduğu göstermiştir (64-67).

## **Tablo II. Miyeloproliferatif neoplazilerin (MPN) 2008 Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) sınıflandırma şeması**

Kronik miyeloid lösemi

Polisitemia vera

Esansiyel trombositemi

Primer myelofibrozis

Kronik nötrofilik lösemi

Kronik eozinofilik lösemi/ başka şekilde sınıflandırılmamış

Hipereozinofilik sendrom

Mast hücre hastalığı

MPN (sınıflandırılmayan)

### **2.2.1. Polisitemia Vera**

#### **2.2.1.1. Epidemiyoloji**

Polisitemia vera (PV), herhangi bir uyaran olmadan ve ekstramedüller hematopoeze eğilim yaratmadan morfolojik olarak normal kırmızı kan hücreleri, beyaz küre hücreleri ve trombositlerin aşırı üretimi ile karakterize, edinsel klonal hematopoetik bir kök hücre hastalığıdır. Yıllık insidensi yaklaşık 100.000'de 2 olmakla beraber, çalışılan hasta popülasyonuna ve yaşa göre 100.000'de 1 ile 100.000'de 18 arasında değiştiği tahmin edilmektedir (68, 69). Çocuklarda nadiren görülebilmekle beraber kadınlar için ortalama yaş 50, erkekler için 60'dır (70). Erkek baskınlığı biraz daha fazla olmasına rağmen 40 yaşın altında kadınlarda daha sık görülmektedir (71). PV tüm etnik gruplarda ortaya çıkmakla

beraber Kafkas ırkına göre Afrika kökenli Amerikalılar'da daha nadir görülmektedir. Doğu Avrupa Yahudilerinde daha sık görülür (72). PV, tipik olarak edinsel bir hastalık olmasına rağmen diğer MPN gibi aynı aile içinde gözlenebildiği belirlenmiştir. Bunun sonucunda MPN gelişim riskini arttıran somatik ve kalıtsal faktörlerin rol oynadığı düşünülmüştür (73, 74).

### **2.2.1.2. Patogenez**

Hematopoez normalde poliklonal olmasına rağmen, PV'da monoklonaldır. PV'da transforme olan pluripotent hematopoetik kök hücreleri, periferik kan hücrelerini üretir. PV'da multipotent hematopoetik progenitör hücrenin etkilenmesi karakteristik bir özelliktir. Geçen yüzyılın ikinci yarısında PV'da kırmızı kan hücrelerinin yaşam süresinde uzama olmadığı ve eritroid havuzda miyeloid progenitör kompartmana göre artış olmadığı gösterilmiştir (75, 76). Hiperoksi sonrası veya böbrek yetersizliğine rağmen PV'lı hastalarda eritropoezin devam ettiği gözlenmiş ve bunun sonucunda PV'da eritropoezin otonom olduğu farkedilmiştir (77, 78). PV'da diğer eritrositoz nedenlerinden farklı olarak serum eritropoetin (EPO) düzeyleri oldukça düşüktür. Eritroid progenitörlerin değerlendirilmesi için saflaştırılmış EPO ve semisolid kültür tekniklerinin geliştirilmesinden sonra PV'da eritropoezin otonom olduğu gösterilmiştir (79). PV'da eritroid progenitör hücrelerinin multipl hematopoetik büyüme faktörlerine in vitro duyarlılığın gösterilmesi, hematopoetik büyüme faktörü reseptör fonksiyonunun araştırılmasına neden olmuştur. PV'da eritroid progenitörlerinde EPO reseptör ekspresyonu ve EPO bağlanması ile ilişkili çalışmalar, normal progenitör hücrelerden büyük farklılıklar ortaya çıkarmamıştır (80). Ayrıca EPO reseptöründe büyük rearanjmanlar veya fonksiyonel mutasyonlar saptanmamıştır (81). PV'da IL-3 ve kök hücre faktörü reseptörleri ile ilgili çalışmalar, normal bireylerden farklılık göstermemiştir (82). PV'da EPO reseptörü patogenezle ilişkisiz kabul edilse de PV'da büyüme faktörü reseptör biyolojisindeki ileri incelemeler, MPL ve insülin-benzeri büyüme faktörü 1'e (IGF-1) dikkati çekmiştir. PV'da eritroid progenitör hücreleri, IGF-1'e aşırı duyarlıdır. Periferik kan mononükleer hücreleri üzerindeki IGF-1 reseptörleri, yapısal olarak tirozin fosforilize olup normal periferik kan mononükleer hücrelerine göre IGF-1'e daha hassastırlar (83, 84). Ayrıca, PV'da IGF-1 bağlayıcı protein-1'in serum konsantrasyonu artmıştır ve bu protein in vitro olarak 'eritroid burst' oluşumunu stimüle eder (85). Takip eden çalışmalarda, PV'da IGF-1 bağlayıcı proteininde artış gösterilmekle beraber fosforilizasyon kusuru veya IGF-1 reseptör geni sekansında anormallikler ortaya konmamıştır (86).

MPL, pluripotent hematopoetik progenitörlerinde eksprese edilir ve onun ligandı olan trombopoetin (TPO), bu hücrelerin yaşam süresini arttırır (87, 88). Farede fazla TPO



maruziyeti sonrasında granülositoz, trombositoz, osteomiyelofibroz ve ekstremiteler hematopoez gösterilmiştir (89). PV'da trombosit ve megakaryositlerde MPL protein ekspresyonu belirgin olarak azalır. Bunun sonucunda trombositlerde trombopoetin indüklenmiş sinyal iletiminde belirgin azalma gözlenir. MPL protein ekspresyon kaybı, PV'lı hastaların çoğunda görülmesine rağmen eritrositoz veya trombositozu neden olan sekonder durumlarda hiçbir zaman gözlenmez (90). MPL ekspresyon kaybının derecesi, hastalık süresi ve ekstremiteler hematopoezin derecesi ile ilişkili görünmektedir (91). MPL hücre yüzey ekspresyonunu hasarlayan MPL polimorfizmi, miyeloproliferatif bir fenotipe neden olmaktadır (92). Bu polimorfizm, MPL'nin distal N-terminal domaininde hasara neden olarak kontrolsüz miyeloproliferasyona neden olur (93, 94).

Bazı miyeloproliferatif hastalıklarda bazal tirozin kinaz aktivitesinin keşfi, PV'da olası bir moleküler hasarın varlığını düşündürmüştür (95, 96). JAK2, PIK3 veya Src'nin inhibitörlerinin, PV'da eritropoetin bağımsız koloni (EEC) oluşumunu ortadan kaldırdığına dair yazılar, artmış kinaz aktivitesinin indirekt kanıtıdır (97). PV'da büyüme faktörüne aşırı duyarlılık göz önüne alındığında temel tirozin kinaz aktivitesi için kanıt yetersizdir.

PV progenitörlerinde endojen eritroid koloni büyümesinin JAK2 kinaz inhibitörleri ile baskılandığının gösterilmesi, JAK2 geninde sekans yapılmasına neden olmuş ve JAK2 psödokinaz domaininde nokta mutasyonun (V617F) keşfedilmesine neden olmuştur (9, 98). Bu gözlemi takiben büyük ölçekli sekanslama projelerinin kapsamında büyük çalışmalar yayınlanmıştır (8, 10, 11, 62, 99).

### **2.2.1.3. Tanı**

JAK2 mutasyonlarının (örneğin JAK2V617F, JAK2 ekson 12 mutasyonları) keşfedilmesinden sonra günümüzde en çok kullanılan tanı sistemi olan 2008 yılında revize edilmiş 'DSÖ' kriterleri geliştirilmiştir (Tablo III) (55). JAK2V617F mutasyonu, miyeloid neoplaziye spesifiktir ve diğer polisitemiye yol açan durumlarda saptanmaz (100). Sonuç olarak PV tanısında sensitif bir göstergedir. Fakat bu mutasyon PV için spesifik değildir, ET, PMF ve RARS-T olgularının yaklaşık %50'sinde bulunmaktadır (101, 102, 103). Diğer miyeloid neoplazilerde daha az sıklıkta saptanmakla beraber lenfoid tümörlerde hiç bulunmamaktadır (104, 105). Sonuç olarak JAK2V617F mutasyonu MPN'leri birbirinden ayırmaz. Ayrıca JAK2 mutasyonu taramaları standardize edilmemiştir ve yalancı pozitiflikler yanında yalancı negatiflikler saptanabilir. Bu durum dikkate alınarak 2008 yılında revize edilmiş DSÖ kriterlerinde, MPN ile tutarlı kemik iliği histolojisi, JAK2 mutasyonu-negatif PV tanısı için gereklidir.

**Tablo III. DSÖ 2008 PV tanı kriterleri**

<p><b>Majör kriterler:</b></p> <ol style="list-style-type: none"><li>1- Erkeklerde hemoglobin (Hgb) &gt; 18.5 g/dl, kadında &gt; 16.5 g/dl olması veya yaş, cinsiyet ve yaşanan irtifaya göre hesaplanmış referans aralığının %99'undan büyük Hgb değeri veya demir eksikliğinin düzeltilmesi ile ilişkili olmadan bazale göre <math>\geq 2</math> g/dl artış ile birlikte erkeklerde Hgb &gt; 17 g/dl veya kadında &gt; 15 g/dl olması veya ortalama değerden %25'den fazla artmış kırmızı hücre kitlesi</li><li>2- JAK2V617F mutasyonu veya benzer mutasyonun varlığı</li></ol> <p><b>Minör kriterler:</b></p> <ol style="list-style-type: none"><li>1- Kemik iliğinde üç seride miyeloproliferasyon</li><li>2- Serum EPO düzeyinin normalin altında olması</li><li>3- Endojen eritroid koloni büyümesi</li></ol>
<p><b>Tanı:</b> Tanı konması için iki majör ve bir minör kriter veya ilk majör kriterle beraber iki minör kriter gereklidir.</p>

#### **2.2.1.4. Klinik Özellikler**

PV'nın başlangıç semptomları spesifik ve diagnostik değildir (Tablo IV). Bu semptomların çoğu eritrosit kitlesinde artış ile ilişkili hiperviskozite sonucunda ortaya çıkar. En belirgin etkisini dolaşım stazı sonucunda santral sinir sisteminde gösterir. PV'lı hastaların yaklaşık %30'unda banyo sonrasında ortaya çıkan kaşıntı, hastalığın en spesifik semptomudur. Fakat başka hastalıklarda da görülebilmektedir (106). Ekstremitelerde yanma veya ağrı ile karakterize olan 'eritromelalji' veya 'oküler migren'in varlığı, PV veya diğer bir MPN olan ET'yi düşündürür. PV, çoğu zaman asemptomatik olup rutin yapılan laboratuvar analizleri sırasında tesadüfen saptanan hemoglobin yüksekliği sonucunda tanı alır. Laboratuvar tetkikleri sırasında eritrositoza paralel olarak her zaman lökositoz ve trombositoz eşlik etmez (Tablo V). Bazı hastalar sadece eritrositoz ve splenomegali ile başvurabilir (107). Kanamaya eğilim vardır, özellikle gastrointestinal sistem kanaması sonucunda hastalar mikrositoz ile başvurabilir. Mikrositik eritrositoz önemli bir ipucu olabilmekle beraber eritrositozun diğer formları ve talasemi taşıyıcılarında da görülebilir. PV, aynı zamanda koagülasyon sisteminde artışa neden olmaktadır. Açıklanamayan bir tromboz atağında, özellikle intraabdominal venöz trombozda mutlaka dışlanmalıdır (108). PV, batı dünyasında hepatik ven trombozunun en sık nedeni olmakla beraber genç bir kadında hepatik ven trombozu, PV'nın sık bir prezentasyon şeklidir (109). Yüz, konjonktiva, mukoz membranlar ve ellerde pletore dikkat çekici bir

bulgudur. Hipertansiyon eritrosit kitlesinde artışın diğeri bir göstergesidir. Dolaşım stazının bir sonucu olarak veya trombosit değerinin 1.000.000/mm<sup>3</sup>'den fazla olduğu durumlarda edinsel tip IIa von Willebrand hastalığına (vWH) bağlı olarak kolay morarma, epistaksis veya gingival kanama ortaya çıkabilir. Splenomegali, pletoreden sonra en sık fizik muayene bulgusudur ve genellikle orta dereceli büyümeye neden olur. Hepatomegali sıklıkla daha az sıklıkta görülür ve hepatik ven trombozu hariç splenomegali olmadan tek başına saptanmaz. Gut veya renal kalkül, hastalığın nadir göstergelerindedir.

PV'nın klinik sonuçları tablo VI'da özetlenmiştir. Hematopoetik öncül hücrelerin artışı, PV'da çeşitli komplikasyonlara neden olur. Komplikasyonlar, hücre birikimi, hücrel metabolizma veya hücrel dönüşümün sonucunda ortaya çıkmaktadır.

Trombotik ve hemorajik olaylar, PV'nın en sık ve en ciddi komplikasyonlarıdır. Geçmiş dönemde tromboz, PV'lı hastaların %49'unda başvuru bulgusu olmakla beraber hastalığın seyri sırasında gelişen tromboz insidensi %40 olarak bildirilmiştir (110). Daha öncesinde tromboz öyküsü olan hastalarda tromboz tekrarlama eğilimindedir. Birkaç çalışmada, PV tanısı konmadan yıllar öncesinde hastalarda vasküler olay insidensinin yüksek olduğu vurgulanmıştır (111, 112). PV'da tromboz, ölümlerin %40'ından sorumludur. Arteriyel tromboz, venöz trombozdan daha sık olmakla beraber en sık miyokard infarktüsü ve inme görülmektedir. PV, intraabdominal venöz trombozun en sık nedeni olmasına rağmen, büyük serili çalışmalarda periferik venöz tromboz, venöz trombozun en sık prezentasyon şekli olarak gösterilmiştir (108, 112-114).

Kanamaya insidensi, trombozdan düşüktür ve hastaların yaklaşık %20'sinde ortaya çıkar. Sıklıkla gastrointestinal sistem veya santral sinir sistemini içermektedir. Hastaların %10'undan azında fatal olabilmektedir (115). Kanamaya neden olan mekanizmalar arasında hiperviskoziteye bağlı endotelial hücre hasarı ile birlikte olan vasküler staz ve edinsel tip IIa vWH'nın gelişimi vardır. Fareler üzerinde yapılan çalışmada artmış eritrosit kitlesinin hemorajik diyateze katkısı kanıtlanmıştır (116). Genetik olarak aşırı eritrosit üretiminin sağlandığı farelerde yaygın damar içi pıhtılaşması sonucunda ölüm meydana gelmiştir (116). Zamanla öncesinde 'hemorajik trombositoz' olarak tanımlanan hastaların çoğunluğunun PV olduğu anlaşılmıştır (117). PV'da trombosit değeri yükseldikçe, trombosit bağlanması ve proteolizise bağlı olarak yüksek moleküler ağırlıklı von Willebrand multimerlerinin konsantrasyonunun azaldığına inanılmaktadır (118, 119).

Sistolik hipertansiyon, PV'da eritrosit kitlesi artışının başka bir sonucu olup özellikle hastalığın geç dönemde tanı aldığı olgularda görülmektedir. Başlangıçta eritrosit kitlesi arttıkça plazma volümü de artar. Bunun tersi olarak sekonder eritrositoz durumlarında normal

kan hacmini korumak için plazma hacminde kontraksiyon gerçekleşir. PV'da kan hacmi genişledikçe öncelikle periferik vasküler dirençte azalma olur. Fakat takiben vasküler sistemde distansiyona bağlı olarak hipertansiyon ortaya çıkar.

PV'da trombosit aktivasyonu sonucunda eritromelalji, geçici iskemik atak ve oküler migren gibi birtakım oklüzif veya vazospastik sendromlar ortaya çıkar. Bu komplikasyonların sıklığı değişmektedir. Birçok hastanın lökosit ve trombosit değerlerini ve aktivasyonunu düşürmek için tedavi edildiği büyük serili bir çalışmada eritromelalji sıklığı %5 olarak bildirilmiştir (114). Eritromelalji, esas olarak ayaklarda, bazen ellerde ortaya çıkan, sıcak, pozisyon ve egzersiz ile alevlenen, etkilenmiş ekstremitelere elevasyon veya soğuk uygulaması sonucunda rahatlayan, eritem, sıcaklık ve yanma ile karakterize özgün bir sendromdur (120). Eritromelalji idiyopatik olabilmekle beraber periferik damarları etkileyen hastalıklarda da ortaya çıkabilir. Fakat eritromelalji, en sık PV ve ET'yi içeren MPN'de görülmektedir (121). Eritromelalji, trombosit agregasyonu ve trombosit-endotelyal hücre etkileşimi sonucunda ortaya çıkar ve geçici veya kalıcı olarak arteriyollerin şişmesi ve oklüzyonuna neden olur (122). Bunun sonucunda akrosiyanoza ve etkilenmiş parmağın ülserasyon veya nekrozuna neden olur. Eritromelaljinin santral sinir sistemindeki eşdeğeri olan oküler migren, skotom, baş dönmesi, baş ağrısı, geçici iskemik atak ve kortikal körlük ile karakterizedir. Bu sendromlar, nadiren kalıcı sekel bırakmaktadır. Etiyolojide trombosit sayısı yanında trombosit aktivasyonu da rol oynamaktadır. Buna yönelik tedavi, semptomları hafifletir ve sendromu ortadan kaldırır. Trombosit aktivasyonunun rolü olduğuna dair göstergeler arasında trombosit araşidonik asit metaboliti olan tromboksan B<sub>2</sub>'nin idrarda artmış atılımı ile ilişkili semptomlar, arteriyoller trombüslerin histolojik kanıtı ve trombotik atakların aspirin veya indometasin gibi siklooksijenaz inhibitörlerinin kullanımı ve trombosit sayısının azaltılmasıyla ortadan kaldırılması vardır (123). Eritromelaljide tek doz aspirin ile semptomların rahatlaması patognomonik bir bulgudur.

PV'da peptik ülserin genel popülasyona göre sıklığının arttığına dair gözlemler genellikle eski çalışmalara dayandırılmaktadır. PV'da peptik ülser gelişiminin spesifik bir kan grubu ile ilişkisi gösterilememiştir ve H.pylori, histamin veya sitokin salınımının rolü net bilinmemektedir (124, 125). Dolaşımdaki staz ve eritrosit kitlesindeki artışın kontrolsüz hale gelmesiyle hemoglobin tarafından nitrik oksid salınımına bağlı ortaya çıkan vazokonstriksiyonun peptik ülserle ilişkisi olabileceği düşünülmektedir (126). PV'da hiperüriseminin, urat metabolizmasındaki değişikliğe bağlı olarak ortaya çıkmadığı ve kan hücrelerinin hızlı turnoverine bağlı olduğu bilinmektedir (127). Sitoredüktif tedavinin yokluğunda sekonder gut veya ürik asit taşlarının gelişimi nadirdir.

PV'da pruritis nadir olmayan bir başvuru bulgusudur ve genellikle banyodan sonra ortaya çıkar. PV'lı hastaların yaklaşık %30'unda görülmektedir. Bazı hastalarda hafif belirti vermekle beraber bazılarında normal aktiviteyi kısıtlayacak kadar şiddetli ağrı ile karakterizedir. PV'da pruritisin mekanizması tartışma konusudur. Kutanoz mast hücre aktivitesindeki artışın rolünü destekleyen çalışmalar yanında ilişkisiz olduğunu vurgulayan çalışmalar da bulunmaktadır (128, 129). Bazı çalışmalarda histaminin, demir eksikliğinin ve trombositlerin rolü olduğu ileri sürülmektedir (130, 131). Pruritisin mekanizmasında vasküler staz önemli rol oynamaktadır. Çünkü flebotomi yapılması bazı hastalarda semptomları azaltmaktadır. PV'da pruritise neden olan birçok mekanizmanın varlığına inanılmakla beraber tüm hastaları neden etkilemediği halen bilinmemektedir.

Organomegali ve portal hipertansiyon, tedavi edilmeyen olgularda dalağın kanla dolup genişlemesinden kaynaklanır. Fakat zaman içerisinde ekstramedüller hematopoeze bağlı bazı hastalarda diğerlerine kıyasla dalak ve karaciğerde daha belirgin büyüme olmaktadır. Dalaktaki büyüme, yer kaplayıcı etkisine ek olarak splanknik kan akımında artışa ve portal hipertansiyona neden olur (132). Bunun sonucunda ortaya çıkan özofagus varisleri bazı hastalarda kanamaya neden olmaktadır. Hepatik ven trombozu da portal hipertansiyon nedenleri arasındadır. Splenik ven trombozu ise gastrik varislere neden olmaktadır. Hepatik ven trombozu varlığında ve splenektomi sonrasında karaciğerin ekstramedüller hematopoezin esas bölgesi haline gelmesiyle karaciğerde büyüme ortaya çıkar (133).

PV'nın 'post-polisitemik miyeloid metaplazi fazı', reaktif bir olaydır ve kemik iliğinde hücre fonksiyonlarına engel olmaz. Ayrıca miyelofibrozun varlığı ile kemik iliği yetersizliği arasında bir korelasyon olmadığı için kemik iliği fonksiyonlarında yetersizliğe neden olmaz. PV'nın doğal seyri sırasında gelişen kemik iliği yetersizliği ile alkilleyici ajanlara bağlı gelişen kemik iliği yetersizliği arasında ayırım yapmak güçtür. Alkilleyici ajanların kullanımı sonrasında kemik iliği yetersizliği beklenen bir süreç olmakla beraber bu ilaçların kullanımı söz konusu olmadığında kemik iliği yetersizliğinin sıklığı bilinmemektedir.

**Tablo IV. PV’da başvuru semptomları (Spivak JL. Myeloproliferative disorders. In: Handin RI, ed. Blood. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2003)**

	Yüzde (%)	Dağılım aralığı
Halsizlik veya güçsüzlük	51	31-66
Baş ağrısı	50	31-90
Baş dönmesi veya vertigo	48	28-70
Kanama veya morarma	34	30-40
Dispne	31	17-40
Karın ağrısı	30	23-50
Görme bulguları	29	7-37
Parestezi/ekstremitte ağrısı	27	13-60
Pruritis	27	10-50
Tromboz	26	17-45
Dispepsi	13	8-19

**Tablo V. PV’da laboratuvar bulguları (Spivak JL. Myeloproliferative disorders. In: Handin RI, ed. Blood. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2003)**

	Yüzde (%)	Dağılım aralığı
Eritrositoz	91	88-99
Lökositoz	67	43-84
Trombositoz	52	40-63
Retikülositoz	35	6-54
Artmış lökosit alkalen fosfataz	81	63-100

**Tablo VI. Polisitemia veranın klinik sonuçları**

Klinik sonuçlar	Neden
Tromboz, hemoraji, hipertansiyon	Eritrosit kitlesinde artış, vWF multimerlerinde azalma
Organomegali	Ekstramedüller hematopoez veya eritrosit kitlesinde artış
Pruritis, peptik hastalık	İnflamatuvar mediatörler
Eritromelalji	Trombositoz
Hiperürisemi, gut, renal kalkül	Artmış hücre turnover
Miyelofibroz	Neoplastik klonun reaksiyonu
Akut lösemi	Tedavi ilişkili veya klonal dönüşüm

### 2.2.1.5. Tedavi

PV'da ortalama yaşam süresinin 15 yılı aştığı ve 10 yılda miyelofibroza veya AML'ye dönüşümün rölatif olarak düşük olduğu bilinmektedir (sırasıyla %10 ve %6) (134-137). Günümüzde, ilaç tedavisinin bu komplikasyonları önlediğine dair veri yoktur. Böylelikle, ilaç tedavisi yaşamı uzatmak veya AML veya miyelofibroza dönüşümü önlemek amacıyla kullanılmaz. Fakat kontrollü çalışmalar, PV'lı hastalarda düşük doz aspirinin trombotik komplikasyonların insidensini belirgin ölçüde azalttığını göstermiştir (138). PV'da tüm hastalarda flebotomi ve yüksek riskli hastalarda hidroksiüre kullanımı ile ilişkili kontrollü çalışmalar olmamasına rağmen bu yönde güçlü kanıtlar mevcuttur (139, 140). Bunların sonucunda, PV'da güncel öneriler, tüm hastalar için flebotomi ve düşük doz aspirini; yüksek riskli hastalar için ek olarak hidroksiürenin kullanımını içermektedir (141). PV'da ileri derecede trombositoz (trombosit sayısı  $1.000.000/\text{mm}^3$ 'den fazla) varlığında edinsel vWH dışlanmalıdır. Ristosetin ko-faktör aktivitesi %30'un altında olan hastalara aspirin tedavisi verilmemelidir (119). Diğer yandan, ileri derecede trombositoz yüksek riskli hastalık anlamına gelmeyeceği gibi sitoredüktif tedavinin kullanımını gerektirmez (142). PV'lı hastalarda hematokrit (Htc) değerini erkekte %45'in, kadında %42'nin altında tutmak önerilmekte ama zorunlu tutulmamaktadır (143).

PV'da tedavinin amacı Htc değerini kontrol altına almak ve morbidite riskini azaltmaktır (144). Günümüzde, halen tam olarak güvenli hematokrit değeri bilinmemekle beraber, güncel kılavuzlar Htc değerini %45'in altında tutmayı önermektedir (145, 146). PV tedavisi için risk faktörlerine dayalı olarak çeşitli algoritmalar geliştirilmiştir (Tablo VII) (134, 144). Bazı çalışmalarda 60 yaşın üzerinde olan ve/veya tromboz öyküsü olanlar yüksek riskli; bu risklerin hiçbirini taşımayanlar düşük riskli ve kardiyovasküler risk faktörlerini taşıyanlar ve/veya lökositozu olanlar orta riskli olarak tanımlanmıştır (145, 147). Bir çalışmada ise risk grupları yukarıda tanımlandığı gibi düşük riskli, yüksek riskli ve ek olarak düşük riskli ama trombosit sayısı  $1.000.000/\text{mm}^3$ 'den fazla olan grup olmak üzere üç gruba ayrılmıştır (134).

Avrupa Birliği'nin PV'da düşük doz aspirinle ilişkili çalışması olan 'ECLAP' çalışmasında tüm hastaların düşük doz aspirinden fayda gördüğü gösterilmiştir. Düşük riskli hastalar flebotomi ile tedavi edilmelidir (144).

Flebotomi, PV'nın başlangıç tedavisidir. PV'da yüksek Htc değeri ile tromboz arasındaki ilişkiyi gösteren büyük çalışmalar sonucunda bu tedavi yöntemi kullanılmaya başlanmıştır (110, 148, 149). PV'da tromboz riskinin altında yatan mekanizmalar tam olarak

çözülmemiştir fakat Htc'in tek risk faktörü ve temeldeki risk faktörü olmadığı bilinmektedir. Yüksek irtifada yaşayan veya Eisenmenger sendromu ve diğer siyanotik kalp hastalıklarından kaynaklanan polisitemisi olan hastalarda yapılan büyük çalışmalar, tromboza neden olan tek faktörün Htc olduğunu iddia etmektedir (150, 151). Konjenital kalp kapak hastalığı olan 100 siyanozlu hasta 748 hasta yılı boyunca gözlenmiş ve polisitemili hiçbir hastada serebral arteriyel tromboz gelişmemiştir (152). Shibata J. ve arkadaşları, EPO'in fazla ekspresyonundan kaynaklanan polisitemili genetiği değiştirilmiş bir fare üzerinde çalışma yapmıştır (116). PV'da mortalite ve morbiditenin ana nedeni olan trombotik komplikasyonlar için bu çalışmanın yararlı bir model olabileceğini tasarlamışlar ama bunu gerçekleştirememişlerdir. Ayrıca, Rus ırkından olan polisitemili hastalarda yapılan çalışmada, flebotomilerle hematokrit değerini kontrol altına almanın inme riskini anlamlı olarak azaltmadığı gösterilmiştir. Ortalama kiloya sahip bir bireyde Htc değerlerini normal veya normale yakın seviyeye indirmek için her 2-4 günde bir 450-500 ml kan alınmalıdır. 50 kg'dan düşük kiloya sahip bireylerde, daha az miktarda kan alınmalıdır (143). Htc değeri %64'den fazla ise, flebotominin uygulanma aralığı kısaltılmalıdır, orta dereceli Htc yüksekliğinde ise daha az enerjik davranılması yeterlidir. Kardiyovasküler fonksiyonları bozulmuş olan hastalara daha sık aralıklarla daha az miktarda flebotomiler uygulanmalıdır. Flebotominin anlık etkisiyle Htc azalmaktadır ve bunun sonucunda baş ağrısı gibi semptomlar gerilemektedir. Flebotomi, lökosit ve trombosit değerini düşürmemekle beraber pruritis veya gut gibi semptomları da etkilememektedir. Demir eksikliği, tekrarlanan flebotomilerin beklenen bir sonucudur (153). Demir eksikliği, Htc değerinin kontrol altına alınmasına yardımcı olmaktadır. Sonuç olarak flebotomi, PV'lı hastalarda kanın viskozitesini normale getirmek için etkili bir yöntemdir. Flebotomi ile sitoredüktif tedaviyi karşılaştıran bir çalışmada, flebotomi uygulanan grupta tromboz atağının daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Fakat bu risk tedavinin ilk 3 yılına sınırlı gibi durmaktadır (140). Flebotominin bu artmış riski, hastalığın geç döneminde lösemi insidensinin diğer gruba göre daha düşük olmasıyla dengelenmektedir. Çalışmalarda trombosit değeri ile trombotik komplikasyonlar arasında bir korelasyon gösterilmemiştir. PV'da birçok hasta flebotomi ile tek başına kontrol altına alındığı için sitotoksik tedavinin yeri bazen sorgulanmaktadır (154). 50 yaşın altında ve tromboz öyküsü olmayan hastalarda tek başına flebotomi önerilmekle beraber bu öneri kesin kanıtlanmış değildir (155).

Yüksek riskli veya flebotomiyi tolere edemeyen hastalarda sitoredüktif tedavi endikedir. Ayrıca progresif miyeloproliferasyon bulguları ile birlikte trombositozu, semptomatik splenomegali, pruritis veya konstitüsyonel semptomları olan hastalarda



kullanılmalıdır (144). Hidroksiüre, PV tedavisinde en sık kullanılan miyelosüpresif ajandır. Başlangıç dozu 500-1000 mg/gün olmakla beraber önerilen günlük doz 10-30 mg/kg/gündür (144). Hidroksiüre, eritrosit, lökosit ve trombosit değerlerini kontrol altına alan etkili bir tedavidir ve tek başına flebotomi ile karşılaştırıldığında tedavinin ilk yıllarında tromboz riskini azalttığı gösterilmiştir (140). Miyelosüpresif etkisi kısa süreli olduğu için aralıklı tedavi yerine devamlı tedavi gerektirmektedir. Ayrıca kısa etkili olduğu için rölatif olarak güvenilir bir ajandır. Kemik iliğini aşırı baskıladığı durumlarda, ilaca ara verildikten sonra günler veya haftalar içinde kan değerleri yükselir. Alkilleyici bir ajan olmadığı için diğer miyelosüpresif ajanlarla kıyaslandığında daha az lökomojenik etkisi vardır. Flebotomi ile birlikte kullanıldığında trombotik komplikasyonların insidensinin azaldığı görülmektedir. Maksimum 7 yıllık bir takip sonrasında, lösemi insidensi tek başına flebotomi uygulanan gruba göre istatistiksel anlamı olmadan hafifçe artmıştır. Hidroksiüre, genel olarak iyi tolere edilmektedir (156). Yan etkileri arasında sitopeni, gastrointestinal sistem semptomları, mukokutanöz ülserler, alopesi ve ateş vardır (144).

Busulfan, PV tedavisinde uygun ve etkili bir tedavi yöntemidir. Bu ilaca bağlı kemik iliği baskılanması uzun süreli olduğu için aralıklı verilmesi önerilir. Birkaç hafta boyunca günde 2-4 mg uygulanması, kan değerlerini normale getirmek için yeterlidir. İlaça ara verildikten sonra birkaç hafta boyunca kan değerleri düşmeye devam eder. Kan değerleri, birkaç ay hatta yıllar boyunca normal aralıktaki kalabilir. Bir büyük çalışmada, busulfanla tedavi edilen hastalarda ortalama ilk remisyon süresi 4 yıldır (157). Uzamış kemik iliği baskılanması, büyük bir avantaj oluşturmakla beraber bazen tehlike yaratmaktadır. Eğer tedavi çok uzun süre veya yüksek dozlarda sürdürülürse kemik iliği baskılanması birkaç ay veya bazen bir yıl sürebilmektedir. Bu nedenle ihtiyaç halinde günlük dozu 4 mg'ın üzerine çıkmak yerine tedavi periyodunu uzatmak daha güvenilir görünmektedir. Busulfan ile aralıklı tedavi edilen hastalarda akut lösemiye transformasyon riski rölatif olarak düşüktür. 145 hastanın 2-11 yıl boyunca takip edildiği bir çalışmada sadece üç hasta akut lösemiye transforme olmuştur (157).

İnterferon alfa'nın PV'da başlangıçta haftada 3 kez 3.000.000 U dozunda uygulanması, %50 veya daha fazla hastada terapötik yanıt sağlamaktadır (158, 159). Eritrosit kitlesi yanında lökosit ve trombosit değerlerinde azalma sağladığı bildirilmiştir. PV'da pruritis şikayetini kontrol altına almakta etkilidir. Bu etkisi, hematolojik yanıtla direkt ilişkili gibi görünmemektedir (159). Bu ilacın uygulanması sık enjeksiyon gerektirdiği için bazı hastalar için sıkıntı vericidir. Ayrıca interferon alfa tedavisinin, PV'da daha az maliyeti olan ve daha kullanışlı tedavilere göre avantajı olup olmadığı açık değildir. İnterferon alfa ile tedavi edilen

hastalarda lösemi ve miyelofibroz insidensinde azalma olasılığı vardır (159). İnterferon alfa'nın FDA ve EMA onayı olmamasına rağmen, hem konvansiyonel hem pegile formlarının iyi yanıt sağladığı ve pegile formunun daha iyi tolere edildiği belirtilmektedir (144). İnterferon alfa, PV'lı hamilelerde tercih edilen ilaçtır (Tablo VII).

Anagrelid, trombositler üzerine selektif etkilidir. PV'lı trombositozu olan 113 hastada, anagrelidin uygulanması sonucunda %75 trombosit yanıtı elde edilmiştir (160). Başlangıç dozu günde 4 kez 0.5-1 mg'dır. Çoğu hastada bir hafta içinde yanıt gözlenmektedir. Trombosit değerini kontrol altına almak için gerekli ortalama doz günde 2.4 mg'dır. Yan etkileri arasında baş ağrısı, çarpıntı, diare ve sıvı retansiyonu vardır. Yan etkileri nadiren tedaviyi kesmeyi gerektirecek ciddiyettedir (161). PV'da anagrelid, hidroksiüre ve interferona refrakter olgularda tercih edilir (162).

Radyoaktif fosfor (32p), orta dereceli lökomojenik riski olan, pahalı ve uygun olmayan bir tedavi yöntemi olmakla beraber bazı araştırmacılar, özellikle yaşlı hastalarda bir tedavi seçeneği olduğunu ileri sürmektedir (163, 164).

JAK2 inhibitörleri, PV'da test edilmesine rağmen hastalığın evolüsyonunu değiştirdiği kanıtlanamamıştır. Bu nedenle miyelofibroz fazındaki endikasyonu daha fazladır (144). Son zamanlarda vorinostat ve givinostatı içeren histon deasetilaz inhibitörlerine (HDAC) ilgi artmıştır fakat etkinliği ve güvenilirliği için ileri çalışmalara ihtiyaç vardır (165).

**Tablo VII. PV'da risk kategorileri ve tedavi yönetimi**

<b>Risk Kategorileri</b>	<b>Tedavi</b>	<b>Hamilelik sırasında tedavi</b>
<b>Düşük risk</b>	Düşük doz aspirin + Flebotomi	Düşük doz aspirin + Flebotomi
<b>Düşük risk ama trombosit sayısı 1.000.000/mm<sup>3</sup>'den fazla</b>	Düşük doz aspirin (ristocetin ko-faktör aktivitesi %30'dan fazla ise) + Flebotomi	Düşük doz aspirin (ristocetin ko-faktör aktivitesi %30'dan fazla ise) + Flebotomi
<b>Yüksek risk ( 60 yaş ve üstü hasta ve/veya tromboz öyküsü)</b>	Düşük doz aspirin + Flebotomi + Hidroksiüre	Düşük doz aspirin + Flebotomi + İnterferon alfa
<b>Hidroksiüreye dirençli veya intoleran yüksek risk hastalık</b>	Düşük doz aspirin + Flebotomi + İnterferon alfa (yaş < 65) veya busulfan (yaş ≥ 65 yaş)	Düşük doz aspirin + Flebotomi + İnterferon alfa

### 2.2.1.6. Seyir ve Prognoz

PV'da morbidite ve mortalitenin en sık nedeni trombotik komplikasyonlardır. Diğer polisitemi yapan hastalıklardan farklı olarak lösemiye dönüşüm riski artmıştır. PV'da birkaç klinik evre tanımlanmasına rağmen (pletorik veya proliferatif faz, stabil faz, postpolisitemik miyeloid metaplazi fazı, akut lösemi), bu evrelerin hastalığın progresyonunun göstergesi olup olmadığı net değildir. 'PVSG', tek başına flebotomi ile tedavi edilen olgularda ortalama yaşamın 13.9 yıl, radyoaktif fosfor (32p) ile tedavi edilenlerde 11.8 yıl ve klorambusil ile tedavi edilenlerde 8.9 yıl olduğunu bildirmiştir (166). Bu çalışmada mortalitenin en sık nedeni tromboz olmakla beraber akut lösemi, diğer maligniteler ve kanama diğer ölüm nedenleri olarak bildirilmiştir (sırasıyla %31, %19, %15 ve %5). Benzer şekilde büyük bir Fransız çalışması, radyoaktif fosfor (32p) ile tedavi edilen hastalarda ortalama yaşamı, yaş uyumlu kontrol grubuna göre sadece hafifçe azalmış olarak bildirdi (sırasıyla 13.5 yıl, 15.2 yıl) (159). Diğer çalışmalar PV'nın normal veya normale yakın yaşam süresi ile ilişkisi olduğunu ileri sürmektedir (167, 168). Fakat birçok çalışma da, PV'nın trombotik komplikasyonlar ve lösemi dönüşümüne bağlı artmış mortalite ile ilişkisini göstermektedir (138). Lösemnin, tek başına flebotomi ile tedavi edilen hastalarda dahi ortaya çıktığı bildirilmekle beraber bazı sitotoksik tedavilerin kullanımı sonucunda insidensinin arttığı gözlenmiştir (Tablo VIII). PV'nın lösemik transformasyonunda en sık neden AML olmakla beraber, akut lenfoblastik lösemi ve kronik nötrofilik lösemi de bildirilmiştir (169, 170).

**Tablo VIII. Polisitemia vera tedavisi**

<b>Tedavi</b>	<b>Avantajlar</b>	<b>Dezavantajlar</b>
<b>Flebotomi</b>	Riski az, uygulaması kolaydır.	Trombositoz veya lökositozu kontrol altına almaz.
<b>Hidroksiüre</b>	Lökositoz ve trombositozu kontrol altına alır, lökomojenik riski düşüktür.	Devamlı tedavi gereklidir.
<b>Busulfan</b>	Uygulanması kolay, uzun süreli remisyon sağlar, lökomojenik riski muhtemelen yüksek değildir.	Yüksek dozu, kemik iliğinde uzamış baskılanmaya neden olur. Lökomojenik riski var, uzun süreli kullanımı akciğer ve deride toksisite yapar.
<b>Radyoaktif fosfor (32p)</b>	Hastanın kompliyansına ihtiyaç yoktur, trombositozu ve lökositozu uzun süre kontrol altına alır.	Pahalı ve rölatif olarak uygun bir tedavi değildir. Lökomojenik riski ortadır.
<b>Klorambusil</b>	Uygulanması kolaydır, trombositoz ve lökositozu kontrol altına alır.	Lökomojenik riski yüksektir.
<b>İnterferon alfa</b>	Düşük lökomojenik potansiyeli vardır, pruritis şikayetine etkilidir.	Uygun bir tedavi değildir, pahalıdır ve yan etkileri sıktır.
<b>Anagrelid</b>	Trombositler üzerine selektif etkilidir.	Trombositler üzerine selektif etkilidir.

## 2.2.2. Esansiyel Trombositemi

### 2.2.2.1. Epidemiyoloji

Miyeloproliferatif sendromlardan biri olan esansiyel trombositemi (ET), primitif multipotansiyel hematopoetik hücreden köken alan, klinik olarak açıklanabilir reaktif bir neden veya KML, PV, PMF, MDS gibi tanımlanmış kronik miyeloid bir hastalık olmaksızın trombosit sayısında persiste eden artış ile karakterize klonal bir hastalıktır (171). Yıllık insidensinin 100.000’de 0.2 ile 2.5 arasında değiştiği tahmin edilmektedir (172). Hastalığın indolent seyri, tanı konulamayan vaka sayısını arttırdığı için muhtemelen gerçek insidens oranı daha yüksektir (69). Büyük retrospektif çalışmalara göre tanıdaki ortalama yaş 55 olmakla birlikte popülasyon bazlı çalışmalarda yaş ortalaması daha yüksektir (173, 174). Hastaların yaklaşık %20’si 40 yaşından önce tanı almıştır (175, 176). Özellikle genç hastalarda kadın baskınlığı vardır (1.5-3 kat fazla) (177). Çocuklarda oldukça nadir görülür (178). Günümüzde, ET gelişiminde çevresel risk faktörlerinin rolü ile ilgili iyi bir kanıt

olmamasına rağmen uzun süre boyunca koyu saç boyası kullanımının risk teşkil ettiği bildirilmiştir (179, 180).

### **2.2.2.2. Patogenez**

Günümüz ET kriterlerini tam olarak dolduran hastaların birçoğu, hem miyeloid hem lenfoid dizide klonal hematopoez sergilemektedir (181-184). İlk çalışmalar, klonaliteyi saptamak için glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G-6-PD) izoenzim analizini ve son çalışmalar X'e bağımlı DNA yanında RNA analizini kullanmıştır (185, 186). X'e bağımlı klonal değerlendirmeler, ET'li hastaların az bir kısmında ayrıca poliklonal hematopoezin varlığını ve kontrol grubunda monoklonal hematopoezin varlığını ortaya çıkarmıştır (187, 188). ET'li hastaların bir kısmında klonal sürecin lenfositleri de kapsadığı, bir kısmında ise megakaryositlere sınırlı olduğu gösterilmiştir (182, 189). Bu gözlemler ışığında bazı araştırmacılar, granülosit ve T lenfositlerden türetilen X kromozom inaktivasyon patternlerine dayalı olarak poliklonaliteye karşın monoklonaliteyi desteklemektedirler (187, 190). Bazı araştırmacılar, tromboz riskinde farklılığı göstererek, bu konuyla kliniğin bağlantılı olduğunu savunmuşlardır (187, 190, 191). Fakat prospektif çalışmaların yokluğu nedeniyle bu gözlem doğrulanamamıştır. ET'de primer moleküler anormalliği tespit etmek güçtür. Hastalığın klinik davranışı ve laboratuvar özelliklerindeki heterojeniteden yola çıkarak birden fazla mutasyon içerdiği düşünülebilir. Tanı sırasında ET'li olguların %5'inden azında sitogenetik anormallikler görülmektedir (192, 193). Trizomi 9 ve trizomi 8, kromozom 5, 7, 13, 17 ve 20. kromozomun uzun kolundaki delesyonları içeren yapısal ve numerik anormallikler, ET ile ilişkili bulunmuştur. Fakat bu anormalliklerin hiçbiri tanı koymak için veya patogenezi anlamada yeterli spesifik özellik taşımamaktadır (193). ET'de JAKV617F mutasyon sıklığı %23-57 arasında değişmektedir ve mutant allelin homozigotluğu nadirdir (9-11).

ET, PV ile bazı ortak biyolojik özellikler taşımaktadır. Bunlar arasında klonal miyelopoez, eritroid ve megakaryositik progenitör hücrelerin aşırı duyarlılığı, in vitro büyüme faktörü bağımsızlığı, megakaryosit/trombosit MPL ekspresyonundaki değişim, artmış nötrofil polisitemia rubra vera-1 (PRV-1) ekspresyonu ve azalmış trombosit serotonin içeriği vardır (194-202). ET'de laboratuvar çalışmaları, TPO ve İL-3'e karşı myeloid büyüme faktörünün aşırı duyarlılığını göstermiştir (195, 203). ET ve diğer ilişkili MPN'de myeloid progenitör hücrelerindeki büyüme faktörünün bağımsızlığı, ligand reseptöründeki mutasyonlara veya reseptör ilişkili sinyal ileti moleküllerindeki mutasyonlara bağlı değildir (81, 204, 205). MPN'de, EPO ve TPO reseptörlerindeki genlerde bir bozukluk saptanmamıştır (81, 204,

206-208). ET, PV ve PMF'de artmış megakaryosit kitlesine rağmen serum TPO seviyeleri genellikle normal veya artmıştır (209-211). Bu durum, PV veya diğer ilişkili MPN'de MPL'nin megakaryosit/trombosit ekspresyonunun belirgin azalmasına bağlanmıştır (198, 199, 212, 213). Bu spesifik özellik, PV ve ET'de morfolojik tanıyı doğrulamak için kullanılabilmesine rağmen patogeneziyle ilişkisi net değildir (214, 215).

ET'de kanama diatezinin, ileri derecede trombositoz varlığında aşikar hale gelen edinsel vWH'na bağlı ortaya çıktığına inanılmaktadır (216, 119, 217). Günümüzde ET'de edinsel vWH'nın, ADAMTS<sub>13</sub> parçalayıcı proteaz tarafından yüksek moleküler ağırlıklı von Willebrand faktörün (vWF) trombosit sayısına bağımlı proteolizi arttırmasına bağlı ortaya çıktığına inanılmaktadır (218-222). ET'de diğer kalitatif trombosit kusurları arasında uzamış kanama zamanı, epinefrin ve kollagende kusurlar ve ADP ilişkili trombosit agregasyonundaki kusurlar, azalmış ATP sekresyonu, tromboksan üretimindeki değişim, tam kanda spontan trombosit agregasyonunda artış, anormal ex vivo trombosit aktivasyonu sonucunda edinsel depo havuz yetersizliği ve azalmış trombosit membran GP Ib ve GP IIb/IIIa reseptör ekspresyonu vardır (223-238).

Trombositoz tek başına ET'de tromboz riski ile ilişkili değildir (239). Araşidonik asit metabolizmasında spesifik kusurlar tanımlanmıştır ve bu kusurların anormal tromboksan A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) üretimine neden olabileceği düşünülmektedir (240-242). PV'da kontrollü bir çalışmada gösterilen aspirinin antitrombotik aktivitesinin kısmen ilacın TXA<sub>2</sub> sentezini engellemesine bağlı olduğu düşünülmektedir (138). TXA<sub>2</sub> sentezinin engellenmesi sonucunda aspirinin, küçük damarlarda anormal trombosit-endotel etkileşimlerine bağlı ortaya çıktığı düşünülen mikrodolaşımsal semptomları azalttığına inanılmaktadır (123, 243, 244). ET'de hidroksiürede olup da anagrelidde olmayan antitrombotik özellik, granülosit ve monositlerin trombofilik rolünü desteklemektedir. Bu durum in vitro şartlarda MPN olgularında gösterilmiş olan nötrofil aktivasyon parametreleri, endotel hasarı ve trombofili belirteçlerindeki değişim ve dolaşan trombosit-lökosit agregatları varlığı ile paralellik göstermektedir.

### **2.2.2.3. Tanı**

2008 yılında revize edilmiş 'DSÖ' sınıflamasında ET için tanımlanan majör kriterlerden biri: 'kemik iliği biyopsisinde büyük matür megakaryositlerin sayısında artış ile birlikte esas olarak megakaryositik dizide çoğalma olması, nötrofil granülopoezde anlamlı bir artış veya sola kayma olmaması ve eritropoezde belirgin artış olmamasıdır' (Tablo IX) (55). Megakaryositlerin çekirdekleri hiperlobüle veya yoğun bir şekilde katlanmış, dağılmış veya

gevşek olarak küme yapmış haldedir. Retikülin liflerinde artış yoktur veya çok az bir artış vardır. Tekrarlanan biyopsilerde retikülin lif artışı olması, miyelofibroza progresyonu düşündürür (245, 246). JAK2V617F mutasyonunun keşfinden sonra bu mutasyon ile birlikte kemik iliği histolojisinin kullanımındaki artış ET’de trombosit sayısındaki eşik değerin 600.000/mm<sup>3</sup>’den 450.000/mm<sup>3</sup>’e düşmesine neden olmuştur (55). ET’de JAK2V617F mutasyon sıklığı %50’dir (101). Ayrıca yapılan çalışmalarda MPL mutasyonu %8.5, TET2 mutasyonu %5 oranında görülmektedir (22, 32). ET tanısında diğer bir önemli kriter diğer MPN’lerden ve geçici reaktif trombositoz nedenlerinden ayırt etmektir (Tablo IX, tablo X) (55, 144).

#### **Tablo IX. DSÖ 2008 ET sınıflandırma kriterleri**

<ol style="list-style-type: none"><li>1. Altı aydan uzun süredir trombosit sayısının &gt; 450.000/mm<sup>3</sup> olması</li><li>2. Megakaryositik seride büyük ve matür morfolojide proliferasyon olması, granülositik veya eritroid seride proliferasyon olmaması veya çok az olması</li><li>3. DSÖ kriterlerine göre KML, PV, PMF, MDS veya başka bir myeloid neoplazinin dışlanması</li><li>4. JAK2V617F veya diğer klonal bir belirtecin gösterilmesi veya JAK2V617F yokluğunda reaktif trombositoz bulgusunun olmaması</li></ol>
<b>Tanı:</b> Tanı konması için dört majör kriterin hepsi karşılanmalıdır.

#### **Tablo X. Reaktif trombositoz nedenleri**

Akut hemoraji
Trombositopeninin iyileşme dönemi
İnfeksiyonlar
İnflamatuvar hastalıklar
Doku hasarı
Demir eksikliği anemisi
Hemolitik anemi
Splenektomi sonrası
Kriyoglobulinemi
İlaçlar (steroidler, adrenalin, trans-retinoik asit)
Neoplaziler
5q delesyonu ile beraber myelodisplazi

#### 2.2.2.4. Klinik Özellikler

Otomatik kan sayımı cihazlarının artmış bir şekilde kullanımı sonucunda birçok hasta asemptomatik dönemde ET tanısını almaktadır (247). Mikrodolaşımı etkileyen semptomlar olarak bilinen vazomotor semptomlar, hayatı tehdit etmeyen semptomlardır. Potansiyel fatal olan komplikasyonlar arasında tromboz, kanama, miyelofibroza veya AML'ye transformasyon vardır (162, 173, 248). Mikrodolaşımı etkileyen semptomlar arasında baş ağrısı, görme semptomları, baş dönmesi, atipik göğüs ağrısı, akral disestezi ve eritromelalji vardır. Bu semptomlar ET'li olguların yaklaşık üçte birinde görülmektedir (247, 249, 250). ET'li hamile kadınların %30-40'ında ilk trimester düşükleri gerçekleşmektedir (251-253). Sonuç olarak mikrodolaşımı etkileyen semptomları veya tekrarlayan düşükleri olan hastaların ayırıcı tanısında ET bulunmaktadır. Eritromelalji, düşük doz aspirine yanıtı akral disestezi ve eritem ile karakterize vazomotor bir semptomdur (123, 254). Eritromelaljinin mekanizmasında anormal trombosit-endotel etkileşiminin rol oynadığına inanılmaktadır ve histopatolojik çalışmalar endotelial inflamasyon ve intimal proliferasyonla birlikte olan trombosit zengin arteriyoller mikrotrombüsü göstermiştir (123, 244). Aspirin tedavisine yanıt veren ET ilişkili geçici nörolojik ve görme bozukluklarında da aynı mekanizmanın varlığına inanılmaktadır (255).

ET'de majör hayatı tehdit eden komplikasyonlar arasında trombohemorajik komplikasyonlar ve klonal evölüsyon vardır. ET'de majör trombotik olayların prevalansı majör kanama epizodlarına oranla daha yüksek olmakla beraber arteriyoller tromboz venöz tromboza göre daha sık görülür (256). ET veya PV'da abdominal büyük damar trombozu riski artmakla beraber insidensi %10'dur (257-259). Majör abdominal ven trombozunun ayırıcı tanısında MPN yer almaktadır ve aşikar anormal kan değerlerinin yokluğunda latent hastalık varlığı olasıdır (260). ET'de diğer atipik tromboz nedenleri arasında serebral sinüslerde ve retinal damarlardaki trombozlar vardır (261-264). ET'de AML veya miyelofibroza dönüşüm nadirdir (173, 265, 266).

ET'li tedavi edilmeyen hastalarda trombosit sayısı normalin hafif üst sınırı ile mikrolitrede birkaç milyon arasında değişmektedir. Bazı hastalarda hafif dereceli lökositoz ve hafif dereceli anemi vardır. Periferik yaymada tipik olarak büyük, soluk mavi boyanan, hipogranüler trombositler ve nadiren lenfoblastoid hücre görünümünde olan çekirdekli megakaryosit parçaları görülür. Klonal trombositozda serum TPO seviyeleri genellikle normal veya hafifçe yüksektir ve trombosit sayısı ile korelasyon göstermemektedir. Reaktif trombositozda da serum TPO düzeyleri genellikle yüksektir. Sonuç olarak TPO düzeyleri, ET



ile reaktif trombositozda ayırım sağlamamaktadır. Klonal trombositozda IL-6 ve CRP düşük seviyelerde iken akut ve kronik inflamatuvar hastalıklara eşlik eden sekonder trombositozda yüksek olabilmektedir (267). Psödohiperkalemi, ileri derecede trombositoz veya lökositozda görülebilir. Trombositozlu hastalarda serum potasyum konsantrasyonu, plazma potasyum konsantrasyonunu geçtiği zaman psödohiperkalemiden şüphelenilmektedir. Psödohiperkalemi, in vitro kanın pıhtılaşması sırasında intraselüler potasyumun salınması sonucunda ortaya çıkmaktadır (268). ET'li hastaların %20'sinden azında kanama zamanı uzundur (269, 270). Kanama zamanı, genellikle trombositozun derecesiyle veya spesifik trombosit fonksiyon anormallikleri ile korelasyon göstermemektedir. Ayrıca ET'li hastalarda kanama veya tromboz eğilimini göstermede güvenilir bir test değildir (271, 272). ET'de kemik iliği aspirasyonunda büyük hiperlobüle megakaryositler görülmektedir. Kemik iliğinde demir boyası, demir eksikliğini veya halkalı sideroblastların varlığını dışlamak için yararlı olabilir. Kemik iliği biyopsisinde tipik olarak anlamlı retikülin fibrozis olmadan megakaryosit kümelenmesi ve nükleer hiperlobülasyonla birlikte megakaryosit sayısında artış görülmektedir. Kemik iliği hücreliliği genellikle normal veya hafif artmıştır. Fakat nadir durumlarda, örneğin MPL mutasyonlarını taşıyan hastaların bir kısmında kemik iliği hiposelülerdir (23, 273). Kemik iliği biyopsisinin, ET ile erken evre PMF ayırımını sağlayabildiği düşünülmekle beraber bu ayırımın klinik yararı net değildir (274, 275).

ET'nin en önemli fizik muayene bulgusu hastaların %25-48'inde gözlenebilen splenomegalidir (276). Reaktif trombositozda splenomegali beklenmemektedir. ET'de hepatomegali ve lenfadenopati nadir bulgulardır.

#### **2.2.2.5. Tedavi**

ET'de ortalama yaşam süresinin 15 yılı aştığı ve 10 yılda miyelofibroza veya AML'ye dönüşümün rölatif olarak düşük olduğu bilinmektedir (sırasıyla <math><4\%</math> ve <math><2\%</math>) (134-137).

ET'de tromboz olasılığını belirlemek için risk faktörleri belirlenmiştir. Birkaç retrospektif ve prospektif çalışmada, vasküler komplikasyonlar için iki majör faktör gösterilmiştir (239, 247, 258, 277, 278). Bunlardan biri yaşın 60 yaş ve üstü olması, diğeri geçirilmiş tromboz öyküsü olmasıdır. Bu faktörlerden herhangi birinin varlığı 'yüksek risk' kategorisini tanımlamaktadır (Tablo XI). Trombosit sayısının  $1.500.000/\text{mm}^3$ 'den fazla olması edinsel vWH ile ilişkili olup kanama riski artmıştır (279, 280). Rosane Isabel Bittencourt ve arkadaşlarının yaptığı derlemede ET'de risk kategorileri yüksek, orta ve düşük riskli olarak gruplandırılmıştır (144) (Tablo XI). Yaşın 60 yaş ve üstü olması, geçirilmiş kanama veya tromboz öyküsü olması, trombosit sayısının  $1.500.000/\text{mm}^3$ 'den fazla olması

yüksek risk faktörlerindedir. Son üç yıl içinde yapılan meta-analizler, JAK2 mutasyonu varlığı ve/veya lökosit sayısının  $10.000/\text{mm}^3$ 'den fazla olmasını tromboz için yüksek risk faktörleri olarak kabul etmiştir (281).

Baş ağrısı veya eritromelalji gibi semptomları ortadan kaldırmak için düşük doz aspirin (40-100 mg/gün) önerilmektedir. İleri derecede trombositoz varlığında edinsel vWH dışlandıktan sonra aspirin başlanmalıdır (256, 282). Randomize bir çalışmada PV'da düşük doz aspirin (100 mg/gün) tedavisinin kanama riskini arttırmadan trombotik olayları azalttığı gösterilmiştir (114). ET'de retrospektif çalışmalar, aspirin kullanımı sonucunda benzer bir koruyucu etki göstermesine rağmen bu konuda prospektif çalışmalar yapılmamıştır (177, 254). Günümüzde aspirin, kontrendikasyon olmadığı durumlarda tüm ET hastalarında önerilmektedir. ET'de klopidogrel gibi yeni antitrombosit ajanların kullanımı ile ilgili birkaç veri olmasına rağmen, günümüzde aterosklerotik komplikasyonları önlemek için aspirini tolere edemeyen hastalarda önerilmektedir.

Prospektif randomize bir çalışma, yüksek riskli ET hastalarında (yaşın 60 ve üstünde olması veya tromboz öyküsü olması) trombozu önlemede hidroksiüre ile sitoredüktif tedavinin net rolünü göstermiştir. Bu çalışmadaki yüksek riskli hastaların %70'i ek olarak antitrombosit ajanları kullanmıştır (283). Retrospektif çalışmalara göre, 60 yaşın altında ek risk faktörleri olmayan hastalarda trombotik komplikasyon riski, kontrol grubundan yüksek olmamasına rağmen bu konuyla ilgili prospektif veri yoktur (284-287). Günümüzde, ET'de sitoredüktif tedaviden yarar gören grup, yüksek riskli hastalar gibi görünmekle beraber tedavi tromboz riskine dayalı olarak düzenlenmektedir. Düşük riskli grupta (yaşın 40'ın altında olması) sitoredüktif tedavi önemli bir koruyucu etki sağlamadığı için önerilmemektedir. Günümüzde, orta riskli grupta (yaşın 40-60 yaş arasında olması) tedavi kararını yönlendiren az kanıt bulunmaktadır. Primer trombositemi-1 (PT-1) çalışmaları, orta riskli grupta hidroksiüre ve aspirinin birlikte kullanımı ile aspirinin tek başına kullanımını randomize olarak karşılaştırmaktadır. Ayrıca düşük riskli hastalarda aspirinin tek başına kullanımı ile ilgili gözlemsel çalışmalar devam etmektedir. Bunların sonucunda oluşan prospektif veri, bu hastalarda tedavi kararının netleşmesine neden olacaktır. Sitoredüktif tedavi başladıktan sonra trombosit değerlerini normal aralıkta tutmak için doz ayarlaması önerilmektedir.

Bir ribonükleotid redüktaz inhibitörü olan, ayrıca hidroksikarbamid olarak da bilinen hidroksiüre, ET'nin ilk basamak tedavisinde kullanılır. Randomize kontrollü bir çalışmada trombotik olayları önlediği kanıtlanan tek sitoredüktif tedavidir (283). Başlangıç dozu günde 500-1000 mg'dır. Tedavideki hedef, trombosit değerini  $400.000/\text{mm}^3$ 'in altına düşürmektir. Bu ilacın majör komplikasyonları, geriye dönüşümlü miyelosüpresyon ve bukkal mukoza

veya alt ekstremitenin ülserasyonudur. Hidroksiürenin, orak hücre hastalığında lökomojenik etkisinin olmadığı kabul edilmekle beraber, miyeloproliferatif hastalıklarda potansiyel lökomojenik etkisinin olup olmadığı tartışmalıdır (110, 288). Bazı çalışmalar, hidroksiüre ile tedavi edilen ET hastalarında akut lösemi riskinde artışı gösterirken bazıları bu ilişkiyi gösterememiştir (173, 289-293). Bu çalışmalardaki problemler, küçük hasta grubunu kapsaması, multipl sitotoksik ajan kullanan hastaların dahil edilmesi, uygun bir kontrol grubunun olmaması, verinin retrospektif toplanması ve rölatif olarak kısa süreli takip olmasıdır. Hidroksiüre kullanan orak hücre hastalığı ve MPN hastalarının kan analizinde normal kontrol grubu ile eşit oranda DNA mutasyonları gösterilmiştir (294). Bunun sonucunda hidroksiürenin mutajenik potansiyelinin düşük olduğu söylenebilir. Günümüzde hidroksiürenin tek ajan kullanımını sonucunda artmış akut lösemi riskinin olup olmadığı net değildir. Fakat artmış risk varlığında bu riskin küçük olduğu ve trombotik komplikasyonlardaki azalma sonucunda bu riskin dengelediği düşünülmektedir.

Bir 'quinazoline' derivesi olarak bilinen anagrelid, megakaryosit farklılaşmasını inhibe ederek trombosit değerini azaltır (295). Bu ilacın kullanımını sonucunda lökosit değerinde değişiklik beklenmezken anemi sık görülür ve sıklıkla progresiftir (296). Başlangıç dozu günde 4 kez oral alınan 0.5 mg veya 2 kez 1 mg olarak önerilmektedir. Başlangıç dozuna bir haftadan fazla süre devam edilmeli ve takiben trombosit değerini  $600.000/mm^3$ 'in altına düşürmek için mümkün olan en az doza indirilmelidir. Doz haftada 0.5 mg/günden fazla arttırılmamalıdır. Birçok hasta 1.5-3 mg/gün dozunda yeterli yanıtı elde etmektedir. Hastaların üçte biri bu ilacı yan etkilerinden dolayı tolere edememektedir. Bu yan etkiler sıklıkla ilacın vazodilatatör ve pozitif inotropik etkilerinden kaynaklanır. Yan etkiler arasında taşikardi ve aritmiler, sıvı retansiyonu, kalp yetersizliği ve baş ağrıları vardır (161, 297). Bu ilaç, yaşlılarda ve kardiyak hastalığı olanlarda dikkatli kullanılmalıdır. Anagrelid sitotoksik olmamasına ve lökomojenik gibi görünmemesine rağmen, 'PT-1' randomize çalışması, yüksek riskli ET'de anagrelidle beraber aspirin tedavisinin hidroksiüre ile beraber aspirin tedavisine göre daha kötü sonuçları olduğunu göstermiştir. Bu çalışmada, anagrelid ile tedavi edilen hastalarda olaysız sağkalım oranı daha düşük, arteriyel tromboz, majör kanama ve miyelofibroza progresyon oranı daha yüksektir. Buna ters olarak anagrelid kullanan grupta trombosit değeri eşit saptanırken venöz tromboz oranı azalmıştır (297). Hidroksiüreden farklı olarak, anagrelid tedavisi zamanla kemik iliğinde retikülin lif artışı ile ilişkilidir (296). 'PT-1' çalışması ve İtalyan prospektif çalışmalarında anagrelid tedavisinin tromboz için kısmi olarak koruma sağladığı gösterilmiş ve hidroksiürenin uygun olmadığı veya bu tedaviyi tolere edilemeyen hastalarda, anagrelidin ikinci basamak tedavide kullanılması gerektiği

belirtmiştir (297, 298). ‘ANAHYDRET’ çalışmasında ET tedavisinde anagrelidin hidroksiüreye oranla daha kötü sonuçları olmadığı gösterilmiştir (299). Fakat bu çalışmada hasta sayısı az, takip süresi kısa ve primer sonlanım noktaları rölatif olarak küçüktür. Bu çalışmada, ‘PT-1’ çalışmasındaki farklılıklar gözlenmemiştir.

Rekombinant interferon alfa, ET’de trombosit değerini kontrol altına almakta etkilidir. Fakat trombozu önlemede etkili olduğuna dair direkt kanıt azdır (300). Başlangıç dozu haftada 3 kez 3 milyon ünedir. Tedaviyi kesmeyi gerektirebilecek önemli yan etkiler arasında grip benzeri semptomlar ve psikiyatrik bozukluklar vardır. Bu ajanın lökomojenik veya teratojenik yan etkileri olmadığı için genç hastalarda veya gebelik planlayan hastalar ve hamilelerde sıklıkla kullanılmaktadır. Rekombinant interferon alfa’nın yan etki profilinden dolayı yaşlı hastalarda kullanımından kaçınılmaktadır. Pegile interferon tedavisi daha az sıklıkta uygulama gerektirmektedir. Bu nedenle kullanımının daha uygun olabildiğine inanılmaktadır. Fakat KML çalışmalarında toksisitesi rekombinant formu ile benzer bulunmuştur (301).

Radyoaktif fosfor ve busulfan gibi alkilleyici ajanlar, ET’de trombosit değerini kontrol altına almaktadır. Fakat bu ilaçlar özellikle hidroksiüreyi takiben kullanıldığı zaman akut lösemiye progresyon riskini arttırmaktadır (302, 303). Sonuç olarak genç hastalarda bu ajanlardan kaçınılmalıdır. Radyoaktif fosfor ve busulfanın her ikisi de, dozlar arasında uzun aralıklar verilerek intermitten kullanılabilir ve düzenli olarak kliniğe başvuramayacak yaşlı hastalarda uygun tedavi seçeneğidir. Bir piperazin derivesi olan pipobroman, ET’de trombosit değerini düşürmede etkilidir. Fakat trombozu önlemede etkili olduğuna dair direkt kanıt azdır (304). Alkilleyici ajanlarla benzer yapısal özelliklere rağmen pipobromanın yüksek lösemik transformasyonla ilişkisi gösterilmemiştir (304, 305). Fakat yine de genç hastalarda kullanımından kaçınılmalıdır.

Sonuç olarak tedavi grupları üç gruba bölünerek tedavi algoritmaları oluşturulmuştur (144):

**1-Düşük riskli grup:** Asemptomatik hastalarda ‘bekle ve gör’ şeklinde gözlem önerilmektedir (kanıt düzeyi evre B). Bazı çalışmalar aspirinin trombotik komplikasyonları önlediğini ve eritromelalji, akrosiyanoz, baş ağrısı, baş dönmesi, görme bozuklukları ve ekstremitelerin (avuç içi ve ayak tabanı) parestезisi gibi mikrovasküler hastalıkları azalttığını desteklemektedir (281). Fakat bu tedavinin etkili profilaksi sağlayıp sağlamadığı kanıtlanmamıştır.

**2-Orta riskli grup:** Tedavi bireyselleştirilmelidir. Kardiyovasküler risk faktörlerinin varlığında trombosit sayısı  $600.000/\text{mm}^3$ 'ün üstünde ise aspirin 100 mg/gün tek başına kullanılabilir veya aspirin tedavisine ek olarak trombosit değerini düşürücü ajanlar eklenebilir (kanıt düzeyi evre C) (306). Yaşı 60'ın altında, trombosit sayısı  $600.000/\text{mm}^3$  ile  $1.000.000/\text{mm}^3$  arasında olan ve kardiyovasküler risk faktörleri olan hastalarda vazomotor ve/veya trombohemorajik olayların yokluğunda tedavi ile ilişkili net bir konsensüs yoktur.

**3-Yüksek riskli grup:** Yaşı 60 ve üstünde olan ve kardiyovasküler risk faktörlerini taşıyan hastalarda trombosit sayısı  $600.000/\text{mm}^3$ 'ün üstünde ise tedavi başlanmalıdır. İlk basamak tedavide 15 mg/kg/gün başlangıç dozunda hidroküüre önerilmektedir. Hedef trombosit sayısı  $450.000/\text{mm}^3$ 'ün altıdır (307). Hidroküreyi tolere edemeyen veya dirençli hastalarda anagrelid ve interferon alfa gibi ikinci basamak tedaviler önerilmektedir (308).

Hematopoetik kök hücre transplantasyonu, ET'de konvansiyonel tedavinin bir parçası değildir. Fakat, yaşı 60'dan küçük ve miyelofibrozu veya akut lösemiye transforme olan hastalarda allogeneik kök hücre nakli önerilebilmektedir (309). ET'de JAK2 inhibitörleri araştırılmıştır fakat yararı net değildir. Progresyonu veya yaşam süresini etkileyip etkilemediği bilinmemektedir (310).

**Tablo XI. ET'de risk kategorileri**

<b>Yüksek risk</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>-60 yaş ve üstü olması</li><li>-Geçirilmiş kanama veya tromboz öyküsü ve/veya</li><li>-Trombosit sayısının <math>1.500.000/\text{mm}^3</math>'den fazla olması</li></ul>
<b>Orta risk</b> <b>Bu grup halen tartışılmaktadır ve genel kabul görmemiştir.</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>-Yaşın 40-60 yaş arasında olması</li><li>-Kardiyovasküler risk faktörlerinin varlığı (sigara, hipertansiyon, dislipidemi, diabetes mellitus)</li><li>-Trombosit sayısının <math>1.500.000/\text{mm}^3</math>'den az olması</li></ul>
<b>Düşük risk</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>-Yaşın 40'ın altında olması</li><li>-Tromboz öyküsü olmaması</li><li>-Kardiyovasküler risk faktörlerinin olmaması</li><li>-Trombosit sayısının <math>1.500.000/\text{mm}^3</math>'den az olması</li></ul>
Son üç yıl içinde yapılan meta-analizler, JAK2V617F mutasyonu varlığı ve/veya lökosit sayısının $10.000/\text{mm}^3$ 'den fazla olmasını tromboz için yüksek risk faktörleri olarak kabul etmiştir.	

#### 2.2.2.6. Seyir ve Prognoz

ET, klinik olarak normale yakın yaşam beklentisi olan, baş ağrısı ve akral parestezi gibi sık mikrovasküler bozuklukların yaşandığı, ayrıca yaş ve tromboz öyküsüne dayalı olarak

tromboembolik komplikasyonların arttığı bir hastalıktır (250, 284). Yapılan çalışmalar, hastalığın ilk dekadında normal yaşam beklentisi olduğunu göstermektedir (167, 173, 239, 250). İlk dekaddan sonra yaşam beklentisi ile ilgili bilgi sınırlıdır fakat gecikmiş klonal evolüsyon nedeniyle beklenen yaşam süresinde hafif bir azalma görülebilir (137, 239). Hastalığın ilk 2 dekadında %5-10 oranında AML, miyelofibroz veya PV'ya dönüşüm gerçekleşebilir (173, 250, 266). 435 ET hastasını içeren retrospektif bir çalışmada AML'ye klonal evolüsyon için 15 yıllık kümülatif risk %2, miyelofibroz için %4 olarak bildirmiştir. Bu riskin hidroksiüreyi de içeren tekli ajan kullanımı ile değişmediği vurgulanmıştır (173). 164 hastayı içeren başka bir retrospektif çalışmada 13 yıl boyunca pipobroman ile tedavi sonrasında lösemik transformasyon %5.5 olarak bildirilmiştir (266). ET'de klonal evolüsyonun hastalığın doğal seyrindeki progresyona bağlı olduğu ve sitoredüktif tedavi yokluğunda da ortaya çıkabildiğine inanılmaktadır (265). Sonuç olarak ET'de uzun dönem yaşam ile ilişkili iyi kalitede prospektif bir data yoktur. Retrospektif çalışmaların sonucunda, ET tanısından sonraki ilk dekadda mortalite oranlarının kontrol grubu ile benzer olduğu fakat sonrasında arttığı söylenebilir (137, 173). Mortalitedeki artışın nedeni tromboz ve miyelofibroz veya AML'ye transformasyon gibi hastalık komplikasyonlarıdır. Son 20 yılda tedavi algoritmalarının belirgin değiştiği düşünülürse, bu verinin günümüz hastaları ile bağlantısı net değildir.

ET'de trombotik komplikasyon riskini öngörmek için birkaç faktör tanımlanmıştır. Bunlar arasında en iyi bilinenleri yaşı 60'ın üstünde olması ve öncesinde tromboz öyküsü olmasıdır (173, 247, 284). Diabetes mellitus, hipertansiyon, hiperkolesterolemi ve sigara kullanımı gibi genel ateroskleroz risk faktörlerinin de ET'de tromboz riskini belirlemede önemli olduğu düşünülmektedir (247, 285, 311). Fakat, yüksek riskli ET özelliklerini taşımayıp (yaşın  $\geq$  60 olması veya tromboz öyküsü olması) kardiyovasküler risk faktörleri olan hastaların sitoredüktif tedaviden fayda görüp görmediği net değildir. Tanıda lökosit sayısı trombotik olaylar için bağımsız risk faktörü kabul edilse de bununla ilgili prospektif veri yoktur (137, 312). Lökosit sayısının tedavi sonucunda azaltılmasının tromboz riskini azaltıp azaltmadığı henüz net değildir. JAK2V617F mutasyonunu taşıyan ET hastalarında venöz tromboz ve tüm tromboz oranları, taşımayanlara göre daha yüksektir (273, 313). Oysa ki, JAK2V617F mutasyonu pozitifliği ile arteriyel trombozun direkt ilişkisi kanıtlanamamıştır (313). Tanıda artmış kemik iliği fibrozisi, trombotik komplikasyon riskini arttırmaktadır (296). Günümüzde, yaşı 60'dan büyük olması veya tromboz öyküsü olması, sitoredüktif tedaviyi gerektirmektedir. Diğer risk faktörlerinin tedaviyi değiştirme kararındaki rolü net değildir. Trombositozun derecesi, tromboz riski için güvenilir bir gösterge olmamasına

rağmen çok yüksek trombosit değeri olan hastalarda (trombosit  $>1.500.000/mm^3$ ) çoğu klinisyen sitoredüktif tedavi başlamaktadır (247, 286, 292, 314). Trombotik komplikasyonlara zıt olarak miyelofibrozu veya akut lösemiye progresyon olacağını düşündüren sadece birkaç faktör vardır. Her iki komplikasyonun insidansı, hastalık süresi ile progresif artış göstermektedir (137, 292, 305, 315). Tedavi seçimi önemli rol oynamaktadır. Anagrelid kullanımının hidroküre kullanımına göre miyelofibrotik transformasyonu arttırdığına ve genotoksik ajanların özellikle hidroküre ile dönüşümlü kullanıldığında lösemi riskini arttırdığına inanılmaktadır (162, 173, 293). Prospektif bir çalışmada, tanı sırasında kemik iliğinde fibrozis varlığının, takip eden dönemde miyelofibrozu riskinde artışa neden olduğu fakat diğer göstergelerin miyelofibrotik veya lösemik transformasyonla tutarlı bir ilişkisinin olmadığı bildirilmiştir (296).

Sonuç olarak, ET'li hastaların çoğunluğu tedavi gerektirmemektedir ve ilaç tedavisinin ömrü uzattığı veya lösemik transformasyonu önlediği gösterilememiştir (239). Günümüzde tedavi, yüksek riskli hastalarda trombohemorajik olayları önlemek veya baş ağrısı ve eritromelalji gibi mikrovasküler semptomları geriletmek için kullanılır (123, 255, 283). Yüksek riskli hastalarda trombohemorajik komplikasyonları önlemek için sitoredüktif tedavi ve mikrovasküler semptomları geriletmek için aspirin kullanılmaktadır (316).

### **2.2.3. Primer Miyelofibrozu**

#### **2.2.3.1. Epidemiyoloji**

Primer miyelofibrozu (PMF), kök hücreden kaynak alan, klonal miyeloproliferasyon, ekstramedüller hematopoez, kemik iliğinin stromal bileşenlerinin proliferasyonu, splenomegali ve inefektif eritropoez ile karakterize klinikopatolojik bir antidedir (317). PMF, ayrıca myeloid metaplazili miyelofibrozu ve kronik idiyomatik miyelofibrozu olarak da anılmaktadır. İsimlendirme üzerine çalışan bir grup tarafından son olarak PMF olarak adlandırılmıştır (318). Yıllık insidansı 100.000'de 0.5 ile 1.3 arasında değişmekle beraber en yüksek oranda İsrail'in kuzeyinde Eşkenazi Yahudileri'nde görülmektedir (174, 319, 320). MPN içindeki en nadir hastalık olması yanında ortalama 4 yıllık yaşam süresi ile prognozu en kötü olanıdır. PMF, karakteristik olarak 50 yaşından sonra ortaya çıkmakla beraber tanıdaki ortalama yaş yaklaşık olarak 65-70'dir (321, 322). Hastalık kadın ve erkeklerde eşit sıklıkta görülmektedir (323, 324). İyonize radyasyon ve benzen gibi bazı çevresel faktörlerin PMF nedeni olabileceği ileri sürülse de etyolojisi tam bilinmemektedir (325, 326).

### 2.2.3.2. Patogenez

Yıllardır PMF'in klonal bir hastalık olduğu ve hastalığın malign pluripotent kök hücrelerin malign proliferasyonu sonucunda ortaya çıktığı kabul edilmektedir. Bunu destekleyen ilk çalışma, G-6-PD geni heterozigot olan bireylerde G-6-PD'in X-kromozomuna bağlı inaktivasyon patternlerinin ortaya çıkmasıdır (327). Fakat, genel popülasyonda G-6-PD heterozigot olguların düşük sıklıkta olması, birkaç grubun daha bilgi verici olduğunu düşündükleri X'e bağımlı genleri, hipoksantin fosforibozil transferaz ve fosfogliserat kinazı analiz etmesine neden olmuştur. Bu çalışmaların sonucunda erken hücre faz veya daha ileri miyelofibroz fazında olan tüm hastalarda monoklonal hematopoez gösterilmiştir (328, 329). Reeder ve arkadaşları, FISH analizi sonucunda hem B hem T hücrelerinin etkilendiğini göstermekle beraber karyotip analizinde stromal proliferasyonun poliklonal veya reaktif olduğu ve altta yatan klonal hematopoezin bir parçası olmadığı gösterilmiştir (330, 331). N-Ras geni mutasyon analizini kullanan bir çalışmada B ve T lenfositik dizinin etkilenmesi, hastalığın pluripotent kök hücre kaynağını desteklemektedir (332). Pluripotent öncül hücreler (CFU-GEMM) ve diğer öncül hücreleri (BFU-E, CFU-GM ve CFU-MK) içeren dolaşan hematopoetik öncüllerin artışı, PMF'in bir özelliğidir (333, 334, 335). Bu öncül hücrelerin kemik iliğindeki kök hücrelerin proteolitik salınımından kaynaklandığına inanılmaktadır. Dalak ve karaciğerin de dolaşan hücre havuzuna katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Çünkü splenektomi geçici olarak değerlerini normale getirmektedir (336, 337). Dolaşan öncül hücrelerin seviyesinde yükselme, periferik kanda CD34 hücre sayısında artış olarak yansımaktadır (338, 339). CD34 hücrelerinin mutlak sayısının, PMF'i diğer Ph-negatif MPN'den ayırt etmek için ve ayrıca blastik transformasyonu tahmin etmek için önemli olduğu ileri sürülmektedir (340). Eritroid öncüllerin EPO'ye karşı duyarlılığında artış bildirilmiştir (333). CFU-MK'nin otonom çoğaldığı ve/veya IL-3'e aşırı duyarlılığı olduğu bilinmektedir (203, 204, 334). Bu bulgular, otonom megakaryosit proliferasyonunun MPL mutasyonları veya MPL-ligandın otokrin stimülasyonu ile ilişkisi olmadığı bilgisi ile birleştirildiğinde, patogeneze reseptör-ligand bağlanması sonrasında gelişen olayların önemli olduğunu düşündürmektedir (204). Pluripotent kök hücrelerin dolaylı olarak etkilendiğine dair bildirilen hastalıklar arasında edinsel hemoglobin H hastalığı, paroksizmal nokturnal hemoglobinüri, edinsel Pelger-Huet anomalisi, nötrofil fonksiyon kusuru ve trombosit fonksiyon bozukluğu vardır (242, 341-344).

Sitogenetik çalışmalar, birçok hematolojik malignitede patogenetik olarak önemli onkogenlerin tespitinde ana rol oynamakla beraber yakın zamana kadar PMF'de sitogenetik



anormallikler nadir ve kafa karıştırıcı bulunmuştur. Fakat son 20 yılda 256 hastayı içeren üç büyük çalışmanın verileri durumu aydınlatmaya yardımcı olmuştur (345-347). Bu üç çalışmayla beraber 157 kromozomal bozukluğu içeren literatür derlendiği zaman, PMF’de kromozomal değişikliklerin %80’den fazlasını 13q, 20q delesyonları, trizomi 8, 1.7.9. kromozomdaki anormalliklerin oluşturduğu anlaşılmaktadır (348). Anormal sitogenetik analizi olan hastaların %25’inde bulunan 13q delesyonları, en sık sitogenetik anormalliklerdir (345, 346). Bunu takiben en sık anormallikler 20q delesyonları ve birinci kromozomun uzun kolunda olan parsiyel duplikasyonlardır (345, 346). Bu üç sitogenetik anormallik PMF’e özgü değildir, PV ve MDS dahil diğer hematolojik malignitelerde de görülmektedir. Der(6)t(1;6)(q23-25;p21-22), PMF’de olası bir belirteç olmasına rağmen olguların %3’ünden azında bulunmaktadır (349). PMF’li olguların üçte birinde tanıda anormal karyotip bulunmakla beraber akut lösemi transformasyonunu takiben sıklığı yaklaşık %90’a kadar yükselmektedir (322, 350). Bu bulgu, lökomogeneziste çok basamaklı olayların rol oynadığını göstermektedir (350, 351). Lösemik transformasyonda büyük oranda 5q ve 7q delesyonunu içeren yüksek riskli sitogenetik anormallikler bulunmaktadır ve bu olgular kemoterapiye zayıf yanıt vermektedir (351). Bazı çalışmalarda kromozomal anormallikler kötü prognoz ile ilişkili bulunmakla beraber spesifik sitogenetik anormalliklerin etkisini tanımlamak güçtür (345, 346). Bir çalışmada trizomi 8 ve 12p delesyonu gibi sadece belirli klonal anormalliklerin kötü prognozla ilişkisi gösterilirken büyük çoğunluğunun yaşama etkisi gösterilmemiştir (351). Bazı nadir karyotip anormallikler de kötü prognozla ilişkili bulunmuştur. Random olmayan bir aberasyon olan trizomi 13 erken blastik transformasyonla ilişkilidir (352). +der(1q9p) ve t(6;10) (q27;q11) kötü prognozla ilişkili diğer sitogenetik anormalliklerdir (353, 354). Kromozom 7 anormallikleri, kötü prognozla ilişkili olmasına rağmen lösemik transformasyonla bağlantısı gösterilememiştir (355). Başka bir çalışmada kompleks karyotip varlığı ya da trizomi 8,  $\square 7/7q\square$ , i(17q), inv(3),  $\square 5/5q\square$ , 12p $\square$  veya 11q23 rearanjmanından herhangi birinin varlığı, PMF’de kötü prognozla ilişkili gösterilmiştir (356).

Dört bağımsız grup tarafından 88 PMF hastasında yapılan çalışmada JAK2V617F mutasyonu sıklığı %49 olarak bildirilmiştir (8-11). PMF olgularının %22’si JAK2 mutasyonu için homozigottur. Bu özelliğin 9p’deki heterozigotluğun kaybı ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (10). Geriye kalan hastalardaki moleküler kusurlar bilinmemektedir. STAT<sub>5</sub>, PMF’deki CD34<sup>+</sup> hücrelerinde ve megakaryositlerin büyük çoğunluğunda aktif bulunmaktadır. STAT<sub>5</sub> aktivasyonunun edinsel JAK2 mutasyonlarından farklı mekanizmalarla oluşabileceği düşünülmektedir (357). Başlıca c-KIT, c-FMS ve FLT3 olmak

üzere JAK2'yi aktive eden reseptör tirozin kinaz (RTK) genlerinin mutasyon taramaları faydasızdır (358). PMF'de alternatif STAT<sub>5</sub> aktivasyon mekanizmalarına olası bir ipucu megakaryositlerde FK506 bağlayıcı protein 51'in (FKBP<sub>51</sub>) artmış ekspresyonudur. Bu protein, JAK2/STAT<sub>5</sub> yolağının sürekli aktivasyonuna neden olmaktadır ve ayrıca antiapoptotik özelliği vardır (359). PMF'de FKBP<sub>51</sub>'in artmış ekspresyonunun, megakaryositlerin ve dolaşan CD34 hücrelerinin bir özelliği olan NF-KB'nin aktivasyonunda rol oynayabileceği düşünülmektedir (360). N-RAS'ın özellikle 12.kodonunu etkileyen RAS mutasyonları, PMF'de görülmekle beraber oldukça nadirdir. Bu mutasyonlar, kronik fazdaki PMF hastalarının yaklaşık %6'sında saptanmıştır (350). p53 ve p16'yı içeren mutasyonlar, hastalığın kronik fazında oldukça nadir görülmekle beraber PMF'i de içeren bir grup Ph-negatif MPN'nin transformasyonunda rol oynamaktadır (361-363). Bir çalışmada PMF'de KIT mutasyonları tanımlanmış ve bu mutasyonun KIT ligandına hassasiyeti arttırdığı bildirilmiştir (364). Fakat sonradan yapılan kapsamlı bir çalışma, bu bulguları desteklememiş ve bu mutasyonların oldukça nadir olduğunu bildirmiştir (358). Saflaştırılmış CD34 hücreleri üzerine yapılan bir çalışmada PMF'de aberan olarak eksprese edilen 95 gen tanımlanmış ve altta yatan kompleks patogeneze dikkat çekilmiştir (365).

Miyelofibrotik stromanın interstisyel ve bazal membran kollagenlerinde artış ile karakterize kompleks bir yapısı vardır (366-368). Buna ek olarak fibronektin, laminin, tenascin ve vitronektinin depolanmasında artış görülür (368-371). Sonuç olarak neovaskülarizasyonda belirginleşme ve endotelial hücre proliferasyonunda artış gözlenmektedir (370, 372). Bu kompleks stromal özellikler ve stromal proteinlerin artışından, trombosit kökenli büyüme faktörü (PDGF) ve TGF-beta'yı içeren büyüme faktörlerinin anormal salınımı sorumlu tutulmaktadır (373, 374). Miyelofibrotik stromanın patogenezinde vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ve metalloproteinazların doku inhibitörlerini de içeren birtakım ek büyüme faktörleri rol oynamaktadır (375, 376, 377). PMF'de displaziyle beraber kusurlu alfa granül salınımının ve megakaryosit kaynaklı büyüme faktörünün salınımının mekanizması açıklanmıştır. PMF'de megakaryositler tarafından nötrofil ve eozinofil emperipolesisi artmakta ve bunun sonucunda nötrofil yuvalanmasında önemli rol oynayan P-selektinin anormal miktarda ekspresyonu gerçekleşmektedir (378). Nötrofil 'engulfment'i' hücre ölümüne yol açarak proteolitik enzimlerin salınımına ve megakaryositik TGF-beta ve PDGF'nün salınımına yol açmaktadır. Bu fenomen, ayrıca nötrofil elastazında artışa neden olmaktadır. Bunun sonucunda proteolitik enzim aktivitesinde artış ve kemik iliğinden CD34<sup>+</sup> öncül hücrelerinin salınımında artış olmaktadır (378).

### 2.2.3.3. Tanı

Splenomegali ve anemi, lökositöz ve/veya trombositöz varlığında PMF'den şüphelenilmelidir. 2008 yılında revize edilmiş 'DSÖ' sınıflamasında PMF için tanımlanan majör kriterlerden biri: 'kemik iliği biyopsisinde megakaryositik proliferasyon ve atipinin varlığı, buna sıklıkla retikülin ve/veya kollagen fibrozisin eşlik etmesi veya önemli bir retikülin fibrozisi olmaksızın granülositik proliferasyon ve sıklıkla azalmış eritropoeze eşlik eden megakaryositik değişikliklerin varlığıdır' (Tablo XII) (55). Kollagen lif artışı olmaksızın retikülin liflerinde orta dereceli artış olabilmektedir. Megakaryositlerdeki değişiklikler oldukça ayırt edicidir. Bu morfolojik değişiklikler arasında pleomorfizm, büyük, hiperkromatik nukleusa bağlı nukleus/sitoplazma oranında artış, nukleer lobulasyonda bozulma ve maturasyon duraklaması vardır. Erken fibrozis, stromal retraksiyon sonucunda sinüs dilatasyonuna neden olur (379). PMF, kemik iliği fibrozisine neden olan diğer malign ve malign olmayan hastalıklardan ayırt edilmelidir (Tablo XIII).

PMF'den sorumlu ilk mutasyon bilinmemektedir. Hastaların büyük bir kısmında JAK2V617F mutasyonu ve az bir kısmında MPL, LNK, CBL, TET2, ASXL1, IDH, IKZF1 veya EZH2 mutasyonları bulunmaktadır (13). JAK2V617F mutasyonu, PMF olgularının yaklaşık %50-65'inde bulunmaktadır. PMF'de klonal miyeloproliferasyon yanında kemik iliğinde stromal değişiklikler ve anormal sitokin ekspresyonu ile karakterize sekonder inflamatuvar bir durum vardır. PMF'de proinflamatuvar sitokinlerin plazmadaki seviyesi artar. Bunların patogenetik olarak hastalık ilişkili konstitüsyonel semptomlar ve kaşeksi ile ilişkili olabileceğine ve ayrıca tüm yaşam süresi (OS) ve lösemi ilişkisiz sağkalımda (LFS) kısalma ile ilişkili olabileceğine inanılmaktadır.

PMF'de tanı, fizik muayene, periferik kan bulguları, kemik iliği morfolojisi, sitogenetik inceleme, moleküler belirteçler ve diğer hastalıkların dışlanması dayalı olarak konulmaktadır (Tablo XII) (55). Periferik kan yaymasında tipik olarak lökoeritroblastozis ve 'tear drop' şeklinde eritrositlerin eşlik ettiği anizopoikilositoz görülür. Hastalık pre-fibrotik evre (erken evre) veya daha sık olarak fibrotik evrede tanı alır. PMF'li hastaların yaklaşık %25'i retikülin lif artışı olmadan veya az retikülin lif artışı ile birlikte granülositik ve megakaryositik proliferasyon ile karakterizedir (pre-fibrotik PMF). Tanı için kemik iliği materyali dikkatli incelenmelidir. Tanı yoğun kümelenmiş hipolobüle ve hiperkromatik nukleusu içeren morfolojik olarak atipik megakaryositlerin varlığı ile konur. Tanıda diğer önemli ayırt edici özellikler, mikrovasküleritenin sıklığı ve şekli yanında CD34<sup>+</sup> öncül hücrelerin seviyesi ve hücre kinetiklerindeki anormalliklerdir (380-382). Pre-fibrotik PMF,

trombositemi, sınırdan anemi, hafif splenomegali varlığı ve lökoeritroblastozisin yokluğu nedeni ile yanlışlıkla ET tanısı alabilmektedir (383, 384). Pre-fibrotik PMF'in doğal seyri bilinmemektedir çünkü bununla ilgili prospektif çalışmalar bulunmamaktadır. Mevcut veriler doğrultusunda belirgin hastalığa progresyonun megakaryositik displazinin varlığına bağlı ortaya çıkabileceği düşünülmektedir (385, 386).

**Tablo XII. DSÖ 2008 PMF sınıflandırma kriterleri**

<p><b>Major kriterler</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1- Kemik iliği biyopsisinde megakaryositik proliferasyon ve atipinin varlığı, buna sıklıkla retikülin ve/veya kollagen fibrozisin eşlik etmesi veya önemli bir retikülin fibrozisi olmaksızın granülositik proliferasyon ve sıklıkla azalmış eritropoeze eşlik eden megakaryositik değişikliklerin varlığı (örneğin pre-fibrotik PMF)</li> <li>2- DSÖ kriterlerine göre KML, PV, MDS veya başka bir myeloid neoplazinin dışlanması</li> <li>3- JAK2V617F veya diğer klonal belirteçlerin gösterilmesi veya reaktif kemik iliği fibrozu kanıtının olmaması</li> </ol> <p><b>Minör kriterler</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1- Lökoeritroblastozis</li> <li>2- LDH düzeyinde artma</li> <li>3- Anemi</li> <li>4- Palpabl splenomegali</li> </ol>
<p><b>Tanı:</b> Tanı konması için üç majör kriterle beraber iki minör kriter gereklidir.</p>

**Tablo XIII. Kemik iliği fibrozisi ile ilişkili hastalıklar**

<b>Malign</b>	<b>Malign olmayan</b>
PMF	Enfeksiyonlar (örneğin tüberküloz, viseral layşmanyazis)
Diğer kronik miyeloproliferatif hastalıklar (örn. PV, KML, ET)	Renal osteodistrofi
Akut megakaryoblastik lösemi (akut miyelofibrozis)	Vitamin D eksikliği
MDS	Hipotiroidi
AML	Hipertiroidi
ALL	Gri trombosit sendromu
Tüylü hücreli lösemi	Sistemik lupus eritematozus (SLE)
Hodgkin lenfoma	Skleroderma
Multipl myelom	Radyasyon maruziyeti
Sistemik mastositoz	Benzen maruziyeti
Metastatik karsinom (örneğin meme, prostat, mide)	Gaucher hastalığı
	Osteopetrozis

#### 2.2.3.4. Klinik Özellikler

PMF'de ortalama tanı yaşı 60 olmakla beraber karakteristik olarak 50 yaşından sonra ortaya çıkmaktadır. Tanıda hastaların yaklaşık %25'i asemptomatiktir ve rutin kan tahlillerini takiben ortaya çıkar. Klasik PMF'in ana semptomları anemiyi takiben ortaya çıkan halsizlik, güçsüzlük, dispne ve taşikardidir. Splenomegali karakteristiktir ve masif olduğu zaman karında huzursuzluk ve erken doyma gibi bir takım şikayetlere neden olur. Büyümüş dalak için kan miktarının yetersiz kalması sonucunda dalak infarktı ortaya çıkar. Dalak infarktı genellikle geçici rahatsızlığa neden olur fakat nadiren akut batını taklit eden ciddi karın ağrısına neden olabilir. Olguların yaklaşık %70'inde hepatomegali görülmektedir. Portal hipertansiyon karaciğer kan akımında artış veya intrahepatik obstrüksiyon sonucunda ortaya çıkar (387, 388). PMF'in klinik tablosunda düşük dereceli ateş, gece terlemesi ve kilo kaybını içeren spesifik olmayan semptomlar hakim olabilir. Bu semptomlar kötü prognoz ile ilişkilidir (389). Diğer bir semptom özellikle alt ekstremitelerdeki kemik ağrısıdır. Kanama da görülebilmekle beraber sıklıkla hafif derecelidir. Peteşi, ekimoz gibi belirti verebileceği gibi masif gastrointestinal kanama gibi hayatı tehdit edebilir. Hemorajik diatez, trombositopeni, edinsel trombosit fonksiyon bozukluğu ve yaygın damar içi pıhtılaşmasından kaynaklanabilir. Tablo XIV'de PMF'de tanı sırasındaki semptom ve fizik muayene bulguları özetlenmiştir.

Ekstramedüller hematopoez veya myeloid metaplazi, etkilenen spesifik organa özgü semptomlara neden olmaktadır. Santral sinir sisteminin etkilenmesi sonucunda spinal kord kompresyonu, deliryum, diabetes insipidus, ciddi baş ağrıları ve meningeal infiltrasyona bağlı ekzoftalmi ortaya çıkabilir (390-395). Bunun yanında papilödemle beraber intrakranial hipertansiyon ve komaya neden olabilir (396-398). Lenf nodlarının tutulumuna bağlı olarak generalize ve belirgin lenfadenopati ortaya çıkabilir (399). Plevral infiltrasyon, hemotoraks ve plevral efüzyona neden olurken peritoneal ektopik implantlara veya mezenterik ekstramedüller hematopoeze bağlı masif asit ortaya çıkabilir (400-402). Efüzyonlar sıklıkla megakaryositler, immatür myeloid hücreler ve eritroblastları içeren birçok hematopoetik elemanları içermektedir. Gastrointestinal sistem etkilendiği zaman karın ağrısı ve intestinal obstrüksiyona neden olabilir (403, 404). Böbreğin infiltrasyonu sonucunda kronik böbrek yetersizliği, prostat tutulumu sonucunda mesane çıkış yolu obstrüksiyonu, safra kesesinin tutulumu sonucunda kronik kolesistit ve sinovyal tutulum sonucunda ise artrit ortaya çıkabilir (405-408). Cilt tutulumları nadirdir ve eritematöz plaklar, nodüller, diffüz veya papüller eritem, ülser ve büllöz lezyonlar şeklinde belirti verebilir (409). PMF nadiren, nötrofilik dermatoz veya 'Sweet sendromu' sonrasında tanı almaktadır. Ayrıca piyoderma

gangrenozum ve lösemik infiltrasyonlar da bildirilmiştir (410). Ölümün majör nedenleri enfeksiyon, kanama, kalp yetersizliği ve akut lösemik transformasyondur. Olguların yaklaşık %15'inde akut lösemiye transformasyon olur (411). En sık myeloblastik veya myelomonoblastik transformasyon görülmekle beraber megakaryositik, eritroid, lenfoid ve bazofilik transformasyon da bildirilmiştir (412-415). Olguların 1/3'ünde görülen mikst myeloid (myeloblastik-eritroid-megakaryositik) veya hibrid (myeloid-lenfoid) lösemiler, pluripotent kök hücre kaynağını desteklemektedir (416). Kemik, lenf nodları ve cilt gibi çeşitli bölgelerde lokalize granülositik sarkomlar saptanabilir.

PMF'de normositik anemi yanında periferik kan yaymasında anizositoz, poikilositoz ve 'tear-drop' şekilli hücreler görülmektedir. Hemen hemen tüm olgularda periferik yaymada çekirdekli eritrositler saptanır. Sıklıkla hafif bir retikülositoz görülür. Hasta serilerinde ortalama Hgb konsantrasyonu 9 ile 12 g/dl olarak bildirilmiştir (321, 322, 324). Aneminin en büyük sebebi inefektif eritropoez olmakla beraber diğer nedenleri arasında demir eksikliği anemisi, eritrosit sekestrasyonu ve splenomegali sonucunda gelişen plazma hücre ekspansiyonuna bağlı hemodilüsyon vardır. Direkt antiglobulin testi sıklıkla negatif olmakla beraber ciddi otoimmün hemoliz eşlik edebilir (417). Anti-eritrosit antikoru dışında immünolojik anormallikler sıklıktır. Antinükleer antikoru, romatoid antikoru, lupus antikoagülanı, antifosfolipid antikoru ve hipokomplementemi saptanabilir (418, 419). Ayrıca kemik iliğinde lenfoid nodüllerde artış görülebilmektedir (420). Bir çalışmada PMF'de dolaşımda immün komplekslerde artış gözlenirken başka bir çalışmada dolaşan immün kompleksler ile transfüzyon ihtiyacı, kemik ağrısı ve ateş gibi hastalık aktivitesi arasında korelasyon gösterilmiştir (419, 421). PMF'de immünolojik hipotez, düşük doz deksametazon, prednizolon ve siklosporin A'yı içeren immünoşüpresif tedaviyle başarılı şekilde tedavi edilen olgularla desteklenmiştir (422-424). Ayrıca SLE ve poliarteritis nodosa (PAN) ile birlikteliği de bu hipotezi desteklemektedir (425, 426). PMF'de genellikle total lökosit sayısı hafif olarak artmıştır (321, 322, 324). Dört büyük çalışmada ortalama total lökosit sayısı 10.000 ile 14.000/mm<sup>3</sup> arasında değişmektedir. Periferik kan yaymasında birçok hastada düşük oranlarda myelosit, promiyelosit ve blastik hücreler (%0.5-2) bulunabilmektedir. Tanı sırasında periferik kanda blast hücrelerinin oranı %0-20 arasında değişmektedir. Nötrofillerde hipersegmentasyon, hiposegmentasyon (edinsel Pelger-Huet anomalisi) ve anormal granülasyon görülebilir (321, 322, 324). Nötrofil alkalen fosfataz hastaların %25'inde artış, %25'inde ise azalış göstermektedir (427). Bazofillerin oranında hafif artış görülebilir. Tanıda hastaların %20'sinde nötropeni vardır (321, 322, 324). Tanıda değişik serilerde ortalama trombosit sayısı 175.000/mm<sup>3</sup> ile 580.000/mm<sup>3</sup> arasında değişmektedir (321, 322, 324).

Hastaların yaklaşık %40'ında trombosit sayısı artar (428). Tanı sırasında hastaların 1/3'ünde hafif ile orta dereceli trombositopeni vardır. Dev trombositler ve abnormal trombosit granülasyonu, hastalığın karakteristik özellikleridir. Hastaların yaklaşık %10'unda hematomoezin ciddi bir şekilde etkilenmesine ve masif dalak büyüklüğüne bağlı pansitopeni görülmektedir. Pansitopeni genellikle yoğun kemik iliği fibrozisi ile ilişkilidir.

**Tablo XIV. PMF'de başvuru semptomları ve fizik muayene bulguları**

<b>Belirti veya bulgu</b>	<b>İnsidens (%)</b>
Asemptomatik	16-30
Halsizlik	47-71
Ateş	5-15
Kilo kaybı	7-39
Gece terlemeleri	6-21
Dalaktaki büyümeye bağlı semptomlar	11-48
Kanama	5-20
Gut veya böbrek taşları	6-13
Solukluk	60
Peteşi veya ekimoz	15-20
Splenomegali	89-99
Hepatomegali	39-70
Periferik ödem	13
Portal hipertansiyon bulguları	2-6
Lenfadenopati	1-10
Sarılık	0-4

Ronald Hoffman, Edward J. Benz, Jr., Leslie E. Silberstein, Helen E. Heslop, Jeffrey I. Weitz, John Anastasi. Hematology Basic Principles and Practice. 6th Edition

### **2.2.3.5. Tedavi**

PMF için güncel ilaç tedavisi küratif değildir ve yaşamı uzattığı gösterilmemiştir. Allogeneik hematopoetik kök hücre nakli (AHKHN), küratif potansiyeli olan tek tedavi modalitesi olmasına rağmen hazırlama rejiminin yoğunluğundan bağımsız olarak nakil olan hastaların yaklaşık yarısında transplantasyona bağlı ölüm veya ciddi morbidite gerçekleşir (429). Sonuç olarak PMF'li daha fazla hasta yeni ilaçlarla tedaviye yönlendirilmektedir.

Bunun yanında birçok hastanın tedavisiz izlenebildiği ve bazılarının konvansiyonel ilaç tedavisiyle etkili olarak tedavi edilebildiği bilinmektedir.

Günümüzde, PMF’de tedavi algoritması, risk skorlama sistemlerine göre geliştirilmiştir. PMF’de prognostik model, 2009 yılında uluslararası prognostik skorlama sisteminin (IPSS) gelişimi ile ortaya çıkmıştır (430). IPSS, tanı sırasında uygulanabilir. IPSS için beş bağımsız risk faktörü kötü seyir ile ilişkilidir (Tablo XV) (430). 0, 1, 2,  $\geq 3$  risk faktörlerinin varlığına göre sırasıyla düşük, orta-1, orta-2 ve yüksek riskli hastalık olarak gruplandırılmaktadır. Dinamik uluslararası prognostik skorlama sistemi (DIPSS), aynı bağımsız risk faktörlerini içermekle beraber hastalık seyrinde herhangi bir zamanda uygulanabilir (Tablo XVI) (431). Düşük (0 risk puanı), orta-1 (1 veya 2 puan), orta-2 (3 veya 4 puan) ve yüksek (5 veya 6 puan) riskli olarak sınıflandırılmaktadır. Sonraki yıllarda PMF’de IPSS ve DIPSS’den bağımsız risk faktörleri tanımlanmıştır. Bunlar arasında kötü karyotip anormallikleri (kompleks karyotip veya trizomi 8, 7/7q, i(17q), inv(3), 5/5q, 12p veya 11q23 rearanjmanını içeren bir veya iki anormallik), eritrosit transfüzyon ihtiyacı ve trombosit sayısının  $100.000/mm^3$ ’den az olması vardır (356, 432-435). 2011 yılında DIPSS, trombosit değerinin  $< 100.000/mm^3$  olması, eritrosit transfüzyon ihtiyacı ve kötü karyotip anormalliğini içeren üç bağımsız risk faktörünün eklenmesi sonucunda modifiye edilmiştir (436). ‘DIPSS-plus’ kriterleri olarak adlandırılan bu kriterlere göre düşük (hiç risk faktörü olmaması), orta-1 (1 risk faktörü), orta-2 (2 veya 3 risk faktörü) ve yüksek ( $\geq 4$  risk faktörü) riskli olarak sınıflandırılmıştır (Tablo XVII) (436).

Düşük veya orta-1 risk grubunda olan asemptomatik hastalarda spesifik tedavinin yararı kanıtlanmamıştır (436). Semptomatik anemi, splenomegali, karaciğer ve dalak dışındaki ekstramedüller hematopoez, kemik ağrısı, ekstramedüller hematopoez ilişkili pulmoner hipertansiyon veya konstitüsyonel semptomların (örneğin halsizlik, gece terlemesi ve pruritis) varlığında tedavi gerekmektedir. Ayrıca belirgin lökositoz veya trombositoz varlığında sitoredüktif tedavi başlanabilir. PMF ilişkili anemi, androjenler (örneğin haftada bir intramüsküler 400-600 mg testosteron, günde 3 kez 10 mg oral fluoksimesteron), prednizon (0.5 mg/kg/gün), danazol (600 mg/gün), talidomid (50 mg/gün)  $\pm$  prednizon veya lenalidomid (10 mg/gün)  $\pm$  prednizon ile tedavi edilmektedir (437-441). Bu ilaçların herbirine yanıt oranı %15-25 arasında değişmekle beraber yanıt süresi yaklaşık olarak 1-2 yıldır. Lenalidomid en çok del(5q31) varlığında etkilidir (442). Androjenlerin en önemli yan etkileri hepatotoksisite ve virilizan etkiler, talidomidin başlıca yan etkisi periferik nöropati ve lenalidomidin yan etkisi miyelosüpresyondur. PMF ilişkili splenomegalide ilk basamak tedavi hidroksiüredir. Başlangıç dozu günde 3 kez 500 mg’dır. Hidroksiüre hastaların yaklaşık



%40'ında dalak boyutunu yarı yarıya azaltmaktadır (443). Hidroksiürenin dalak üzerine etkisi ortalama bir yıl sürmektedir. Yan etkileri arasında miyelosüpresyon ve mukokutanöz ülserler vardır. Talidomid ve lenalidomid bazı hastalarda splenomegaliyi geriletir ve trombositopeniyi düzeltir (423, 438, 439, 441). İnterferon-alfa'nın PMF ilişkili splenomegalide yararı sınırlıdır (444). Düşük veya orta-1 risk grubunda splenomegalinin derecesi sıklıkla splenektomi veya radyoterapi gerektirecek kadar ciddi değildir.

Yüksek veya orta-2 risk grubunda olan PMF'de deneysel ilaç tedavisi veya AHKHN önerilmektedir. İleri derece kötü prognozlu bireylerde (monozomal karyotip, inv(3)/i(17q) anormalliklerinin olması veya dolaşımdaki blast sayısının %9'un üzerinde olması, lökosit değerinin  $\geq 40.000/\text{mm}^3$  olması veya diğer kötü prognozlu karyotip anormalliklerinin ikisinin varlığı) acil AHKHN planlanmalıdır (445). PMF'de AHKHN ile ilişkili en büyük çalışmalardan birinde HLA tam uyumlu akraba vericiden yapılan nakilde 5 yıllık hastaliksız sağkalım %33 ve tedavi ilişkili mortalite %35 iken akraba dışı nakillerde sırasıyla %27 ve %50 olarak bildirilmiştir (446). Bu çalışmada HLA tam uyumlu akraba vericiden yapılan nakilde kronik graft versus host hastalığı (GVHH) ve relaps oranlarının sırasıyla %40 ve %32 olduğu ve splenektomi öyküsünden etkilenmediği bildirilmiştir. İndirgenmiş hazırlama rejimi ile yapılan başka bir çalışmada 5 yıllık hastaliksız sağkalım %51, kronik GVHH %49 olarak bildirilmiştir (447). Aynı çalışmada relaps oranı %29 olarak bildirilmekle beraber yüksek riskli hastalık olması ve splenektomi öyküsü relaps için en büyük risk faktörlerindedir (447). Günümüzde PMF ve PV/ET dönüşümlü miyelofibroza birkaç deneysel ilaç araştırılmıştır (448). Bunlar arasında pomalidomid, JAK2 inhibitör ATP mimetikleri ve rapamisin protein kompleksinin memeli hedefinin inhibitörleri (mTOR inhibitörleri) umut vericidir (449-452). Ayrıca JAK-STAT'ın panobinostat (LBH589) ve givinostat (ITF2357) gibi HDAC tarafından inhibe edildiği bilinmektedir. Bu ilaçların PMF'deki yeri araştırılmaktadır (165, 453). İki farklı çalışmada panobinostatın doz kısıtlayıcı toksisitesi trombositopeni olarak bildirilmiştir. Bu ilacın histon asetilasyonunu artırarak klinik aktiviteyi sağladığı bilinmektedir. PMF'de düşük doz panobinostatın uzun dönem kullanımının konstitüsyonel semptomları ve splenomegaliyi geriletmediği, anemiyi düzelttiği, periferik kandaki lökoeritroblastozisi ortadan kaldırdığı, kemik iliğindeki retikülin ve kollagen fibrozisi azalttığı ve az sayıdaki hastada normal kemik iliği morfolojisini sağladığı gösterilmiştir. Günümüzde panobinostatın haftada üç kez oral 25 mg dozunda kullanımı ile ilişkili faz 2 çalışması sürmektedir.

Pomalidomid, ikinci kuşak immünomodulator bir ilaçtır. Faz 2 randomize bir çalışmada PMF'li anemisi olan hastaların %25'inin tek başına pomalidomid tedavisine (2 mg/gün) veya prednizonla (0.5 veya 2 mg/gün) olan kombinasyon tedavisine yanıt verdiği

bildirilmiştir (449). Tek ajan pomalidomid (0.5 mg/gün) kullanımı ile ilgili yapılan başka bir faz 2 çalışmasında sadece JAK2V617F mutasyonu varlığında anemide düzelme sağlanmıştır (sırasıyla %24, %0) (454). Pomalidomid indüklenmiş bazofili varlığında veya belirgin splenomegalinin yokluğunda ilaç daha etkin bulunmuştur (454). Pomalidomid, hastaların %58'inde trombosit yanıtı elde etmesine rağmen dalak boyutunu azaltmakta sınırlı etkiye sahiptir (454). İlaç ilişkili nöropati veya miyelosüpresyon nadir yan etkilerdir. Bir faz-1 çalışmasında yüksek dozların (> 2 mg/gün) daha etkin olmadığı ve miyelosüpresyon riskini arttırdığı bildirilmiştir (455).

Günümüzde klinik çalışmaları süren JAK2 inhibitör ATP mimetikleri arasında ruxolitinib (INCB018424), SAR302503 (TG101348), CYT387, lestaurtinib (CEP-701), SB1518, AZD1480, BMS911543, LY2784544 ve XL019 vardır. Bu ilaçların toksisite ve etkinlik profillerinde belirgin farklılıklar bulunmaktadır. Bu durumun diğer JAK ve JAK dışı kinaz hedeflerine karşı in vitro etkinliklerindeki farklılığa bağlı olduğu düşünülmektedir (456). Bir JAK1/JAK2 inhibitörü olan ruxolitinib, bir faz 1/2 çalışmasında PMF veya PV/ET dönüşümlü miyelofibroz tanısı alan 153 hastada araştırılmıştır (450). Bu ilacın doz kısıtlayıcı toksisitesi trombositopenidir ve maksimum tolere edilen doz günde 2 kez 25 mg veya bir kez 100 mg'dır. Yan etkileri arasında trombositopeni, anemi ve ilacın kesilmesi sonucunda semptomların ve splenomegalinin akut relapsı ile karakterize 'rebound sitokin reaksiyonu' vardır (457). Hematolojik olmayan yan etkileri nadirdir. Başlangıçta transfüzyon bağımsız olan hastalarda günde 2 kez 10-25 mg dozunda kullanılan ruxolitinibin grade 3/4 trombositopeni ve anemi sıklığı sırasıyla %39 ve %43 olarak bildirilmiştir. Hastaların %44'ünde %50'nin üzerinde dalak boyutunda azalma saptanmıştır. Hastaların büyük çoğunluğunda konstitüsyonel semptomlarda iyileşme (halsizlik, pruritis, karında huzursuzluk, erken doyma, gece terlemeleri ve egzersiz intoleransı) ve kilo artışı gözlenmiştir. 28 transfüzyon bağımlı hastanın 4'ü (%14) transfüzyon bağımsız hale gelmiştir. İlacın JAK2V617F alleli üzerine veya kemik iliği patolojisi üzerine etkisi belirsizdir. Esas olarak proinflamatuvar sitokinlerde (IL-1RA, IL-6, TNF-a, MIP-1b) belirgin azalma ve konstitüsyonel semptomlarda gerileme saptanmıştır. Ruxolitinibin PMF'de uzun dönem sonuçları, yüksek oranda tedavinin kesilmesiyle sonuçlandığını göstermektedir (Ortalama 9.2 ayda %92'sinde ilaç kesilmiştir). Ruxolitinibin kesilmesi sonucunda ciddi çekilme semptomları ortaya çıkmıştır ve 'ruxolitinib çekilme sendromu' olarak adlandırılmıştır. Bu sendrom, hastalık semptomlarının akut relapsı, splenomegali, sitopenilerin derinleşmesi ve septik şok benzeri sendromu içeren nadir bir hemodinamik dekompanseasyonla karakterizedir (457). Diğer bir selektif JAK2 inhibitörü olan TG101348, bir faz 1/2 çalışmasında PMF veya PV/ET

dönüşümlü miyelofibroz tanısı alan 59 hastada araştırılmıştır (451). Bu ilacın doz kısıtlayıcı toksisitesi geriye dönüşümlü olan amilaz ve lipazdaki asemptomatik artıştır. İlacın maksimum tolere edilen dozu günde 680 mg'dır. Grade 3 veya 4 yan etkileri doza bağımlı ve geriye dönüşümlüdür. Bunlar arasında bulantı (%3), kusma (%3), diare (%10), serum lipazda artış (%27), transaminaz artışı (%27), kreatinin yüksekliği (%24), trombositopeni (%24) ve anemi (%35) vardır. Tedavinin 6. ayında hastaların %39'unda ve birinci yılında %47'sinde palpabl dalak boyutunda %50'den fazla azalma bildirilmiştir. Buna ek olarak hastaların çoğunluğunda erken doyma, halsizlik, gece terlemesi, öksürük veya pruritis gibi semptomlarda gerileme saptanmıştır. Trombositozlu hastaların hepsinde ve lökositozlu hastaların çoğunluğunda değerler normale gelmiştir. Bazal JAK2V617F allel yükü %20'nin üzerinde olan 23 hastanın 9'unda (%39) allel yükünde %50 ve üzerinde azalma saptanmıştır. Kemik iliği patolojisi üzerine etkisi kısıtlı bulunmuştur. Genel olarak ilaç yanıtı, JAK2V617F mutasyonu varlığından etkilenmemiştir.

CEP-701, bir JAK2 ve FLT-3 inhibitörüdür (458). CEP-701, bir çalışmada JAK2V617F pozitif PMF tanısı alan 22 hastada araştırılmıştır (458). İlacın oral olarak günde iki kez 80 mg kullanımı sonucunda 6'sında (%27) klinik iyileşme gözlenmiştir. Klinik iyileşme gözlenen 3 hastada dalak boyutu azalmış ve iki hastada eritrosit transfüzyon bağımsızlığı gelişmiştir. Hiçbir hastada kemik iliği fibrozisinde gerileme veya JAK2V617F allel yükünde azalma görülmemiştir. Yan etkileri arasında grade 1-2 bulantı (%50), grade 1-2 kusma (%27), grade 3-4 anemi (%14), trombositopeni (%23) ve diare (%9) vardır. Tüm bu gözlemler, çeşitli JAK inhibitörlerinin toksisite ve aktivite profillerindeki büyük farkları ortaya koymaktadır. Sonuç olarak PMF'de JAK2 inhibitörlerinin yerini tartışmadan önce bu mekanizmayla etki eden daha çok ilaç araştırılmalıdır. Bu ilaçların yararlı etkilerinin anti-sitokin aktivitesinden kaynaklandığı söylenebilir. Günümüzde ruxolitinibin panobinostat ile kombine kullanımını araştıran çalışmalar sürmektedir. Kromatin düzenleyici ilaçların PMF'deki tedavi edici potansiyeli umut verici olup iyi tasarlanmış klinik çalışmalarda değerlendirilmelidir.

JAK-STAT aktivasyonunun mTOR aktivasyonuna neden olduğu bilinmektedir. Bundan dolayı, PMF'de mTOR inhibitörlerinin terapötik aktivitesi araştırılmıştır. Bir faz 1/2 çalışmasında mTOR inhibitörü olan everolimus, 39 PMF'li hastanın %20'sinde %50'den fazla dalak boyutunda azalma, konstitüsyonel semptomlarda %69 ve pruritiste %80 gerileme sağlamıştır (452). Anemi üzerine minimal etki göstermiştir ve JAK2V617F allel yükü üzerine etki sağlamamıştır. En sık yan etkisi grade 1-2 stomatit olmakla beraber tüm yanıt oranı %23'dür.

Sonuç olarak etkili bir ilaç tedavisinin olmadığı bilinen PMF’de ortalama yaşam süresinin 5 yıldan kısa ve lösemik transformasyon riskinin %20’den fazla olduğu düşünülen hastalarda nakil ilişkili komplikasyon riski göze alınmalıdır. Bu riski taşıyan grup, modifiye DIPSS kriterlerine göre yüksek veya orta-2 risk grubunda olan hastalar, trombosit değeri  $< 100.000/mm^3$  olan ve kötü karyotip anormalliği olan hastalardır. Transplantasyon adayı olmayan hastaların en iyi tedavi şekli deneysel ilaçlardır (456).

Hidroksiüreye dirençli splenomegali sıklıkla splenektomi ile tedavi edilmektedir (459). Splenektominin diğer endikasyonları arasında semptomatik portal hipertansiyon, trombositopeni ve sık eritrosit transfüzyon ihtiyacı vardır. 314 splenektomili PMF hastasını kapsayan bir çalışmada hastaların %75’inden fazlası splenektomiden fayda görmüştür ve ortalama yararı 1 yıl sürmüştür (460). Bu işlemin spesifik yararları arasında transfüzyon bağımsızlığı ve trombositopeninin gerilemesi vardır. Hastaların %28’inde perioperatif komplikasyonlar gelişmiştir. Bunlar arasında infeksiyonlar, abdominal ven trombozu ve kanama vardır. Perioperatif mortalite oranı %9’dur. Splenektomi sonrasında hastaların yaklaşık %10’unda progresif hepatomegali ve %29’unda trombositoz gelişmiştir. Splenektomi sonrasında ortalama yaşam 19 aydır. Hastaların %14’ünde lösemik transformasyon saptanmıştır. Lösemiye transforme olan grupla olmayan grup arasında yaşamda farklılık saptanmamıştır (461). Dalak ışınlanması (5-10 fraksiyon 100 cGy) dalak boyutunda geçici azalma sağlamasına rağmen ciddi pansitopeniye neden olabilir (459). Dalak ve karaciğer dışında vertebra, lenf nodları, plevra ve peritonda ekstramedüller hematopoez görülebilir ve düşük doz radyoterapi ile etkili tedavi edilebilir (5-10 fraksiyon 100-1000 cGy) (459). PMF ilişkili pulmoner hipertansiyon tanısı teknesyum 99 m sülfür kolloid sintigrafisi ile konulmaktadır. Tek fraksiyon (100 cGy) akciğer ışınlanması etkili gösterilmiştir (459). PMF ilişkili ekstremitte ağrısında tek fraksiyon 100-400 cGy dozunda ilgili alan ışınlanması yararlıdır (459). Transjuguler intrahepatik portosistemik şant (TIPS), portal hipertansiyon semptomlarını ortadan kaldırmak için kullanılabilir (459). Günümüzde TIPS endikasyonları arasında PMF ilişkili tekrarlayan varis kanaması ve refrakter asit vardır. PMF’de TIPS’in terapötik etkinliği sistemik olarak araştırılmamıştır. PMF’de TIPS’in etkinliğini ve uygulanabilirliğini doğrulayan olgu sunumları vardır (462-466).

Sonuç olarak ilaca dirençli splenomegali durumunda ilk basamak tedavide deneysel ilaçlar denenmelidir. Dirençli hastalarda splenektomi ve düşük doz radyoterapi akılcı alternatif tedavilerdendir (456). Splenektomi sonrasında trombositozu önlemek için profilaktik hidroksiüre tedavisi önerilmektedir (467). Splenektomi sonrasında tromboz gelişimi kısa süreli sistemik antikoagülan tedavisi ile önlenir. PMF tedavisinde

laparoskopik splenektomi önerilmemektedir ve splenik arter embolizasyonunun değeri tartışmalıdır (468-471).

**Tablo XV. Primer Miyelofibrozis IPSS risk skorlaması**

<ol style="list-style-type: none"><li>1- Yaş &gt; 65</li><li>2- Hgb &lt; 10 g/dl</li><li>3- Lökosit sayısı &gt; 25.000/mm<sup>3</sup></li><li>4- Dolaşan blast sayısı ≥ %1</li><li>5- Konstitüsyonel semptomların varlığı</li></ol>
<b>Skor:</b> Her biri 1 puan olmak üzere; düşük risk 0 puan, orta-1 risk 1 puan, orta-2 risk 2 puan ve yüksek risk ≥ 3 puan

**Tablo XVI. Primer Miyelofibrozis DIPSS risk skorlaması**

<ol style="list-style-type: none"><li>1- Yaş &gt; 65</li><li>2- Hgb &lt; 10 g/dl</li><li>3- Lökosit sayısı &gt; 25.000/mm<sup>3</sup></li><li>4- Dolaşan blast sayısı ≥ %1</li><li>5- Konstitüsyonel semptomların varlığı</li></ol>
<b>Skor:</b> Hgb < 10 g/dl için 2 puan olmak üzere; diğerleri için 1 puan almaktadır; düşük risk 0 puan, orta-1 risk 1-2 puan, orta-2 risk 3-4 puan ve yüksek risk 5-6 puan

**Tablo XVII. Primer Miyelofibrozis DIPSS-plus risk skorlaması**

<ol style="list-style-type: none"><li>1- Yaş &gt; 65</li><li>2- Hgb &lt; 10 g/dl</li><li>3- Lökosit sayısı &gt; 25.000/mm<sup>3</sup></li><li>4- Dolaşan blast sayısı ≥ %1</li><li>5- Konstitüsyonel semptomların varlığı</li><li>6- Eritrosit transfüzyon ihtiyacı</li><li>7- Trombositopeni (trombosit sayısı &lt; 100.000/mm<sup>3</sup>)</li><li>8- Kötü karyotip anormalliği (kompleks karyotip veya trizomi 8, 7/7q , i(17q), inv(3), 5/5q , 12p veya 11q23 rearanjmanını içeren bir veya iki anormallik)</li></ol>
<b>Skor:</b> Her biri 1 puan olmak üzere; düşük risk 0 puan, orta-1 risk 1 puan, orta-2 risk 2 veya 3 puan ve yüksek risk ≥ 4 puan

### 2.2.3.6. Seyir ve Prognoz

PMF’de ortalama yaşam süresi seriden seriye değişmekle beraber ortalama 4 yıldır (346, 472-474). Bunun yanında PMF’de bireysel yaşamın 1 yıl ile 30 yıl arasında değişebildiği bilinmektedir. 14 yıllık ortalama yaşam süresi, yaş ve cinsiyet uyumlu kontrol grubuna göre kısa bulunmuştur (167). Ölümün ana nedenleri enfeksiyon, lösemik transformasyon, kalp yetersizliği, kanama, karaciğerin ekstramedüller hematopoezine bağlı karaciğer yetersizliği, portal hipertansiyon, renal yetersizlik, pulmoner emboli ve nakil ilişkili komplikasyonlardır. Akut lösemi insidensi değişik serilerde %5 ile %22 arasında değişmektedir (346, 472-474). Akut lösemi gelişen hastaların yaklaşık yarısında alkilleyici ajan veya radyoterapi öyküsü olmamasından yola çıkarak akut lösemi dönüşümünün PMF’de doğal seyrin bir parçası olduğu düşünölmektedir. Tanıdan 1 yıl ve 5 yıl sonra akut lösemiden ölüm sıklığı %2 ve %16 olarak bildirilmiştir. Prognozla ilişkili faktörler arasında anemi, tanı yaşı, karyotip anormalliği, dolaşımdaki immatür granülositler ve miyeloblastların yüzdesi vardır (347, 475-480). Periferik kan CD34 mutlak sayısının prognostik önemi net değildir. Bazı yazarlar periferik kan CD34 mutlak sayısının tanısal rolü yanında önemli bir prognostik belirteç olduğunu bildirmişlerdir (340, 481, 482). Bunun tersi olarak Arora ve arkadaşları, çok değişkenli analizde, periferik kan CD34 mutlak sayısının yaşam süresi ile ilişkisinin kaybolduğunu göstermişlerdir (339). Ayrıca kollagen fibrozis veya osteosklerozisin derecesinden farklı olarak anjiogenezisin derecesi tüm yaşam süresi için önemli ve bağımsız risk faktörüdür (372, 473, 476, 479). Kromozom 5, 7 veya 17’yi içeren belirli klonal sitogenetik anormalliklerin kısa yaşam süresi ile ilişkisi bilinmektedir. Bunun tersi olarak 13q veya 20q’daki anormalliklerin hasta yaşamını etkilemediği bilinmektedir.

Prognostik skorum sistemlerinden biri olan IPSS’de düşük, orta-1, orta-2 ve yüksek riskli hastalıkta ortalama yaşam süresi 11.3, 7.9, 4 ve 2.3 yıl olarak bildirilmiştir (430). DIPSS düşük riskli grubun ortalama yaşam süresine ulaşılamamıştır. DIPSS orta-1, orta-2 ve yüksek riskli hastalıkta ise ortalama yaşam süresi sırasıyla 14.2, 4 ve 1.5 yıldır (431). DIPSS’ne trombosit değerinin  $< 100.000/mm^3$  olması, eritrosit transfüzyon ihtiyacı ve kötü karyotip anormalliğini içeren üç bağımsız risk faktörünün eklenmesi sonucunda tanımlanan düşük, orta-1, orta-2 ve yüksek riskli grupta ortalama yaşam süresi sırasıyla 15.4, 6.5, 2.9 ve 1.3 yıldır (436).

PMF’de kötü yaşam süresi ile ilişkili faktörler arasında JAK2 46/1 haplotipi, düşük JAK2V617F allel yükü, IDH, EZH2, SRSF2 veya ASXL1 mutasyonları vardır (12, 13, 38, 40, 483-485). Bunun tersi olarak JAK2V617F, MPL veya TET2 mutasyonları yaşamı

etkilemiyor gibi görünmektedir (12, 13, 486, 487). Ayrıca PMF’de yaşam, serum İL-8, İL-2R ve serum serbest hafif zincir düzeylerindeki artışla ilişkili bulunmuştur (488, 489). Lösemi transformasyonu için risk faktörleri arasında dolaşımda blast sayısının %3’ün üzerinde olması, trombosit sayısının 100.000/mm<sup>3</sup>’den az olması ve kötü karyotip anormalliğinin varlığı sayılmaktadır (490, 491). Bir çalışmaya göre lösemi transformasyonu için en önemli iki faktör, trombosit sayısının 100.000/mm<sup>3</sup>’den az olması ve kötü karyotip anormalliğinin varlığıdır (436). İki risk faktörünün yokluğunda 10 yıllık lösemik transformasyon riski %12 iken bir veya iki risk faktörünün varlığında lösemiye dönüşüm riski %31’dir. Ayrıca bazı çalışmalar IDH ve SRSF2 mutasyonlarının LFS’ı etkilediğini göstermektedir (40, 484, 492). Buna ek olarak eritropoetin tedavisi veya androjen kullanımının akut lösemiye progresyon riskini arttırdığı bilinmektedir (491).

## **2.3. Miyeloproliferatif Neoplazilerde Mutasyonlar**

### **2.3.1. JAK2V617F Mutasyonu**

İki dekattan uzun süredir PV’nın altında yatan genetik kusur araştırılmaktadır. Birçok araştırmacı EPO reseptöründeki (EPOR) sinyal yolağında kusur olduğunu tahmin etmiştir. Bu yollar tirozin kinaz JAK2, transkripsiyonel sinyal dönüştürücüler ve STAT3 (transkripsiyon 3 sinyal aracı molekülü ve aktivatörü) ve STAT5 (transkripsiyon 5 sinyal aracı molekülü ve aktivatörü) gibi transkripsiyon aktivatörlerini içerir. İlk mutasyonun keşfi Vainchenker ve arkadaşları tarafından Fransa’da gerçekleşmiş ve bu çalışma 2005’de yayınlanmıştır (9). Küçük bir molekül (AG490) veya siRNA tarafından JAK2’nin inhibisyonu sonucunda PV’da kemik iliği mononükleer hücrelerinden EPO bağımsız koloni oluşumunun azaldığı gözlenmiştir. Bu gözlem araştırmacıları, PV hastalarındaki hematopoetik hücrelerde JAK2’yi direkt sekans etmeye yönlendirmiş ve tek tekrarlayan nokta mutasyonunun keşfine neden olmuştur. Guanin-timin mutasyonu sonucunda JAK2 geninin psödokinaz domaini (JH2) içerisinde valin fenilalanin değişimi gerçekleşmiştir (Şekil I). Bu bulgular başka gruplar tarafından hızlıca doğrulanmıştır. Başka bir çalışmada PV’da 9p kromozomu üzerinde heterozigotluk kaybı (LOH) bölgesi ve taranan tüm PV hastalarında ortak olan 6.2-Mbp bölgesi tanımlanmıştır (10). Bu bölge eritropoezde rol oynayan JAK2’yi içerdiği için mutasyonlar açısından taranmıştır ve aynı JAK2V617F mutasyonu tanımlanmıştır. Başka gruplar JAK2’yi MPN’de bulunan tirozin kinazlar ve fosfatazların global sekans taramasının bir parçası olarak kabul etmişlerdir. DNA analizi, JAK2V617F mutasyonunun sadece hematopoetik hücrelerde bulunduğunu göstermiştir. PV’lı tüm hastalardaki eritroid öncül hücreler mutasyon için homozigottur. Kantitatif PCR’ın kullanımı sonucunda hastalar

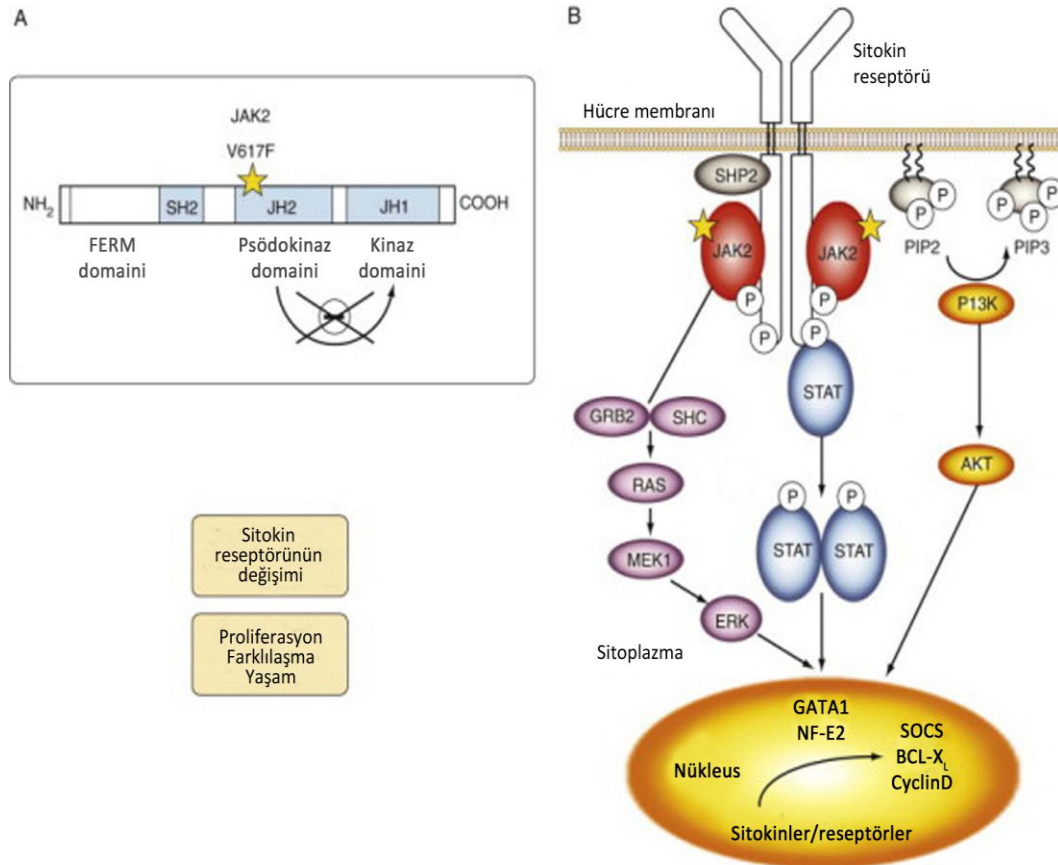
granülositlerde JAK2V617F mutasyonunun yüküne göre düşük allel yüklü (<%50) ve yüksek allel yüklü (>%50) olarak iki gruba ayrılmıştır. JAK2V617F mutasyonu için homozigotluğun, mutant allelin mitotik rekombinasyonu ve duplikasyonundan kaynaklandığı gösterilmiştir. Hastaların klinik seyri sırasında mitotik rekombinasyonun zaman içerisinde heterozigot mutasyonu homozigot mutasyona dönüştürdüğü gösterilmiştir. Yüksek allel yükü olan bireylerde ortalama hastalık süresi 48 ay ve düşük allel yükü olanlarda 23 ay olarak gözlenmiştir. Bu durum da düşük allel yükünün yüksek allel yüküne dönüşümünü desteklemektedir. Bu bulgular PV patogenezinin çok basamaklı olduğunu düşündürmektedir. İlk basamakta JAK2V617F geninde edinilmiş mutasyon düşük allel yüküne neden olmaktadır. İkinci basamakta homolog rekombinasyon, yüksek allel yükü ile beraber JAK2V617F homozigotluğu olan öncül hücreleri ve granülositlerine neden olmaktadır. JAK2V617F mutasyonu PV'lı hastaların %95'inden fazlasında görülmektedir. Tablo XVIII'de MPN'de değişik gruplar tarafından bildirilen JAK2V617F mutasyon sıklığı özetlenmiştir (493).

ET'li hastaların %40-60'ında JAK2V617F mutasyonu bulunmaktadır (493). JAK2, İL-3, EPO, G-CSF ve TPO'ü içeren bir grup büyüme faktörünün intraselüler sinyalinde önemli rol oynamaktadır. Klonal ve poliklonal hematopoezi birlikte olan ET hastalarında JAK2V617F mutasyonu saptanmıştır. Klonal hematopoezi olan grupta JAK2V617F allel yükü poliklonal hematopoezi gruba göre daha yüksektir (sırasıyla %26, %16). JAK2V617F klonunun hem klonal hem poliklonal hematopoezi hastalarda zaman içerisinde stabil kaldığı gösterilmiştir. Yüksek allel yükü (>%50) olan JAK2V617F homozigot mutasyonu PV'lı hastaların %70'inde bulunmakla beraber ET hastalarında daha az sıklıkta bulunmaktadır. JAK2V617F mutasyonu düşük allel yükü taşıyanlar dahil tüm PV olgularında homozigottur. Bunun tersine ET hastalarındaki hematopoetik kolonilerde nadiren JAK2V617F homozigotluğu bulunur. Bazı araştırmacılar ET'de trombositlerdeki JAK2V617F mutasyonunun allel yükünün granülositlere göre daha fazla olduğunu, bunun tersine PV ve PMF'de granülositlerdeki allel yükünün daha fazla olduğunu bildirmiştir. JAK2V617F mutasyonu, ET'de nadiren sadece trombositlerde saptanır. ET'li hastalarda granülosit ve trombositler yanında eritroblastlarda da bu mutasyon saptanabilir. JAK2V617F mutant allelleri için tek nükleotid polimorfizmi (SNP) genotiplemesini kullanan bir çalışmada en azından iki JAK2V617F mutasyonunun varlığı gösterilmiştir (494). Bu çalışmada ET'nin kökeninde birbirinden bağımsız multipl anormal klonların varlığı gösterilmiştir. Bazı araştırmacılar tarafından ET'de biallelik JAK2 mutasyonlarının gerçek prevalansının %5-10 olduğu bildirilmektedir.



PMF'li hastaların yaklaşık %50'sinde JAK2V617F mutasyonu bulunmaktadır (13). PMF hastalarının yaklaşık %13'ünde bu mutasyon homozigot olarak bulunur. PMF'de bu mutasyonun homozigotluğunun, kötü prognostik önemi olan sitogenetik anormalliklerle ilişkisi olduğuna inanılmaktadır.

JAK2V617F biyolojisinde devam eden sıklardan biri fenotipik olarak birbirinden farklı MPN'lerde bu mutasyonun nasıl ortak olduğunun kavranmamış olmasıdır. PV'da kemik iliği hücrelerinde fosforilize STAT3 ve STAT5 artışı görülür. ET'de ise fosforilize STAT3'de artış olmakla beraber fosforilize STAT5'de azalma görülür. PMF'de ise hem STAT3 hem de STAT5'in ekspresyonu azalmaktadır. Bu gözlemler PV, ET, PMF'de alternatif veya ek moleküler olayların rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Bu farklılıklar bu hastalıkların ayrı klinik fenotipleri olmasını açıklayabilir. Ayrıca JAK2V617F mutasyonu taşımayan ET ve PMF hastalarının büyük çoğunluğunda klonal hematopoezin varlığı bilinmektedir. Bundan yola çıkarak JAK2V617F mutasyonunun başka genetik olayların sonucunda ortaya çıktığı düşünülebilir.



**Şekil I. Miyeloproliferatif hastalıklarda JAK2V617F sinyal mekanizması**

**A.** JAK2V617F yapısı: mutasyon JH2 bölgesinde yerleşmiştir. Mutasyon, düzenleyici bölgenin otoinhibisyonunu bozarak JH1 bölgesine karşılık gelen tirozin kinazı aktifler. **B.**

Homodimerik sitokin reseptörü varlığında (örn. EPOR), transfosforilat reseptörünün intrasellüler bölümüne bağlı JAK2V617F proteinleri, tirozin kalıntılarının fosforillenmesini sağlar. Takiben STAT5, fosfotidil 3-kinaz (PI3K) ve renin–angiotensin sistemi (RAS) sinyal yolları aktiflenerek hücre döngüsü, proliferasyonu ve apoptoz ilişkili faktörlerin transkripsiyonu regüle olur. **Bcl-X<sub>L</sub>**, Çok büyük B hücre lenfoması; **ERK**, Ekstrasellüler sinyal ilişkili kinaz; **GATA**, GATA-bağlayıcı faktör; **GRB**, Büyüme faktörü reseptörüne bağlı protein; **MEK1**, Karşılıklı hassas mitojen aktive protein kinaz 1; **NF**, Nükleer faktör; **P**, Fosfat; **PIP2**, Fosfotidil inositol bifosfat ve **PIP3**, Fosfotidil inositol trifosfat; **SH2**, Src homoloji 2; **SOCS**, Sitokin sinyal baskılayıcısı.

**Tablo XVIII. Polisitemia vera, esansiyel trombositemi ve primer miyelofibrozisde JAK2V617F mutasyon sıklığı**

	Metod	PV:mutasyon (homozigot)	ET:mutasyon (homozigot)	PMF:mutasyon (homozigot)
<b>James ve ark.</b>	Sekanslama	89 (30)	43	43
<b>Levine ve ark.</b>	Sekanslama	74 (25)	32 (3)	35 (9)
<b>Kravolics ve ark.</b>	Sekanslama	65 (27)	23 (3)	57 (22)
<b>Baxter ve ark.</b>	Sekanslama	97 (26)	57 (0)	50 (19)
<b>Jones ve ark.</b>	ARMS/prosekanslama	81 (33)	41 (7)	43 (29)
<b>Levine ve ark.</b>	Allel spesifik/Taqman	99	72	39

### 2.3.2. JAK2 ekzon 12 mutasyonu

JAK2'nin diğer mutasyonları eritrositozla ilişkili olmakla beraber JAK2 kinaz aktivitesini aktif hale getirebilir. JAK2 ekzon 12'yi etkileyen birkaç fonksiyonel mutasyon JAK2V617F mutasyonuna komşu olarak bulunmaktadır. JAK2 ekzon 12 mutasyonları tüm PV'da %2.5-3.4 oranında bulunmakla beraber JAK2V617F negatif PV hastalarının yaklaşık %30'unda bulunmaktadır (20, 495). Bugüne kadar bu mutasyonlardan 17 farklı tip tanımlanmıştır (10). JAK2 ekzon 12 mutasyonunu içeren hastaların 2/3'ünde izole eritrositoz, ayırt edici bir kemik iliği morfolojisi ve azalmış serum EPO seviyeleri bulunmaktadır. Geri kalan olgularda eritrositoz, lökositoz, trombositoz veya her ikisi birden eşlik etmektedir. JAK2 ekzon 12 mutasyonları, JAK2'nin otoinhibitör domainini yanıltmaktadır. JAK2 ekzon 12 mutasyonları, ET veya PMF'de bulunmamaktadır. Fakat nadiren refrakter anemi ve RARS-T grubunda gösterilmiştir. JAK2 ekzon 12 mutasyonunun JAK2 aracılı intrasellüler

sinyal yolağının uzun süreli aktivasyonu sonucunda ortaya çıktığına inanılmaktadır. JAK2 ekzon 12 mutasyonuna sahip hastalarda trombotik olaylar görülebilir. Ayrıca PV'da miyelofibrozu veya akut lösemiye dönüşüm görülebilir (496). Fare EPOR'nü eksprese eden ve JAK2 ekzon 12 mutasyonunu taşıyan BaF3 hücreleri İL-3 eklenmeden proliferasyon gösterir. Ayrıca bu mutasyon, JAK2 ve ERK'ların fosforilasyonunu artırır. Bunun sonucunda eritrositozu içeren miyeloproliferatif hastalık fenotipi ortaya çıkar. Böylelikle JAK2 ekzon 12 mutasyonları öncesinde idiyopatik eritrositoz tanısı alan hastaları etkileyen ayırt edici bir MPN'yi tanımlayabilir. Bazı serilerde PV'yı taklit eden klinik sendromu olan hastaların yaklaşık %2.7'sinde wild-tip JAK2 bulunmaktadır. Bu hastaların varlığı, genotip tayini için yapılan değerlendirmenin duyarlılığının düşük olduğunu, JAK2 mutasyonlarının eliminasyonunu sağlayan interferon kullanımını veya eritrositozla ilişkili kalıtsal genetik hastalıklarının dışlanmadığını düşündürür. Buna ek olarak hastalık fenotipinden sorumlu henüz tanımlanmayan ek edinsel genetik olayların varlığı düşünülebilir.

### **2.3.3. MPL mutasyonu**

ET veya PMF hastalarının önemli bir kısmında JAK2V617F mutasyonunun bulunmadığı bilinmektedir. Bundan yola çıkarak bir çalışmada JAK-STAT yolağının, EPOR veya MPL'nü içeren hematopoetik-spesifik sitokin reseptörlerdeki aktivasyon sonucunda aktif hale gelebileceği ortaya çıkmıştır (21). TPO reseptörünü kodlayan MPL geninin sekans analizi JAK-2 mutasyonu negatif MPN hastalarında yeni bir moleküler anormalliğin keşfine neden olmuştur. MPL mutasyonları reseptörün juksta membran bölgesinde yerleşmiştir. MPL mutasyonları %60 oranında W515L (triptofan lösemi dönüşümü) ve %40 oranında W515K (triptofan lizin dönüşümü) mutasyonlarından oluşmaktadır (21, 23, 25). Bu mutasyon farklı serilerde PMF'de %0-10 ve ET'de %0-6 oranında bulunmaktadır (66, 497-499). W515K mutasyonunu taşıyan hastaların %50'sinde ve W515L mutasyonunu taşıyan hastaların %17'sinde mutant allel yükü %50'den fazladır. MPL mutasyonları, hücre dizilerinde sitokinden bağımsız çoğalmaya ve TPO'ye duyarlılığın artmasına neden olur. Bunun sonucunda JAK-STAT sinyali aktive olmaktadır. MPLW515L mutasyonunun splenomegali, lökositoz, belirgin trombositoz, ekstremiteler hematopoez ve miyelofibrozu karakterize miyeloproliferasyonu indüklediği gösterilmiştir. Buna ek olarak JAK kinaz inhibitörü, MPLW515L-transforme hücrelerin proliferasyonunu inhibe etmektedir. Bundan yola çıkarak JAK-STAT sinyalinin inhibisyonunun JAK2V617F ve MPLW515L mutasyonu taşıyan MPN için etkili bir tedavi olabileceği söylenebilir (21). MPL mutasyonu granülositlerde bulunmaktadır. Hematopoetik olmayan DNA'da gösterilmemiştir. Bu

bulgular, MPLW515L mutasyonunun klonal hematopoetik hücrelerde bulunan somatik bir mutasyon olduğunu göstermektedir. Ayrıca MPLW515L allelinin normal bireylerde görülmemesi, sık bir nükleotid polimorfizmi olmadığını ortaya çıkarmıştır. Bu veriler, bir grup JAK2V617F negatif MPN'de MPLW515L'nin patojenik bir mutasyon olduğunu desteklemektedir (21).

ET'de MPL mutant alleli taşıyan hastaların %50'sinden fazlası ayrıca JAK2V617F mutasyonu taşımaktadır. ET'de W515K mutasyonu düşük hemoglobin ve yüksek trombosit değerleri ile ilişkili bulunmuştur. Ayrıca bu mutasyonu taşıyan hastaların kemik iliği biyopsi piyeslerinde eritroid öncülleri yerine öncelikli olarak megakaryositlerin sayısında artış gösterilmiştir.

PMF'de MPL mutant alleli taşıyan hastaların %30'unda ayrıca JAK2V617F mutasyonu bulunmaktadır (25). MPL515L, MPL515K ve JAK2V617F mutasyonun yükü PMF hastalarının klinik seyri sırasında sabit kalmaktadır. Bir fare modelinde MPL515L mutasyonunun ileri derecede trombositoz, lökositoz, splenomegali, hepatomegali, kemik iliğinde megakaryositik hiperplazi ve kemik iliği fibrozisi ile karakterize hızlı progresif ve letal MPN'ye neden olduğu ortaya çıkarılmıştır. Bu mutasyon eritrositoza neden olmamıştır. Bu veri, MPL mutasyonunun trombositoz gelişimine neden olurken JAK2V617F mutasyonunun eritrositoza neden olduğunu desteklemektedir. MPL515L/K mutasyonunu taşıyan PMF hastaları, daha ileri yaşta, daha ciddi anemisi olan ve daha çok transfüzyon ihtiyacı olan hastalardır (21). PMF hastalarının yaklaşık %50'sinde klonal hematopoez olmasına rağmen JAK2 ve MPL mutasyonu yoktur. Böylelikle bu mutasyonların PMF'in tek nedeni olduğunu söylemek güçtür. PMF'de genetik temelin, birçok genetik ve muhtemelen epigenetik olayların birleşiminden kaynaklandığı söylenebilir.

#### **2.3.4. LNK mutasyonu**

Lenfosit-spesifik Adaptör Protein (LNK), bir JAK-STAT inhibitör adaptör proteindir. Miyeloproliferatif hastalık patogenezinde rol oynadığına inanılmaktadır. Başlıca prolinden zengin amino bölgesi, hücre membranında yerleşimi için gerekli olan PH domaini ve MPL-JAK2'ye bağlanan SH2 domaini olmak üzere 3 ana bölümden meydana gelir. LNK, TPO ve MPL aracılı JAK2 aktivasyonu için negatif düzenleyicidir (500, 501). LNK yetmezliği olan farelerde megakaryositlerde ve eritroid seri öncüllerinde artış yanında kendi kendine yenilenme gösteren hematopoetik kök hücre havuzu gösterilmiştir (500). Bazı çalışmalarda LNK'in in vitro olarak MPLW515L ve JAK2V617F'nin oluşturduğu sinyalleri baskıladığı gösterilmiştir (502, 503). Bir fare modelinde, LNK eksikliğinin TEL-JAK2 ve JAK2V617F

tarafından indüklenen miyeloproliferatif hastalığı hızlandırdığı gösterilmiştir. Bu modelde, PV/PMF ekspresyonunu baskılamak için JAK2V617F ve LNK arasında etkileşime gerek olduğu, ayrıca TEL-JAK2'nin indüklediği myeloid ekspansiyonunu baskılamak için LNK'in SH2 domainine ihtiyaç olduğu gösterilmiştir. Bir çalışmada LNK mutasyonunun kronik faz MPN'de nadir olmakla beraber blastik dönüşüm olan MPN'lerde daha sık görüldüğü (%9.8) bildirilmiştir (504). Sonuç olarak LNK, sitokin sinyalinde negatif düzenleyici rolü ile hematopoezde önemli rol oynar. Fosforilize tirozin kinazlara bağlanarak, c-KİT, JAK2 ve MPL-JAK2'yi içeren majör sitokin reseptör sinyalini inhibe eder (505).

### **2.3.5. Casitas B-hücresi Lenfoma Mutasyonu**

Casitas B-hücresi lenfoma (CBL) gen ailesi, 11q23.3 kromozomu üzerinde yerleşmiş olan c-CBL, CBL-b ve CBL-c'yi içeren bir proto-onkogendir (506, 507). Hematopoetik pluripotent kök hücre havuzunun sürdürülmesinde rol oynadığı düşünülmektedir. CBL, adaptör protein olarak görev yapmaktadır. Bunun yanında E3 ubiquitin-protein ligaz aktivitesini artırır. Böylelikle tirozin kinaz aktivitesini regüle etme özelliğine sahiptir. CBL mutasyonları ilk kez edinsel 11q'nun mutasyon taraması sırasında MPN'de araştırılmıştır. MPN'de 27 CBL varyantı saptanmıştır (508). 579 MPN hastasını içeren kohort çalışmasında 3 hastada (%6) CBL mutasyonu gösterilmiştir. CBL mutasyonlarının çoğu RING bölgesinde lokalize olmuştur. Bunun sonucunda ubiquitin ligaz aktivitesi bozulmuştur.

### **2.3.6. CHEK2 gen Mutasyonu**

CHEK2, hücre bölünmesini regüle ederek hücreleri kontrolsüz ve hızlı çoğalmaya karşı koruyan bir tümör baskılayıcı gendir (509). CHEK2, çeşitli tiplerde DNA hasarına karşı olan hücresel yanıt için anahtar rol oynayan bir medyatördür. CHEK2, hücre döngüsündeki G2 kontrol noktasındaki kinazı kodlamaktadır. CHEK2 kinaz, ATP bağımlı yolak üzerinde aktive olur. DNA onarımını sağlamakla beraber hücre döngüsündeki progresyon ve apoptozisdeki koordinasyonu sağlayan p53, BRCA1, CDC25A ve CDC25C'yi içeren substratları fosforilize etmektedir (510). CHEK2 mutasyonlarının (örneğin 1100delC, I157T) Li-Fraumeni sendromu, bazı lenfoid malignitelerde ve MDS, AML gibi bazı myeloid malignitelerde bulunduğu önceden bildirilmiştir (510-514). Yakın zamanda yapılan bir çalışmada ET hastalarının %15.1'inde CHEK2 mutasyonu bildirilmiştir (509). Bu çalışmada elde edilen sonuçlara dayalı olarak CHEK2 gen mutasyonlarının ET gelişimine katkıda bulunabileceği söylenebilir. Aynı çalışmada CHEK2'nin inaktivasyonunun ET gelişimine direkt etkisi olmadığı fakat hücre döngüsündeki kontrol noktasında hasara neden olduğu

vurgulanmıştır. Sonuç olarak CHEK2 gen mutasyonlarının ET gelişimine neden olup olmadığı speküle edilmekle beraber ET’de daha genç yaşta kanserojenik olayı başlatabileceği veya destekleyebileceği söylenebilir.

### **2.3.7. IKZF Delesyon Mutasyonu**

Ikaros Family Zinc Finger Protein (IKZF1) geni, normal hematopoezin gelişiminde fonksiyonel önemi olan Ikaros transkripsiyon faktörünü kodlayan 7p.12’de lokalize olan gendir. IKZF1 mutasyonunun etkisi fare primer öncül hücrelerinde çalışılmıştır. Sonuç olarak RNA aracılı IKZF1 eksikliğinin sitokin duyarlılığında ve p-STAT5 ekspresyonunda artışa neden olduğu gösterilmiştir. Bir çalışmada IKZF1 delesyonlarının, MPN sonrası lösemi gelişen 29 olgunun 6’sında (%21) ortaya çıktığı fakat transforme olmayan 526 MPN olgusunun hiçbirinde saptanmadığı bildirilmiştir (515). Sonuç olarak iki bağımsız kohort çalışmasında IKZF1 delesyonları ile MPN sonrası lösemi arasında güçlü bir ilişki gösterilmiştir. Bu çalışmada IKZF1 kaybı olan hastalarda kompleks karyotip saptanmıştır ve MPN klonunun genetik evolüsyonunda del7p geç bir olay olarak bildirilmiştir. Sonuç olarak IKZF1 kaybının MPN hastalarının bir kısmında lösemik transformasyonda önemli rol oynadığı söylenebilir.

### **2.3.8. EZH2 Mutasyonu**

Polycomb-grup (Pc-G) genleri, gelişim sırasında gen ekspresyon patternini düzenleyen proteinlerdir (516). PcG proteinlerini içeren üç kompleks, Polycomb Repressive kompleks 1 (PRC1), Polycomb Repressive kompleks 2 (PRC2) ve PhoRC’dır. Enhancer of Zeste Homolog 2 (EZH2) proteinleri, PRC2’nin 4 bileşeninden biridir. EZH2, histon H3 üzerinde lizin 27’nin trimetilasyonundan sorumlu multiprotein enzim kompleksidir (EZH2, SUz12, EED ve YYI). Bunun yanında PRC2, diğer polycomb komplekslerini gen bölgesine çekerek kromatinin kompakt hale gelmesine neden olur (30). EZH2’nin onkogenik aktivitesi bulunmaktadır ve önceki yıllarda artmış ekspresyonunun, epitelyal tümörlerdeki diferansiasyonu önlediği gösterilmiştir (517). MPN’lerde EZH2 gen ekspresyonunun upregülasyonu gösterilmiştir. EZH2 mutasyonları en sık PMF’de bildirilmiştir. Sonuç olarak EZH2’nin myeloid malignitelerde tümör baskılayıcı olarak etki ettiği söylenebilir. 614 myeloid maligniteyi içeren bir çalışmada 42 hastada toplam olarak 49 EZH2 mutasyonu bulunmuştur (30). Bu kohort çalışmasında 30 PMF olgusunun %13’ünde EZH2 mutasyonu saptanmıştır. Az sayıda PMF hastası ve kısa takip süresi nedeniyle EZH2 mutasyonunun

gerçek prognostik önemini kestirmek güçtür. Ayrıca EZH2 mutasyonunun ET’de bulunmadığı ve PV hastalarının yaklaşık %3’ünde saptandığı bildirilmiştir (30).

### **2.3.9. RAS Mutasyonları**

Ras proteinleri, küçük guanozin-5-trifosfaz ailesine aittir. RAF/MEK/ERK, PI3K/AKT ve diğer yolları anormal bir şekilde stimüle eden RAS mutasyonları insan kanserlerinde sık bulunmaktadır (518, 519). RAS genine ait üç onkojenik mutasyon HRAS, NRAS ve KRAS mutasyonlarıdır. Myeloid hastalıklarda KRAS ve NRAS mutasyonları sık görülmekle beraber HRAS mutasyonları nadiren bulunmaktadır (520). RAS mutasyonları, G12V ve G13R gibi genellikle tek aminoasit değişimleridir. Bu mutasyon RAS’ın guanin trifosfat (GTP) aktive edici proteine hassasiyetini azaltır. Böylece RAS-GTP seviyelerinin yüksek kalmasını sağlar (518, 521). RAS ailesi mutasyonları arasında NRAS aktive edici mutasyonları, AML, MDS ve MPN’leri içeren hematopoetik malignitelerin yaklaşık %30’unda bulunmaktadır (522, 523). NRAS/KRAS mutasyonları PV’da nadir görülmekle beraber PV’dan akut lösemiye transformasyonla ilişkisi olduğu gösterilmiştir (523).

### **2.3.10. Tp53 Mutasyonu**

p53 mutasyonları, lenfomalar ve lösemileri içeren insan kanserlerinde en sık görülen genetik değişimlerdir (524). Normal fare hematopoetik hücrelerinin mutant p53 ile transdüksiyonu sonucunda in vitro olarak proliferatif kapasitenin arttığı ve transdüksiyona uğramış hücrelerde farklılaşmanın modifiye edildiği gösterilmiştir. Bu çalışmada mutant p53’ün artmış ekspresyonunun in vivo olarak immatür fare hematopoetik hücrelerinin transformasyonunu başlattığını göstermiştir. Bunun sonucunda MPN ve MDS’u içeren iki tip hematopoetik hastalık indüklenmiştir (524). MPN’lerde lösemik transformasyon için kalıtsal eğilim olduğu bilinmekle beraber transformasyona yol açan genetik mekanizmalar büyük oranda bilinmemektedir. Bir çalışmada MPN sonrasında AML gelişen 22 hastanın 6’sında (%27.3) Tp53 geninde somatik mutasyon saptanmıştır (525). Bundan dolayı Tp53 mutasyonlarının lösemik transformasyonda önemli rolü olabileceği düşünülmüştür. Tp53 mutasyonları PV’da nadir görülmekle beraber PV’dan akut lösemiye transformasyonla ilişkisi olduğu gösterilmiştir (525).

### **2.3.11. RUNX1 Mutasyonu**

Runt transkripsiyon faktör 1 (RUNX1) nokta mutasyonları MDS ve AML’de ilk kez 1999 yılında tanımlanmıştır (526). RUNX1’in bazı tip mutantları transaktivasyon aktivitesi üzerine negatif bir etki göstermektedir. Bu mutasyonlar normal fonksiyon kaybına neden

olmakla beraber bazı onkojenik potansiyeller taşımaktadır. MPN’li bazı hastalarda hastalıktan birkaç yıl sonra lösemik transformasyon ortaya çıkmaktadır. Altta yatan moleküler patogeneze hakkında yeterli bilgiye sahip olunmadığı için lösemik transformasyonun mekanizması net değildir. Bir çalışmada MPN’lerde lösemik transformasyon sırasında RUNX1 mutasyon sıklığının arttığı fakat kronik fazda bu mutasyonun saptanmadığı bildirilmiştir (527). Bu çalışmada MPN’den akut lösemiye transforme olan 18 hastanın 5’inde (%27.7) RUNX1 mutasyonu gösterilmiştir.

### 2.3.12. TET2 Mutasyonu

Ten-Eleven Translocation (TET) gen ailesi, TET onkogen ailesi üyesi 1 (TET1), TET onkogen ailesi üyesi 2 (TET2) ve TET onkogen ailesi üyesi 3’den (TET3) oluşmaktadır (528, 529, 530). TET2 geni, kromozom 4q24’te yerleşim göstermekle beraber metilsitozine hidroksil eklenmesini sağlayan hidroksilaz enzimini kodlar (528). TET2 mutasyonları fonksiyon kaybına yol açarak DNA metilasyonunu artırır ve hidroksimetil sitozin seviyesinde azalmaya neden olur. TET2 mutasyonları, JAK2V617F veya MPL mutasyonlarından önce veya sonra ortaya çıkabilir. TET2 mutasyonları çeşitli myeloid malignitelerde yaklaşık %15 oranında bulunmaktadır (531-535). IDH mutasyonları, fonksiyonel olarak DNA metilasyonu üzerine TET2 mutasyonu ile benzer etkiler yaratabilir. TET2 genindeki edinsel somatik mutasyonlar, DNA’da 5-metilsitozinin (5mC) 5-hidroksimetilsitozine (5hmC) oksidasyonununun sorumlu  $\alpha$ -ketoglutarat bağımlı enzimin katalitik aktivitesini baskılar. Düşük 5hmC seviyeleri, çeşitli DNA promoter bölgelerinin CpG bölgelerinde hipermetilasyon fenotipine neden olur. TET2 mRNA’sı, C57BL/6 faresinin kemik iliği ve timusundan izole edilen Lin<sup>-</sup>, Sca-1<sup>+</sup>, c-Kit<sup>hi</sup> multipotent öncül hücrelerinde yüksek oranda ekspresyon edilir. Bu ekspresyon patterni myeloid öncül hücrelerinde sürdürülmekle beraber matür granülositlerde düşük oranda bulunur. Bunun yanında hastaların örnekleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, düşük 5hmC seviyeleri DNA hipermetilasyonunda anlamlı düşüğe neden olmuştur. Günümüzde TET2 mutasyonlarının TET2’de fonksiyon kaybına neden olduğuna inanılmaktadır. Sonuç olarak bu mutasyonlar DNA’da 5hmC’nin birikime neden olarak DNA’da hipermetilasyonu ortaya çıkarır (536). DNA hipermetilasyonu hücrelerin farklılaşmasını önlemektedir. İn vitro çalışmalar, TET2 eksikliğinin hematopoetik hücrelerin normal farklılaşma sürecini önlediğini göstermiştir. Transgenik hayvanlarda TET2’nin hasara uğratılması sonucunda monositik dizi artış gösterir ve bu fenotip KMML’yi taklit eder. TET2’deki değişiklikler arasında çerçeve kayması insersiyonları veya delesyonları, splice-site mutasyonları ve baz değişimleri vardır. Bu mutasyonların ileri yaşta



daha sık olduğu bildirilmiştir. MPN tanısı bulunan ailelerde tüm TET2 mutasyonları hemen her zaman edinseldir. Bu ailelerdeki TET2 mutasyonlarının insidensi sporadik PMF ile benzerdir. MPN hastalarında yapılan klonal analiz çalışmalarında TET2 mutasyonunun edinilmesi ile JAK2 mutasyonunun edinilmesi arasında kesin kararlı bir kronolojik sıralama tespit edilememiştir. TET2 mutasyonu, MPN'nin progresyon gösterdiği geç dönemde de ortaya çıkabilir. Bu iki genetik olay birbirinden bağımsız gibi görünmektedir. TET2 mutasyonunun PMF hastalarındaki klinik korelasyonu sonucunda bu mutasyonun yeni bir prognostik marker olmadığı düşünülmektedir. Sonuç olarak TET2 mutasyonları PMF hastalarında JAK2V617F mutasyonundan bağımsız gibi görünmektedir. Çalışmalarda tromboz oranını, lösemik transformasyonu veya tüm yaşam süresini etkilemediği belirtilmektedir. Çok değişkenli analizde PMF'de TET2 mutasyon varlığında anemi (Hgb < 10 g/dl) ile korelasyon gösterilmemiştir. Çalışmalarda TET2 mutasyon sıklığı PMF'de %17, ET'de %11 ve PV'da %7-16 oranında bildirilmiştir (537).

### **2.3.13. DNMT3a Mutasyonu**

DNA metil transferaz (DNMT) gen ailesi, DNMT1, DNMT3A ve DNMT3B'den oluşmaktadır. DNMT gen ailesi, CpG dinükleotidlerin sitozin kalıntısına metil grubunun eklenmesini katalize eden enzim olan DNA metil transferazı kodlamaktadır (538). DNMT3A mutasyonları AML'de yaklaşık %20 oranında bulunmaktadır (538-540). Bu mutasyonların fonksiyon kaybına bağlı ortaya çıktığına inanılmaktadır. DNMT3A mutasyonları, metil transferaz domaininde özellikle heterozigot mutasyon şeklinde ve ağırlıklı olarak R882 kodonunda tekrarlayan mutasyon şeklinde bulunur. AML'de bu mutasyonun yaşam üzerine kötü etkisi olduğu bildirilmiştir (538). Bir çalışmada 62 RAEB hastasının 3'ünde (%4.8), başka bir çalışmada MDS grubunda %8 oranında bildirilmiştir (541, 542). DNMT3a mutasyonları, MPN'de oldukça nadir bulunmaktadır. Bir çalışmada 135 MPN hastasının sadece ikisinde (%1.5) DNMT3A mutasyonu saptanmıştır (543). Başka bir çalışmada PMF'de bu mutasyon araştırılmış olmakla beraber MPN'lerde klinik veya prognostik önemini anlamak için daha büyük hasta gruplarına ihtiyaç vardır (544).

### **2.3.14. ASXL1 Mutasyonu**

Additional Sex Combs-Like 1 (ASXL1) geni, kromozom 20q11.1'de yerleşmiştir. ASXL1, 'Drosophila Additional sex combs'un (Asx)' insan homologudur. Asx delesyonu, Pc-G ve Trithorax grup (Tx-G) gen delesyonlarına neden olur (545). Bundan yola çıkarak Asx'un, homeotik gen ekspresyonunun baskılanması ve aktivasyonunda rolü olduğu hipotez

edilmiştir. Buna ek olarak *Drosophila*'daki fonksiyonel çalışmalar *Asx*'un Pc-G proteinleri ile benzer kromatin ilişkili proteini kodladığını göstermektedir (546). ASXL1 mutasyonlarının myeloid transformasyonla ilişkili mekanizması net aydınlatılmış değildir. Hematopoetik olmayan hücrelerde yapılan *in vitro* çalışmalar, ASXL1'in retinoik asid-reseptör aktivitesini baskılamak için HP1a ve LSD1 ile fiziksel etkileşimini ve lipogenezisi baskılamak için peroksizom proliferatör-aktive reseptör gamma ile etkileşimini göstermektedir (Şekil II) (547, 548).

ASXL ailesi üyesinin 3 üyesi (ASXL1, ASXL2 ve ASXL3), amino-terminal homolog bölgesi (ASXH domaini) ve C-terminal bitki homeodomaininden (PHD domaini) oluşmaktadır (Şekil II) (547, 549). Memeli ASXL proteinlerinin korunmuş domain yapısı ile ilişkili son analizler, ASXL1'in N-terminal bölgesinin (10-100 aminoasit), HARE-HTH bölgesi (HB1, ASXL1, restriksiyon endonükleaz sarmal dönüm bölgesi) olarak adlandırılan özgün bir DNA bağlama bölgesine sahip olabileceğini göstermiştir (550). Ayrıca, PHD domainini içeren proteinlerle ilişkili analizlere dayalı olarak, ASXL proteinlerinin PHD bölgesi özgün görünmektedir. Bu bölgede histon H3'ün N-terminal ucundaki lizinlere karşı özellikle histon H3 ucunda bulunan metillenmiş lizin bölgesini tanıdığı tahmin edilmektedir. ASXL1 bölgelerinin rolünü anlamak için ileri fonksiyonel çalışmalara ihtiyaç vardır. ASXL1 mutasyonları çerçeve kayması mutasyonları şeklinde olup 12.ekzonda yer alırlar ve olgunlaşmamış proteinlerin oluşumuna neden olurlar.

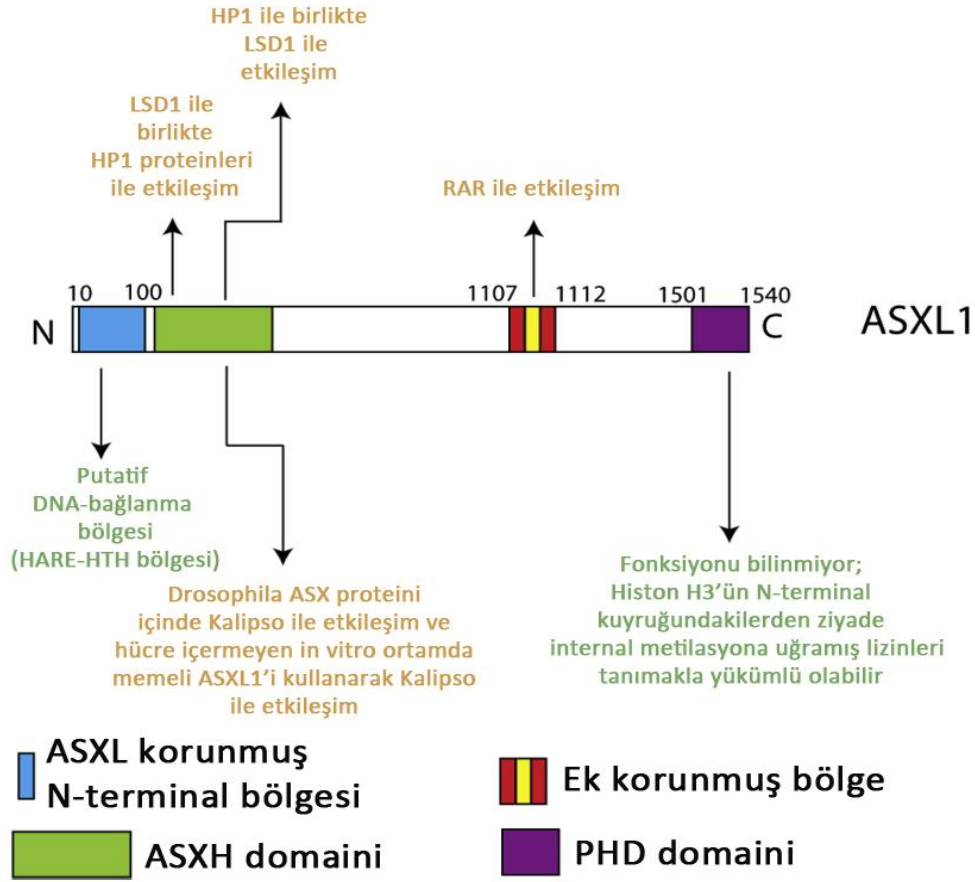
*Drosophila Asx*, Polycomb-baskılayıcı deubiquitinaz kompleksini (PR-DUB) oluşturan 'kromatin deubiquitinaz Kalipso' ile kompleks oluşturmaktadır. PR-DUB kompleksi, lizin 119 bölgesindeki histon H2A'dan monoubiquitini uzaklaştırmaktadır (Şekil II). Kalipso'nun memeli homologu olan BAP1, direkt olarak ASXL1 ile etkileşime girmektedir. Ayrıca memeli BAP-1-ASXL1 kompleksinin *in vitro* deubiquitinaz aktivitesi gösterilmiştir (551).

ASXL1'in hematopoezdeki fonksiyonu net olarak aydınlatılamamıştır. ASXL1 ile ilişkili bir fare modelinde bu allelin önemli bir şekilde perinatal ölüme neden olduğu gösterilmiştir. Hayatta kalan az sayıda fare, belirgin ve kısa latent periyodu olan hematopoetik fenotip için araştırılmıştır. Fisher ve arkadaşlarının modelinde PGK promoter bölgesinde neomisin eskprese eden kaset, ASXL1 ekzon 5 bölgesine konularak ASXL1 okuma bölgesini engellemiştir (bu allel *Asxl1tm1BC* olarak adlandırılır) (549). Bunun sonucunda PHD bölgesi yanında nüklear temas bölgesini içermeyen proteinlerin ekspresyonu gerçekleşmiştir. Ancak *Asxl1tm1BC/tm1BC* alleli için homozigot farelerde yaşamın ilk bir kaç ayında aşikar hematolojik malignite gelişmemekle beraber multipotent progenitörlerin sayısında da kusur

görülmemiştir. Bu çalışmadaki homozigot *Asxl1*tm1BC/tm1BC alleli, %75 perinatal ölüme neden olmuştur. Ayrıca fare tam bir C57BL/6J yapısına hibridize edildiğinde embriyonik letalite gözlenmiştir. Bundan dolayı postnatal ve hematopoetik özgün delesyonlar için knockout modelleri kullanarak ASXL1'in hematopoezdeki fonksiyonunun daha detaylı araştırılması gerekmektedir.

Myeloid kanserlerde TET2 mutasyonlarının keşfedildiği aynı yılda, diğer bir epigenetik düzenleyici bölge olan ASXL1'de mutasyonlar tanımlanmıştır. ASXL1'deki mutasyonlar, MDS'lu hasta örneklerindeki karşılaştırılmalı genomik hibridizasyon (aCGH) çalışmalarına dayalı olarak tanımlanmıştır (34). Gelsi-Boyer V ve arkadaşları, MDS'lu hastalarda aCGH çalışmalarını uygulamıştır (31, 34, 552). Bu çalışmada bir hastada 20q11'de delesyonlar tespit edilmiştir. 20q delesyonlarının ASXL1 ve DNMT3B adlı olası iki genle ilişkili olduğu düşünülmüştür. Her iki gende sekanslama sonucunda 35 MDS'lu hastanın 4'ünde (%11) ASXL1 mutasyonları saptanmıştır. ASXL1'in ileri sekans analizleri MPN ve diğer myeloid hastalıklarda ASXL1 mutasyonlarının frekansının belirlenmesini sağlamıştır. Çalışmalar ASXL1 mutasyonlarının MPN'de %10, AML'de %17 ve KMML'de %49 oranında bulunduğu bildirilmiştir (31, 34, 553).

AML ve MDS hastalarında ASXL1 mutasyonlarının yaşam ve tedaviye olan yanıtla ilişkili detaylı klinik çalışmalarının aksine şimdiye kadar MPN'lerde bu mutasyona ilişkili daha az sayıda ve daha küçük çalışmalar bildirilmiştir. MPN hastaları arasında ASXL1 mutasyonları ileri yaş hastalar yanında PMF ve post-PV/ET miyelofibroza, PV veya ET ile karşılaştırıldığında daha sık görülmektedir (31, 36, 37). Çalışmalarda ASXL1 sıklığı PV'da %2-5, ET'de %5-10, PMF'de %13-26 ve post-PV/ET miyelofibroza %22-38.5 oranında bildirilmiştir. Son dönemlerde yapılan bir çalışmada ASXL1 mutasyonu olan PMF hastalarında taşımayanlara göre anlamlı olarak daha kısa tüm yaşam süresi saptanmıştır. Fakat bu çalışma 9 ASXL1 mutasyonu içeren ve 35 mutasyonu bulunmayan hasta grubunu içermektedir (38). Sonuç olarak daha büyük hasta grubunu içeren çalışmalara ihtiyaç vardır. Güncel literatür bilgisine göre ASXL1 mutasyonları, kronik faz MPN'lerde lösemik transformasyon riskinde artışa neden olmamaktadır (36). Kronik ve blastik fazdaki MPN hastalarını karşılatıran bir çalışmada blastik fazdaki hastalarda ASXL1 mutasyonları daha sık gözlenmemiştir (36). Bu veriye dayanarak ASXL1 mutasyonunun MPN'lerin oluşum sürecinin başlangıcında kritik rol oynayabileceği ve MPN'lerde klonal evolüsyonun erken evresinde rol oynayabileceği düşünülebilir.



**Şekil II. Memelilerde ASXL proteininin korunmuş bölgeleri ve ASXL1'in olası fonksiyonları.**

ASXL1, ASX proteinleri arasında korunmuş olan globüler yapıda bir N-terminal bölge ve fonksiyonu bilinen diğer proteinlere benzer yapıda potansiyel bir DNA-bağlama bölgesi içerir. Bu bölge, HARE-HTH bölgesi (HB1, ASXL1, restriksiyon endonükleaz sarmal dönüm bölgesi) olarak adlandırılmıştır. Bu bölgenin hemen distalindeki bölge, Kalipso'ya (BAP1'in memelideki analogu) bağlanıp histon H2A lizin 119 için deubiquitinaz aktivitesi göstermektedir. Bu aktivite in vivo olarak Drosophila'larda ve ASXL1 pürifiye proteinini kullanan hücreden bağımsız tetkiklerde gösterilmiştir. Aynı bölgenin HP1 proteinlerine ve LSD1'e de bağlandığı düşünülmüştür (bu aktivite hematopoetik yönüyle çalışılmamıştır). Bu bölgenin distalinde retinoik asit reseptörü ile fiziksel teması olan korunmuş bir bölge bulunmaktadır (bu bölgedeki aktivite de hematopoetik hücrelerde doğrulanmamıştır). Son olarak PHD domaini, tüm ASXL proteinlerinin en uçtaki C-terminal bölgesinde bulunmaktadır. PHD bölgesinin görevi henüz bilinmemektedir.

### 2.3.15. IDH1/IDH2 Mutasyonları

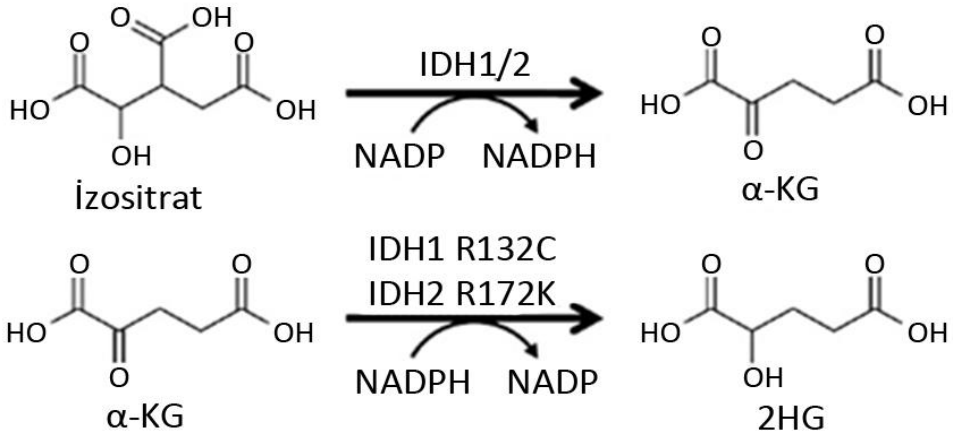
İki izositrat dehidrogenaz (IDH) geni olan izositrat dehidrogenaz 1 (IDH1) ve izositrat dehidrogenaz 2 (IDH2), glioma ve sekonder glioblastomalarda yüksek oranda tanımlanmış olan mutasyona uğramış onkogenlerdir (42). Santral sinir sistemi dışındaki yaklaşık 500 solid tümör doku örneklerinin analizinde IDH1 ve IDH2 mutasyonu saptanmamıştır. Bundan yola çıkarak bu genlerin doku-spesifik onkogenler olduğu desteklenmiştir. Böylelikle AML’li hastalarda tüm genomu içeren sekans analizinde 188 hastanın 16’sında tekrarlayan IDH1 mutasyonun keşfi beklenmemekteydi (43). AML, lösemik transformasyon sırasındaki MPN’de ve nadiren MDS’lu hastalarda IDH1 ve IDH2’deki mutasyonlar gösterilmiştir (36, 40, 44, 45, 554).

Memeli hücrelerinde IDH1, IDH2 ve izositrat dehidrogenaz 3 (IDH3) olmak üzere 3 ana IDH izoenzimi bulunmaktadır (555). IDH1 ve IDH2, izositratı alfa-ketoglutarata dönüştüren homodimerik, nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADP<sup>+</sup>) bağımlı enzimlerdir (Şekil III). IDH1 sitoplazma ve peroksisomlarda, IDH2 ise mitokondriada bulunmaktadır. IDH3’ü kodlayan genin kromozomal bölgesi henüz bilinmemektedir ve günümüzde potansiyel IDH3 mutasyonları ile ilgili az veri bulunmaktadır. IDH1 ve IDH2’de tanımlanmış mutasyonlar korunmuş kodonlarda spesifik yanlış anlamlı (missense) mutasyonlardır. Çerçeve kayması mutasyonları veya erken sonlandırma mutasyonları yoktur ve tüm mutasyonlar wild-tip allel için heterozigottur. Bundan yola çıkarak mutant proteinin wild-tip enzimi inhibe ettiği ve IDH mutasyonlarının baskın bir negatif fenotipe neden olduğu düşünülmektedir. Bunun yanında son verilere dayanarak mutant proteinin wild-tip formundan farklı bir yolda etki ederek fonksiyon kazanılmasına neden olduğu düşünülmektedir. Mutant IDH1’i eksprese eden hücrelerin yüksek seviyelerde 2-hidroksiglutarat (2-HG) içerdiği gösterilmiştir (556). Ayrıca bu anormal metabolit IDH1 veya IDH2 mutasyonunu içeren primer lösemi hücrelerinde bulunmaktadır (557). Mutant IDH enzimleri, substratın spesifitesini değiştirmektedir. Mutant IDH, izositratın  $\alpha$ -ketoglutarata ( $\alpha$ -KG) dönüşümünü katalizleyerek NADPH molekülünü oluşturmak yerine  $\alpha$ -KG’ı 2-HG’a dönüştürerek NADPH’ı tüketmektedir (Şekil III). 2-HG’ın direkt onkogenik etkisinin olup olmadığı veya NADPH ve  $\alpha$ -KG’ın azalmasının lökomogenezis ile ilişkisi olup olmadığı henüz bilinmemektedir (558).

IDH1, kromozom 2q33.3’de ve IDH2, kromozom 15q26.1’de yerleşmiştir. IDH mutasyonları ekzon 4’de yer alırlar ve bir arginin kalıntısında tek aminoasit değişimini içermektedirler. Bu mutasyonlar üç spesifik arginin kalıntısını etkilemektedir: R132(IDH1),

R172(IDH2) ve R140 (IDH2) (40). Mutant IDH'in izositrat için afinitesinin azaldığı ve  $\alpha$ -KG'ı 2-HG'a dönüştürmek için katalitik aktivitesinin olduğu bilinmektedir (557, 559, 560, 561). Mutant IDH'in onkogeneik özelliklerinin  $\alpha$ -KG'ın azalması veya 2-HG'ın birikiminden kaynaklandığına inanılmaktadır (559, 562). Çalışmalarda IDH mutasyonları, düşük gradlı gliomalarda ve sekonder glioblastomalarda %70, AML'de %10-20, MDS'da %3-5, MPN'lerde %1-4, KMML'yi içeren MDS/MPN'de %9, MDS'dan AML'ye tranforme olan hastalarda %15, MPN'den AML'ye tranforme olan hastalarda %22, MDS/MPN'den AML'ye tranforme olan hastalarda %10, del(5q) ilişkili yüksek riskli MDS veya AML'de %22 ve blastik faz KML'de %4 oranında bildirilmiştir (40, 41, 43, 45, 554, 563-567). AML'de IDH1 ve IDH2 mutasyonlarının fenotipik ve prognostik etkilerini araştıran çalışmaların çoğu, normal veya orta riskli karyotip, trizomi 8 ve NPM1 mutasyonları ile tutarlı bir ilişki göstermiştir (563, 568-571). NPM1<sup>+</sup>/FLT3<sup>-</sup> moleküler profilini taşıyan normal sitogenetik analize sahip hastalarda mutant IDH1 kötü prognozla ilişkili bulunurken FLT3<sup>+</sup> AML'de daha iyi prognozla ilişkisi gösterilmiştir (44, 564, 571, 572). Bazı çalışmalarda mutant IDH2, normal sitogenetik analize sahip AML'de kötü prognozla ilişkili saptanırken bir çalışmada mutant R140'ın (IDH2) prognozu, mutant R172'ye (IDH2) göre daha iyi bulunmuştur (564, 573, 574).

AML'li hastalardan farklı olarak MDS ve MPN'leri içeren kronik myeloid neoplazilerde IDH mutasyonlarının prognostik önemiyle ilgili bilgi kısıtlıdır (40, 45). Bu çalışmalardan birinde 1473 Ph-negatif MPN hastasında IDH1 ve IDH2 mutasyon sıklığı araştırılmıştır (40). Aynı çalışmada ET'de IDH mutasyonu %0.8, PV'da %1.9, PMF'de %4.1, post-ET/PV miyelofibroza %1, blastik faz ET'de %0, blastik faz PV'da %25 ve blastik faz PMF'de %25 oranında saptanmıştır (40). Bu çalışmada klinik bilgisi tam olan sadece 111 kronik faz PMF hastası bulunduğu için detaylı prognostik analiz yapılamamıştır. Başka bir çalışmada 301 kronik faz PMF hastasında IDH1 ve IDH2 mutasyonlarının fenotipik ve prognostik etkileri araştırılmıştır (46). 12 hastada (%4) mutant IDH saptanmıştır. 7 hastada IDH2 mutasyonu (5 R140Q, 1 R140W ve 1 R172G) ve 5 hastada IDH1 mutasyonu (3 R132S ve 2 R132C) saptanmıştır. 12 mutant hastanın 6'sında (%50) JAK2V617F mutasyonu saptanmıştır. Bu çalışma, PMF'de IDH mutasyonlarının lösemik transformasyon için bağımsız risk faktörü olduğunu ve JAK2V617F mutasyonu ile birlikte lökogenik riski arttırdığını göstermiştir (46). IDH mutasyonlarının JAK2V617F, TET2 ve MPL mutasyonları ile birliktelik gösterebileceği bilinmektedir. Farklı IDH mutasyon varyantlarının PMF'de farklı biyolojik veya prognostik özellikler taşıyıp taşımadığı henüz bilinmemektedir.



**Şekil III.** IDH tarafından normal reaksiyonların ve mutasyon sonucunda kazanılan yeni reaksiyonların katalize edilmesi. Normal reaksiyon izositratı  $\alpha$ -KG'a, mutasyon sonucunda oluşan reaksiyon ise  $\alpha$ -KG'ı 2-HG'a dönüştürmektedir.

### 3. MATERYAL VE METOD

#### 3.1. Olgular

İstanbul Tıp Fakültesi (İTF) Etik Kurulu tarafından kabul edilen (2012/1571-1245 dosya numaralı) bu çalışmada hasta grubu İTF İç Hastalıkları Ana Bilim Dalı, Hematoloji Bilim Dalı tarafından takip edilen olgular arasından seçilmiştir. Olgulardan çalışma öncesi bilgilendirilmiş onay alınmıştır. Çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Fonu tarafından tez projesi kapsamında 30427 proje numarası ile desteklenmiştir.

1995-2013 yılları arasında İTF İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Hematoloji Bilim Dalı Polikliniği'nden Ph-negatif MPN tanısı ile takipli ve 2008 'DSÖ' kriterlerini karşılayan 184 olgu (107 ET ve 77 PMF) çalışmaya dahil edilmiştir (55). Olguların demografik bilgilerine ek olarak, tanı sırasındaki yaş, örneğin elde edildiği sıradaki yaş, kemik iliği sitogenetik incelemeleri (Ph kromozomu), serum BCR-ABL, başlangıç lökosit, Hgb, Htc, trombosit, LDH düzeyleri, eritrosit transfüzyon ihtiyacı, kanama öyküsü ve lokalizasyonu, flebotomi öyküsü, kardiyovasküler risk faktörleri (sigara, hipertansiyon, dislipidemi, diabetes mellitus), tromboz öyküsü ve lokalizasyonu, kullanılan ilaçlar, AHKHN ve splenektomi öyküsü, lösemiye dönüşüm ve ölüm taranmıştır. Kemik iliği fibrozisi, retikülin 0, 1, 2, 3 olarak derecelendirilmiştir (575). İTF Biokimya Ana Bilim Dalı'nda bakılan LDH düzeyinin normal aralığı 240-480 U/L olup, > 480 U/L olması yüksek LDH düzeyi olarak kabul edilmiştir. Olguların dalak boyutu USG ile incelenmiştir. USG incelemesinde dalağın longitudinal çapının 130 mm'nin altında olması normal kabul edilmiştir. Dalak boyutu 130 mm ile 160 mm arasında olanlar 'hafif' ve 160 mm ve üzerinde olanlar 'masif' splenomegali olarak gruplandırılmıştır. OS (ay), tanıdan ölüme kadar veya tanıdan takip edilen güne kadar geçen süre olarak tanımlanmıştır.

PMF olgularında 'kötü karyotip anormallikleri' arasında kompleks karyotip veya trizomi 8, 7/7q, i(17q), inv(3), 5/5q, 12p veya 11q23 rearanjmanı vardır. Bunun dışındaki karyotip anormallikleri 'iyi karyotip anormallikleri' olarak sınıflandırılmıştır. Hiçbir karyotip anormalliği olmayanlar ise 'normal karyotip' olarak gruplandırılmıştır. PMF olgularında tanı sırasında risk skorlaması olarak 'DIPPS-plus' kriterleri kullanılmıştır (436). Bu kriterlere göre olgular düşük (hiç risk faktörü olmaması), orta-1 (1 risk faktörü), orta-2 (2 veya 3 risk faktörü) ve yüksek ( $\geq 4$  risk faktörü) riskli olarak sınıflandırılmıştır.

2011-2013 yılları arasında çalışmaya dahil edilen olguların venöz kanları prospektif olarak toplanarak İstanbul Üniversitesi İTF Moleküler Hematoloji Laboratuvarı'na analiz için yönlendirilmiştir.



## 3.2. Metod

ET ve PMF tanılı olgulardan kliniğe başvuruları sırasında rutin testler için alınan 2 cc EDTA'lı periferik kan örnekleri, çalışmada kullanılmak üzere saklanmıştır. İki olgu grubu çalışmada araştırılan ASXL1, IDH1 ve IDH2 mutasyonunu bulundurmaları açısından karşılaştırılmıştır (40, 576-579).

### 3.2.1. Periferik Kandan DNA İzolasyonu

Alınan periferik kan örneklerinden kit manuelinde belirtilen şekilde genomik DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir (High Pure PCR Template Preparation Kit, Roche Diagnostic, Mannheim, Almanya).

#### 3.2.1.1. DNA İzolasyonu

- 1- Mikrosantrifüj tüpüne 200 µl kan, 200 µl Binding buffer ve 40 µl Proteinaz K konularak karıştırılır ve 70°C'de 10 dakika inkübe edilir.
- 2- İnkübasyon sonrasında isopropanol (100 µl) alkol eklenerek kısa bir vorteks uygulanır.
- 3- Atık tüplerinin içine filtreli tüpler yerleştirilir.
- 4- Her bir örnek filtreli tüplere alınır.
- 5- 8000 g'de 1 dk santrifüj edilir.
- 6- Atık tüplerinde biriken sıvı uzaklaştırılır.
- 7- 500 µl inhibitör removal buffer eklenir.
- 8- 8000 g'de 1 dk santrifüj edilir.
- 9- Atık tüplerinde biriken sıvı uzaklaştırılır.
- 10- 500 µl wash buffer eklenir.
- 11- 8000 g'de 1 dk santrifüj edilir.
- 12- Basamak 7 ve 8 bir kez daha tekrar edilir.
- 13- 2 dk maksimum devirde santrifüj edilir.
- 14- Atık tüplerinde biriken sıvı uzaklaştırılır.
- 15- Filtreli tüpler 1.5ml'lik steril, kapaklı, Dnase/RNase free mikrosantrifüj tüplerine konur.
- 16- 100 µl Elution Buffer eklenir.
- 17- 1 dk 8000 g'de santrifüj edilir.
- 18- 16-Kolonlar atılır.

### **3.2.1.2. Elde Edilen DNA'nın Konsantrasyon ve Kalitesinin Tayini**

İzole edilen DNA örneklerinin konsantrasyon tayini Nanodrop 2000c spektrofotometre ile gerçekleştirilmiştir (Thermo Scientific, USA). Spektrofotometrede 260 nm ve 280 nm dalga boylarında yapılan ölçümlerle DNA'nın saflığı ve konsantrasyonu belirlenmiştir. Elde edilen DNA çalışma yapılana kadar +4°C'de saklanmıştır.

### **3.2.2. JAK2V617F Mutasyonunun Gerçek zamanlı Semi-Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Analizi**

Üreticinin önerdiği çalışma protokolü kullanılarak semi-kantitatif olarak JAK2V617F tayini yapılmıştır ('JAK2 MutaScreen™ Kit Reference Scale' Ipsogen, Luminy Biotech, Marsilya, Fransa) (576). Kit TaqMan allelik ayırımını kullanarak genomik DNA'da doğal-tip JAK2 ve JAK2V617F allelerini tespit edilmekte ve yöntemin semi-kantitatif olması nedeniyle eş zamanlı olarak mutant allel yükü de tespit edilmektedir (578). Olguların polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) deneyleri, ince çeperli 0.2 ml hacimli polistiren tüpler içinde eş zamanlı olarak 2 spesifik TaqMan probu (Applied Biosystems) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Gerekli PZR bileşenleri Tablo XIX'da özetlenmiştir. Çalışma Rotor-Gene (Corbett Research, Australia) cihazında Tablo XX'deki PZR protokolü kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Her bir alleli ayırt etmek için floresan ölçümü kullanılmıştır (JAK2V617F için FAM ve doğal tip için VIC) (578).

Allelik ayırımın değerlendirilmesinde iki TaqMan probu, multipleks ölçüm için kullanılmaktadır. Problemlerden biri allel 2 dizisine uyum sağlarken (örneğin doğal tip allel) diğeri allel 1 dizisine (mutasyonu taşıyan allel) uyum göstermektedir. Her bir prob 5' ucunda ayırt edici floresan boya (FAM veya VIC) ile işaretlenmiştir ve 3' ucunda floresan olmayan bir baskılayıcı içermektedir. Problemlerin içerdiği MGB (ikincil oluk bağlayıcı) sayesinde daha kısa problemlerle daha fazla stabilite sağlanır. Bunun sonucunda daha doğru bir allelik ayırım yapılabilmektedir. PZR'nun çoğalma fazı sırasında tam uyum sağlayan prob, Taq DNA polimerazın 5'→3' ekzonükleaz aktivitesi tarafından kesilmektedir. Böylece indikatör boya, baskılayıcısından ayrılarak floresan ışımaya yapmaktadır. Tam uyum sağlamayan prob, Taq DNA polimeraz tarafından kesilmez ancak yeri değiştirilir. Böylece indikatör boya salınmaz. PZR sonunda floresan sinyali (VIC veya FAM) toplanır ve hedef dizilerin varlığı (doğal-tip allel, mutant allel veya her ikisi) kontaminasyon riskini arttıran PZR sonrası uzun ve yorucu basamaklara gereksinim olmadan saptanır. JAK2V617F mutant allel yükünü tahmin etmek için altı ölçekli standard kullanılmıştır (%2, % 5, %12.5, %31, %50 ve %78) (576).

JAK2V617F allel yükü  $\leq$  %50 olan olgular düşük allel yükü,  $>$  %50 olan olgular yüksek allel yüküne sahip kabul edilmiştir.

**Tablo XIX. JAK2V617F analizi için hazırlanan PZR karışımının bileşenleri**

PZR BİLEŞENLERİ	Reaksiyon için gerekli miktar ( $\mu$ l)
TaqMan Universal Master Mix, 2x	12.5
Primer ve prob karışımı, 10x	1.5
Nükleaz içermeyen steril ultra saf su	5
DNA (50ng/ $\mu$ l)	5
Toplam hacim	25

**Tablo XX. JAK2V617F analizinde kullanılan Gerçek zamanlı Semi-kantitatif PZR koşulları**

95°C	15 dk	İlk Denatürasyon	
95°C	15 sn	Denatürasyon	50 döngü
60°C	1 dk	Bağlanma	
60°C	20 sn	Uzama	

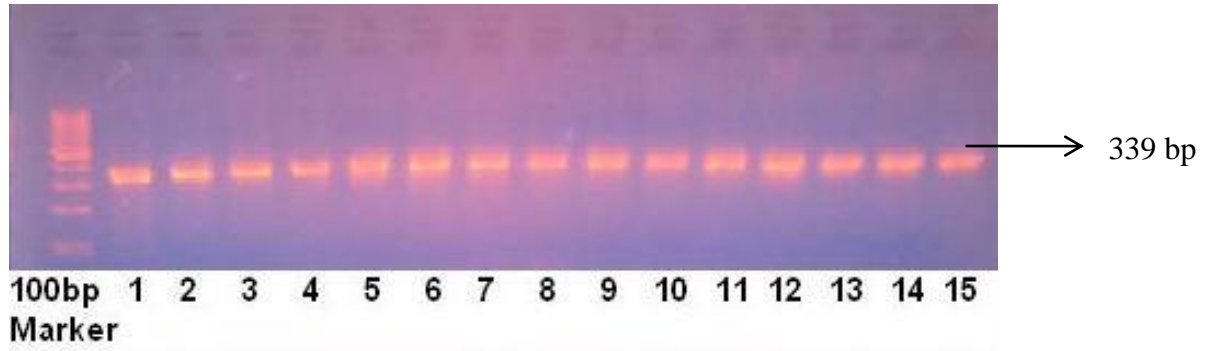
### 3.2.3. ASXL1 Mutasyon Analizi

ASXL1 geninin ekzon 12 bölgesinde ortaya çıkan mutasyonların saptanması amacıyla literatürde belirtilen primerler kullanılarak DNA bölgesi çoğaltılmıştır. Bu amaçla ileri primer olarak 5'-CCACCCTGGGTTAAAG-3', geri primer olarak 5'-TCGCTGTAGATCTGACGTAC-3' kullanılmıştır (577). PZR reaksiyonu için primerler önceden sulandırılarak 12.5 pmol/ $\mu$ l konsantrasyona getirilmiştir. Toplam 25  $\mu$ l olarak hazırlanan PZR karışımı, 1.5  $\mu$ l dNTP, 3  $\mu$ l PZR tampon çözeltisi, 1.2  $\mu$ l MgCl<sub>2</sub>, her primerden 0.4'er  $\mu$ l, 0.3  $\mu$ l Taq polimeraz, 50 ng/ $\mu$ l DNA ve hacmi 25  $\mu$ l'ye tamamlayacak miktarda dH<sub>2</sub>O içermektedir. PZR çalışması, konvansiyonel tip PZR cihazında gerçekleştirilmiştir (PalmCycler, Corbett Research, Australia). Kullanılan PZR koşulları, Tablo XXI'de görülmektedir. Bu yaklaşımla bilinen tüm ASXL1 (ekzon 12) mutasyonlarının %83'ünün tanımlandığı bildirilmiştir (ASXL1'de P575-R687 aralığındaki amino asit bölgesine denk gelmektedir) (577, 580).

**Tablo XXI. ASXL1 Ekzon 12 gen bölgesinin çoğaltılması için gerekli PZR koşulları**

95°C	5 dk	İlk Denatürasyon	
95°C	1 dk	Denatürasyon	35 döngü
56°C	1 dk	Bağlanma	
72°C	1 dk	Uzama	
72°C	7 dk	Son uzama	

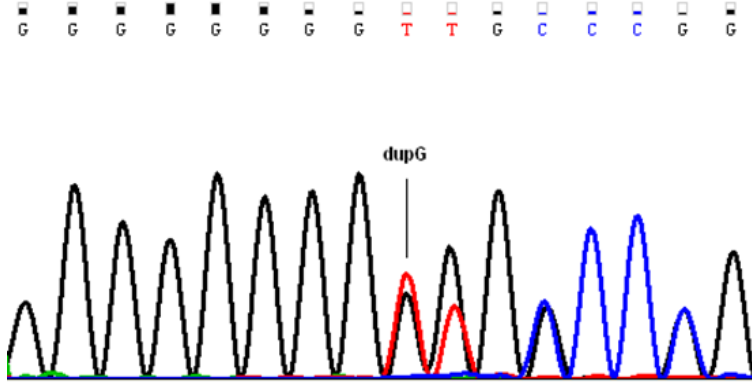
Elde edilen PZR ürünlerinin kontrolü için %2'lik agaroz jel hazırlanmıştır. Ardından 8 µl PZR ürünü 1 µl yükleme tamponu ile karıştırılarak jeldeki kuyulara yükleme yapılmıştır. Ürünler 100 bp'lik DNA markeri (Fermentas, Lithuania) ile birlikte elektroforezde yürütülmüştür. Yürütme sonrası jel üzerindeki bantlar UV ışık altında incelenmiştir. Elde edilen 339 bp'lik PZR ürününün jeldeki görüntüsü Şekil IV'de gösterilmiştir.



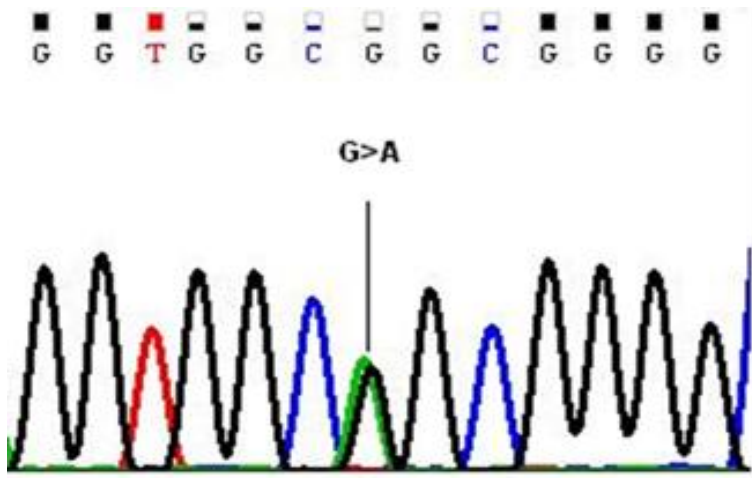
**Şekil IV. ASXL1 (Ekzon 12) bölgesinin PZR ürününün jeldeki görüntüsü**

Kontrol edilen PZR ürünleri Invisorb® Spin DNA Extraction Kit (Invitex GMBH, Almanya) kullanılarak saflaştırılmıştır. Ardından Applied Biosystems 3730xl cihazında (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) konvansiyonel PZR için kullanılan ileri ve geri primerle çift yönlü dizileme yapılmıştır. Sekans kromatogramları 'ClustalW2 multiple sequence alignment' adlı program ile taranmış ve NCBI Blast programında kontrol edilmiştir. Saptanan mutasyon bölgelerinin belirlenmesinde Ensembl veri tabanı kullanılmıştır.

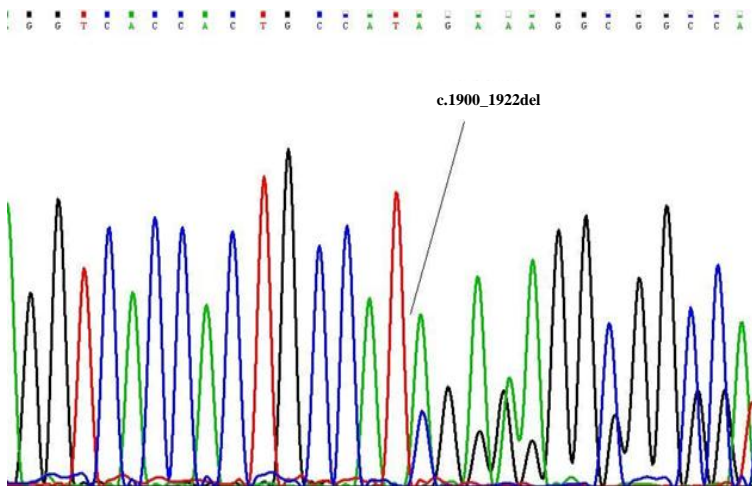
Şekil V, VI, VII, VIII ve IX'da olgularımızda saptadığımız ASXL1 mutasyon varyantlarının sekans kromatogramındaki görünümü verilmiştir.



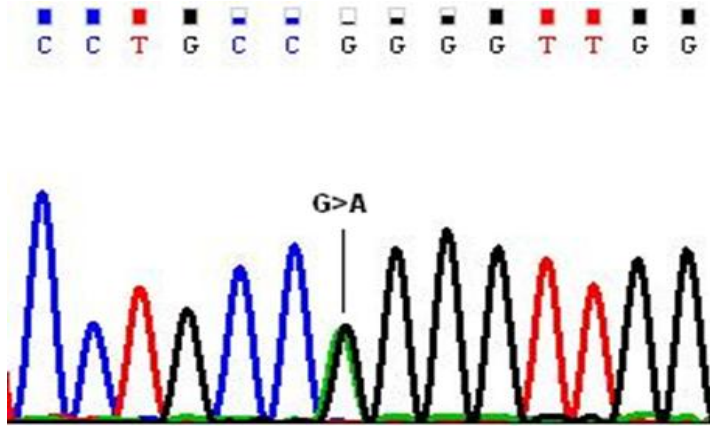
Şekil V. Olgularımızda en sık saptadığımız mutasyon varyantı olan c.1934dupG'nin (p.G646TrpfsX12) sekans kromatogramındaki görünümü (çerçeve kayması mutasyonu)



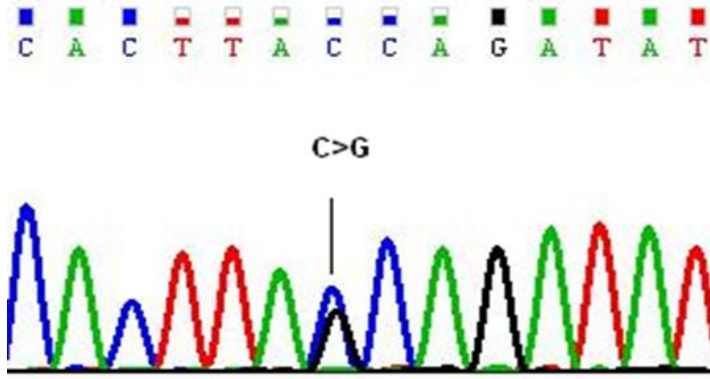
Şekil VI. Ph-negatif MPN tanılı olgu grubumuzda 2.sıklıkta saptadığımız c.1954G>A (p.G652S) adlı bir missense mutasyona ait sekans kromatogramı görülmektedir



Şekil VII. Ph-negatif MPN tanılı olgu grubumuzda 3.sıklıkta saptanan mutasyon varyantı olan c.1900\_1922del'in (p.Glu635ArgfsX15) sekans kromatogramındaki görünümü (nonsense mutasyon)



Şekil VIII. c.1817G>A mutasyonu (p.Arg606Gln) saptanan ET tanılı bir olgumuzun sekans kromatogramının görünümü (missense mutasyon)



Şekil IX. Bir nonsense mutasyon olan c.1773C>G (p.Tyr591X) adlı mutasyonun sekans kromatogramındaki görünümü

### 3.2.4. IDH1 ve IDH2 Mutasyon Analizleri

IDH1 (ekzon 4) ve IDH2 (ekzon 4) mutasyonlarının saptanması 'LightCycler 480II Gerçek zamanlı PZR cihazında' (Roche Diagnostics) yüksek çözünürlüklü melting (YÇM) analizi ile gerçekleştirilmiştir (40).

IDH1 geninin ekzon 4 bölgesindeki mutasyonların (R132) saptanması için aşağıdaki primerler kullanılmıştır:

İleri Primer: 5'- CGGTCTTCAGAGAAGCCATT-3'

Geri Primer: 5'- CACATTATTGCCAACATGAC-3'

IDH2'nin ekzon 4 bölgesindeki R140 mutasyonunun saptanması için gerekli primerler:

İleri Primer: 5'- GCTGAAGAAGATGTGGAA-3'

Geri Primer: 5'- TGATGGGCTCCCGGAAGA-3'

IDH2'nin ekzon 4 bölgesindeki R172 mutasyonunun saptanması için gerekli primerler:

İleri Primer: 5' - CCAAGCCCATCACCATTG-3'

Geri Primer: 5' - CCCAGGTCAGTGGATCCC-3'

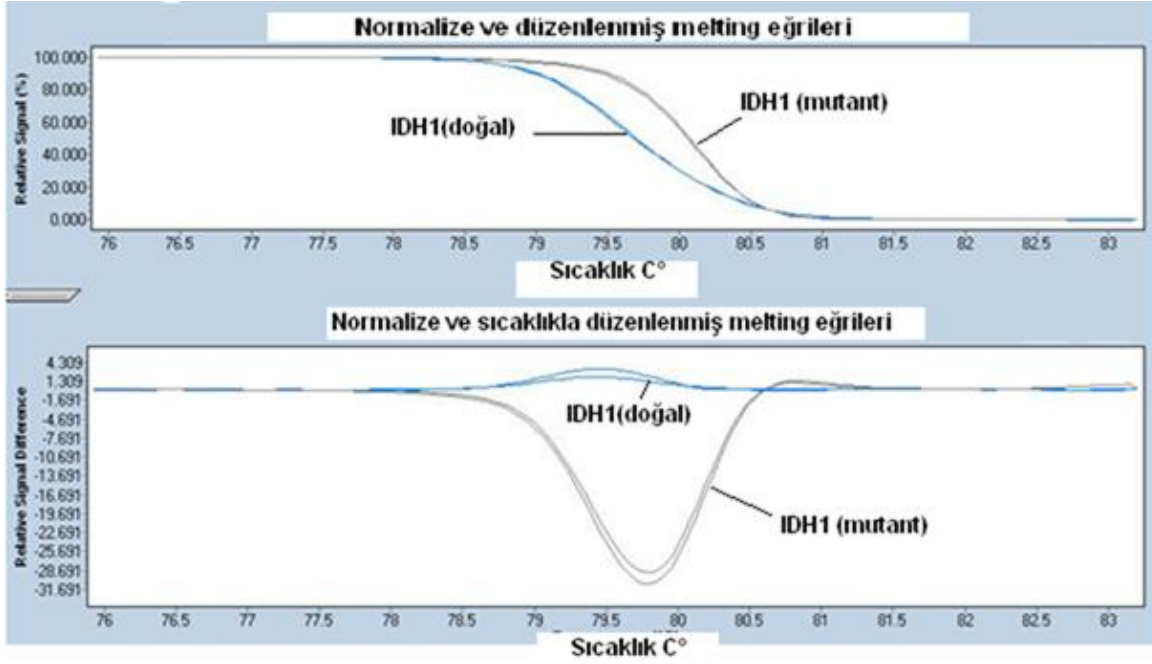
Her üç bölgenin çoğaltılması için gerekli bağlanma ısı 54°C olarak belirlenmiş ve hepsinin YÇM analizlerinde aynı PZR protokolü kullanılmıştır. Tablo XXII, LightCycler'da kullandığımız PZR protokolünü göstermektedir. Toplam 20 µl olan reaksiyon karışımı için 10 µl YÇM master miski, 0.2 µl ileri primer 0.2 µl geri primer, 1.6 µl MgCl<sub>2</sub>, 50 ng/µl olacak şekilde DNA ve dH<sub>2</sub>O eklenmiştir. Çalışma 96'lık platelerde gerçekleştirilmiştir.

**Tablo XXII. IDH1 ve IDH2'nin YÇM PZR reaksiyonu için gerekli profil şartları**

Program	Denatürasyon	Amplifikasyon			YÇM				Soğuma
Analiz mode	Yok	Kantifikasyon			Melting Eğrileri				Yok
Döngü	1	45			1				1
Segment	1	1	2	3	1	2	3	4	1
Hedef (°C)	95	95	54	72	95	40	65	95	40
Süre	10 dk	10 sn	15 sn	25 sn	1 dk	1 dk	1 sn		30 sn
Rampa oranı (°C/sn)	4.4	4.4	2.2	4.4	4.4	2.2	4.4	0.02	2.2
Toplama modu	Yok	Yok	Yok	Tek	Yok	Yok	yok	Devamlı	Yok

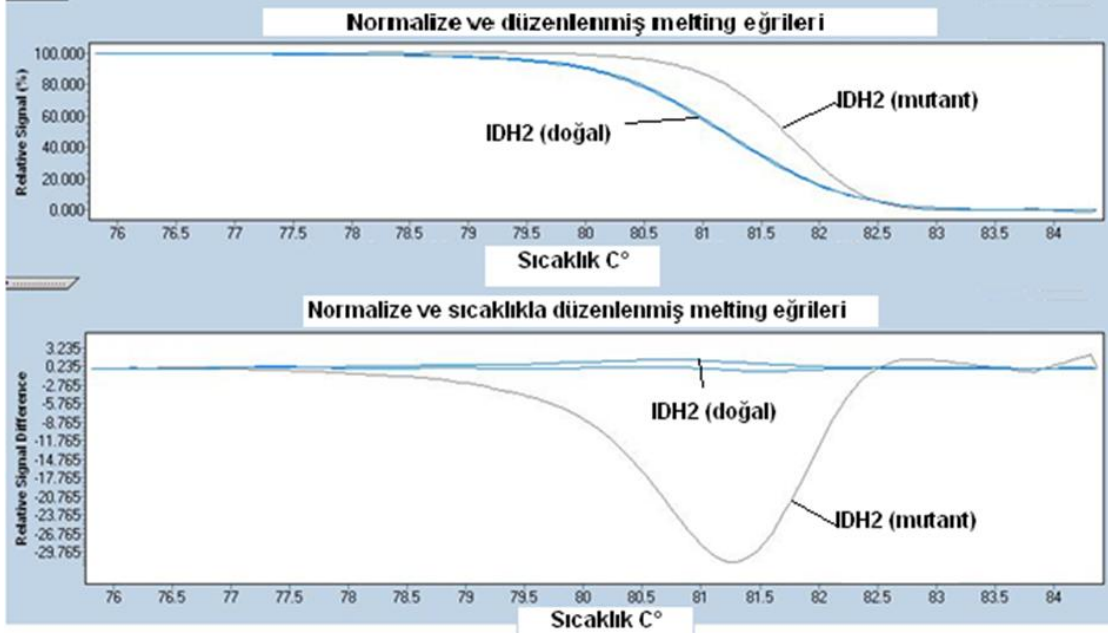
LightCycler 480 software 1.5.0 SP3 versiyonunun "Gene-Scanning" (Gen tarama) programı kullanılarak normalizasyon, sıcaklığın ayarlanması (temperature shifting) ve farklılık çizimi (difference plot) olmak üzere üç basamaklı bir analizle örnekler gruplara ayrılmıştır. Analiz sonucunda elde edilen erime eğrilerindeki farklılıklar kıyaslanarak yorum yapılmıştır. Analiz sonucu melting eğrilerinde farklılık olan örnekler potansiyel mutasyon taşıyıcı olarak kabul edilmiştir.

Şekil X'da IDH1 R132, Şekil XI'da IDH2 R140 ve Şekil XII'de IDH2 R172'ye ait melting eğrileri görülmektedir.

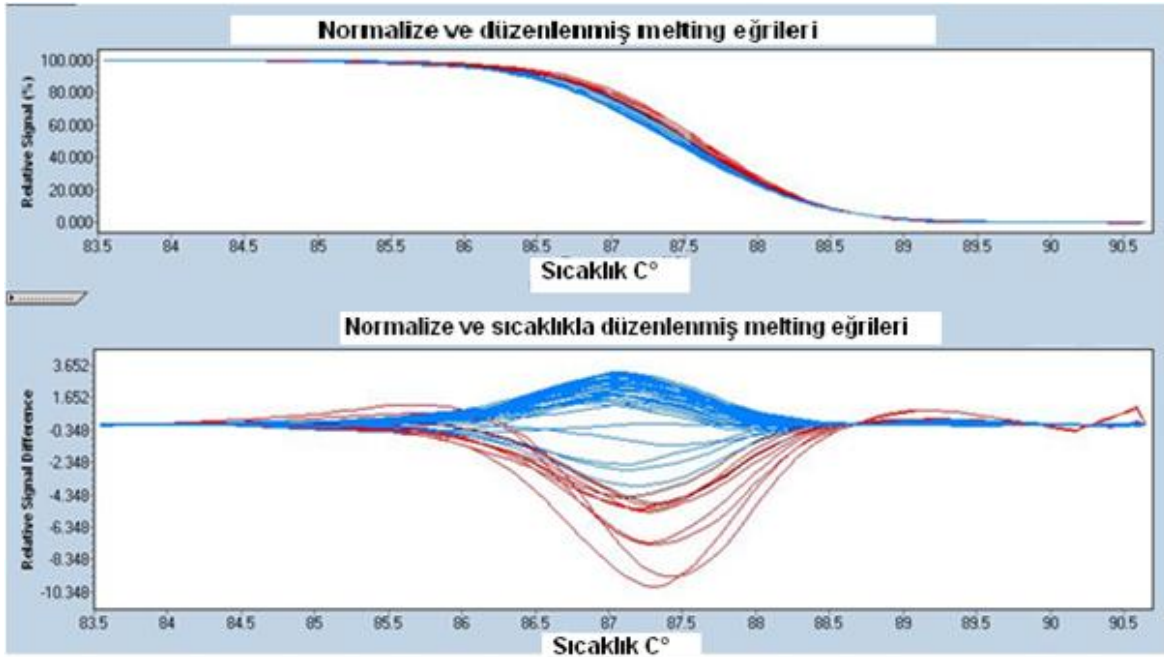


Şekil X. IDH1 R132'nin normalize ve düzenlenmiş melting eğrileri ve normalize ve sıcaklıkla düzenlenmiş difference plot grafiği. Grafiklerde doğal ve mutant IDH1'in eğrileri görülmektedir.





Şekil XI. IDH2 R140 normalize ve düzenlenmiş melting eğrileri ve normalize ve sıcaklıkla düzenlenmiş difference plot grafiği. Grafiklerde doğal ve mutant IDH2'nin eğrileri görülmektedir.



Şekil XII. IDH2 R172'nin normalize melting eğrileri ve sıcaklıkla düzenlenmiş difference plot grafiği. YÇM analizine göre elde edilen şekilde normalize melting eğrileri ve sıcaklıkla ayarlanmış difference plot grafiği incelendiğinde IDH2 R172'de tüm örneklerin tek

bir grup halinde melting özelliği gösterdiği görülmektedir; ayrı bir ısıda melting eğrisi veren örnek bulunmamaktadır. Dolayısıyla örneklerin hepsi doğal tip grubundadır.

### 3.3. İstatistiksel Analiz

ET grubu ve PMF tanımlı bireylerde elde edilen sonuçlar SPSS istatistik programına (Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey, 2008) yüklenmiştir. Parametrik verilerin iki grup arasındaki farklılıkları 'student t testi' ile değerlendirilmiştir. Üç grup arasındaki parametrik farklılıklar tek yönlü varyans analizi (Anova) ile değerlendirilmiştir. Üç grup arasındaki parametrik olmayan değerlendirmeler Kruskal-Wallis Testi ve iki grup arasındaki değerlendirmeler ise Mann-Whitney testi ile yapılmıştır. Oranlar ki-kare testi ile karşılaştırılmıştır. Sonuçlar mean (SD) olarak gösterilmiştir. %95 Güven aralığı (CI), OR ve p değeri belirlenmiştir. p değeri < 0.05 olan sonuçlar anlamlı kabul edilmiştir. Minimum beklenen değer (MBD)  $\leq 5$  olduğu zaman Fisher's exact testi,  $5 < \text{MBD} < 25$  olduğu zaman Continuity correction test (yates düzeltmeli kıkare),  $\text{MBD} \geq 25$  olduğu zaman pearson ki kare kullanılmıştır. ASXL1, IDH, JAK2V617F mutasyonu, JAK2V617F allel yükü ve mutasyon kombinasyonları ile ilişkili parametrik ve nonparametrik korelasyon analizleri yapılmıştır. Korelasyon katsayısı r ile gösterilmiştir (r değeri: 0.2-0.3 arası zayıf, 0.3-0.4 arası hafif, 0.4-0.6 arası orta, 0.6-0.8 arası iyi dereceli ve 0.8'den büyük olması ileri dereceli ilişki olarak kabul edilmiştir). ET ve PMF'de yaşam eğrileri, 'Kaplan-Meier' analizi kullanılarak OS'ni (mean, ay) ve PMF'de LFS'ı hesaplamak için oluşturulmuştur. Gruplar arası sağkalım ve lösemiye transformasyon oranlarının karşılaştırılması log rank testi ile yapılmıştır. Bağımsız değişkenler ile yaşam süresi arasındaki ilişkinin incelenmesi için Cox regresyon modeli kullanılarak çok değişkenli analiz yapılmış ve risk oranı OR olarak belirlenmiştir.

## 4. BULGULAR

### 4.1. OLGULAR

Bu çalışmada 107 ET ve 77 PMF olmak üzere toplam 184 Ph-negatif MPN olgusu incelenmiştir.

#### 4.1.1. ET grubu

Bu grupta 2008 ‘DSÖ’ kriterlerini karşılayan, 58 kadın ve 49 erkekten oluşan, yaş ortalamaları 56.3 (SD 14.5) olan toplam 107 ET tanılı olgu bulunmaktadır. Olguların klinik ve laboratuvar verileri Tablo XXIII, XXIV ve XXV’de özetlenmiştir.

Olguların ortalama tanı yaşı 50.5 (SD 15.2) ve DNA için kan örneğinin alındığı sıradaki yaş ortalaması 54.9 (14.4) olarak saptanmıştır. Tanı sırasında ortalama lökosit sayısı 9.954/mm<sup>3</sup> (SD 3.865), Hgb düzeyi 13.1 (SD 1.9), Htc değeri %39.1 (SD 5.61), trombosit değeri 947.253/mm<sup>3</sup> (SD 408.082), LDH düzeyi 456 U/L (SD 153) ve dalak boyutu 137.84 mm (SD 32.76) olarak bulunmuştur. ET tanılı olguların 18’inin (%16.8) başlangıç trombosit değeri 450.000-600.000/mm<sup>3</sup> arasında, 55 olgunun (%51.4) 600.000-1.000.000/mm<sup>3</sup> arasında ve 34 olgunun (%31.8) ise  $\geq 1.000.000/\text{mm}^3$  saptanmıştır. Tanı sırasındaki lökosit dağılımlarına bakıldığında zaman 65 olgunun (%60.74) başlangıç lökosit değeri 10.000/mm<sup>3</sup> ün altında, 41 olgunun (%38.31) 10.000-25.000/mm<sup>3</sup> arasında ve sadece bir olguda (%0.95)  $\geq 25.000/\text{mm}^3$  saptanmıştır. Olguların tanı sırasında 43’ünde (%40.2) LDH düzeyi yüksek bulunmuştur.

Olguların tanı sırasındaki dalak boyutları göz önüne alındığında ET tanılı olguların 22’sinde (%20.6) hafif, 18’inde (%16.8) masif splenomegali tespit edilirken 67 olguda (%62.6) splenomegali saptanmamıştır.

Olguların kemik iliği biyopsileri incelendiğinde 10 olguda (%9.3) kemik iliği fibrozis derecesi grade 0, 67 olguda (%62.6) grade 1, 27 olguda (%25.2) grade 2, 3 olguda (%2.8) grade 3 olarak tespit edilmiştir.

ET tanılı olguların 64’ünde (%59.8) JAK2V617F mutasyonu saptanmıştır. JAK2V617F allel yükünü değerlendirmek için altı ölçekli standard kullanıldığı zaman olguların 15’inde (%14) allel yükü %2-5 arasında, 11’inde (%10.3) %5 düzeyinde, 17’inde (%15.9) %5-12.5 arasında, 11’inde (%10.3) %12.5-31 arasında, 4’ünde (%3.7) %31-50 arasında, birinde (%0.9) %50 düzeyinde, 3’ünde (%2.8) %50-78 arasında, ve 2’sinde (%1.9) %78-100 arasında saptanmıştır. Olguların 59’u (%55.1) düşük JAK2V617F allel yüküne ve 5’i (%4.7) yüksek allel yüküne sahip bulunmuştur (Şekil XIII).

ET tanılı 2 olguda (%1.9) IDH mutasyonu (IDH1 veya IDH2) saptanmıştır (Tablo XXVI). IDH mutasyonlarının biri IDH1 mutasyonu (IDH1 R132C) ve diğeri IDH2 mutasyonundan (IDH2 R140Q) oluşmaktaydı. ET tanılı olgularda IDH2 R172 mutasyonuna rastlanmamıştır. IDH mutasyonu olan olguların birinde (IDH2 R140Q) JAK2V617F mutasyonu saptanmışken (JAK2V617F allel yükü:%5) diğeri JAK2V617F mutasyonuna rastlanmamıştır. ET tanılı olguların birinde (%0.9) IDH mutasyonu ile beraber JAK2V617F mutasyonu tespit edilmiştir. IDH mutasyonu olan ET'li olguların hiçbirine ASXL1 mutasyonu eşlik etmemiştir.

ET tanılı olguların 9'unda (%8.4) ASXL1 mutasyonu saptanmıştır (Tablo XXVII). ET tanılı olgularda ASXL1 geninde eşit sıklıkta olarak en sık saptadığımız mutasyonlar c.1934dupG (n=3) ve c.1954G>A (n=3) mutasyonlarıdır. ET tanılı hiçbir olguda birden fazla ASXL1 mutasyonuna rastlanmamıştır. ASXL1 mutasyonunu taşıyan olguların 6'sında (%66.6) JAK2V617F mutasyonu saptanmıştır. ET tanılı 107 olgunun 6'sında (%5.6) ASXL1 mutasyonu ile beraber JAK2V617F mutasyonu gözlenmiştir. ASXL1 mutasyonunu taşıyan ET'li olguların hiçbirinde IDH mutasyonuna rastlanmamıştır.

Olguların 76'sında (%71) kardiyovasküler risk faktörleri ve 41'inde (%38.3) major trombotik olay tespit edilmiştir. Toplam 21 olguda (%19.6) arteriyel tromboz, 18 olguda (%16.8) venöz tromboz, 2 olguda (%1.9) hem arteriyel hem venöz tromboz gelişmiştir. Arteriyel tromboz komplikasyonu olarak 11 olguda koroner arter hastalığı, 5 olguda SVO, 2 olguda periferik arter hastalığı, 1 olguda koroner arter hastalığı ve SVO, 1 olguda renal arter hastalığı ve koroner arter hastalığı ve 1 olguda SVO ile birlikte periferik arter hastalığı görülmüştür. Venöz tromboz komplikasyonu olarak 11 olguda batin içi tromboz, 4 olguda serebral venöz tromboz, 2 olguda DVT ve 1 olguda pulmoner emboli görülmüştür. Arteriyel ve venöz tromboz komplikasyonunu birarada yaşayan olgulardan birinde SVO, koroner arter hastalığı ve pulmoner emboli, diğeri ise koroner arter hastalığı ve batin içi tromboz gözlenmiştir. ET tanılı 107 olgunun 13'ünde (%12.1) kanama komplikasyonu saptanmıştır. Kanama komplikasyonu olarak 9 olguda gastrointestinal sistem kanaması, 1 olguda intrakranial kanama, 1 olguda mukozal kanama, 1 olguda tekrarlayan cilt altı kanamaları ve 1 olguda göz içine kanama gerçekleşmiştir.

107 ET tanılı olgunun 5'inde (%4.6) eritrosit transfüzyon ihtiyacı ve 5'inde (%4.6) flebotomi ihtiyacı olduğu görülmüştür. Olguların 92'si (%86) hidroksiüre, 5'i (%4.7) anagrelid, 7'si (%6.5) interferon alfa, 2'si (%1.9) alkeran, 93'ü (%86.9) aspirin, 17'si (%15.9) warfarin, 10'u (%9.3) enoxaparin ve 8'i (%7.5) klopidogrel kullanmıştır. İki olguya (%1.9) splenektomi uygulanmıştır.

Takip süresince olguların 5'i (%4.7) hayatını kaybetmiştir. Hiçbir olguda seyir sırasında lösemik dönüşüm gerçekleşmemiştir. Olguların tanıdan itibaren ortalama takip süresi (TS) 69.91 (SD 60.8) ay olup 'Kaplan-Meier' analizinde ortalama OS 215 ay (%95 CI: 197-233) olarak saptanmıştır.

#### 4.1.2. PMF grubu

Bu grupta 2008 'DSÖ' kriterlerini karşılayan 43 kadın ve 34 erkekten oluşan, yaş ortalamaları 60.8 (SD 14.5) olan toplam 77 PMF tanılı olgu bulunmaktadır. Olguların klinik ve laboratuvar verileri Tablo XXIII, XXIV ve XXV'de özetlenmiştir.

Olguların ortalama tanı yaşı 56.8 (SD 14.4) ve DNA için kan örneğinin alındığı sıradaki yaş ortalaması 59.6 (SD 14.3) olarak saptanmıştır. Tanı sırasında ortalama lökosit sayısı 14.552/mm<sup>3</sup> (SD 13.528), Hgb düzeyi 10.6 g/dl (SD 2.1), Htc değeri %32.1 (SD 6.98), trombosit değeri 433.767/mm<sup>3</sup> (SD 362.244), LDH düzeyi 828 U/L (SD 394) ve dalak boyutu 197.64 mm (SD 43.16) olarak bulunmuştur.

PMF tanılı olguların 49'unun (%63.6) başlangıç trombosit değeri 450.000/mm<sup>3</sup>'den küçük, 6'sının (%7.8) 450.000-600.000/mm<sup>3</sup> arasında, 15 olgunun (%19.5) 600.000-1.000.000/mm<sup>3</sup> arasında ve 7 olgunun (%9.1) ise  $\geq$  1.000.000/mm<sup>3</sup> saptanmıştır. Tanı sırasında 9 olguda (%11.7) trombositopeni saptanmıştır. Tanı sırasındaki 40 olgunun (%51.9) başlangıç lökosit değeri 10.000/mm<sup>3</sup>'ün altında, 25 olgunun (%32.5) 10.000-25.000/mm<sup>3</sup> arasında ve 12 olgunun (%15.6) ise  $\geq$  25.000/mm<sup>3</sup> saptanmıştır. Olguların 64'ünde (%83.1) LDH düzeyi yüksek bulunmuştur.

Olguların tanı sırasındaki dalak boyutları göz önüne alındığında PMF tanılı olguların 17'sinde (%22.1) hafif, 59'unda (%76.6) masif splenomegali tespit edilirken bir olguda (%1.3) splenomegali saptanmamıştır.

Olguların kemik iliği biyopsileri incelendiğinde 16 olguda (%20.8) kemik iliği fibrozis derecesi grade 2 ve 61 olguda (%79.2) grade 3 olarak tespit edilmiştir.

Kemik iliği sitogenetik incelemelerinde 7'si (%9.1) iyi karyotip anormalliği ve 3'ü (%3.9) kötü karyotip anormalliği olmak üzere toplam 10 olguda (%12.9) karyotip anormalliği saptanmıştır. Karyotip anormalliklerin dağılımı Şekil XIV'de görülmektedir. Bunlar arasında en sık 20q delesyonu saptanmıştır (Şekil XV). 'DIPSS-plus' kriterlerine göre 15 olgu (%19.5) düşük, 27 olgu (%35.1) orta-1, 27 olgu (%35.1) orta-2 ve 8 olgu (%10.4) yüksek riskli olarak saptanmıştır (Şekil XVI).

PMF tanılı olguların 58'inde (%75.3) JAK2V617F mutasyonu saptanmıştır. JAK2V617F allel yükünü değerlendirmek için altı ölçekli standard kullanıldığı zaman

olguların 8'inde (%10.4) allel yükü %2-5 arasında, 7'sinde (%9.1) %5 düzeyinde, 10'unda (%13) %5-12.5 arasında, 2'sinde (%2.6) %12.5-31 arasında, 3'ünde (%3.9) %31 düzeyinde, 10'unda (%13) %31-50 arasında, 3'ünde (%3.9) %50-78 arasında, 3'ünde (%3.9) %78 düzeyinde ve 12'sinde (%15.6) %78-100 arasında saptanmıştır (Şekil XIII). Olguların 40'ı (%51.9) düşük JAK2V617F allel yüküne, 18'i (%23.4) yüksek JAK2V617F allel yüküne sahip bulunmuştur.

PMF tanılı 5 olguda (%6.5) IDH mutasyonu (IDH1 veya IDH2) saptanmıştır (Tablo XXVIII). IDH mutasyonlarının 4'ü (%80) IDH1 mutasyonu (3 IDH1 R132C, 1 IDH1 R132S) ve biri (%20) IDH2 (1 IDH2 R140Q) mutasyonundan oluşmaktaydı. IDH mutasyonu sıklığına bakıldığı zaman en sık IDH2 R132 (n=4) olmak üzere bunu IDH1 R140 (n=1) mutasyonları takip etmektedir. PMF tanılı olgularda IDH2 R172 mutasyonuna rastlanmamıştır. IDH mutasyonu olan olguların 3'ünde (%60) JAK2V617F mutasyonu saptanmıştır. PMF tanılı 3 olguda (%3.9) IDH mutasyonu ile beraber JAK2V617F mutasyonu tespit edilmiştir. IDH mutasyonu olan olguların 3'üne (%60) eş zamanlı ASXL1 mutasyonu eşlik etmekteydi. PMF tanılı olguların 3'ünde (%3.9) IDH mutasyonu ile beraber ASXL1 mutasyonu varlığı tespit edilmiştir.

PMF tanılı olguların 19'unda (%24.7) ASXL1 mutasyonu saptanmıştır (Tablo XXIX). PMF grubunda ASXL1 geninde saptanan en sık mutasyon c.1934dupG (n=11) adlı mutasyondur. Takiben c.1900\_1922 del (n=3) mutasyonu ve c.1954G>A (n=3) eşit sıklıkta bulunmuştur. c.1934dupG taşıyan olgulardan birine eş zamanlı c.1954G>A mutasyonunun eşlik ettiği tespit edilmiştir. ASXL1 mutasyonunu taşıyan olguların 14'ünde (%73.6) JAK2V617F mutasyonu saptanmıştır. PMF tanılı olguların 14'ünde (%18.2) ASXL1 mutasyonu ile beraber JAK2V617F mutasyonu gözlenmiştir. 19 ASXL1 mutasyonu olan olgunun 3'ü eş zamanlı IDH mutasyonunu taşımaktaydı (%15.7).

Olguların 46'sında (%59.7) kardiyovasküler risk faktörleri ve 11'inde (%14.3) major trombotik olay tespit edilmiştir. Toplam 7 olguda (% 9.1) arteriyel tromboz, 3 olguda (%3.9) venöz tromboz ve 1 olguda (%1.3) hem arteriyel hem venöz tromboz gelişmiştir. Arteriyel tromboz komplikasyonu olarak 4 olguda (%5.2) koroner arter hastalığı ve 3 olguda (%3.9) periferik arter hastalığı görülmüştür. Venöz tromboz komplikasyonu olarak 3 olguda (%3.9) batin içi tromboz görülmüştür. Arteriyel ve venöz tromboz komplikasyonu gelişen bir olguda (%1.3) SVO ile birlikte DVT görülmüştür.

PMF tanılı 77 olgunun 15'inde (%19.5) kanama komplikasyonu saptanmıştır. Kanama komplikasyonu olarak 5 olguda (%6.5) gastrointestinal sistem kanaması, 2 olguda (%2.6) intrakranial kanama, 5 olguda (%6.5) mukozal kanama, 2 olguda (%2.6) tekrarlayan cilt altı

kanamaları ve bir olguda (%1.3) gastrointestinal kanama ile beraber tekrarlayan cilt altı ve mukozal kanamalar görülmüştür.

77 PMF tanılı olgunun 21'inde (%27.3) eritrosit transfüzyon ihtiyacı ve birinde (%1.3) flebotomi ihtiyacı olduğu görülmüştür. Takip sürecinde olguların 72'si (%93.5) hidroksiüre, biri (%1.3) anagrelid, 3'ü (%3.9) interferon alfa, 3'ü (%3.9) lenalidomid, 5'i (%6.5) oksimetalon, 47'si (%61) aspirin, 5'i (%6.5) warfarin, 4'ü (%5.2) enoxaparin, biri (%1.3) klopidogrel kullanmıştır. Bir olguya (%1.3) ruxolitinib ve iki olguya (%2.6) azasitidin uygulanmıştır. Dört olguya (%5.2) splenektomi uygulanmıştır.

Takip süresince olguların 14'ü (%18.2) hayatını kaybetmiştir. Dört olguda (%5.2) seyir sırasında lösemik transformasyon görülmüştür. Olguların tanıdan itibaren ortalama TS 45.61 (SD 47.52) olup 'Kaplan-Meier' analizinde ortalama OS 165 ay (%95 CI: 110-221) olarak saptanmıştır.

**Tablo XXIII. ET ve PMF tanılı olguların klinik ve laboratuvar bulguları**

	<b>ET</b> (mean [SD])	<b>PMF</b> (mean [SD])	<b>Toplam</b> (mean [SD])	<b>P</b> <b>değeri</b>
<b>Olgu sayısı</b>	107	77	184	-
<b>Ortalama yaş</b>	56.3 [14.5]	60.8 [14.5]	58.2 [14.68]	0.647
<b>Tanı sırasındaki yaş</b>	50.5 [15.2]	56.8 [14.4]	53.1 [15.18]	0.327
<b>Örnek alındığı sıradaki yaş</b>	54.9 [14.4]	59.6 [14.3]	56.9 [14.5]	0.616
<b>Kadın (%)</b>	58 (%54.2)	43 (%55.8)	101 (%54.9)	0.826
<b>Tanı sırasındaki lökosit (mm<sup>3</sup>)</b>	9.954 [3.865]	14.552 [13.528]	11.878 [9.478]	0.001*
<b>Tanı sırasındaki Hgb (g/dl)</b>	13.1 [1.9]	10.6 [2.1]	12.1 [2.3]	0.371
<b>Tanı sırasındaki Htc (%)</b>	39.1 [5.61]	32.1 [6.98]	36.2 [7.12]	0.094
<b>Tanı sırasındaki trombosit (mm<sup>3</sup>)</b>	947.253 [408.082]	433.767 [362.244]	732.370 [464.189]	0.931
<b>Tanı sırasındaki LDH (U/L)</b>	456 [153]	828 [394]	612 [334]	0.001*
<b>Tanı sırasındaki dalak boyutu (mm)</b>	137.84 [32.76]	197.64 [43.16]	162.8 [47.65]	0.002*
<b>Kemik iliği fibrozis (%)</b>	107 (%100)	77 (%100)	184 (%100)	0.001*
<b>0</b>	10 (%9.3)	0	10 (%5.4)	-
<b>1</b>	67 (%62.6)	0	67 (%36.4)	-
<b>2</b>	27 (%25.2)	16 (%20.8)	43 (%23.4)	-
<b>3</b>	3 (%2.8)	61 (%79.2)	64 (%34.8)	-
<b>Takip süresi (ay)</b>	69.91 [60.8]	45.61 [47.52]	59.7 [56.7]	0.001*
<b>OS-Kaplan Meier (mean ; %95 CI)</b>	215 (197-233)	165 (110-221)	224 (198-251)	0.001*
* istatistiksel olarak anlamlı p değeri				



**Tablo XXIV. ET ve PMF tanılı olguların klinik ve laboratuvar bulguları (devam)**

	<b>ET n (%)</b>	<b>PMF n (%)</b>	<b>Toplam n (%)</b>	<b>P değeri</b>
<b>Olgu sayısı</b>	107	77	184	-
<b>Lökosit grup</b>	107 (%100)	77 (%100)	184 (%100)	0.001*
<b>&lt; 10.000/mm<sup>3</sup></b>	65 (%60.74)	40 (%51.9)	105 (%57.1)	-
<b>10.000-25.000</b>	41 (%38.31)	25 (%32.5)	66 (%35.9)	-
<b>≥ 25.000</b>	1 (%0.95)	12 (%15.6)	13 (%7)	-
<b>Trombosit grup</b>	107 (%100)	77 (%100)	184 (%100)	0.001*
<b>&lt; 450.000/mm<sup>3</sup></b>	0	49 (%63.6)	49 (%26.6)	-
<b>450.000-600.000</b>	18 (%16.8)	6 (%7.8)	24 (%13.1)	-
<b>600.000-1.000.000</b>	55 (%51.4)	15 (%19.5)	70 (%38.1)	-
<b>≥ 1.000.000</b>	34 (%31.8)	7 (%9.1)	41 (%22.2)	-
<b>Tanı sırasında trombositopeni</b>	0	9 (%11.7)	9 (%4.9)	0.001*
<b>Tanı sırasında LDH yüksekliği</b>	43(%40.2)	64 (%83.1)	107 (%58.2)	0.001*
<b>Splenomegali grup</b>	107 (%100)	77 (%100)	184 (%100)	0.001*
<b>splenomegali yok</b>	67 (%62.6)	1 (%1.3)	68 (%37)	-
<b>hafif splenomegali</b>	22 (%20.6)	17 (%22.1)	39 (%21.2)	-
<b>masif splenomegali</b>	18 (%16.8)	59 (%76.6)	77 (%41.8)	-
<b>Eritrosit transfüzyon ihtiyacı</b>	5 (%4.7)	21 (%27.3)	26 (%14.1)	0.001*
<b>Flebotomi ihtiyacı</b>	5 (%4.7)	1 (%1.3)	6 (%3.3)	0.403
<b>Hidroksiüre</b>	92 (%86)	72 (%93.5)	164 (%89.1)	0.168
<b>Aspirin</b>	93 (%86.9)	47 (%61)	140 (%76.1)	0.001*
<b>AHKHN</b>	0	3 (%3.9)	3 (%1.6)	0.072
<b>Lösemi dönüşüm</b>	0	4 (%5.2)	4 (%2.2)	0.029*
<b>Ölüm</b>	5 (%4.7)	14 (%18.2)	19 (%10.3)	0.006*

**Tablo XXV. ET ve PMF tanılı olguların klinik ve laboratuvar bulguları (devam)**

	<b>ET n (%)</b>	<b>PMF n (%)</b>	<b>Toplam</b>	<b>P değeri</b>
<b>Olgu sayısı</b>	107	77	184	-
<b>Kanama varlığı</b>	13 (%12.1)	15 (%19.5)	28 (%15.2)	0.247
<b>Tromboz varlığı</b>	41 (%38.3)	11 (%14.3)	52 (%28.3)	0.001*
<b>Kardiyovasküler risk</b>	76 (%71)	46 (%59.7)	122 (%66.3)	0.11
<b>Tromboz grup</b>	107 (%100)	77 (%100)	184 (%100)	0.006*
<b>yok</b>	66 (%61.7)	66 (%85.7)	133 (%72.3)	-
<b>arteriyel</b>	21 (%19.6)	7 (%9.1)	28 (%15.2)	-
<b>venöz</b>	18 (%16.8)	3 (%3.9)	20 (%10.9)	-
<b>arteriyel+venöz</b>	2 (%1.9)	1 (%1.3)	3 (%1.6)	-
<b>JAK2V617F mutasyonu</b>	64 (%59.8)	58 (%75.3)	122 (%66.3)	0.028*
<b>JAK2V617F grup</b>	107 (%100)	77 (%100)	184 (%100)	0.001*
<b>mutasyon yok</b>	43 (%40.2)	19 (%24.7)	62 (%33.7)	-
<b>düşük allel yükü</b>	59 (%55.1)	40 (%51.9)	99 (%53.8)	-
<b>yüksek allel yükü</b>	5 (%4.7)	18 (%23.4)	23 (%12.5)	-
<b>ASXL1 mutasyonu</b>	9 (%8.4)	19 (%24.7)	28 (%15.2)	0.005*
<b>IDH mutasyonu (IDH1 veya IDH2)</b>	2 (%1.9)	5 (%6.5)	7 (%3.8)	0.131
<b>JAK2-ASXL1 birliktelik</b>	6 (%5.6)	14 (%18.2)	20 (%10.9)	0.014*
<b>JAK2-IDH birliktelik</b>	1 (%0.9)	3 (%3.9)	4 (%2.2)	0.31
<b>ASXL1-IDH birliktelik</b>	0	3 (%3.9)	3 (%1.6)	0.072

**Tablo XXVI. IDH mutasyonu taşıyan ET tanılı olgularda klinik ve moleküler özellikler**

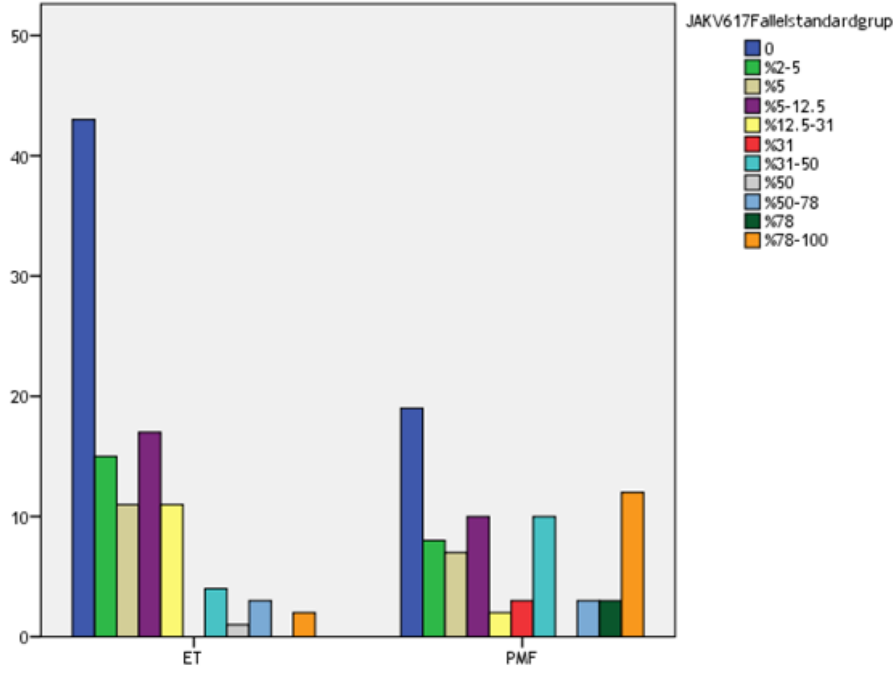
Olgu	Yaş	C	IDH	JAK2V617F	ASXL1	TS	OS	İlaç	Sağkalım
1	55	E	IDH1 R132C	yok	yok	64	64	Hidroksiüre ASA Klopidogrel	Hayatta
2	33	K	IDH2 R140Q	var (%5)	yok	52	60	Hidroksiüre	Hayatta

TS: Takip süresi (ay)  
OS: Tüm yaşam süresi (ay)

**Tablo XXVII. ASXL1 mutasyonu taşıyan ET tanılı olgularda klinik ve moleküler özellikler**

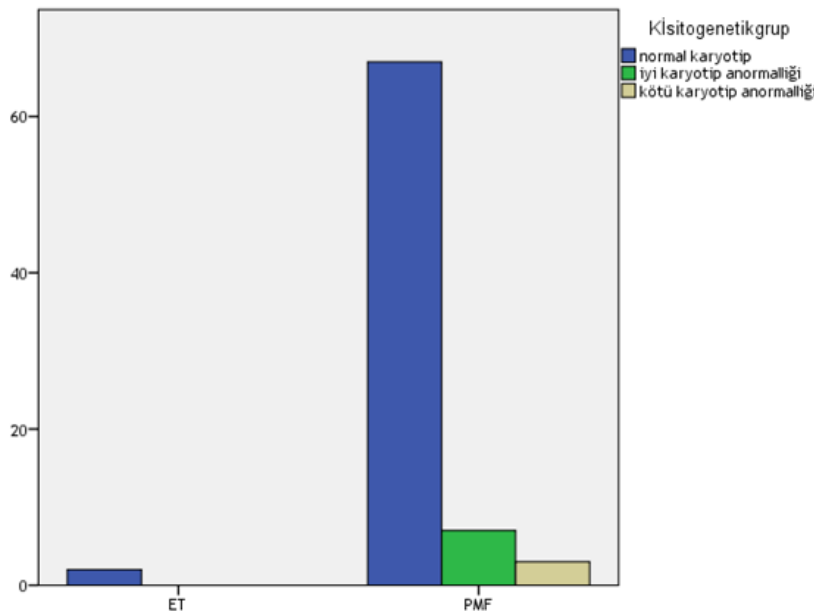
Olgu	Yaş	C	ASXL1	IDH	JAK2V617F	TS	OS	İlaç	Sağkalım
1	53	K	c.1817G>A p.Arg606Gln	yok	var (%5-12.5)	40 ay	40 ay	ASA	Hayatta
2	85	E	c.1954G>A p.G652S	yok	var (%12.5-31)	96 ay	96 ay	Hidroksiüre	Hayatta
3	65	E	c.1954G>A p.G652S	yok	var (%2-5)	40 ay	40 ay	Hidroksiüre ASA	Hayatta
4	80	E	c.1873_1874del p.Arg626GlyfsX8	yok	var (%5-12.5)	41 ay	41 ay	Hidroksiüre ASA	Hayatta
5	47	K	c.1954G>A p.G652S	yok	yok	18 ay	18 ay	Hidroksiüre ASA	Hayatta
6	65	E	c.1934dupG p.G646TrpfsX12	yok	var (%78-100)	75 ay	75 ay	Hidroksiüre ASA	Hayatta
7	64	K	c.1934dupG p.G646TrpfsX12	yok	yok	9 ay	9 ay	Hidroksiüre Enoxaparin	Hayatta
8	70	E	c.1934dupG	yok	yok	27 ay	27 ay	Hidroksiüre ASA	Hayatta
9	36	K	c.1900_1922del p.Glu635ArgfsX15	yok	var (%5-12.5)	94 ay	94 ay	Anagrelid İnterferon ASA	Hayatta

TS: Takip süresi  
OS: Tüm yaşam süresi



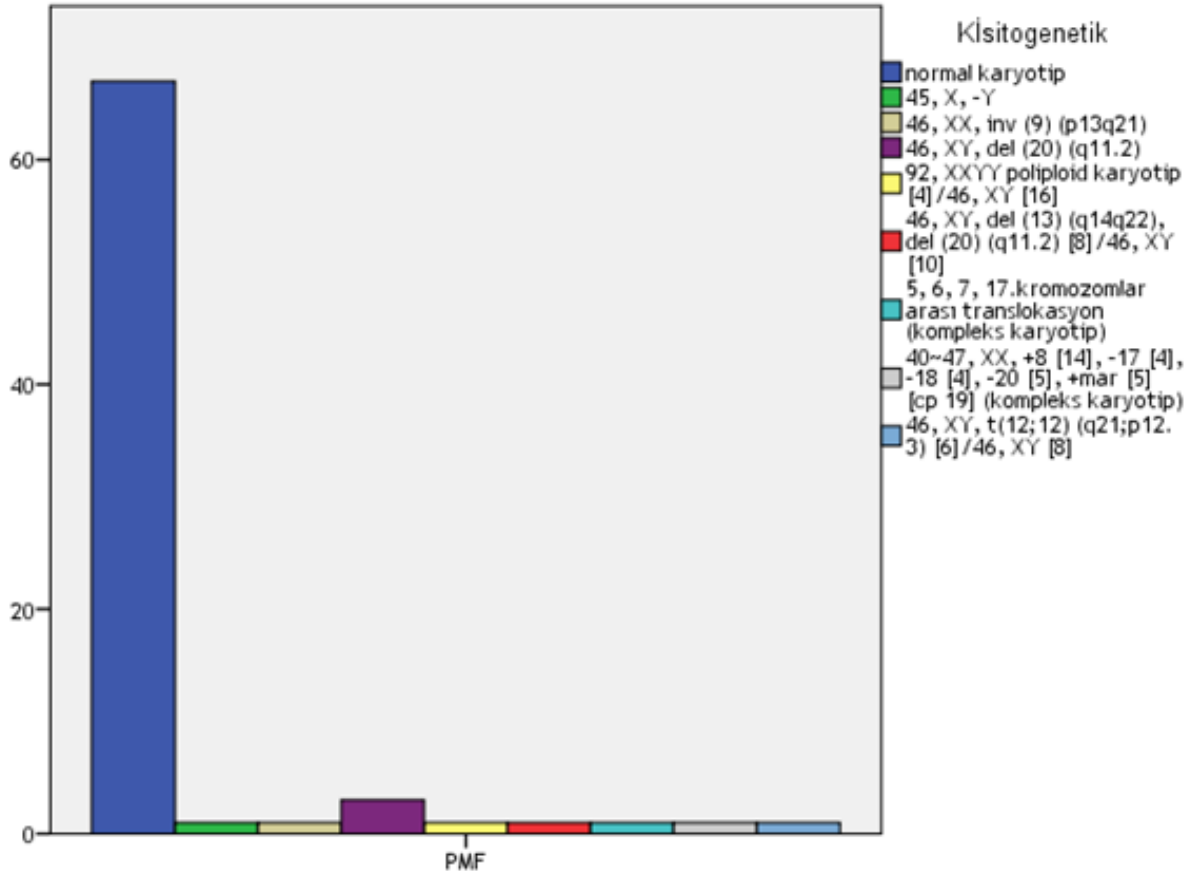
**Şekil XIII. . ET ve PMF olgularında JAK2V617F allel yükünün dağılımı görülmektedir**

ET olgularında ve PMF olgularında sırasıyla %40.2 ve %24.7 oranında JAK2V617F mutasyonu saptanmamıştır. PMF olgularının %13'ünde ve ET olgularının %3.7'sinde JAK2V617F allel yükü %31-50 arasında iken; PMF tanılı olguların %15.6'sında ve ET tanılı olguların %1.9'unda JAK2V617F allel yükü %78-100 arasında saptanmıştır; p=0.001



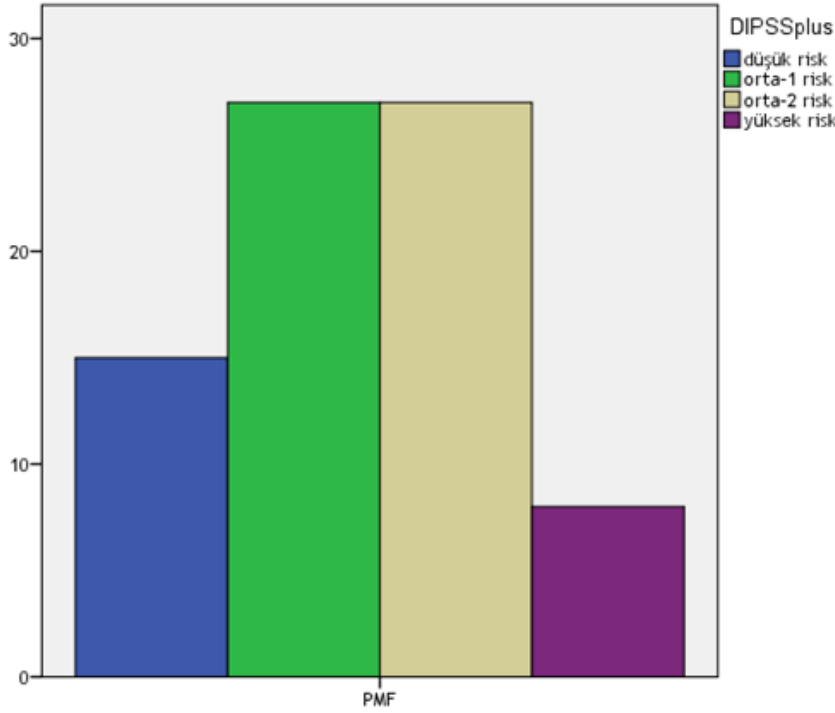
**Şekil XIV. PMF olgularında karyotip anormalliklerin dağılımı görülmektedir**

77 PMF olgusunun 67'sinde (%87) normal karyotip saptanırken 7'sinde (%9.1) iyi karyotip anormalliği ve 3'ünde (%3.9) kötü karyotip anormalliği saptanmıştır



**Şekil XV. PMF olgularında karyotip anormalliklerin dağılımı görülmektedir**

En sık saptanan anormallik 20q delesyonudur



**Şekil XVI. ‘DIPSS-plus’ kriterlerine göre PMF olgularının dağılımı görülmektedir**

PMF tanılı 77 olgunun 15’i (%19.5) düşük risk, 27’si (%35.1) orta-1 risk, 27’si (%35.1) orta-2 risk ve 8’i (%10.4) yüksek risk grubunda saptanmıştır

**Tablo XXVIII. IDH mutasyonu taşıyan PMF tanılı olgularda klinik ve moleküler özellikler**

Olgu	Yaş	C	Karyotip	IDH	JAK2	ASXL1	TS	OS	İlaç	Sağkalım
1*	82	K	normal	IDH1 R132C	yok	c.1954G>A p.G652S	5	5	Hidroksiüre	Ölü
2	59	K	normal	IDH1 R132C	yok	c.1934dupG p.G646TrpfsX12	24	24	Hidroksiüre	Ölü
3	86	K	normal	IDH1 R132C	var (%31-50)	c.1934dupG p.G646TrpfsX12	187	187	Hidroksiüre	Ölü
4	57	K	normal	IDH1 R132S	var (%5-12.5)	yok	284	284	Hidroksiüre	Hayatta
5	37	K	normal	IDH2 R140Q	var (%31-50)	yok	4	4	Hidroksiüre	Hayatta

TS: Takip süresi  
OS: Tüm yaşam süresi  
\* Lösemiye transforme olan olguları göstermektedir

**Tablo XXIX. ASXL1 mutasyonu taşıyan PMF tanılı olgularda klinik ve moleküler özellikler**

Olgu	Yaş	C	Karyotip	ASXL1	IDH	JAK2	TS	OS	İlaç	Sağkalım
1	76	E	normal	c.1934dupG p.Gly646TrpfsX12	yok	var (%5)	24	24	Hidroksiüre ASA	Ölü
2*	82	E	normal	c.1954G>A p.G652S	IDH1-R132C	yok	5	5	Hidroksiüre	Ölü
3	57	E	iyi kar. anormalliği	c.1773C>G p.Tyr591X	yok	var (%31-50)	15	15	Hidroksiüre ASA	Hayatta
4	65	K	normal	c.1954G>A p.G652S	yok	var (%2-5)	36	36	Hidroksiüre ASA	Hayatta
5	70	K	normal	c.1934dupG p.G646TrpfsX12	yok	yok	33	33	Hidroksiüre ASA	Hayatta
6	40	K	normal	c.1934dupG p.G646TrpfsX12	yok	yok	26	26	Hidroksiüre ASA	Hayatta
7	59	K	normal	c.1934dupG p.G646TrpfsX12	IDH1-R132C	yok	24	24	Hidroksiüre ASA	Ölü
8	75	E	normal	c.1934dupG p.G646TrpfsX12	yok	var (%78-100)	36	36	Hidroksiüre ASA	Hayatta
9*	78	E	normal	c.1934dupG p.G646TrpfsX12	yok	var (%31-50)	19	19	Hidroksiüre	Ölü
10	75	K	normal	c.1934dupG p.G646TrpfsX12	yok	var (%5)	48	48	Hidroksiüre	Ölü
11	79	E	normal	c.1900_1922del p.Glu635ArgfsX15	yok	var (%78-100)	36	36	Hidroksiüre ASA	Ölü
12	76	E	normal	c.1934dupG p.G646TrpfsX12	yok	var (%5-12.5)	52	52	Hidroksiüre ASA	Ölü
13	52	E	normal	c.1900_1922del p.Glu635ArgfsX15	yok	var (%78-100)	132	132	Hidroksiüre ASA	Hayatta
14	61	E	normal	c.1900_1922del p.Glu635ArgfsX15	yok	var (%5)	15	15	Oksimetalo n	Hayatta
15	53	K	normal	p.G646TrpfsX12 c.1934dupG	yok	yok	118	118	Hidroksiüre ASA	Hayatta
16	86	K	normal	c.1934dupG p.G646TrpfsX12	IDH1-R132C	var (%31-50)	187	187	Hidroksiüre	Ölü
17	59	E	iyi kar. anormalliği	c.2039G>A p.G680D	yok	var (%12.5-31)	9	9	Hidroksiüre	Hayatta
18	52	E	normal	c.2053G>A p.G685R	yok	var (%50-78)	28	28	Hidroksiüre ASA	Hayatta
19**	83	E	normal	c.1934dupG p.G646TrpfsX12 c.1954G>A p.G652S	yok	var (%5-12.5)	98	98	Hidroksiüre	Hayatta

TS: Takip süresi (ay)

OS: Tüm yaşam süresi (ay)

\* Lösemiye transforme olan olguları göstermektedir.

\*\* 19 nolu olgu çift ASXL1 mutasyonu taşımaktadır.

#### 4.1.3. ET ile PMF grubunun karşılaştırılması:

ET ile PMF olguları karşılaştırıldığı zaman her iki grup arasında ortalama yaş, hastalığın başlangıç yaşı, örneğin alındığı yaş, cinsiyet, trombosit, Hgb değerlerinin ortalamaları açısından fark saptanmamıştır ( $p>0.05$ ). PMF grubunda ortalama Htc değeri ET grubuna göre düşük olma eğiliminde saptanmıştır ( $p=0.094$ ) (Tablo XXIII). PMF olgularında tanı sırasındaki ortalama lökosit sayısı ve LDH düzeyi belirgin yüksek saptanmıştır (sırasıyla  $p=0.001$ ;  $p=0.001$ ). PMF grubunda tanıda LDH yüksekliği olan olgu sayısı ET grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (sırasıyla %83.1, %40.2;  $p=0.001$ ) (Tablo XXIV). Her iki grup kemik iliği fibrozis dağılımları açısından karşılaştırıldığında ET’de grade 1 fibrozis sıklığı ve PMF’de grade 3 fibrozis sıklığı belirgin yüksek saptanmıştır ( $p=0.001$ ). PMF grubunda tanı sırasındaki dalak boyutu ortalaması belirgin yüksek bulunmuştur ( $p=0.002$ ) (Tablo XXIII).

PMF olgularında tanı sırasında masif splenomegali sıklığı, ET’ye göre belirgin yüksek saptanmıştır ( $p=0.001$ ). Tanı sırasında gruplandırılmış trombosit değerleri açısından bakıldığı zaman, PMF grubunda diğer gruba göre trombosit  $< 450.000/mm^3$  olan olgu sayısı fazla iken ET grubunda tanı sırasında ileri derecede trombositoz (trombosit  $\geq 1.000.000/mm^3$ ) varlığı, PMF grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek saptanmıştır ( $p=0.001$ ). Her iki grup arasında lökosit dağılımlarına bakıldığı zaman PMF grubunda diğer gruba göre lökosit sayısı  $\geq 25.000/mm^3$  olan olgu sayısı fazla saptanmıştır ( $p=0.001$ ) (Tablo XXIV).

Olguların seyri sırasında PMF’de eritrosit transfüzyon ihtiyacı ET’ye göre istatistiksel olarak belirgin yüksek bulunmuştur (sırasıyla %27.3, %4.7;  $p=0.001$ ). Her iki grup flebotomi ihtiyacı açısından karşılaştırıldığında belirgin bir fark saptanmamıştır ( $p=0.403$ ) (Tablo XXIV).

ET ile PMF olguları arasında kardiyovasküler risk faktörleri varlığı ve kanama sıklığı açısından istatistiksel anlamlı fark saptanmamıştır (sırasıyla  $p=0.11$ ;  $p=0.247$ ). ET olgularında total tromboz sıklığı PMF grubuna göre anlamlı derecede yüksek saptanmıştır ( $p=0.001$ ). Ayrıca ET grubunda venöz tromboz sıklığı da belirgin derecede yüksektir (sırasıyla %18.6, %5.1,  $p=0.0075$ ). ET grubunda, diğer grupla kıyaslandığında arteriyel tromboz eğilimi daha yüksek bulunmuştur (sırasıyla %21.4, %10.3;  $p=0.07$ ). Bunun yanında gruplar kanama komplikasyonunun dağılımı açısından incelendiğinde ET grubunda en sık gastrointestinal kanama geliştiği (%8.4) ve PMF grubunda gastrointestinal kanama ve mukozal kanamanın eşit sıklıkta görüldüğü anlaşılmıştır (%6.5). Her iki grup arasında kanama lokalizasyonu açısından istatistiksel anlamlı fark saptanmamıştır ( $p=0.212$ ). Her iki grup venöz tromboz



dağılımı açısından incelendiği zaman ET ve PMF grubunda batın içi tromboz sıklığının %11.2 ve %3.9 olduğu, ET grubunda 2.sıklıkta serebral venöz tromboz geliştiği (%3.7) ve PMF grubunda hiç serebral venöz tromboz gelişmediği gözlenmiştir (p=0.08). ET grubunda arteriyel tromboz olarak en sık koroner arter hastalığı ve SVO (sırasıyla %14, %7.4) ve PMF grubunda en sık koroner arter hastalığı ve periferik arter hastalığı geliştiği (sırasıyla %5.2, %3.9) görülmüştür. Her iki grup arasında arteriyel tromboz yerleşimi açısından istatistiksel anlamlı fark saptanmamıştır (p=0.223) (Tablo XXV).

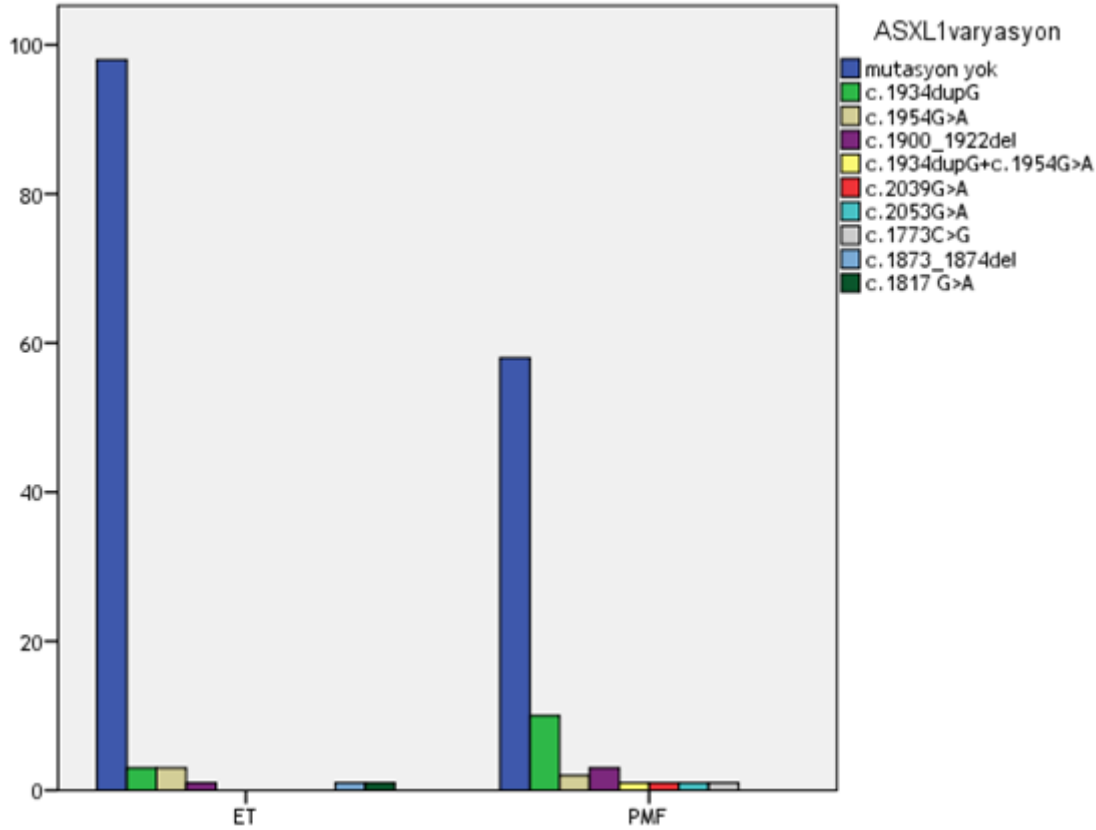
PMF ile ET tanılı olgular JAK2V617F mutasyonunun sıklığı açısından karşılaştırıldığı zaman PMF'deki oran daha yüksek saptanmıştır (sırasıyla %75.3, %59.8; p=0.028). ET olgularında ve PMF olgularında sırasıyla %40.2 ve %24.7 oranında JAK2V617F mutasyonu saptanmamıştır. PMF olgularının %13'ünde ve ET olgularının %3.7'sinde allel yükü %31-50 arasında iken; PMF tanılı olguların %15.6'sında ve ET tanılı olguların %1.9'unda allel yükü %78-100 arasında saptanmıştır; p=0.001) (Şekil XIII).

PMF ile ET olgu grupları IDH mutasyon sıklığı açısından karşılaştırıldığı zaman istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır (sırasıyla %6.5, %1.9; p=0.131). ET ile PMF grubu arasında IDH mutasyonu ile JAK2V617F mutasyonunun birlikteliği açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır (p=0.31) (Tablo XXV).

PMF tanılı olgularda ASXL1 mutasyon sıklığı, ET tanılı olgulara göre anlamlı oranda yüksek saptanmıştır (sırasıyla %24.7, %8.4; p=0.005) (Tablo XXV). PMF grubunda ASXL1 ve JAK2V617F mutasyonu birlikteliği, ET grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulunmuştur (sırasıyla %18.2, %5.6; p=0.014). Bunun yanında ASXL1 mutasyonu ve IDH mutasyonu birlikteliği PMF'de yüksek olma eğiliminde saptanmıştır (sırasıyla %3.9, 0; p=0.072) (Tablo XXV, XIX). ASXL1 mutasyon tiplerinin dağılımına bakıldığı zaman ET'de en sık 2 mutasyon c.1934dupG ve c.1954G>A olmakla beraber (sırasıyla %2.8, %2.8), PMF'de en sık mutasyon c.1934dupG (%14.3) olarak saptanmıştır (p=0.05) (Şekil XVII). ASXL1 mutasyon dağılımına bakıldığı zaman PMF'de nonsense mutasyon (çerçeve kayması mutasyonları dahil) sıklığı, ET grubuna göre anlamlı olarak yüksek saptanmıştır (sırasıyla %18.2, %4.7; p=0.012) (Şekil XVIII).

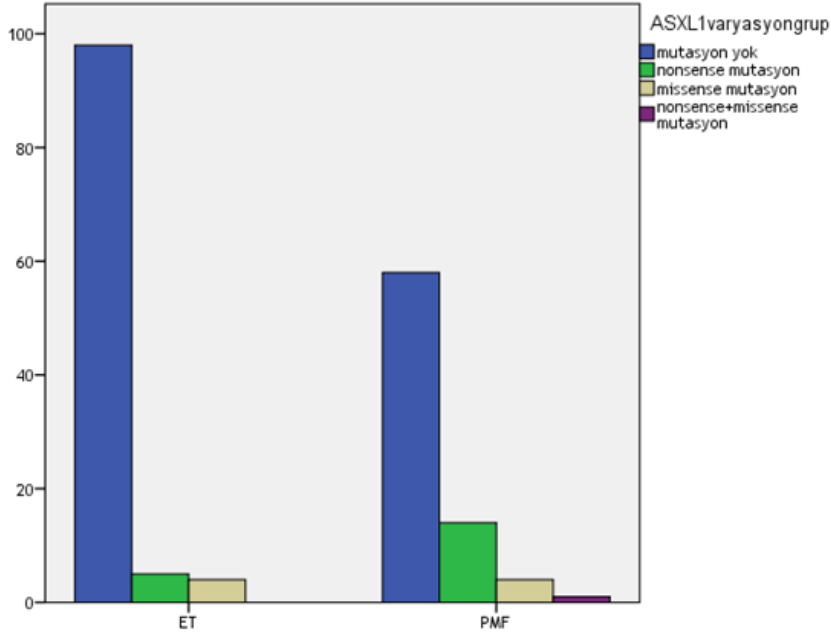
PMF ile ET grubu tedavi açısından karşılaştırıldığı zaman her iki grup arasında splenektomi oranı açısından anlamlı fark saptanmamıştır (sırasıyla %5.2, %1.9; p=0.238). Her iki grup arasında hidroküre kullanımı açısından da istatistiksel anlamlı fark bulunmamıştır (p=0.238). ET grubunda aspirin kullanımı PMF grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (p=0.001). PMF grubunda 3 olguya AHKHN uygulanırken ET grubunda hiçbir olguya uygulanmamıştır (p=0.072) (Tablo XXIV).

Her iki grup ölüm oranları açısından karşılaştırıldığında PMF’de ölüm oranı ET’ye göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek saptanmıştır (sırasıyla %18.2, %4.7;  $p=0.006$ ) (Tablo XXIV). Buna benzer şekilde ‘Kaplan-Meier’ analizi sonucunda PMF’de OS, ET’ye göre belirgin kısa bulunmuştur (sırasıyla ortalama 165 ay; %95 CI: 110-121 ve 215 ay; %95 CI: 197-233;  $p=0.001$ ) (Tablo XXIII) (Şekil XIX). PMF grubunda lösemiye dönüşüm sıklığı %5.2 iken ET grubunda lösemiye dönüşüm olmamıştır ( $p=0.029$ ) (Tablo XXIV). PMF grubunun TS, ET’ye göre belirgin olarak kısa saptanmıştır ( $p=0.001$ ) (Tablo XXIII).



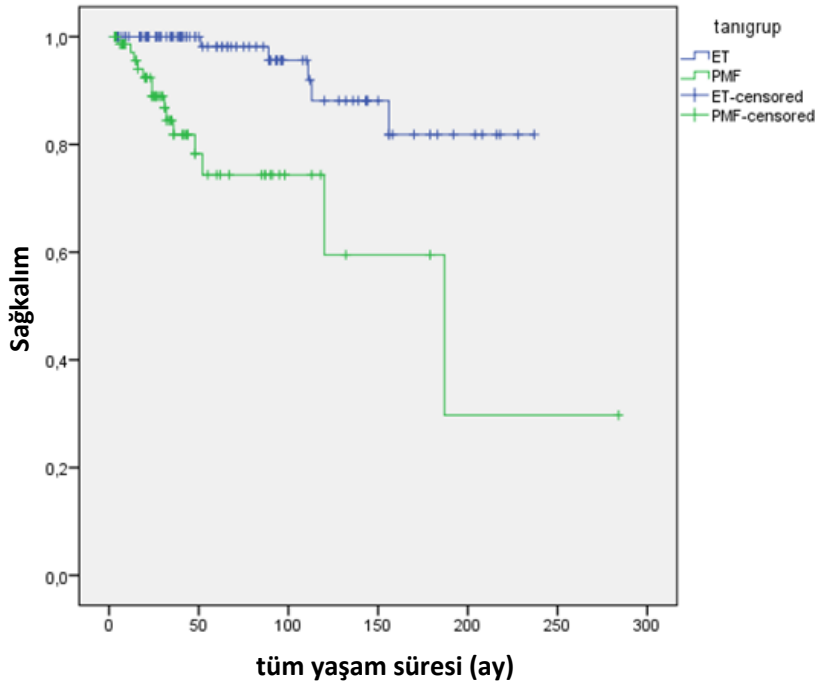
**Şekil XVII. ET ve PMF tanılı olgularda ASXL1 mutasyon tiplerinin dağılımı görülmektedir**

ET’de en sık 2 mutasyon c.1934dupG ve c.1954G>A olmakla beraber (sırasıyla %2.8, %2.8), PMF’de en sık mutasyon c.1934dupG (% 14.3) olarak saptanmıştır ( $p=0.05$ ).



**Şekil XVIII. ASXL1 mutasyon dağılımına bakıldığı zaman PMF’de nonsense mutasyon (çerçeve kayması mutasyonları dahil) sıklığı, ET grubuna göre anlamlı yüksek saptanmıştır (sırasıyla %18.2, %4.7; p=0.012)**

ET’de missense mutasyon sıklığı %3.7 iken PMF’de %5.2 olarak saptanmıştır. PMF tanılı bir olguda ise (%1.3) nonsense ve missense mutasyon birlikteliği görülmektedir.



**Şekil XIX. ET ve PMF olgularında OS’nin ‘Kaplan-Meier’ analizindeki görünümü**

PMF’de OS, ET’ye göre belirgin kısa bulunmuştur (sırasıyla ortalama 165 ay; %95 CI: 110-215 ve 215 ay; %95 CI: 197-233; p=0.001).

## 4.2. ASXL1 (EKZON 12) MUTASYON SONUÇLARI

Çalışmamızda 184 Ph-negatif MPN tanılı olgunun 28'inde (%15.2) toplam 29 ASXL1 (ekzon 12) mutasyonu saptanmıştır (PMF tanılı bir olgumuzda c.1934dupG ve c.1954G>A mutasyon birlikteliği görülmüştür). 29 mutasyonun 14'ü (%48.2) c.1934dupG, 6'sı (%20.6) c.1954G>A ve 4'ü (%13.7) c.1900\_1922 del adlı mutasyonlardan oluşmuştur (Şekil XVII).

### 4.2.1. ASXL1 mutasyonunu taşıyan ile taşımayan ET olgularının karşılaştırılması

ET tanılı 107 olgunun 9'unda (%8.4) ASXL1 geni ekzon 12'de mutasyon saptanmıştır. Beş olguda (%4.7) nonsense mutasyon (çerçeve kayması mutasyonu dahil) ve 4 olguda (%3.7) missense mutasyon saptanmıştır. ET tanılı olgularda ASXL1 geninde saptanan en sık mutasyonlar eşit sıklıkta olan c.1934dupG (n=3) ve c.1954G>A (n=3) mutasyonlarıdır. ET'de ASXL1 mutasyonunun dağılımı Tablo XXVII'de özetlenmiştir.

ASXL1 mutasyonunu taşıyan ET olguları ile taşımayan olguların klinik ve laboratuvar özellikleri Tablo XXX, XXXI ve XXXII'de görülmektedir.

ASXL1 mutant ve ASXL1 wild tip ET olgularında ortalama yaş ve örneğin alındığı sıradaki yaş ortalaması açısından anlamlı bir fark saptanmamıştır (sırasıyla  $p=0.183$ ;  $p=0.144$ ). Tanı sırasındaki yaş ortalamasına bakıldığı zaman ise ASXL1 mutant olgularda tanı sırasındaki yaş ortalaması ileri olma eğiliminde saptanmıştır ( $p=0.073$ ). Her iki grup arasında cinsiyet açısından farklılık gözlenmemiştir ( $p=1$ ).

ASXL1 mutant ET olgularında ASXL1 mutasyonunu taşımayan grup ile karşılaştırıldığı zaman tanı sırasında ortalama Hgb düzeyi, Htc düzeyi ve trombosit değerleri açısından fark saptanmamıştır (sırasıyla  $p=0.346$ ;  $p=0.328$ ;  $p=0.946$ ). Her iki grup arasında tanı sırasındaki ortalama LDH düzeyi açısından da anlamlı fark gözlenmemiştir ( $p=0.606$ ). ASXL1 mutant olgularda tanı sırasında ortalama lökosit değeri yüksek olma eğiliminde saptanmıştır ( $p=0.06$ ).

Her iki grup arasında tanı sırasında lökosit ve trombosit değerlerinin dağılımları açısından istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmemiştir (sırasıyla  $p=0.186$ ;  $p=0.156$ ). ASXL1 mutasyonunu taşıyan grupta LDH yüksekliği olan olgu sayısı, mutasyon taşımayan grupla benzer bulunmuştur (%44.4, %39.8;  $p=1$ ).

Her iki grup kemik iliği fibrozis dağılımları açısından karşılaştırıldığında mutasyon taşıyan grupta kemik iliğinde grade 3 fibrozis oranı mutasyon taşımayan gruba göre anlamlı derecede yüksek saptanmıştır (sırasıyla %22.2, %1;  $p=0.003$ ).

ET olgularında ASXL1 mutasyonunu taşıyan grup ile taşımayan grup karşılaştırıldığı zaman tanı sırasında ortalama dalak boyutu açısından istatistiksel olarak fark saptanmamıştır (p=0.342). Ayrıca her iki grup arasında splenomegali derecesi açısından anlamlı fark gözlenmemiştir (p=0.877).

ASXL1 mutasyonunu taşıyan ve taşımayan ET olguları arasında eritrosit transfüzyon ihtiyacı ve flebotomi sıklığı açısından anlamlı fark saptanmamıştır (p=0.361; p=1).

ASXL1 mutant ile ASXL1 wild tip olgular arasında kardiyovasküler risk faktörleri ve total tromboz sıklığı açısından anlamlı bir fark saptanmamıştır (sırasıyla p=1; p=0.73). Her iki grup arteriyel ve venöz tromboz varlığı açısından ayrı ayrı değerlendirildiği zaman da istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır (sırasıyla p=0.416; p=1). Ayrıca her iki grup arasında kanama sıklığı ve kanama lokalizasyonu açısından da istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir (sırasıyla p=1; p=0.994). Her iki grup arteriyel tromboz lokalizasyonu açısından değerlendirildiğinde ASXL1 mutant grupta %11.1 oranında koroner arter hastalığı, %11.1 oranında SVO ve %11.1 oranında SVO ile birlikte periferik arter hastalığı, ASXL1 wild tip olgularda %10.2 oranında koroner arter hastalığı ve %5.1 oranında SVO varlığı gözlenmiştir (p=0.059) (Şekil XX). Gruplar arasında venöz tromboz lokalizasyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir (p=0.184).

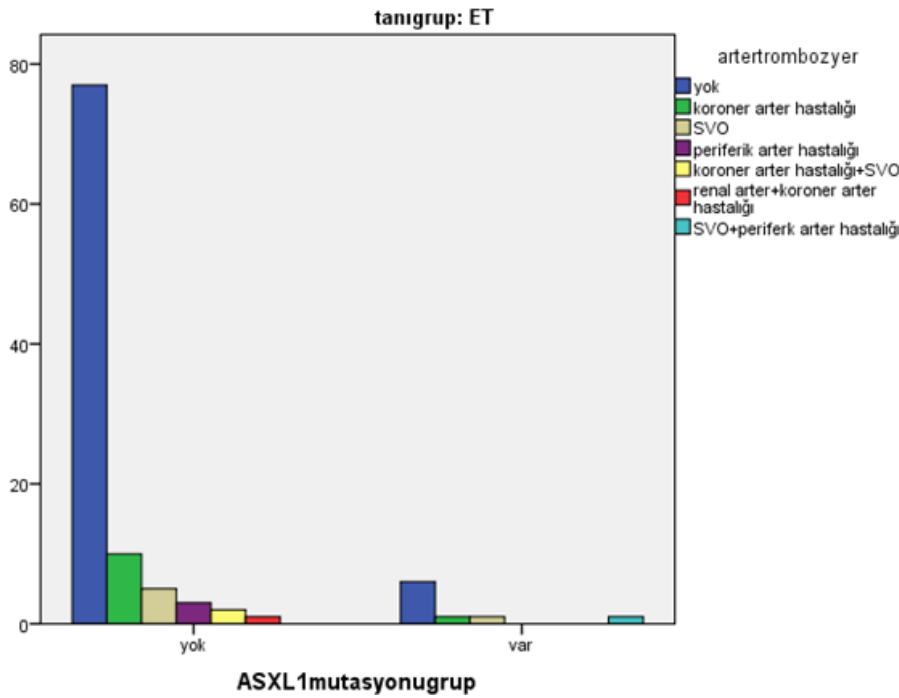
ASXL1 mutant ET olguları ile ASXL1 wild tip ET olguları JAK2V617F mutasyonunun sıklığı açısından karşılaştırıldığı zaman her 2 grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (sırasıyla %66.7, %59.2; p=0.738). ASXL1 mutant ET ve wild tip ET olgularının altı ölçekli standarda göre JAK2V617F allel yük dağılımlarına bakıldığı zaman mutant gruptaki allel yükün çoğunlukla %5-12.5 arasında olduğu, ASXL1 mutasyonu taşımayan grupta ise JAK2V617F allel yükünün %2-5 ve %5-12.5 arasında eşit sıklıkta olduğu gözlenmiştir (p=0.405). ASXL1 mutant ET ve ASXL1 wild tip ET arasında yüksek JAK2V617F allel yüküne sahip olgu sıklığı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (sırasıyla %11.1, %4.1; p=0.611).

ASXL1 mutasyonunu taşıyan ile ASXL1 mutasyonu olmayan ET tanılı olgular arasında IDH mutasyon sıklığı açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır (sırasıyla 0, %2; p=0.838). Ayrı ayrı değerlendirildiği zaman ASXL1 mutasyonunu taşıyan ve taşımayan grup arasında IDH1 ve IDH2 sıklığı açısından anlamlı bir fark saptanmamıştır (sırasıyla p=1; p=1). ASXL1 mutant ET tanılı hiçbir olguda IDH mutasyonu ve JAK2V617F mutasyonu birlikteliği gözlenmezken ASXL1 wild tip olan tek bir olguda IDH mutasyonu ve JAK2V617F mutasyonu birlikteliği saptanmıştır (sırasıyla 0, %1; p=1).

ASXL1 mutant ET olguları ile ASXL1 wild tip ET olguları arasında splenektomi oranı açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır (p=1). Ayrıca her iki grup arasında hidroksiüre kullanımı açısından anlamlı fark saptanmamıştır (p=0.611). Her iki grup arasında farklı ilaç kullanımları açısından da anlamlı fark saptanmamıştır (p>0.05). ASXL1 mutasyonundan biri, ET'de hiçbir sitoredüktif tanı almamış olan 53 yaşındaki bir kadın olguda gözlenmiştir (Tablo XXVII).

ASXL1 mutant ve wild tip ET olguları arasında ölüm oranı açısından anlamlı bir fark gözlenmemiştir (sırasıyla 0, %5.1, p=1). Her iki grup arasında TS açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır (p=0.559). Kaplan-Meier analizi sonucunda ASXL1 mutant tip ET olguları ile ASXL1 wild tip ET olguları arasında OS açısından anlamlı bir fark saptanmamıştır (p=0.737).

Korelasyon analizi sonucunda ET'de ASXL1 mutasyonu ile tanı sırasındaki Htc, lökosit, trombosit, LDH düzeyi, dalak boyutu ortalaması, kanama komplikasyonu, total tromboz, arteriyel tromboz ve venöz tromboz arasında ilişki saptanmamıştır (r<0.2).



**Şekil XX. ASXL1 mutant ve wild tip ET olgularında arteriyel tromboz sıklığı açısından fark saptanmamıştır (sırasıyla %33.3, %20.4; p=0.416)**

Fakat her iki grup arteriyel tromboz lokalizasyonu açısından değerlendirildiğinde ASXL1 mutant grupta %11.1 oranında koroner arter hastalığı, %11.1 oranında SVO ve %11.1 oranında SVO ile birlikte periferik arter hastalığı, ASXL1 wild tip olgularda %10.2 oranında koroner arter hastalığı ve %5.1 oranında SVO varlığı gözlenmiştir. Bunun sonucunda ASXL1 mutasyonunu taşıyan grupta SVO eğiliminin daha yüksek olduğu söylenebilir (p=0.059).

**Tablo XXX. ASXL1 mutasyonunu taşıyan ve taşımayan ET tanılı olguların klinik ve laboratuvar bulguları**

<b>ET</b>	<b>ASXL1 mutant (mean [SD])</b>	<b>ASXL1 wild tip (mean [SD])</b>	<b>P değeri</b>
<b>Olgu sayısı</b>	9	98	-
<b>Ortalama yaş</b>	62.7 [15.4]	55.7 [14.4]	0.183
<b>Tanı sırasındaki yaş</b>	59.3 [14.3]	49.7 [15.1]	0.073
<b>Örnek alındığı sıradaki yaş</b>	61.7 [15.8]	54.3 [14.2]	0.144
<b>Kadın (%)</b>	5 (%55.6)	53 (%54.1)	1
<b>Tanı sırasındaki lökosit (mm<sup>3</sup>)</b>	11.407 [3.448]	9.820 [3.890]	0.06
<b>Tanı sırasındaki Hgb (g/dl)</b>	12.3 [2.5]	13.2 [1.8]	0.346
<b>Tanı sırasındaki Htc (%)</b>	36.7 [7.2]	39.4 [5.4]	0.328
<b>Tanı sırasındaki trombosit (mm<sup>3</sup>)</b>	878.111 [322.633]	953.603 [415.828]	0.946
<b>Tanı sırasındaki LDH (U/L)</b>	471.1 [135.5]	455.4 [155.3]	0.606
<b>Tanı sırasındaki dalak boyutu (mm)</b>	142.6 [28.16]	137.4 [33.2]	0.342
<b>Kemik iliği fibrozis (%)</b>	9 (%100)	98 (%100)	0.003*
<b>0</b>	1 (%11.1)	9 (%9.2)	-
<b>1</b>	4 (%44.5)	63 (%64.3)	-
<b>2</b>	2 (%22.2)	25 (%25.5)	-
<b>3</b>	2 (%22.2)	1 (%1)	-
<b>Takip süresi (ay)</b>	48.8 [31.9]	71.8 [62.5]	0.559

**Tablo XXXI. ASXL1 mutasyonunu taşıyan ve taşımayan ET tanılı olguların klinik ve laboratuvar bulguları (devam)**

<b>ET</b>	<b>ASXL1 mutant n (%)</b>	<b>ASXL1 wild tip n (%)</b>	<b>P değeri</b>
<b>Olgu sayısı</b>	9	98	-
<b>Lökosit grup</b>	9 (%100)	98 (%100)	0.186
<b>&lt; 10.000/mm<sup>3</sup></b>	3 (%33.3)	62 (%63.3)	-
<b>10.000-25.000</b>	6 (%66.7)	35 (%35.7)	-
<b>≥ 25.000</b>	0	1 (%1)	-
<b>Trombosit grup</b>	9 (%100)	98 (%100)	0.156
<b>&lt; 450.000/mm<sup>3</sup></b>	0	0	-
<b>450.000-600.000</b>	3 (%33.3)	15 (%15.3)	-
<b>600.000-1.000.000</b>	2 (%22.2)	53 (%54.1)	-
<b>≥ 1.000.000</b>	4 (%44.4)	30 (%30.6)	-
<b>Tamı sırasında LDH yüksekliği</b>	4 (%44.4)	39 (%39.8)	1
<b>Splenomegali grup</b>	9 (%100)	98 (%100)	0.877
<b>splenomegali yok</b>	5 (%55.6)	62 (%63.3)	-
<b>hafif splenomegali</b>	2 (%22.2)	20 (%20.4)	-
<b>masif splenomegali</b>	2 (%22.2)	16 (%16.3)	-
<b>Eritrosit transfüzyon ihtiyacı</b>	1 (%11.1)	4 (%4.1)	0.361
<b>Flebotomi ihtiyacı</b>	0	5 (%5.1)	1
<b>Hidroksiüre</b>	7 (%77.8)	85 (%86.7)	0.611
<b>Splenektomi</b>	0	2 (%2)	1
<b>Lösemi dönüşüm</b>	0	0	-
<b>Ölüm</b>	0	5 (%5.1)	1



**Tablo XXXII. ASXL1 mutasyonunu taşıyan ve taşımayan ET tanılı olguların klinik ve laboratuvar bulguları (devam)**

<b>ET</b>	<b>ASXL1 mutant n (%)</b>	<b>ASXL1 wild tip n (%)</b>	<b>P değeri</b>
<b>Olgu sayısı</b>	9	98	-
<b>Kanama varlığı</b>	1 (%11.1)	12 (%12.2)	1
<b>Tromboz varlığı</b>	4 (%44.4)	37 (%37.8)	0.73
<b>Kardiyovasküler risk</b>	7 (%77.8)	69 (%70.4)	1
<b>Tromboz grup</b>	9 (%100)	98 (%100)	0.719
<b>yok</b>	5 (%55.6)	62 (%63.3)	-
<b>arteriyel</b>	3 (%33.3)	18 (%18.4)	-
<b>venöz</b>	1 (%11.1)	16 (%16.3)	-
<b>arteriyel+venöz</b>	0	2 (%2)	-
<b>JAK2V617F mutasyonu</b>	6 (%66.7)	58 (%59.2)	0.738
<b>JAK2V617F grup</b>	9 (%100)	98 (%100)	0.611
<b>mutasyon yok</b>	3 (%33.3)	40 (%40.8)	
<b>düşük allel yükü</b>	5 (%55.6)	54 (%55.1)	
<b>yüksek allel yükü</b>	1 (%11.1)	4 (%4.1)	
<b>IDH1 mutasyonu</b>	0	1 (%1)	1
<b>IDH2 mutasyonu</b>	0	1 (%1)	1
<b>IDH mutasyonu (IDH1 veya IDH2)</b>	0	2 (%2)	0.838
<b>JAK2-IDH birliktelik</b>	0	1 (%1)	1

#### 4.2.2. ASXL1 mutasyonunu taşıyan ile taşımayan PMF olgularının karşılaştırılması

PMF olgularının 19'unda (%24.7) ASXL1 geni ekzon 12'de mutasyon saptanmıştır. 14 olguda (%18.2) nonsense mutasyon (çerçeve kayması mutasyonu dahil), 4 olguda (%5.2) missense mutasyon ve bir olguda (%1.3) missense ve nonsense mutasyon birlikteliği gözlenmiştir. PMF grubunda ASXL1 geninde saptanan en sık mutasyon c.1934dupG (n=11) ve takiben c.1900\_1922 del (n=3) mutasyonudur. c.1934dupG taşıyan olgulardan birine eş zamanlı c.1954G>A mutasyonunun eşlik ettiği tespit edilmiştir. PMF olgularında ASXL1 mutasyonunun dağılımı Tablo XXIX'da özetlenmiştir.

ASXL1 mutasyonunu taşıyan olgular ile taşımayan olguların klinik ve laboratuvar özellikleri Tablo XXXIII, XXXIV ve XXXV'de görülmektedir.

ASXL1 mutant PMF olgularında ortalama yaş, tanı sırasındaki yaş ve örneğin alındığı sıradaki yaş, ASXL1 wild tip PMF olgularına göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (p=0.037; p=0.029; p=0.034). Her iki grup arasında cinsiyet açısından anlamlı farklılık gözlenmemiştir (p=0.261).

ASXL1 mutant PMF olgularında ASXL1 mutasyonunu taşımayan grup ile karşılaştırıldığı zaman tanı sırasında ortalama lökosit sayısı, Hgb düzeyi, Htc düzeyi, trombosit değeri ve serum LDH düzeyi açısından fark saptanmamıştır (sırasıyla p=0.855; p=0.859; p=0.615; p=0.531; p=0.101).

Her iki grup arasında tanı sırasında lökosit ve trombosit değerlerinin dağılımları açısından istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmemiştir (sırasıyla p=0.196; p=0.313). ASXL1 mutasyonunu taşıyan grupta LDH yüksekliği olan olgu sıklığı, mutasyonu taşımayan grupla benzer bulunmuştur (sırasıyla %84.2; %82.8; p=1). ASXL1 mutasyonunu taşıyan grupla taşımayan grup arasında tanı sırasında trombositopeni sıklığı açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir (sırasıyla %5.3, %13.8; p=0.438).

Her iki grup arasında kemik iliği fibrozis derecesi açısından anlamlı fark saptanmamıştır (p=0.747). ASXL1 mutant olgularda tanı sırasındaki dalak boyutu ortalaması diğer grupla farklılık göstermemiştir (p=0.193).

ASXL1 mutant ile wild tip PMF olgularında karyotip anormalliklerinin dağılımı açısından anlamlı fark gözlenmemiştir (p=0.589) (Tablo XXXVI). ASXL1 mutant PMF olguları ile mutasyonu taşımayan PMF olgularının 'DIPSS-plus' kriterlerine göre risk dağılımlarında anlamlı bir fark saptanmamıştır (p=0.803) (Tablo XXXVI).

PMF olgularında ASXL1 mutasyonunu taşıyan grup ile taşımayan grup karşılaştırıldığı zaman tanı sırasındaki dalak boyutu ortalaması açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (p=0.193). ASXL1 mutasyonunu taşıyan ile taşımayan PMF olguları karşılaştırıldığında tanı sırasında splenomegali derecesi açısından istatistiksel anlamlı farklılık gözlenmemiştir (p=0.755).

ASXL1 mutasyonunu taşıyan PMF ile taşımayan PMF olguları arasında flebotomi ihtiyacı ve eritrosit transfüzyon ihtiyacı açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır (sırasıyla p=0.247; p=0.85).

ASXL1 mutant ile ASXL1 wild tip olgular arasında kardiyovasküler risk faktörleri varlığı, total tromboz, arteriyel tromboz ve venöz tromboz sıklığı açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır (sırasıyla p=0.936; p=1; p=0.437; p=0.567). Her iki grup arasında arteriyel tromboz ve venöz tromboz lokalizasyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır (p=0.591; p=0.501).

ASXL1 mutant olgularda kanama sıklığı diğer gruba göre anlamlı derecede yüksek saptanmıştır (sırasıyla %42.1, %12.1; p=0.008). Her iki grup kanama lokalizasyonu açısından değerlendirildiğinde ASXL1 mutant PMF olgularında gastrointestinal kanama sıklığı %21.1 iken ASXL1 mutasyonunu taşımayan olgularda %1.7 saptanmıştır. ASXL1 mutant olguların %10.5'inde intrakranial kanama gözlenirken, ASXL1 mutasyonunu taşımayan PMF olgularında hiç rastlanmamıştır (p=0.001) (Şekil XXI).

ASXL1 mutant PMF olguları ile ASXL1 wild tip PMF olguları JAK2V617F mutasyonunun sıklığı açısından karşılaştırıldığı zaman her 2 grup arasında istatistiksel anlamlı bir fark saptanmamıştır (sırasıyla %73.7, %75.9; p=1). ASXL1 mutant PMF ve wild tip PMF olgularının altı ölçekli standarda göre JAK2V617F allel yük dağılımlarına bakıldığı zaman ASXL1 mutasyonunu taşımayan grupta allel yükün sıklıkla %78-100 arasında olduğu ve mutant gruptaki allel yükün %5 düzeyinde ve %31-50 arasında eşit sıklıkta olduğu gözlenmiştir (p=0.838). ASXL1 mutant PMF ile ASXL1 wild tip PMF arasında yüksek JAK2V617F allel yüküne sahip olgu sıklığı açısından anlamlı bir fark saptanmamıştır (sırasıyla %21.1, %24.2; p=0.957).

ASXL1 mutasyonu olan PMF grubunda mutasyon olmayan grup ile karşılaştırıldığında IDH mutasyon (IDH1 veya IDH2) sıklığı yüksek olma eğilimindedir (sırasıyla %15.8, %3.4; p=0.093). ASXL1 mutant PMF grubunda 3 olguda IDH1 mutasyonuna rastlanırken (IDH1 R132C), ASXL1 mutasyonunu taşımayan PMF grubunda 1 olguda IDH1 mutasyonu (IDH1 R132S) saptanmıştır (sırasıyla %15.8, %1.7, p=0.044). Sonuç olarak ASXL1 mutasyonunu taşıyan PMF grubunda ASXL1 mutasyonu olmayan gruba göre

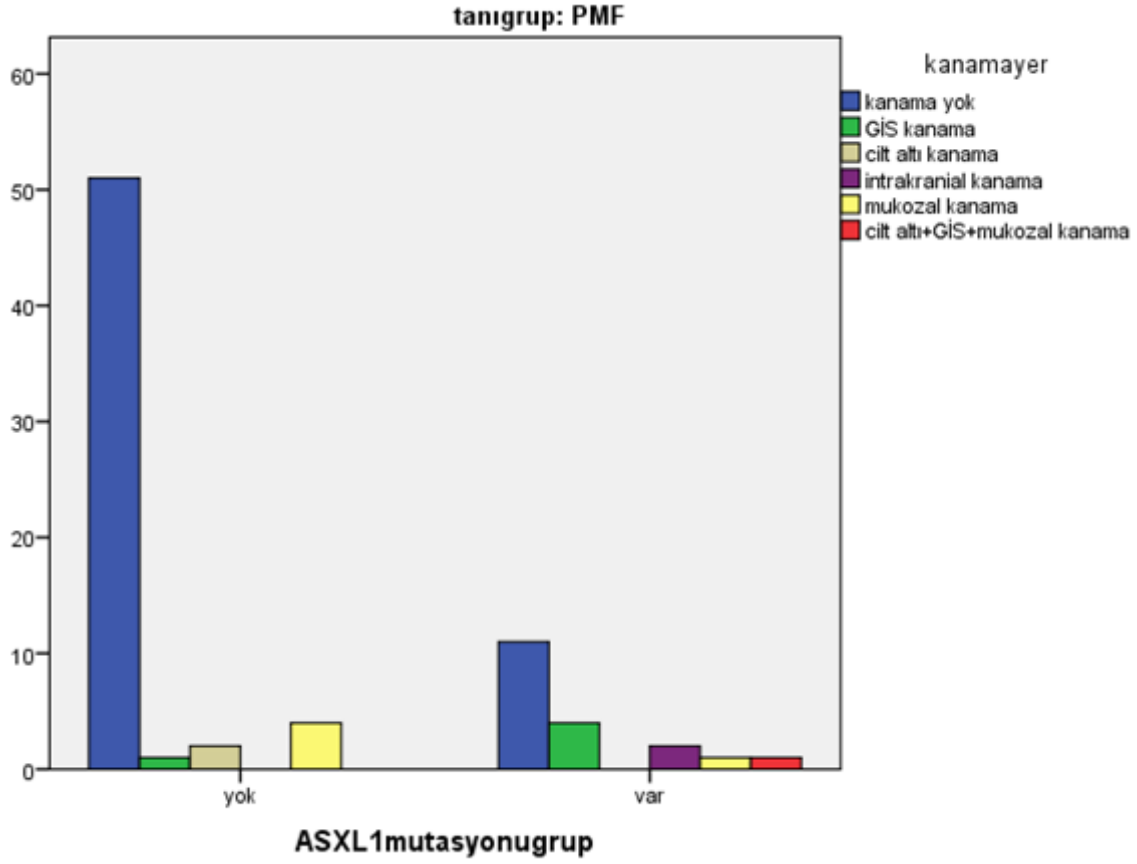
IDH1 sıklığı anlamlı derecede yüksek saptanmıştır ( $p=0.044$ ). ASXL1 mutant ile wild tip PMF grubu arasında IDH2 mutasyon sıklığı açısından anlamlı fark saptanmamıştır ( $p=1$ ). ASXL1 mutant PMF olguları ile ASXL1 wild tip olgular arasında IDH mutasyonu ve JAK2V617F mutasyonu birlikteliği açısından fark saptanmamıştır (sırasıyla %5.3, %3.4;  $p=1$ ).

ASXL1 mutant PMF olguları ile ASXL1 wild tip PMF olguları arasında splenektomi oranı açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir ( $p=0.567$ ). Her iki grup arasında hidroksiüre kullanımı açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır ( $p=0.802$ ). Her iki grup arasında diğer ilaçlarının kullanımı açısından da istatistiksel anlamlı bir fark saptanmamıştır ( $p>0.05$ ). PMF tanılı 61 yaşında hiç sitoredüktif tedavi almamış ve sadece oksimetalon kullanan bir erkek olguda da ASXL1 mutasyonuna rastlanmıştır (Tablo XXIX).

ASXL1 mutasyonunu taşıyan PMF olguları ile taşımayan olgular arasında AHKHN açısından anlamlı fark saptanmamıştır ( $p=0.571$ ) (Tablo XXXIV).

ASXL1 mutant tip PMF olgularında ölüm oranı ASXL1 wild tip PMF olgularına göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek saptanmıştır (%42.1, %10.3;  $p=0.004$ ). ASXL1 mutasyonunu taşıyan ve ASXL1 mutasyonu bulunmayan olgular arasında lösemik dönüşüm oranı açısından anlamlı bir fark saptanmamıştır (sırasıyla %10.5, %3.4;  $p=0.253$ ). Her iki grup arasında TS açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır ( $p=0.382$ ). ‘Kaplan-Meier analizi’ sonucunda ASXL1 mutasyonunu taşıyan PMF olgularında OS, ASXL1 mutasyonunu taşımayan olgulara göre anlamlı derecede kısa saptanmıştır (sırasıyla ortalama 108 ay; %95 CI: 62-153 ve 202 ay; %95 CI: 123-282;  $p=0.025$ ).

Korelasyon analizi sonucunda PMF olgu grubunda ASXL1 mutasyonu varlığı ile kanama komplikasyonu arasında pozitif yönde hafif dereceli bir ilişki saptanmıştır ( $r=0.327$ ). PMF’de ASXL1 mutasyonu ile tanı sırasındaki Htc, lökosit, trombosit, LDH düzeyi, dalak boyutu ortalaması, total tromboz, arteriyel tromboz ve ven trombozu arasında korelasyon saptanmamıştır ( $r<0.2$ ). PMF’de ASXL1 mutasyonu ile IDH mutasyonu arasında pozitif yönde zayıf bir ilişki saptanmıştır ( $r=0.216$ ).



**Şekil XXI. ASXL1 mutasyonunu taşıyan ve taşımayan PMF olgularındaki kanama dağılımı görülmektedir**

Her iki grup kanama lokalizasyonu açısından değerlendirildiğinde ASXL1 mutant PMF olgularında gastrointestinal kanama sıklığı %21.1 iken ASXL1 mutasyonunu taşımayan olgularda %1.7 saptanmıştır. ASXL1 mutant olguların %10.5'inde intrakranial kanama gözlenirken, ASXL1 mutasyonunu taşımayan PMF olgularında intrakranial kanamaya hiç rastlanmamıştır (p=0.001). Bundan yola çıkarak ASXL1 mutant olgularda kanamanın hayati organlarda görülme sıklığının daha yüksek olduğu söylenebilir.

**Tablo XXXIII. ASXL1 mutasyonunu taşıyan ve taşımayan PMF tanılı olguların klinik ve laboratuvar bulguları**

<b>PMF</b>	<b>ASXL1 mutant (mean [SD])</b>	<b>ASXL1 wild tip (mean [SD])</b>	<b>P değeri</b>
<b>Olgu sayısı</b>	19	58	-
<b>Ortalama yaş</b>	67.2 [13]	58.7 [14.5]	0.037*
<b>Tanı sırasındaki yaş</b>	62.5 [13]	54.9 [14.5]	0.029*
<b>Örnek alındığı sıradaki yaş</b>	65.8 [13]	57.5 [14.2]	0.034*
<b>Kadın (%)</b>	8 (%42.1)	35 (%60.3)	0.261
<b>Tanı sırasındaki lökosit (mm<sup>3</sup>)</b>	17.547 [19.903]	13.571 [10.722]	0.855
<b>Tanı sırasındaki Hgb (g/dl)</b>	10.6 [1.8]	10.6 [2.3]	0.859
<b>Tanı sırasındaki Htc (%)</b>	31.2 [6.05]	32.4 [7.29]	0.615
<b>Tanı sırasındaki trombosit (mm<sup>3</sup>)</b>	459.000 [348.092]	425.501 [369.345]	0.531
<b>Tanı sırasındaki LDH (U/L)</b>	949 [411]	789 [383]	0.101
<b>Tanı sırasındaki dalak boyutu (mm)</b>	192.4 [53.2]	199.3 [39.7]	0.193
<b>Kemik iliği fibrozis (%)</b>	19 (%100)	58 (%100)	0.747
<b>0</b>	0	0	-
<b>1</b>	0	0	-
<b>2</b>	3 (%15.8)	13 (%22.4)	-
<b>3</b>	16 (%84.2)	45 (%77.6)	-
<b>Takip süresi (ay)</b>	51.5 [48.6]	43.6 [47.4]	0.382
<b>OS-Kaplan Meier (mean, ay)</b>	108 ay (%95 CI: 62-153)	202 ay (%95 CI: 123-282)	0.025*

**Tablo XXXIV. ASXL1 mutasyonunu taşıyan ve taşımayan PMF tanılı olguların klinik ve laboratuvar bulguları (devam)**

<b>PMF</b>	<b>ASXL1 mutant n (%)</b>	<b>ASXL1 wild tip n (%)</b>	<b>P değeri</b>
<b>Olgu sayısı</b>	19	58	-
<b>Lökosit grup</b>	19 (%100)	58 (%100)	0,196
<b>&lt; 10.000/mm<sup>3</sup></b>	12 (%63.2)	28 (%48.3)	-
<b>10.000-25.000</b>	3 (%15.8)	22 (%37.9)	-
<b>≥ 25.000</b>	4 (%21.1)	8 (%13.8)	-
<b>Trombosit grup</b>	19 (%100)	58 (%100)	0.313
<b>&lt; 450.000/mm<sup>3</sup></b>	10 (%52.6)	39 (%67.2)	-
<b>450.000-600.000</b>	3 (%15.8)	3 (%5.2)	-
<b>600.000-1.000.000</b>	5 (%26.3)	10 (%17.2)	-
<b>≥ 1.000.000</b>	1 (%5.3)	6 (%10.3)	-
<b>Tanı sırasında trombositopeni</b>	1 (%5.3)	8 (%13.8)	0.438
<b>Tanı sırasında LDH yüksekliği</b>	16 (%84.2)	48 (%82.8)	1
<b>Splenomegali grup</b>	19 (%100)	58 (%100)	0.755
<b>splenomegali yok</b>	0	1 (%1.7)	-
<b>hafif splenomegali</b>	5 (%26.3)	12 (%20.7)	-
<b>masif splenomegali</b>	14 (%73.7)	45 (%77.6)	-
<b>Eritrosit transfüzyon ihtiyacı</b>	6 (%31.6)	15 (%25.9)	0.85
<b>Flebotomi ihtiyacı</b>	1 (%5.3)	0	0.247
<b>Hidroksiüre</b>	18 (%94.7)	54 (%93.1)	0.802
<b>Splenektomi</b>	0	4 (%6.9)	0.567
<b>AHKHN</b>	0	3 (%5.2)	0.571
<b>Lösemi dönüşüm</b>	2 (%10.5)	2 (%3.4)	0.253
<b>Ölüm</b>	8 (%42.1)	6 (%10.3)	0.004*

**Tablo XXXV. ASXL1 mutasyonunu taşıyan ve taşımayan PMF tanılı olguların klinik ve laboratuvar bulguları (devam)**

<b>PMF</b>	<b>ASXL1 mutant n (%)</b>	<b>ASXL1 wild tip n (%)</b>	<b>P değeri</b>
<b>Olgu sayısı</b>	19	58	-
<b>Kanama varlığı</b>	8 (%42.1)	7 (%12.1)	0.008*
<b>Tromboz varlığı</b>	3 (%15.8)	8 (%13.8)	1
<b>Kardiyovasküler risk varlığı</b>	12 (%63.2)	34 (%58.6)	0.936
<b>Tromboz grup</b>	19 (%100)	58 (%100)	0.464
<b>yok</b>	16 (%84.2)	50 (%86.2)	-
<b>arteriyel</b>	3 (%15.8)	4 (%6.9)	-
<b>venöz</b>	0	3 (%5.2)	-
<b>arteriyel+venöz</b>	0	1 (%1.7)	-
<b>JAK2V617F mutasyonu</b>	14 (%73.7)	44 (%75.9)	1
<b>JAK2V617F grup</b>	19 (%100)	58 (%100)	0.957
<b>mutasyon yok</b>	5 (%26.3)	14 (%24.1)	-
<b>düşük allel yükü</b>	10 (%52.6)	30 (%51.7)	-
<b>yüksek allel yükü</b>	4 (%21.1)	14 (%24.2)	-
<b>IDH1 mutasyonu</b>	3 (%15.8)	1 (%1.7)	0.044*
<b>IDH2 mutasyonu</b>	0	1 (%1.7)	1
<b>IDH mutasyonu (IDH1 veya IDH2)</b>	3 (%15.8)	2 (%3.4)	0.093
<b>JAK2-IDH birliktelik</b>	1 (%5.3)	2 (%3.4)	1



**Tablo XXXVI. ASXL1 mutasyonunu taşıyan ve ASXL1 mutasyonu olmayan PMF olgularının kemik iliği sitogenetik ve ‘DIPSS-plus’ kriterlerine göre karşılaştırılması**

PMF	ASXL1 mutant n (%)	ASXL1 wild tip n (%)	P değeri
<b>Olgu sayısı</b>	19	58	-
<b>Karyotip</b>	19 (%100)	58 (%100)	0.589
<b>normal</b>	17 (%89.5)	50 (%86.2)	-
<b>iyi karyotip</b>	2 (%10.5)	5 (%8.6)	-
<b>kötü karyotip</b>	0	3 (%5.2)	-
<b>‘DIPSS-plus’</b>	19 (%100)	58 (%100)	0.803
<b>düşük risk</b>	3 (%15.8)	12 (%20.7)	-
<b>orta-1 risk</b>	7 (%36.8)	20 (%34.5)	-
<b>orta-2 risk</b>	6 (%31.6)	21 (%36.2)	-
<b>yüksek risk</b>	3 (%15.8)	5 (%8.6)	-

### 4.3. IDH (EKZON 4) MUTASYON SONUÇLARI

Çalışmamızda 184 Ph-negatif MPN tanılı olgunun 7’sinde (%3.8) IDH (ekzon 4) mutasyonu saptanmıştır. 7 olgunun 4’ünde (%57.1) IDH1 R132C, 2’sinde (%28.6) IDH2 R140Q ve birinde (%14.3) IDH1 R132S mutasyonu saptanmıştır. Sonuç olarak olguların 5’inde IDH1 (%71.4) ve ikisinde (%28.6) IDH2 mutasyonu bulunmuştur. Aynı ayrı olgu gruplarına bakıldığı zaman PMF’de saptanan 5 IDH mutasyonunun 3’ünün (%60) IDH1 R132C, birinin (%20) IDH1 R132S ve birinin (%20) IDH2-R140Q mutasyonu olduğu görülmüştür. Sonuç olarak PMF’de mutant olguların %80’i IDH1 mutasyonundan oluşmaktaydı. ET’li mutant 2 olgunun birinde IDH1 R132C ve diğerinde IDH2 R140Q mutasyonu saptanmıştır.

#### 4.3.1. ET olgularında IDH mutasyonu

107 ET tanılı olgunun 2’sinde (%1.9) IDH geni ekzon 4’de mutasyon (1 olguda IDH1 R132C, 1 olguda IDH2 R140Q) tespit edilmiştir. IDH mutasyonlarının hepsi missense mutasyonlar şeklinde saptanmıştır (Tablo XXVI). Bu olguların biri JAK2V617F mutasyonu

taşımazken diğerine JAK2V617F mutasyonunun eşlik ettiği gözlenmiştir (JAK2V617F allel yükü:%5). Her iki olguda da hidroksiüre kullanımı mevcuttur ve ikisi de hayattadır.

#### **4.3.2. IDH mutasyonunu taşıyan ile taşımayan PMF olgularının karşılaştırılması**

PMF olgularının 5'inde (%6.5) hepsi missense mutasyon olan IDH geni ekzon 4'de mutasyon (3 IDH1 R132C, 1 IDH1 R132S, 1 IDH2 R140Q) saptanmıştır. PMF olgularında IDH mutasyon dağılımı Tablo XXVIII'de özetlenmiştir.

IDH mutasyonunu taşıyan PMF olguları ile taşımayan olguların klinik ve laboratuvar özellikleri Tablo XXXVII, XXXVIII ve XXXIX'da görülmektedir.

IDH mutasyonunu taşıyan ve taşımayan PMF olguları arasında yaş ortalaması, tanı sırasındaki ortalama yaş ve örneğin alındığı sıradaki ortalama yaş açısından anlamlı fark saptanmamıştır (sırasıyla  $p=0.642$ ;  $p=0.86$ ;  $p=0.679$ ). IDH mutasyonunu taşıyan PMF olgularında kadın cinsiyeti sıklığında artışa eğilim olduğu gösterilmiştir (sırasıyla %100, %52.8;  $p=0.063$ ).

IDH mutasyonunu taşıyan PMF olgularında IDH mutasyonunu taşımayan grup ile karşılaştırıldığı zaman tanı sırasında ortalama lökosit sayısı, Hgb düzeyi, Htc düzeyi ve trombosit değerleri açısından fark saptanmamıştır (sırasıyla  $p=0.482$ ;  $p=0.482$ ;  $p=0.694$ ;  $p=0.193$ ). IDH mutasyonunu taşıyan PMF olguları ile mutasyonu taşımayan olgular arasında tanı sırasındaki ortalama LDH düzeyi açısından da anlamlı fark saptanmamıştır ( $p=0.251$ ).

Her iki grup arasında tanı sırasında lökosit ve trombosit değerlerinin dağılımları açısından istatistiksel anlamlı fark gözlenmemiştir (sırasıyla  $p=0.387$ ;  $p=0.77$ ). IDH mutasyonunu taşıyan grupla taşımayan grup arasında LDH yüksekliği ve trombositopeni sıklığı açısından istatistiksel anlamlı bir fark gözlenmemiştir (sırasıyla  $p=0.196$ ;  $p=0.101$ ).

Her iki grup kemik iliği fibrozis dağılımları açısından karşılaştırıldığında mutasyonu taşıyan grupla taşımayan grup arasında kemik iliği fibrozis derecesi açısından anlamlı bir fark gözlenmemiştir ( $p=0.577$ ).

IDH mutasyonu olan ve olmayan PMF olgularında karyotip anormalliklerinin dağılımı açısından anlamlı fark gözlenmemiştir ( $p=0.671$ ) (Tablo XL). IDH mutant PMF olguları ile mutasyonu taşımayan PMF olgularının 'DIPSS-plus' kriterlerine göre risk dağılımlarında anlamlı bir fark saptanmamıştır ( $p=0.889$ ) (Tablo XL).

PMF olgularında IDH mutasyonunu taşıyan grup ile taşımayan grup karşılaştırıldığı zaman tanı sırasında ortalama dalak boyutu ve splenomegali derecesi açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (sırasıyla  $p=0.325$ ;  $p=0.594$ ).

IDH mutasyonunu taşıyan ile taşımayan PMF olguları arasında flebotomi ihtiyacı ve eritrosit transfüzyon ihtiyacı açısından anlamlı bir fark saptanmamıştır (sırasıyla  $p=1$ ;  $p=1$ ).

IDH mutasyonunu taşıyan ile taşımayan olgular arasında kardiyovasküler risk faktörleri varlığı, total tromboz, arteriyel tromboz ve venöz tromboz sıklığı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (sırasıyla  $p=1$ ;  $p=0.548$ ;  $p=0.662$ ;  $p=0.558$ ). Her iki grup arasında arteriyel tromboz ve venöz tromboz lokalizasyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir (sırasıyla  $p=0.459$ ,  $p=0.864$ ).

IDH mutant PMF olgularında kanama sıklığı IDH mutasyonunu taşımayan gruba göre anlamlı derecede yüksek saptanmıştır ( $p=0.048$ ). Her iki grup kanama lokalizasyonu açısından değerlendirildiğinde IDH mutant olguların %20'sinde gastrointestinal kanama, %20'sinde mukozal kanama ve %20'sinde intrakranial kanama gözlenirken IDH mutasyonu taşımayan olguların %5.6'sında gastrointestinal kanama, %5.6'sında mukozal kanama ve birinde (%1.4) intrakranial kanama gözlenmiştir ( $p=0.061$ ) (Şekil XXII). IDH mutasyonunu taşıyan PMF olgularında aspirin kullanımının diğer gruba göre düşük olma eğiliminde olduğu gözlenmiştir (sırasıyla %20, %63.9;  $p=0.072$ ). Bu durum IDH mutant grupta kanama sıklığının fazla olması ile açıklanabilir.

IDH mutasyonunu taşıyan ve taşımayan PMF olguları JAK2V617F mutasyonunun sıklığı açısından karşılaştırıldığı zaman her 2 grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (sırasıyla %60, %76.4;  $p=0.592$ ). IDH mutant 5 PMF olgusunun 2'si (%40) JAK2V617F mutasyonu taşımazken, iki olgunun (%40) JAK2V617F allel yükünün %31-50 arasında olduğu ve bir olgunun (%20) allel yükünün %5-12.5 arasında olduğu gözlenmiştir. IDH mutasyonunu taşımayan PMF olgularında ise allel yükün çoğunlukla %78-100 arasında olduğu görülmüştür. Sonuç olarak altı ölçekli standarda dayalı olarak her 2 grup arasında JAK2V617F allel yükü dağılımı açısından anlamlı bir fark saptanmamıştır ( $p=0.704$ ). IDH mutant tip ile wild-tip olgular arasında yüksek JAK2V617F allel sıklığı açısından anlamlı bir fark saptanmamıştır (sırasıyla 0, %25;  $p=0.401$ ).

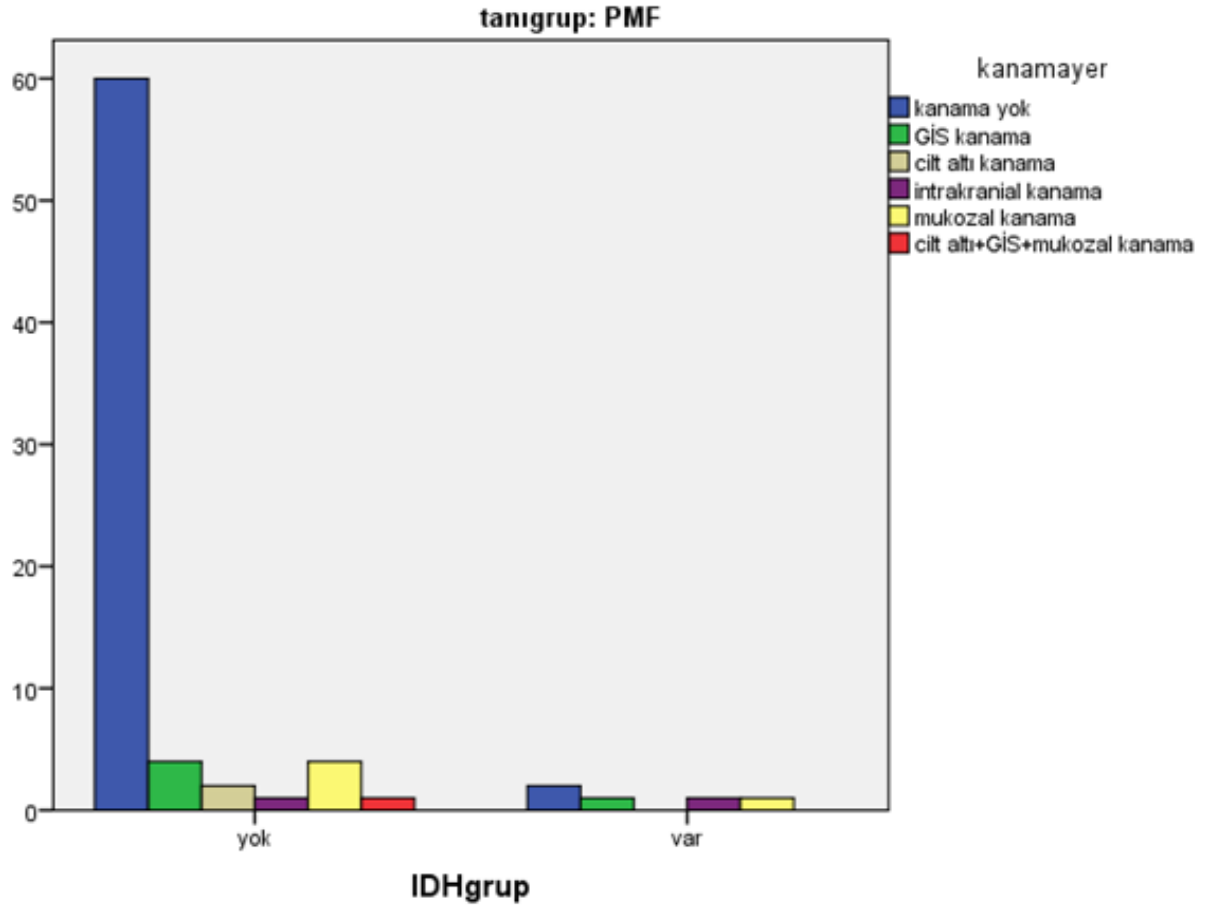
IDH mutant PMF grubunda ASXL1 mutasyon sıklığı, IDH wild tip PMF grubuna göre yüksek olma eğiliminde saptanmıştır (sırasıyla %60, %22.2;  $p=0.093$ ). IDH mutant ile wild tip PMF olguları arasında ASXL1 mutasyon tiplerinin dağılımı açısından fark saptanmamıştır ( $p=0.157$ ). IDH mutant PMF olguları ile IDH wild tip olgular arasında ASXL1 mutasyonu ve JAK2V617F mutasyonu birlikteliği açısından anlamlı bir fark saptanmamıştır ( $p=1$ ).

IDH mutasyonunu taşıyan ve taşımayan PMF olguları arasında splenektomi sıklığı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ( $p=1$ ). Her iki grup arasında hidroksiüre kullanımı açısından anlamlı bir fark gözlenmemiştir ( $p=1$ ). IDH mutasyonu olan

grupla mutasyonu taşımayan grup arasında diğer ilaçların kullanımını açısından da anlamlı bir fark saptanmamıştır ( $p>0.05$ ). Her iki grup arasında AHKHN açısından bir fark bulunmamıştır ( $p=1$ ).

IDH mutant tip PMF olgularında ölüm oranı IDH mutasyonu olmayan PMF olgularına göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek saptanmıştır (sırasıyla %60, %15.3;  $p=0.039$ ). IDH mutasyonunu taşıyan PMF olgularında lösemiye dönüşüm oranı, IDH mutasyonu olmayan PMF grubuna göre yüksek olmakla beraber istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (sırasıyla %20, %4.2;  $p=0.24$ ). Her iki grup arasında TS açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır ( $p=0.934$ ). ‘Kaplan-Meier’ analizi sonucunda IDH mutasyonunu taşıyan ve taşımayan PMF olguları arasında OS benzer bulunmuştur (sırasıyla ortalama 125 ay; %95 CI: 11-238 ve 128 ay; %95 CI: 98-157;  $p=0.351$ ). Fakat tek değişkenli analiz sonucunda IDH mutasyonu olan PMF grubunda mutasyon taşımayan gruba göre LFS belirgin derecede kısa saptanmıştır (sırasıyla ortalama 169 ay; %95 CI: 159-180 ve 214 ay; %95 CI: 95-332;  $p=0.024$ ).

Korelasyon analizi sonucunda PMF olgu grubunda IDH mutasyonu ile kanama komplikasyonu arasında pozitif yönde zayıf bir ilişki saptanmıştır ( $r=0.27$ ). PMF’de IDH mutasyonu ile tanı sırasındaki Htc, lökosit, trombosit, LDH düzeyi, dalak boyutu ortalaması, total tromboz, arteriyel tromboz ve venöz tromboz arasında ilişki saptanmamıştır ( $r<0.2$ ). PMF olgu grubunda ASXL1 mutasyonu ve IDH mutasyonu birlikteliği ile kanama komplikasyonu arasında pozitif yönde zayıf bir ilişki saptanmıştır ( $r=0.240$ ). PMF’de ASXL1 mutasyonu ve IDH mutasyonu birlikteliği ile ölüm arasında pozitif yönde zayıf bir korelasyon saptanmıştır ( $r=0.255$ ). ASXL1 mutasyonu ve IDH mutasyonu birlikteliği ile tanı sırasındaki Htc, lökosit, trombosit, LDH düzeyi, dalak boyutu ortalaması, total tromboz, arteriyel tromboz ve venöz trombozu arasında ilişki saptanmamıştır ( $r<0.2$ ).



**Şekil XXII. IDH mutasyonunu taşıyan ve taşımayan PMF olgularında kanama lokalizasyonu görülmektedir**

IDH mutant olguların %20'sinde gastrointestinal kanama, %20'sinde mukozal kanama ve %20'sinde intrakranial kanama gözlenirken IDH mutasyonu taşımayan olguların %5.6'sında gastrointestinal kanama, %5.6'sında mukozal kanama ve birinde (%1.4) intrakranial kanama gözlenmiştir (p=0.061). Bundan yola çıkarak IDH mutasyonu olan olgularda kanamanın hayati organlarda görülme eğiliminin daha yüksek olduğu söylenebilir.

**Tablo XXXVII. IDH mutasyonunu taşıyan ve taşımayan PMF tanılı olguların klinik ve laboratuvar bulguları**

<b>PMF</b>	<b>IDH mutant (mean [SD])</b>	<b>IDH wild tip (mean [SD])</b>	<b>P değeri</b>
<b>Olgu sayısı</b>	5	72	-
<b>Ortalama yaş</b>	64.2 [20]	60.6 [14.2]	0.642
<b>Tanı sırasındaki yaş</b>	55.4 [20.6]	56.93 [14.1]	0.86
<b>Örnek alındığı sıradaki yaş</b>	63.2 [20.1]	59.3 [14.02]	0.679
<b>Kadın (%)</b>	5 (%100)	38 (%52.8)	0.063
<b>Tanı sırasındaki lökosit (mm<sup>3</sup>)</b>	9.662 [5.725]	14.892 [13.886]	0.482
<b>Tanı sırasındaki Hgb (g/dl)</b>	10 [1.3]	10.6 [2.2]	0.482
<b>Tanı sırasındaki Htc (%)</b>	31.4 [4.87]	32.1 [7.13]	0.694
<b>Tanı sırasındaki trombosit (mm<sup>3</sup>)</b>	272.760 [267.777]	444.948 [366.701]	0.193
<b>Tanı sırasındaki LDH (U/L)</b>	713 [470]	836 [390]	0.251
<b>Tanı sırasındaki dalak boyutu (mm)</b>	179.4 [30.7]	198.9 [43.7]	0.325
<b>Kemik iliği fibrozis (%)</b>	5 (%100)	72 (%100)	0.577
<b>0</b>	0	0	-
<b>1</b>	0	0	-
<b>2</b>	0	16 (%22.2)	-
<b>3</b>	5 (%100)	56 (%77.8)	-
<b>Takip süresi (ay)</b>	100.8 [127.9]	41.7 [35.5]	0.934
<b>OS-Kaplan Meier (mean, ay)</b>	125 ay (%95 CI: 11-238)	128 ay (%95 CI: 98-157)	0.351

**Tablo XXXVIII. IDH mutasyonunu taşıyan ve taşımayan PMF tanılı olguların klinik ve laboratuvar bulguları (devam)**

<b>PMF</b>	<b>IDH mutant n (%)</b>	<b>IDH wild tip n (%)</b>	<b>P değeri</b>
<b>Olgu sayısı</b>	5	72	-
<b>Lökosit grup</b>	5 (%100)	72 (%100)	0.387
<b>&lt; 10.000/mm<sup>3</sup></b>	4 (%80)	36 (%50)	-
<b>10.000-25.000</b>	1 (%20)	24 (%33.3)	-
<b>≥ 25.000</b>	0	12 (%16.7)	-
<b>Trombosit grup</b>	5 (%100)	72 (%100)	0.77
<b>&lt; 450.000/mm<sup>3</sup></b>	4 (%80)	45 (%62.5)	-
<b>450.000-600.000</b>	0	6 (%8.3)	-
<b>600.000-1.000.000</b>	1 (%20)	14 (%19.4)	-
<b>≥ 1.000.000</b>	0	7 (%9.7)	-
<b>Tanı sırasında trombositopeni</b>	2 (%40)	7 (%9.7)	0.101
<b>Tanı sırasında LDH yüksekliği</b>	3 (%60)	61 (%84.7)	0.196
<b>Splenomegali grup</b>	5 (%100)	72 (%100)	0.594
<b>splenomegali yok</b>	0	1 (%1.4)	-
<b>hafif splenomegali</b>	2 (%40)	15 (%20.8)	-
<b>masif splenomegali</b>	3 (%60)	56 (%77.8)	-
<b>Eritrosit transfüzyon ihtiyacı</b>	1 (%20)	20 (%27.8)	1
<b>Flebotomi ihtiyacı</b>	0	1 (%1.4)	1
<b>Hidroksiüre</b>	5 (%100)	67 (%93.1)	1
<b>Splenektomi</b>	0	4 (%5.6)	1
<b>AHKHN</b>	0	3 (%4.2)	1
<b>Lösemi dönüşüm</b>	1 (%20)	3 (%4.2)	0.24
<b>Ölüm</b>	3 (%60)	11 (%15.3)	0.039*

**Tablo XXXIX. IDH mutasyonunu taşıyan ve taşımayan PMF tanılı olguların klinik ve laboratuvar bulguları (devam)**

<b>PMF</b>	<b>IDH mutant n (%)</b>	<b>IDH wild tip n (%)</b>	<b>P değeri</b>
<b>Olgu sayısı</b>	5	72	-
<b>Kanama varlığı</b>	3 (%60)	12 (%16.7)	0.048*
<b>Tromboz varlığı</b>	1 (%20)	10 (%13.9)	0.548
<b>Kardiyovasküler risk</b>	3 (%60)	43 (%59.7)	1
<b>Tromboz grup</b>	5 (%100)	72 (%100)	0.802
<b>yok</b>	4 (%80)	62 (%86.1)	-
<b>arteriyel</b>	1 (%20)	6 (%8.3)	-
<b>venöz</b>	0	3 (%4.2)	-
<b>arteriyel+venöz</b>	0	1 (%1.4)	-
<b>JAK2V617F mutasyonu</b>	3 (%60)	55 (%76.4)	0.592
<b>JAK2V617F grup</b>	5 (%100)	72 (%100)	0.401
<b>mutasyon yok</b>	2 (%40)	17 (%23.6)	-
<b>düşük allel yükü</b>	3 (%60)	37 (%51.4)	-
<b>yüksek allel yükü</b>	0	18 (%25)	-
<b>ASXL1 mutasyonu</b>	3 (%60)	16 (%22.2)	0.093
<b>Birden fazla ASXL1 mutasyonu</b>	0	1 (%1.4)	1
<b>JAK2-ASXL1 birliktelik</b>	1 (%20)	13 (%18.1)	1



**Tablo XL. IDH mutasyonunu taşıyan ve taşımayan PMF olgularının kemik iliği sitogenetik ve ‘DIPSS-plus’ kriterlerine göre karşılaştırılması**

<b>PMF</b>	<b>IDH mutant n (%)</b>	<b>IDH wild tip n (%)</b>	<b>P değeri</b>
<b>Olgu sayısı</b>	5	72	-
<b>Karyotip</b>	5 (%100)	72 (%100)	0.671
<b>normal</b>	5 (%100)	62 (%86.1)	-
<b>iyi karyotip</b>	0	7 (%9.7)	-
<b>kötü karyotip</b>	0	3 (%4.2)	-
<b>‘DIPSS-plus’</b>	5 (%100)	72 (%100)	
<b>düşük risk</b>	1	14 (%19.4)	0.889
<b>orta-1 risk</b>	2	25 (%34.7)	-
<b>orta-2 risk</b>	2	25 (%34.7)	-
<b>yüksek risk</b>	0	8 (%11.2)	-

#### **4.4. JAK2V617F MUTASYON SONUÇLARI**

##### **4.4.1. JAK2V617F mutasyonunu taşıyan ile taşımayan ET olgularının karşılaştırılması**

ET olgularının 64’ünde (%59.8) JAK2V617F mutasyonu saptanmıştır. JAK2V617F mutasyonunu taşıyan olgular ile taşımayan olguların klinik ve laboratuvar özellikleri Tablo XLI, Tablo XLII ve XLIII’de görülmektedir.

JAK2V617F mutasyonu olan ve olmayan ET olguları arasında yaş ortalaması, tanı sırasındaki ortalama yaş ve örneğin alındığı sıradaki ortalama yaş açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermemiştir (sırasıyla p=0.554; p=0.565; p=0.531). Her iki grup arasında cinsiyet açısından anlamlı farklılık gözlenmemiştir (p=0.266).

Her iki grup arasında tanı sırasındaki ortalama lökosit sayısı ve serum LDH düzeyi açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır (sırasıyla p=0.483; p=0.927). JAK2V617F mutasyonunu taşıyan grupta tanı sırasındaki Hgb düzeyi ve Htc değeri anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur (sırasıyla p=0.001; p=0.001). JAK2V617F mutasyonunu

taşımayan grupta ise tanı sırasındaki ortalama trombosit değeri istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (sırasıyla  $p=0.043$ ). Her iki grup arasında tanı sırasında LDH yüksekliği sıklığı açısından anlamlı bir fark gözlenmemiştir ( $p=1$ ).

JAK2V617F mutasyonunu taşıyan ve taşımayan ET olguları arasında tanı sırasındaki lökosit ve trombosit dağılımları açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır (sırasıyla  $p=0.689$ ;  $p=0.359$ ).

Her iki grup kemik iliği fibrozis dağılımları açısından karşılaştırıldığında kemik iliği fibrozis derecesi açısından anlamlı bir fark bulunmamıştır ( $p=0.522$ ).

ET olgularında JAK2V617F mutasyonunu taşıyan grup ile taşımayan grup tanı sırasındaki ortalama dalak boyutu açısından karşılaştırıldığı zaman istatistiksel anlamlı bir fark saptanmamıştır ( $p=0.126$ ). Fakat her 2 grup tanı sırasında splenomegali derecesi açısından karşılaştırıldığı zaman JAK2V617F mutasyonu olmayan olguların %76.7'sinde splenomegali olmadığı, %11.6'sında masif splenomegali görüldüğü, mutasyonu taşıyan olguların ise %53.1'inde splenomegali görülmediği ve masif splenomegali oranının %20.3 olduğu gözlenmiştir ( $p=0.044$ ).

JAK2V617F mutasyonunu taşıyan ve taşımayan ET olguları arasında flebotomi ve eritrosit transfüzyon ihtiyacı açısından anlamlı fark saptanmamıştır (sırasıyla  $p=0.646$ ;  $p=0.155$ ).

JAK2V617F mutasyonunu taşıyan ile mutasyonu taşımayan olgular arasında kardiyovasküler risk faktörleri ve total tromboz sıklığı açısından istatistiksel olarak farklılık gözlenmemiştir (sırasıyla  $p=0.186$ ;  $p=0.692$ ). JAK2V617F mutasyonunu taşıyan ET grubunda venöz tromboz sıklığı %23.4 ve JAK2V617F mutasyonu olmayan grupta %11.6 olmakla beraber istatistiksel anlamlı bir fark saptanmamıştır ( $p=0.139$ ). JAK2V617F mutasyonu olan ile mutasyonu taşımayan olgular arasında arteriyel tromboz sıklığı açısından da anlamlı fark saptanmamıştır (sırasıyla %18.75, %25.5,  $p=0.47$ ).

Her iki grup arasında kanama sıklığı açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir ( $p=0.298$ ). Her iki grup arasında kanama lokalizasyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir ( $p=0.687$ ). Bunun yanında gruplar arasında arteriyel tromboz ve venöz tromboz lokalizasyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır (sırasıyla  $p=0.47$ ;  $p=0.196$ ).

JAK2V617F mutasyonunu taşıyan ET olguları ile JAK2V617F mutasyonunu taşımayan ET olguları ASXL1 mutasyonunun sıklığı açısından karşılaştırıldığı zaman istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (sırasıyla %9.4, %7;  $p=0.738$ ). JAK2V617F mutasyonunu taşımayan ET olgularında bulunan en sık ASXL1 mutasyonu

c.1934dupG (%4.7) olmakla beraber, JAK2V617F mutasyonunu taşıyan grupta en sık c.1954G>A saptanmıştır (%3.1) (p=0.705).

JAK2V617F mutasyonunu taşıyan ile taşımayan ET olguları arasında IDH mutasyon sıklığı açısından anlamlı bir fark saptanmamıştır (sırasıyla %1.6, %2.3; p=0.645). Her iki grup arasında splenektomi oranı açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir (p=1). Her iki grup hidrokşiüre kullanımı açısından karşılaştırıldığında anlamlı bir fark gözlenmemiştir (p=0.273). Ayrıca diğer ilaç kullanımları açısından da anlamlı bir fark saptanmamıştır (p>0.05).

JAK2V617F mutasyonunu taşıyan ile taşımayan ET olguları arasında ölüm oranı açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır (p=1). Her iki grup arasında TS açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır (p=0.675). ‘Kaplan-Meier’ analizi sonucunda JAK2V617F mutasyonunu taşıyan ve taşımayan ET olguları arasında OS benzer bulunmuştur (sırasıyla ortalama 215 ay; %95 CI: 193-238 ve 200 ay; %95 CI: 177-223; p=0.958).

Korelasyon analizi sonucunda ET olgu grubunda JAK2V617F mutasyonu ile tanı sırasındaki lökosit ve Htc değerleri arasında pozitif yönde hafif dereceli bir ilişki saptanmıştır (sırasıyla r=0.324; r=0.362). ET olgularında JAK2V617F mutasyonu ile tanı sırasındaki trombosit, LDH düzeyi, dalak boyutu ortalaması, total tromboz, arteriyel tromboz ve venöz tromboz varlığı arasında ilişki saptanmamıştır (r<0.2).

Korelasyon analizi sonucunda, ET’de JAK2V617F mutasyonu ve ASXL1 mutasyonu birlikteliği ile tanı sırasındaki Htc, lökosit, trombosit değerleri, LDH düzeyi, kanama komplikasyonu, total tromboz, arteriyel tromboz ve venöz tromboz arasında ilişki saptanmamıştır (r<0.2).

Korelasyon analizi sonucunda, ET’de JAK2V617F mutasyonu ve IDH mutasyonu birlikteliği ile venöz tromboz arasında pozitif yönde zayıf bir ilişki saptanmıştır (r=0.203). JAK2V617F mutasyonu ve IDH mutasyonu birlikteliği ile tanı sırasındaki Htc, lökosit, trombosit değerleri, LDH düzeyi, kanama komplikasyonu, total tromboz ve arteriyel tromboz arasında ilişki saptanmamıştır (r<0.2).

**Tablo XLI. JAK2V617F mutasyonunu taşıyan ve taşımayan ET tanılı olguların klinik ve laboratuvar bulguları**

<b>ET</b>	<b>JAK2V617F mutant (mean [SD])</b>	<b>JAK2 wild tip (mean [SD])</b>	<b>P değeri</b>
<b>Olgu sayısı</b>	64	43	-
<b>Ortalama yaş</b>	55.5 [14.4]	57.4 [14.7]	0.554
<b>Tanı sırasındaki yaş</b>	49.7 [14.9]	51.7 [15.7]	0.565
<b>Örnek alındığı sıradaki yaş</b>	54.1 [14.3]	56 [14.7]	0.531
<b>Kadın (%)</b>	38 (%59.4)	20 (%46.5)	0.266
<b>Tanı sırasındaki lökosit (mm<sup>3</sup>)</b>	10.196 [4.138]	9.593 [3.434]	0.483
<b>Tanı sırasındaki Hgb (g/dl)</b>	13.6 [1.8]	12.4 [1.9]	0.001*
<b>Tanı sırasındaki Htc (%)</b>	40.7 [5.37]	36.8 [5.21]	0.001*
<b>Tanı sırasındaki trombosit (mm<sup>3</sup>)</b>	874.782 [320.867]	1.055.116 [495.928]	0.043*
<b>Tanı sırasındaki LDH (U/L)</b>	453.2 [150]	462.1 [159.7]	0.927
<b>Tanı sırasındaki dalak boyutu (mm)</b>	141.7 [37.26]	132.07 [23.86]	0.126
<b>Kemik iliği fibrozis</b>	64 (%100)	43 (%100)	0.522
<b>0</b>	7 (%10.9)	3 (%7)	-
<b>1</b>	42 (%65.6)	25 (%58.1)	-
<b>2</b>	14 (%21.9)	13 (%30.2)	-
<b>3</b>	1 (%1.6)	2 (%4.7)	-
<b>Takip süresi (ay)</b>	69.7 [63.7]	70.1 [56.9]	0.675
<b>OS-Kaplan Meier (mean, ay)</b>	215 ay (%95 CI: 193-238)	200 ay (%95 CI: 177-223)	0.958

**Tablo XLII. JAK2V617F mutasyonunu taşıyan ve taşımayan ET tanılı olguların klinik ve laboratuvar bulguları (devam)**

<b>ET</b>	<b>JAK2V617F mutant n (%)</b>	<b>JAK2 wild tip n (%)</b>	<b>P değeri</b>
<b>Olgu sayısı</b>	64	43	-
<b>Lökosit grup</b>	64 (%100)	43 (%100)	0.689
<b>&lt; 10.000/mm<sup>3</sup></b>	38 (%59.4)	27 (%62.8)	-
<b>10.000-25.000</b>	25 (%39.1)	16 (%37.2)	-
<b>≥ 25.000</b>	1 (%1.5)	0	-
<b>Trombosit grup</b>	64 (%100)	43 (%100)	0.359
<b>&lt; 450.000/mm<sup>3</sup></b>	0	0	-
<b>450.000-600.000</b>	12 (%18.8)	6 (%14)	-
<b>600.000-1.000.000</b>	35 (%54.7)	20 (%46.5)	-
<b>≥ 1.000.000</b>	17 (%26.5)	17 (%39.5)	-
<b>Tanı sırasında LDH yüksekliği</b>	26 (%40.6)	17 (%39.5)	1
<b>Splenomegali grup</b>	64 (%100)	43 (%100)	0.044*
<b>splenomegali yok</b>	34 (%53.1)	33 (%76.7)	-
<b>hafif splenomegali</b>	17 (%26.6)	5 (%11.6)	-
<b>masif splenomegali</b>	13 (%20.3)	5 (%11.6)	-
<b>Eritrosit transfüzyon ihtiyacı</b>	1 (%1.6)	4 (%9.3)	0.155
<b>Flebotomi ihtiyacı</b>	4 (%6.3)	1 (%2.3)	0.646
<b>Hidroksiüre</b>	57 (%89.1)	35 (%81.4)	0.273
<b>Splenektomi</b>	1 (%1.6)	1 (%2.3)	1
<b>Lösemi dönüşüm</b>	0	0	-
<b>Ölüm</b>	3 (%4.7)	2 (%4.7)	1

**Tablo XLIII. JAK2V617F mutasyonunu taşıyan ve taşımayan ET tanılı olguların klinik ve laboratuvar bulguları (devam)**

<b>ET</b>	<b>JAK2V617F mutant n (%)</b>	<b>JAK2 wild tip n (%)</b>	<b>P değeri</b>
<b>Olgu sayısı</b>	64	43	-
<b>Kanama varlığı</b>	10 (%15.6)	3 (%7)	0.298
<b>Tromboz varlığı</b>	26 (%40.6)	15 (%34.9)	0.692
<b>Kardiyovasküler risk</b>	49 (%76.6)	27 (%62.8)	0.186
<b>Tromboz grup</b>	64 (%100)	43 (%100)	0.219
<b>yok</b>	38 (%59.4)	28 (%65.1)	-
<b>arteriyel</b>	11 (%17.2)	10 (%23.3)	-
<b>venöz</b>	14 (%21.9)	4 (%9.3)	-
<b>arteriyel+venöz</b>	1 (%1.5)	1 (%2.3)	-
<b>ASXL1 mutasyonu</b>	6 (%9.4)	3 (%7)	0.738
<b>IDH mutasyonu (IDH1 veya IDH2)</b>	1 (%1.6)	1 (%2.3)	0.645
<b>ASXL1-IDH birliktelik</b>	0	0	-

#### **4.4.2. JAK2V617F mutasyonunu taşıyan ile taşımayan PMF olgularının karşılaştırılması**

PMF olgularının 58'inde (%75.3) JAK2V617F mutasyonu saptanmıştır. JAK2V617F mutasyonunu taşıyan olgular ile taşımayan olguların klinik ve laboratuvar özellikleri Tablo XLIV, XLV ve XLVI'da görülmektedir.

JAK2V617F mutasyonunu taşıyan ile taşımayan PMF olguları arasında ortalama yaş, tanı sırasındaki ortalama yaş ve örneğin alındığı sıradaki yaş ortalaması açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (sırasıyla  $p=0.344$ ;  $p=0.12$ ;  $p=0.279$ ). JAK2V617F mutasyonunu taşımayan PMF grubunda kadın cinsiyeti sıklığı anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (sırasıyla %84.2, %46.6;  $p=0.009$ ).

JAK2V617F mutasyonunu taşıyan PMF olgularında JAK2V617F mutasyonunu taşımayan grup ile karşılaştırıldığı zaman tanı sırasındaki ortalama trombosit değeri ve LDH

düzeıı açısından anlamlı bir fark gözlenmemiştir (sırasıyla  $p=0.832$ ;  $p=0.836$ ). JAK2V617F mutasyonunu taşıyan grupta tanı sırasındaki ortalama lökosit sayısı, Hgb düzeyi ve Htc düzeyi belirgin yüksek saptanmıştır (sırasıyla  $p=0.046$ ;  $p=0.005$ ;  $p=0.034$ ).

Her iki grup tanı sırasında lökosit değerlerinin dağılımları açısından değerlendirildiği zaman JAK2V617F mutasyonunu taşımayan grupta lökosit değerinin  $10.000/mm^3$ 'den küçük olma eğiliminin diğer gruba göre yüksek olduğu gözlenmiştir ( $p=0.088$ ). Tanı sırasında trombosit değerlerinin dağılımları açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır ( $p=0.172$ ). JAK2V617F mutasyonu olan ve olmayan grup arasında LDH yüksekliği açısından anlamlı bir fark saptanmamıştır ( $p=0.725$ ) (Tablo XLV).

Her iki grup arasında kemik iliği fibrozis derecesi açısından anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir ( $p=0.33$ ).

JAK2V617F mutasyonu olan ve olmayan PMF olguları arasında kemik iliği sitogenetik bulguları açısından anlamlı fark saptanmamıştır ( $p=0.274$ ) (Tablo XLVII). JAK2V617F mutasyonunu taşıyan grup ile taşımayan grup karşılaştırıldığında 'DIPSS-plus' kriterlerine göre risk dağılımında anlamlı bir fark gözlenmemiştir ( $p=0.143$ ) (Tablo XLVII).

PMF olgularında JAK2V617F mutasyonunu taşıyan grup ile taşımayan grup karşılaştırıldığı zaman tanı sırasında dalak boyutu ortalaması açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ( $p=0.193$ ). JAK2V617F mutasyonunu taşıyan ile taşımayan PMF olguları karşılaştırıldığı zaman mutant olgularda tanı sırasında masif splenomegali oranı yüksek olma eğiliminde bulunmuştur ( $p=0.096$ ).

JAK2V617F mutasyonunu taşıyan ile taşımayan PMF olguları arasında flebotomi ihtiyacı ve eritrosit transfüzyon ihtiyacı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (sırasıyla  $p=1$ ;  $p=0.318$ ).

JAK2V617F mutasyonunu taşıyan ile mutasyonu taşımayan olgular arasında kardiyovasküler risk faktörleri varlığı, total tromboz, arteriyel tromboz ve venöz tromboz sıklığı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (sırasıyla  $p=0.647$ ;  $p=1$ ;  $p=0.437$ ;  $p=0.567$ ). PMF'de JAK2V617F mutasyonu varlığında kanamaya eğilim görülmüştür ( $p=0.098$ ). Her iki grup arasında arteriyel tromboz lokalizasyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ( $p=0.591$ ). Bunun yanında gruplar arasında venöz tromboz lokalizasyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir ( $p=0.501$ ). Her iki grup kanama lokalizasyonu açısından değerlendirildiğinde JAK2V617F mutant grupta gastrointestinal kanama sıklığı %8.6 ve mukozal kanama sıklığı %8.6 oranında saptanırken, mutasyon taşımayan grupta intrakranial kanama sıklığı %5.3 saptanmıştır ( $p=0.349$ ).

JAK2V617F mutasyonunu taşıyan PMF olguları ile mutasyonu taşımayan PMF olguları ASXL1 mutasyonunun sıklığı açısından karşılaştırıldığı zaman istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (sırasıyla %24.1, %26.3;  $p=0.535$ ). Her 2 grup arasında ASXL1 mutasyon tiplerinin dağılımı açısından istatistiksel fark saptanmamıştır ( $p=0.75$ ).

JAK2V617F mutasyonunu taşıyan PMF grubunda 2 olguda IDH1 mutasyonu saptanırken (IDH1 R132S, IDH1 R132C), JAK2V617F mutasyonu olmayan grupta da 2 olguda IDH1 mutasyonuna (2 IDH1 R132C) rastlanmıştır (sırasıyla %3.4, %10.5,  $p=0.253$ ). JAK2V617F mutant grupta bir olguda IDH2 mutasyonuna rastlanırken (IDH2 R140Q), JAK2V617F mutasyonu olmayan grupta IDH2 mutasyonu saptanmamıştır ( $p=1$ ). JAK2V617F mutasyonunu taşıyan ile taşımayan PMF olguları arasında IDH mutasyon sıklığı açısından anlamlı bir fark gözlenmemiştir (sırasıyla %5.2, %10.5;  $p=0.36$ ). JAK2V617F mutasyonunu taşıyan PMF olguları ile mutasyonu taşımayan olgular arasında ASXL1 mutasyonu ve IDH mutasyonu birlikteliği açısından bir fark saptanmamıştır ( $p=0.149$ ).

JAK2V617F mutasyonunu taşıyan PMF olguları ile mutasyonu taşımayan olgular arasında splenektomi oranı ve hidroksiüre kullanımı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir (sırasıyla  $p=1$ ;  $p=1$ ). Her 2 grup arasında AHKHN açısından anlamlı bir fark saptanmamıştır ( $p=1$ ).

Her 2 grup arasında ölüm oranı ve lösemiye dönüşüm açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır (sırasıyla  $p=1$ ;  $p=1$ ). Her iki grup arasında TS açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır ( $p=0.165$ ). ‘Kaplan-Meier’ analizi sonucunda JAK2V617F mutasyonunu taşıyan ve taşımayan PMF olguları arasında OS benzer bulunmuştur (sırasıyla ortalama 170 ay; %95 CI: 112-229 ve 133 ay; %95 CI: 92-175;  $p=0.589$ ).

Korelasyon analizi sonucunda PMF olgu grubunda JAK2V617F mutasyonu ile tanı sırasındaki Htc düzeyi arasında pozitif yönde zayıf bir ilişki ve lökosit ortalaması ile pozitif yönde hafif dereceli bir ilişki saptanmıştır (sırasıyla  $r=0.243$ ;  $r=0.325$ ). Bunun yanında PMF olgularında JAK2V617F mutasyonu ile kanama komplikasyonu arasında pozitif yönde zayıf bir ilişki saptanmıştır ( $r=0.205$ ). PMF grubunda JAK2V617F mutasyonu ile tanı sırasındaki trombosit, LDH düzeyi, dalak boyutu ortalaması, total tromboz, arteriyel tromboz, venöz tromboz ve ölüm arasında ilişki saptanmamıştır ( $r < 0.2$ ).

PMF’de JAK2V617F mutasyonu ve ASXL1 mutasyonu birlikteliği ile kanama komplikasyonu arasında pozitif yönde hafif dereceli bir ilişki saptanmıştır ( $r=0.363$ ). PMF’de JAK2V617F mutasyonu ve IDH mutasyonu birlikteliği ile kanama arasında bir ilişki saptanmamıştır ( $r < 0.2$ ). PMF’de JAK2V617F mutasyonu ve ASXL1 mutasyonu birlikteliği



ile tanı sırasındaki Htc, lökosit, trombosit değerleri, LDH düzeyi, total tromboz, arteriyel tromboz, venöz tromboz ve ölüm arasında ilişki saptanmamıştır ( $r < 0.2$ ). Ayrıca JAK2V617F mutasyonu ve IDH mutasyonu birlikteliği ile tanı sırasındaki Htc, lökosit, trombosit değerleri, LDH düzeyi, total tromboz, arteriyel tromboz, venöz tromboz ve ölüm arasında ilişki saptanmamıştır ( $r < 0.2$ ).

**Tablo XLIV. JAK2V617F mutasyonunu taşıyan ve taşımayan PMF tanılı olguların klinik ve laboratuvar bulguları**

PMF	JAK2V617F mutant (mean [SD])	JAK2 wild tip (mean [SD])	P değeri
<b>Olgu sayısı</b>	58	19	-
<b>Ortalama yaş</b>	61.9 [13.7]	57.7 [16.6]	0.344
<b>Tanı sırasındaki yaş</b>	58.1 [13.7]	52.8 [16]	0.12
<b>Örnek alındığı sıradaki yaş</b>	60.6 [13.4]	56.3 [19]	0.279
<b>Kadın (%)</b>	27 (%46.6)	16 (%84.2)	0.009*
<b>Tanı sırasındaki lökosit (mm<sup>3</sup>)</b>	16.134 [14.633]	9.726 [7.875]	0.046*
<b>Tanı sırasındaki Hgb (g/dl)</b>	11.03 [2.2]	9.4 [1.3]	0.005*
<b>Tanı sırasındaki Htc (%)</b>	32.9 [7.39]	29.4 [4.81]	0.034*
<b>Tanı sırasındaki trombosit (mm<sup>3</sup>)</b>	423.691 [353.469]	464.526 [396.324]	0.832
<b>Tanı sırasındaki LDH (U/L)</b>	843 [405]	782 [364]	0.836
<b>Tanı sırasındaki dalak boyutu (mm)</b>	202.19 [44.2]	183.7 [37.3]	0.193
<b>Kemik iliği fibrozis (%)</b>	58 (%100)	19 (%100)	0.33
<b>0</b>	0	0	-
<b>1</b>	0	0	-
<b>2</b>	14 (%24.1)	2 (%10.5)	-
<b>3</b>	44 (%75.9)	17 (%89.5)	-
<b>Takip süresi (ay)</b>	42 [46.9]	56.6 [48.7]	0.165
<b>OS-Kaplan Meier (mean, ay)</b>	170 ay (%95 CI: 112-229)	133 ay (%95 CI: 92-175)	0.589

**Tablo XLV. JAK2V617F mutasyonunu taşıyan ve taşımayan PMF tanılı olguların klinik ve laboratuvar bulguları (devam)**

<b>PMF</b>	<b>JAK2V617F mutant n (%)</b>	<b>JAK2 wild tip n (%)</b>	<b>P değeri</b>
<b>Olgu sayısı</b>	58	19	-
<b>Lökosit grup</b>	58 (%100)	19 (%100)	0.088
<b>&lt; 10.000/mm<sup>3</sup></b>	26 (%44.8)	14 (%73.7)	-
<b>10.000-25.000</b>	22 (%37.9)	3 (%15.8)	-
<b>≥ 25.000</b>	10 (%17.2)	2 (%10.5)	-
<b>Trombosit grup</b>	58 (%100)	19 (%100)	0.172
<b>&lt; 450.000/mm<sup>3</sup></b>	39 (%67.2)	10 (%52.6)	-
<b>450.000-600.000</b>	5 (%8.6)	1 (%5.3)	-
<b>600.000-1.000.000</b>	8 (%13.8)	7 (%36.8)	-
<b>≥ 1.000.000</b>	6 (%10.4)	1 (%5.3)	-
<b>Tanı sırasında trombositopeni</b>	5 (%6.8)	4 (%21.1)	0.212
<b>Tanı sırasında LDH yüksekliği</b>	49 (%84.5)	15 (%78.9)	0.725
<b>Splenomegali grup</b>	58 (%100)	19 (%100)	0.096
<b>splenomegali yok</b>	0	1 (%5.3)	-
<b>hafif splenomegali</b>	11 (%19)	6 (%31.6)	-
<b>masif splenomegali</b>	47 (%81)	12 (%63.2)	-
<b>Eritrosit transfüzyon ihtiyacı</b>	18 (%31)	3 (%15.8)	0.318
<b>Flebotomi ihtiyacı</b>	1 (%1.7)	0	1
<b>Hidroksiüre</b>	54 (%93.1)	18 (%94.7)	1
<b>Splenektomi</b>	3 (%5.2)	1 (%5.3)	1
<b>AHKHN</b>	2 (%3.4)	1 (%5.3)	1
<b>Lösemi dönüşüm</b>	3 (%5.2)	1 (%5.3)	1
<b>Ölüm</b>	11 (%19)	3 (%15.8)	1

**Tablo XLVI. JAK2V617F mutasyonunu taşıyan ve taşımayan PMF tanılı olguların klinik ve laboratuvar bulguları (devam)**

PMF	JAK2V617F mutant n (%)	JAK2 wild tip n (%)	P değeri
<b>Olgu sayısı</b>	58	19	-
<b>Kanama varlığı</b>	14 (%24.1)	1 (%5.3)	0.098
<b>Tromboz varlığı</b>	8 (%13.8)	3 (%15.8)	1
<b>Kardiyovasküler risk</b>	36 (%62.1)	10 (%52.6)	0.647
<b>Tromboz grup</b>	58 (%100)	19 (%100)	0.437
<b>yok</b>	50 (%86.2)	16 (%84.2)	0.464
<b>arteriyel</b>	4 (%6.9)	3 (%15.8)	-
<b>venöz</b>	3 (%5.2)	0	-
<b>arteriyel+venöz</b>	1 (%1.7)	0	-
<b>ASXL1 mutasyonu</b>	14 (%24.1)	5 (%26.3)	0.535
<b>Birden fazla ASXL1 mutasyonu</b>	1 (%1.7)	0	1
<b>IDH1 mutasyonu</b>	2 (%3.4)	2 (%10.5)	0.253
<b>IDH2 mutasyonu</b>	1 (%1.7)	0	1
<b>IDH mutasyonu (IDH1 veya IDH2)</b>	3 (%5.2)	2 (%10.5)	0.36
<b>ASXL1-IDH birliktelik</b>	1 (%1.7)	2 (%10.5)	0.149

**Tablo XLVII. JAK2V617F mutasyonunu taşıyan ile taşımayan PMF olgularının kemik iliği sitogenetik ve ‘DIPSS-plus’ kriterlerine göre karşılaştırılması**

PMF	JAK2V617F mutant n (%)	JAK2 wild tip n (%)	P değeri
<b>Olgu sayısı</b>	58	19	-
<b>Karyotip normal</b>	58 (%100)	19 (%100)	0.274
<b>iyi karyotip</b>	49 (%84.5)	18 (%94.7)	-
<b>kötü karyotip</b>	7 (%12.1)	0	-
<b>‘DIPSS-plus’</b>	58 (%100)	19 (%100)	0.143
<b>düşük risk</b>	11 (%19)	4 (%21.1)	-
<b>orta-1 risk</b>	22 (%37.9)	5 (%26.3)	-
<b>orta-2 risk</b>	17 (%29.3)	10 (%52.6)	-
<b>yüksek risk</b>	8 (%13.8)	0	-

## 4.5. JAK2V617F ALLEL YÜKÜ SONUÇLARI

### 4.5.1. ET olgularının JAK2V617F allel yüküne göre karşılaştırılması

ET olgularında JAK2V617F allel yükünün dağılımı Şekil XII'de görülmektedir. ET olgularının 59'u (%55.1) düşük allel yüküne, 5'i (%4.7) yüksek allel yüküne sahip olarak bulunmuştur.

ET olgularının JAK2V617F allel yüküne göre klinik ve laboratuvar verileri Tablo XLVIII, XLIX ve L'de özetlenmiştir.

JAK2V617F mutasyonunu taşımayan, düşük JAK2V617F allel yüküne sahip ve yüksek JAK2V617F allel yüküne sahip ET tanı olgular karşılaştırıldığı zaman her 3 grup arasında yaş ortalaması, tanı sırasındaki ortalama yaş ve örneğin alındığı sıradaki ortalama yaş açısından anlamlı fark saptanmamıştır (sırasıyla  $p=0.642$ ;  $p=0.732$ ;  $p=0.601$ ). Her üç grup arasında cinsiyet açısından anlamlı fark saptanmamıştır ( $p=0.267$ ).

Kruskal Wallis testinde üç grup arasında non-parametrik karşılaştırma yapıldığı zaman yüksek JAK2V617F allel yüküne sahip grupta tanı sırasındaki ortalama Hgb ve Htc düzeyi diğer gruplara göre anlamlı olarak düşük saptanmıştır (sırasıyla  $p=0.001$ ,  $p=0.001$ ). Hangi gruplar arasında anlamlı fark olduğunu anlamak için Mann-Whitney testi yapılmıştır. JAK2V617F mutasyonunu taşımayan grupta Hgb ve Htc değeri, düşük JAK2V617F allel yükü olan gruba göre anlamlı olarak daha düşük saptanmıştır (sırasıyla  $p=0.001$ ;  $p=0.001$ ). JAK2V617F mutasyonu olmayan grupla yüksek allel yükü olan grup arasında Hgb ve Htc düzeyi açısından anlamlı fark saptanmamıştır (sırasıyla  $p=0.073$ ;  $p=0.338$ ). Yüksek JAK2V617F allel yükü olan grupta düşük allel yükü olan gruba göre Hgb ve Htc düzeyleri anlamlı olarak düşük saptanmıştır (sırasıyla  $p=0.002$ ;  $p=0.011$ ).

Her üç grup arasında tanı sırasındaki ortalama lökosit ve trombosit değerleri açısından fark saptanmamıştır (sırasıyla  $p=0.263$ ;  $p=0.123$ ). Yüksek JAK2V617F allel yükü taşıyan grupta diğer 2 gruba göre serum LDH düzeyi anlamlı olarak yüksek saptanmıştır ( $p=0.012$ ).

Her üç grup tanı sırasında lökosit ve trombosit değerlerinin dağılımları açısından karşılaştırıldığı zaman istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (sırasıyla  $p=0.326$ ;  $p=0.279$ ). Her üç grup LDH yüksekliği açısından karşılaştırıldığı zaman istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır ( $p=0.173$ ) (Tablo XLIX).

Her üç grup arasında tanı sırasında kemik iliği fibrozis derecesi açısından anlamlı farklılık gözlenmemiştir ( $p=0.315$ ).

Her üç grup tanı sırasında ortalama dalak boyutu açısından karşılaştırıldığı zaman istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ( $p=0.123$ ). Fakat her üç grup tanı sırasında

splenomegali derecesi açısından karşılaştırıldığı zaman JAK2V617F allel yükü yüksek olan grupta masif splenomegali oranı mutasyon olmayan ve düşük allel yüküne sahip gruba göre belirgin yüksek bulunmuştur (sırasıyla %60, %11.6, %16.9;  $p=0.015$ ).

Her 3 grup arasında flebotomi ihtiyacı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır belirgin ( $p=0.5$ ).

Yüksek JAK2V617F allel yüküne sahip grupta kanama sıklığı düşük allel yükü olan ve mutasyon taşımayan gruba göre anlamlı derecede yüksek saptanmıştır (sırasıyla %60, %11.9, %7;  $p=0.003$ ). Bununla paralel olarak yüksek JAK2V617F allel yüküne sahip grupta eritrosit transfüzyon ihtiyacı belirgin olarak yüksek saptanmıştır ( $p=0.022$ ).

Her üç grup arasında kardiyovasküler risk faktörleri varlığı, total tromboz, arteriyel tromboz ve venöz tromboz sıklığı açısından istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmemiştir (sırasıyla  $p=0.148$ ;  $p=0.835$ ;  $p=0.428$ ;  $p=0.142$ ).

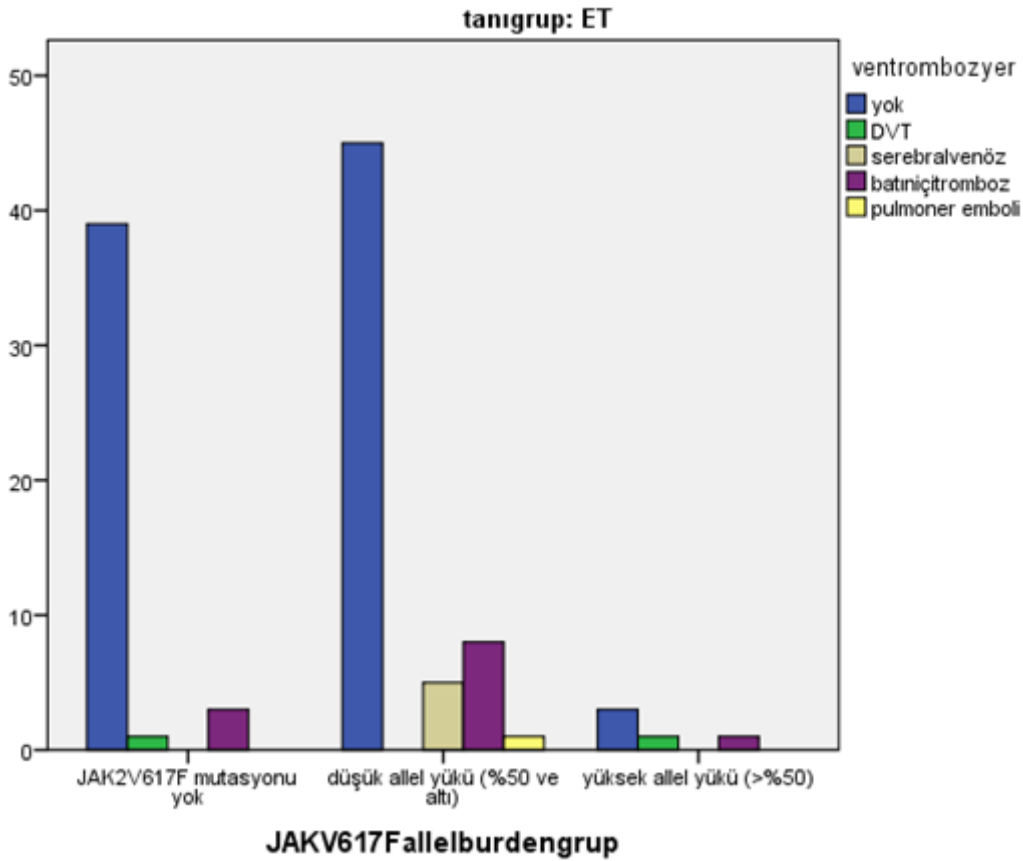
Her üç grup venöz tromboz yerleşimi açısından değerlendirildiği zaman yüksek JAK2V617F allel yüküne sahip grupta DVT sıklığı %20 iken düşük allel yüküne sahip grupta DVT'ye hiç rastlanmamış ve JAK2V617F mutasyonu taşımayan grupta %2.3 oranında saptanmıştır ( $p=0.029$ ) (Şekil XXIII). Her üç grup arasında arteriyel tromboz yerleşimi açısından anlamlı fark saptanmamıştır ( $p=0.428$ ). Kanama lokalizasyonu açısından değerlendirildiği zaman yüksek allel yüküne sahip olguların %20'sinde gastrointestinal kanama, %20'sinde göz içi kanama ve %20'sinde mukozal kanama gözlenirken, JAK2V617F mutasyonu taşımayan grupta ve düşük allel yüküne sahip grupta gastrointestinal kanama sıklığı sırasıyla %7 ve %8.5 olarak saptanmıştır. JAK2V617F mutasyonu taşımayan grupta ve düşük allel yüküne sahip grupta göz içi kanama ve mukozal kanamaya rastlanmamıştır ( $p=0.001$ ) (Şekil XXIV).

Her üç grup ASXL1 mutasyonunun sıklığı açısından karşılaştırıldığı zaman istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ( $p=0.611$ ). Ayrıca her üç grup ASXL1 mutasyon tipleri açısından karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ( $p=0.421$ ).

JAK2V617F mutasyonunu taşımayan, düşük JAK2V617F allel yüküne sahip ve yüksek JAK2V617F allel yüküne sahip ET tanılı olgular, IDH mutasyon sıklığı açısından karşılaştırıldığı zaman istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (sırasıyla %2.3, %1.7, 0;  $p=0.926$ ). Her üç grup arasında splenektomi oranı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ( $p=0.926$ ). Her üç grup hidroksiüre kullanımı açısından karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulunmamıştır ( $p=0.408$ ).

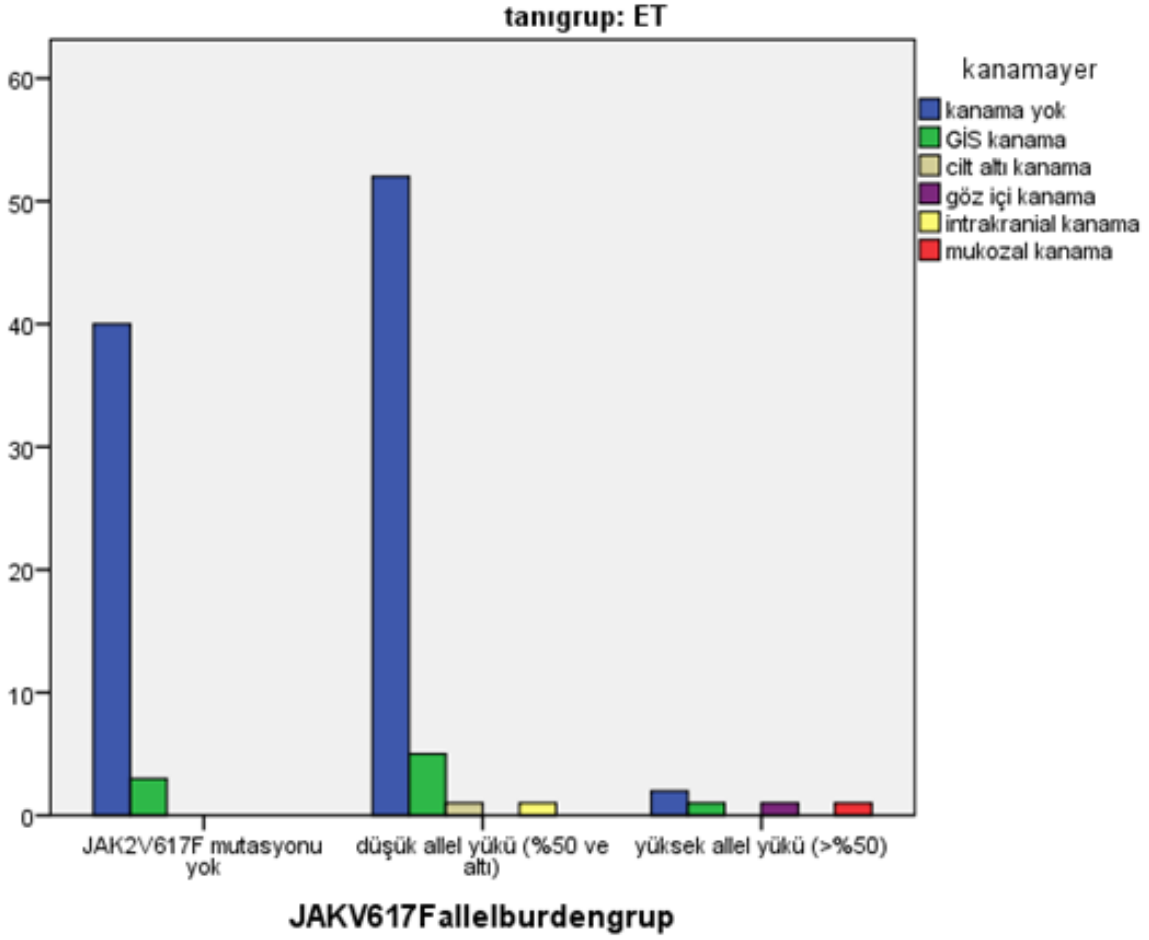
Her üç grup arasında ölüm açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir (p=0.24). Her üç grup arasında TS açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır (p=0.887). ‘Kaplan-Meier’ analizi sonucunda JAK2V617F mutasyonunu taşımayan, JAK2V617F allel yükü düşük ve JAK2V617F allel yükü yüksek olan gruplar OS açısından karşılaştırıldığı zaman anlamlı bir fark saptanmamıştır (sırasıyla ortalama 200 ay; %95 CI: 177-223; 219 ay; %95 CI: 197-241 ve 169 ay; %95 CI: 74-263; p=0.249).

Korelasyon analizi sonucunda ET olgu grubunda JAK2V617F allel yükü ile kanama komplikasyonu ve venöz tromboz arasında pozitif yönde zayıf bir ilişki saptanmıştır (sırasıyla  $r=0.213$ ;  $r=0.201$ ). Bunun yanında ET olgularında JAK2V617F allel yükü ile tanı sırasındaki lökosit değeri arasında pozitif yönde zayıf bir ilişki saptanmıştır ( $r=0.238$ ). ET’de JAK2V617F allel yükü ile tanı sırasındaki trombosit değeri, LDH düzeyi, dalak boyutu ortalaması, total tromboz ve arteriyel tromboz sıklığı arasında ilişki saptanmamıştır ( $r < 0.2$ ).



### Şekil XXIII. ET tanılı olguların JAK2V617F allel yüküne göre venöz tromboz yerleşimleri görülmektedir

Yüksek JAK2V617F allel yüküne sahip grupta DVT sıklığı %20 iken düşük allel yüküne sahip grupta DVT’ye hiç rastlanmamış ve JAK2V617F mutasyonu taşımayan grupta %2.3 oranında saptanmıştır (p=0.029).



**Şekil XXIV. ET tanılı olguların JAK2V617F allel yüküne göre kanama lokalizasyonları görülmektedir**

Yüksek allel yüküne sahip olguların %20'sinde gastrointestinal kanama, %20'sinde göz içi kanama ve %20'sinde mukozal kanama gözlenirken, JAK2V617F mutasyonu taşımayan grupta ve düşük allel yüküne sahip grupta gastrointestinal kanama sıklığı sırasıyla %7 ve %8.5 olarak saptanmıştır. JAK2V617F mutasyonu taşımayan grupta ve düşük allel yüküne sahip grupta göz içi kanama ve mukozal kanamaya rastlanmamıştır (p=0.001). Yüksek JAK2V617F allel yükü olan grupta hayati organlarda kanama sıklığının arttığı söylenebilir.

**Tablo XLVIII. JAK2V617F mutasyonunu taşımayan, düşük JAK2V617F allel yüküne sahip ve yüksek JAK2V617F allel yüküne sahip ET tanılı olguların klinik ve laboratuvar bulguları**

ET	JAK2 wild tip (mean [SD])	Düşük JAK2 allel yükü ( $\leq$ %50) (mean [SD])	Yüksek JAK2 allel yükü (>%50) (mean [SD])	P değeri
<b>Olgu sayısı</b>	43	59	5	-
<b>Ortalama yaş</b>	57.44 [14.7]	55.2 [14.2]	59.8 [17.9]	0.642
<b>Tanı yaşı</b>	51.7 [15.7]	49.4 [14.6]	53.2 [19]	0.732
<b>Örnek alındığı sıradaki yaş</b>	56.07 [14.7]	53.8 [14.2]	58.4 [17.1]	0.601
<b>Kadın (%)</b>	20 (%46.5)	34 (%57.6)	4 (%80)	0.267
<b>Tanı sırasındaki lökosit (mm<sup>3</sup>)</b>	9.593 [3.434]	9.853 [3.663]	14.240 [7.279]	0.263
<b>Tanı sırasındaki Hgb (g/dl)</b>	12.4 [1.9]	13.8 [1.7]	11.1 [0.9]	0.001*
<b>Tanı sırasındaki Htc (%)</b>	36.8 [5.21]	41.2 [5.15]	34.8 [4.76]	0.001*
<b>Tanı sırasındaki trombosit (mm<sup>3</sup>)</b>	1.055.116 [495.928]	881.238 [323.317]	798.600 [312.966]	0.123
<b>Tanı sırasındaki LDH (U/L)</b>	462 [159.7]	430.7 [125.2]	718 [178.6]	0.012*
<b>Tanı sırasındaki dalak boyutu</b>	132.07 [23.86]	138.3 [31.4]	181 [74]	0.123
<b>K.İ.fibrozis</b>	43 (%100)	59 (%100)	5 (%100)	0.351
<b>0</b>	3 (%7)	7 (%11.9)	0	-
<b>1</b>	25 (%58.1)	40 (%67.8)	2 (%40)	-
<b>2</b>	13 (%30.2)	11 (%18.6)	3 (%60)	-
<b>3</b>	2 (%4.7)	1 (%1.7)	0	-



**Tablo XLIX. JAK2V617F mutasyonunu taşımayan, düşük JAK2V617F allel yüküne sahip ve yüksek JAK2V617F allel yüküne sahip ET tanılı olguların klinik ve laboratuvar bulguları (devam)**

ET	JAK2 wild tip n (%)	Düşük JAK2 allel yükü, n (%)	Yüksek JAK2 allel yükü, n (%)	P değeri
<b>Olgu sayısı</b>	43	59	5	-
<b>Lökosit grup</b>	43 (%100)	59 (%100)	5 (%100)	0.326
<b>&lt; 10.000/mm<sup>3</sup></b>	27 (%62.8)	37 (%62.7)	1 (%20)	-
<b>10.000-25.000</b>	16 (%37.2)	21 (%35.6)	4 (%80)	-
<b>≥ 25.000</b>	0	1 (%1.7)	0	-
<b>Trombosit grup</b>	43 (%100)	59 (%100)	5 (%100)	0.279
<b>&lt; 450.000/mm<sup>3</sup></b>	0	0	0	-
<b>450.000-600.000</b>	6 (%14)	10 (%16.9)	2 (%40)	-
<b>600.000-1.000.000</b>	20 (%46.5)	34 (%57.6)	1 (%20)	-
<b>≥ 1.000.000</b>	17 (%39.5)	15 (%25.5)	2 (%40)	-
<b>Tanı sırasında LDH yüksekliği</b>	17 (%39.5)	22 (%37.3)	4 (%80)	0.173
<b>SM grup</b>	43 (%100)	59 (%100)	5 (%100)	0.015*
<b>SM yok</b>	33 %76.8)	33 (%55.9)	1 (%20)	
<b>Hafif SM</b>	5 (%11.6)	16 (%27.1)	1 (%20)	
<b>Masif SM</b>	5 (%11.6)	10 (%16.9)	3 (%60)	
<b>Eritrosit transfüzyon ihtiyacı</b>	4 (%9.3)	0	1 (%20)	0.022*
<b>Flebotomi ihtiyacı</b>	1 (%2.3)	4 (%6.8)	0	0.5
<b>OS-Kaplan Meier mean (%95 CI)</b>	200 ay (177-223)	219 ay (197-241)	169 ay (74-263)	0.249
<b>Takip süresi ay; (mean [SD])</b>	70.1 [56.9]	69.76 [62.9]	69.2 [80.7]	0.887

**Tablo L. JAK2V617F mutasyonunu taşımayan, düşük JAK2V617F allel yüküne sahip ve yüksek JAK2V617F allel yüküne sahip ET tanılı olguların klinik ve laboratuvar bulguları (devam)**

<b>Esansiyel trombositemi</b>	<b>JAK2 wild tip n (%)</b>	<b>Düşük JAK2 allel yükü, n (%)</b>	<b>Yüksek JAK2 allel yükü, n (%)</b>	<b>P değeri</b>
<b>Olgu sayısı</b>	43	59	5	-
<b>Kanama varlığı</b>	3 (%7)	7 (%11.9)	3 (%60)	0.003*
<b>Tromboz varlığı</b>	15 (%34.9)	24 (%40.7)	2 (%40)	0.835
<b>Kardiyovasküler risk</b>	27 (%62.8)	44 (%74.6)	5 (%100)	0.148
<b>Tromboz grup</b>	43 (%100)	59 (%100)	5 (%100)	0.377
<b>yok</b>	28 (%65.1)	35 (%59.3)	3 (%60)	-
<b>arteriyel</b>	10 (%23.3)	11 (%18.6)	0	-
<b>venöz</b>	4 (%9.3)	12 (%20.3)	2 (%40)	-
<b>arteriyel+venöz</b>	1 (%2.3)	1 (%1.8)	0	-
<b>ASXL1 mutasyonu</b>	3(%7)	5 (%8.5)	1 (%20)	0.611
<b>IDH mutasyonu (IDH1/IDH2)</b>	1 (%2.3)	1 (%1.7)	0	0.926
<b>ASXL1-IDH birliktelik</b>	0	0	0	-
<b>Hidroksiüre</b>	35 (%81.4)	52 (%88.1)	5 (%100)	0.408
<b>Splenektomi</b>	42 (%97.7)	58 (%98.3)	5 (%100)	0.926
<b>Lösemi dönüşüm</b>	0	0		-
<b>Ölüm</b>	2 (%4.7)	2 (%3.4)	1 (%20)	0.24

#### 4.5.2. PMF olgularının JAK2V617F allel yüküne göre karşılaştırılması

PMF olgularında JAK2V617F allel yükünün dağılımı Şekil XII'de görülmektedir. PMF olgularının 40'ında (%51.9) allel yükü düşük, 18'inde (%23.4) allel yükü yüksek olarak saptanmıştır.

PMF olgularının JAK2V617F allel yüküne göre klinik ve laboratuvar verileri Tablo LI, LII, LIII'de özetlenmiştir.

JAK2V617F mutasyonunu taşımayan, düşük JAK2V617F allel yüküne sahip ve yüksek JAK2V617F allel yüküne sahip PMF tanılı olgular karşılaştırıldığı zaman yaş ortalaması, tanı sırasındaki ortalama yaş ve örneğin alındığı sıradaki ortalama yaş açısından anlamlı bir fark saptanmamıştır (sırasıyla  $p=0.454$ ;  $p=0.192$ ;  $p=0.404$ ). JAK2V617F mutasyonu taşımayan grupta kadın cinsiyet oranı belirgin yüksek saptanmıştır ( $p=0.011$ ).

Kruskal Wallis testinde üç grup arasında non-parametrik karşılaştırma yapıldığı zaman yüksek allel yüküne sahip grupta tanı sırasındaki ortalama Hgb, Htc ve lökosit düzeyleri diğer gruplara göre anlamlı olarak yüksek saptanmıştır (sırasıyla  $p=0.003$ ;  $p=0.021$ ;  $p=0.001$ ). İkili karşılaştırma yapıldığı zaman JAK2V617F mutasyonunu taşımayan grupta tanı sırasındaki ortalama Hgb değerinin düşük JAK2V617F allel yükü olan gruba göre düşük olma eğiliminde olduğu fakat her iki grup arasında Htc ve lökosit değerlerinin ortalaması açısından anlamlı fark saptanmadığı gözlenmiştir (sırasıyla  $p=0.057$ ;  $p=0.208$ ;  $p=0.417$ ). Yüksek JAK2V617F allel yükü olan grup mutasyon taşımayan grupla karşılaştırıldığı zaman tanı sırasındaki Hgb, Htc ve lökosit değerleri anlamlı olarak yüksek saptanmıştır (sırasıyla  $p=0.001$ ,  $p=0.002$ ,  $p=0.001$ ). Yüksek JAK2V617F allel yüküne sahip grupta Hgb değeri, düşük JAK2V617F allel yüküne sahip grupla karşılaştırıldığı zaman yüksek olma eğiliminde saptanmıştır ( $p=0.075$ ). Yüksek JAK2V617F allel yükü ile düşük JAK2V617F allel yüküne sahip grup karşılaştırıldığı zaman Htc düzeyi açısından anlamlı fark saptanmazken, yüksek allel yüküne sahip grupta lökosit değeri anlamlı olarak yüksek saptanmıştır (sırasıyla  $p=0.106$ ;  $p=0.001$ ).

Her üç grup tanı sırasında lökosit değerlerinin dağılımları açısından değerlendirildiği zaman JAK2V617F mutasyonunu taşımayan ve düşük allel yüküne sahip grupta çoğunlukla lökosit değeri  $10.000/\text{mm}^3$ 'den küçük saptanmıştır (sırasıyla %73.7, %57.5). Yüksek JAK2V617F allel yüküne sahip grupta ise olguların %50'sinde lökosit değeri  $10.000-25.000/\text{mm}^3$  arasında ve %33.3'ünde lökosit  $\geq 25.000/\text{mm}^3$  olarak bulunmuştur ( $p=0.006$ ). Her üç grup arasında tanı sırasında trombosit değerlerinin dağılımları ve LDH yüksekliği açısından istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmemiştir ( $p=0.347$ ;  $p=0.714$ ) (Tablo LII).

Her üç grup arasında kemik iliği fibrozis derecesi açısından anlamlı fark saptanmamıştır ( $p=0.08$ ).

Her üç grup arasında kemik iliği sitogenetik bulguları açısından anlamlı fark saptanmamıştır ( $p=0.572$ ) (Tablo LIV). Her üç grubun 'DIPSS-plus' kriterlerine göre risk dağılımları karşılaştırıldığı zaman JAK2V617F mutasyonunu taşımayan PMF'de olguların orta-2 risk kategorisinde olma eğiliminde olduğu ve düşük JAK2V617F allel yüküne sahip PMF olgularının %20'sinin yüksek risk kategorisinde olduğu, mutasyonu taşımayan ve yüksek allel yüküne sahip hiçbir olgunun ise yüksek risk kategorisinde olmadığı belirlenmiştir ( $p=0.076$ ) (Tablo LIV).

Her üç grup tanı sırasındaki ortalama dalak boyutu açısından karşılaştırıldığı zaman istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır ( $p=0.22$ ). Her üç grup arasında splenomegali derecesi açısından da anlamlı farklılık gözlenmemiştir ( $p=0.115$ ).

Her üç grup arasında flebotomi ihtiyacı açısından anlamlı fark saptanmamıştır ( $p=0.190$ ). Düşük JAK2V617F allel yüküne sahip grupta diğer 2 gruba göre eritrosit transfüzyon ihtiyacı belirgin yüksek ve yüksek allel yüküne sahip grupta belirgin düşük saptanmıştır ( $p=0.032$ ).

Her üç grup arasında kardiyovasküler risk faktörleri varlığı, total tromboz, arteriyel tromboz ve venöz tromboz sıklığı açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır (sırasıyla  $p=0.763$ ;  $p=0.905$ ;  $p=0.322$ ;  $p=0.142$ ).

Her üç grup arasında kanama sıklığı açısından istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmemiştir ( $p=0.124$ ). Her üç grup arasında arteriyel tromboz ve venöz tromboz lokalizasyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir (sırasıyla  $p=0.435$ ;  $p=0.419$ ). Bunun yanında gruplar arasında kanama lokalizasyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır ( $p=0.309$ ).

JAK2V617F mutasyonunu taşımayan, düşük JAK2V617F allel yüküne sahip ve yüksek JAK2V617F allel yüküne sahip PMF tanılı olgular, ASXL1 mutasyonunun sıklığı açısından karşılaştırıldığı zaman istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (sırasıyla %26.3, %25, %22.2;  $p=0.957$ ). Her üç grup ASXL1 mutasyon tiplerinin dağılımı açısından değerlendirildiği zaman istatistiksel anlamlı bir fark saptanmamıştır ( $p=0.596$ ). Birden fazla ASXL1 mutasyonu taşıyan tek PMF olgusunun JAK2V617F allel yükü %5-12.5 olarak saptanmıştır.

JAK2V617F mutasyonunu taşımayan, düşük JAK2V617F allel yüküne sahip ve yüksek JAK2V617F allel yüküne sahip grup IDH mutasyon sıklığı açısından karşılaştırıldığı zaman istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir (sırasıyla %10.5, %7.5, 0;

p=0.401). ASXL1 ve IDH mutasyonu birlikteliği olan 3 PMF olgusunun 2'si JAK2V617F mutasyonu olmayan grupta ve biri düşük JAK2V617F allel yükü olan grupta olmakla beraber bu durum istatistiksel anlamlı bir fark yaratmamıştır (p=0.205).

Her üç grup arasında splenektomi oranı açısından istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmemiştir (p=0.492). Her üç grup hidrokisiüre kullanımı ve AHKHN açısından karşılaştırıldığında anlamlı bir fark saptanmamıştır (sırasıyla p=0.349; p=0.62).

Her üç grup arasında ölüm ve lösemiye dönüşüm oranı açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır (sırasıyla p=0.909; p=0.996). Her üç grup arasında TS açısından anlamlı farklılık gözlenmemiştir (p=0.359). 'Kaplan-Meier' analizi sonucunda JAK2V617F mutasyonunu taşımayan, JAK2V617F allel yükü düşük ve JAK2V671F allel yükü yüksek olan gruplar OS açısından karşılaştırıldığında anlamlı bir fark saptanmamıştır (ortalama 133 ay; %95 CI: 92-175; 167 ay; %95 CI: 104-230 ve 101 ay; %95 CI: 71-132; p=0.857).

Korelasyon analizi sonucunda PMF olgu grubunda JAK2V617F allel yükü ile tanı sırasındaki lökosit ve Htc değeri arasında pozitif yönde hafif dereceli bir ilişki saptanmıştır (sırasıyla r=0.396; r=0.318). PMF'de JAK2V617F allel yükü ile tanı sırasındaki trombosit, LDH düzeyi, dalak boyutu ortalaması, total tromboz, arteriyel tromboz, venöz tromboz ve kanama komplikasyonu arasında ilişki saptanmamıştır (r<0.2).

**Tablo LI. JAK2V617F mutasyonunu taşımayan, düşük JAK2V617F allel yüküne sahip ve yüksek JAK2V617F allel yüküne sahip PMF tanılı olguların klinik ve laboratuvar bulguları**

PMF	JAK2 wild tip (mean [SD])	Düşük JAK2 allel yükü ( $\leq$ %50) (mean [SD])	Yüksek JAK2 allel yükü ( $>$ %50) (mean [SD])	P değeri
<b>Olgu sayısı</b>	19	40	18	-
<b>Ortalama yaş</b>	57.7 [16.6]	60.5 [15.5]	64.8 [8.4]	0.454
<b>Tanı yaşı</b>	52.8 [16]	56.7 [15.2]	61.2 [9.5]	0.192
<b>Örnek alındığı sıradaki yaş</b>	56.3 [16.7]	59.3 [15.1]	63.5 [8.5]	0.404
<b>Kadın (%)</b>	16 (%84.2)	19 (%47.5)	8 (%44.4)	0.011*
<b>Tanı sırasındaki lökosit (<math>\text{mm}^3</math>)</b>	9.726 [7.875]	11.597 [9.018]	26.216 [19.374]	0.001*
<b>Tanı sırasındaki Hgb (g/dl)</b>	9.4 [1.3]	10.7 [2.3]	11.76 [1.9]	0.003*
<b>Tanı sırasındaki Htc (%)</b>	29.4 [4.81]	31.8 [7.71]	35.5 [6.1]	0.021*
<b>Tanı sırasındaki trombosit (<math>\text{mm}^3</math>)</b>	464.526 [396.324]	377.302 [341.495]	526.777 [367.513]	0.184
<b>Tanı sırasındaki LDH (U/L)</b>	782 [364.5]	808 [350]	921 [508.7]	0.855
<b>Tanı sırasındaki dalak boyutu</b>	183.7 [37.3]	196.9 [42.8]	213.8 [46.3]	0.22
<b>K.İ.fibrozis</b>	19 (%100)	40 (%100)	18 (%100)	0.08
<b>0</b>	0	0	0	-
<b>1</b>	0	0	0	-
<b>2</b>	2 (%10.5)	7 (%17.5)	7 (%38.9)	-
<b>3</b>	17 (%89.5)	33 (%82.5)	11 (%61.1)	-
<b>Takip süresi (ay)</b>	56.6 [48.7]	42.8 [52.1]	40.1 [33.9]	0.359
<b>OS-ay; Mean (%95 CI)</b>	133 ay (92-175)	167 ay (104-230)	101 (71-132)	0.857

**Tablo LII.**

**Tablo LII. JAK2V617F mutasyonunu taşımayan, düşük JAK2V617F allel yüküne sahip ve yüksek JAK2V617F allel yüküne sahip PMF tanılı olguların klinik ve laboratuvar bulguları (devam)**

<b>PMF</b>	<b>JAK2 wild tip n (%)</b>	<b>Düşük JAK2 allel yükü, n (%)</b>	<b>Yüksek JAK2 allel yükü, n (%)</b>	<b>P değeri</b>
<b>Olgu sayısı</b>	19	40	18	-
<b>Lökosit grup</b>	19 (%100)	40 (%100)	18 (%100)	0.006*
<b>&lt; 10.000/mm<sup>3</sup></b>	14 (%73.7)	23 (%57.5)	3 (%16.7)	-
<b>10.000-25.000</b>	3 (%15.8)	13 (%32.5)	9 (%50)	-
<b>≥ 25.000</b>	2 (%10.5)	4 (%10)	6 (%33.3)	-
<b>Trombosit grup</b>	19 (%100)	40 (%100)	18 (%100)	0.347
<b>&lt; 450.000/mm<sup>3</sup></b>	10 (%52.6)	28 (%70)	11 (%61.1)	-
<b>450.000-600.000</b>	1 (%5.3)	4 (%10)	1 (%5.5)	-
<b>600.000-1.000.000</b>	7 (%36.8)	5 (%12.5)	3 (%16.7)	-
<b>≥ 1.000.000</b>	1 (%5.3)	3 (%7.5)	3 (%16.7)	-
<b>Tanı sırasında trombositopeni</b>	4 (%21.1)	4 (%10)	1 (%5.6)	0.304
<b>Tanı sırasında LDH yüksekliği</b>	15 (%78.9)	33 (%82.5)	16 (%88.9)	0.714
<b>SM grup</b>	19 (%100)	40 (%100)	18 (%100)	0.115
<b>SM yok</b>	1 (%5.3)	0	0	-
<b>Hafif SM</b>	6 (%31.6)	10 (%25)	1 (%5.6)	-
<b>Masif SM</b>	12 (%63.2)	30 (%75)	17 (%94.4)	-
<b>Eritrosit transfüzyon ihtiyacı</b>	3 (%15.8)	16 (%40)	2 (%11.1)	0.032*
<b>Flebotomi ihtiyacı</b>	0	0	1 (%5.6)	0.190

**Tablo LIII. JAK2V617F mutasyonunu taşımayan, düşük JAK2V617F allel yüküne sahip ve yüksek JAK2V617F allel yüküne sahip PMF tanılı olguların klinik ve laboratuvar bulguları (devam)**

<b>PMF</b>	<b>JAK2 wild tip n (%)</b>	<b>Düşük JAK2 allel yükü, n (%)</b>	<b>Yüksek JAK2 allel yükü, n (%)</b>	<b>P değeri</b>
<b>Olgu sayısı</b>	19	40	18	-
<b>Kanama varlığı</b>	1 (%5.3)	11 (%27.5)	3 (%16.7)	0.124
<b>Tromboz varlığı</b>	3 (%15.8)	6 (%15)	2 (%11.1)	0.905
<b>Kardiyovasküler risk</b>	10 (%52.6)	25 (%62.5)	11 (%61.1)	0.763
<b>Tromboz grup yok</b>	19 (%100)	40 (%100)	18 (%100)	0.483
<b>arteriyel</b>	16 (%84.2)	34 (%85)	16 (%88.9)	-
<b>venöz</b>	3 (%15.8)	2 (%5)	2 (%11.1)	-
<b>arteriyel+venöz</b>	0	3 (%7.5)	0	-
<b>ASXL1 mutasyonu</b>	0	1 (%2.5)	0	-
<b>ASXL1 mutasyonu</b>	5 (%26.3)	10 (%25)	4 (%22.2)	0.957
<b>Birden fazla ASXL1 mutasyonu</b>	0	1 (%2.5)	0	0.626
<b>IDH1 mutasyonu</b>	2 (%10.5)	2 (%5)	0	0.352
<b>IDH2 mutasyonu</b>	0	1 (%2.5)	0	0.626
<b>IDH mutasyonu (IDH1/IDH2)</b>	2 (%10.5)	3 (%7.5)	0	0.401
<b>ASXL1-IDH</b>	2 (%10.5)	1 (%2.5)	0	0.205
<b>Hidroksiüre</b>	18 (%94.7)	36 (%90)	18 (%100)	0.349
<b>Splenektomi</b>	1 (%5.3)	3 (%7.5)	0	0.492
<b>AHKHN</b>	1 (%5.3)	2 (%5)	0	0.62
<b>Lösemi dönüşüm</b>	1 (%5.3)	2 (%5)	1 (%5.6)	0.996
<b>Ölüm</b>	3 (%15.8)	8 (%20)	3 (%16.7)	0.909



**Tablo LIV. JAK2V617F mutasyonunu taşımayan, düşük JAK2V617F allel yüküne sahip ve yüksek JAK2V617F allel yüküne sahip PMF olgularının kemik iliği sitogenetik ve ‘DIPSS-plus’ kriterlerine göre karşılaştırılması**

PMF	JAK2 wild tip n (%)	Düşük JAK2 allel yükü, n (%)	Yüksek JAK2 allel yükü, n (%)	P değeri
<b>Olgu sayısı</b>	19	40	18	-
<b>Karyotip</b>	19 (%100)	40 (%100)	18 (%100)	0.572
<b>normal</b>	18 (%94.7)	34 (%85)	15 (%83.3)	-
<b>iyi karyotip</b>	0	5 (%12.5)	2 (%11.1)	-
<b>kötü karyotip</b>	1 (%5.3)	1 (%2.5)	1 (%5.6)	-
<b>‘DIPSS-plus’</b>	19 (%100)	40 (%100)	18 (%100)	0.076
<b>düşük risk</b>	4 (%21)	7 (%17.5)	4 (%22.2)	-
<b>orta-1 risk</b>	5 (%26.3)	13 (%32.5)	9 (%50)	-
<b>orta-2 risk</b>	10 (%52.6)	12 (%30)	5 (%27.8)	-
<b>yüksek risk</b>	0	8 (%20)	0	-

## 4.6. YAŞAM EĞRİLERİ

ET ve PMF’de yaşam eğrileri, ‘Kaplan-Meier’ analizi kullanılarak OS’ni (mean, ay) ve PMF’de LFS’ı (mean, ay) hesaplamak için oluşturulmuştur. Gruplar arası sağkalım ve lösemiye transformasyon oranlarının karşılaştırılması log rank testi ile yapılmıştır. OS (ay), tanıdan ölüme kadar veya tanıdan takip edilen güne kadar geçen süre olarak tanımlanmıştır. Bağımsız değişkenler ile yaşam süresi arasındaki ilişkinin incelenmesi için Cox regresyon modeli kullanılarak çok değişkenli analiz yapılmış ve ölümün kümülatif riskini hesaplamak için odds ratio (OR) kullanılmıştır.

### 4.6.1. ET olgularında yaşam eğrileri

ET olgularında mutasyon durumuna (ASXL1, IDH ve JAK2V617F), ASXL1 mutasyon tipine ve JAK2V617F allel yüküne göre OS’nin tahmini yapılmıştır.

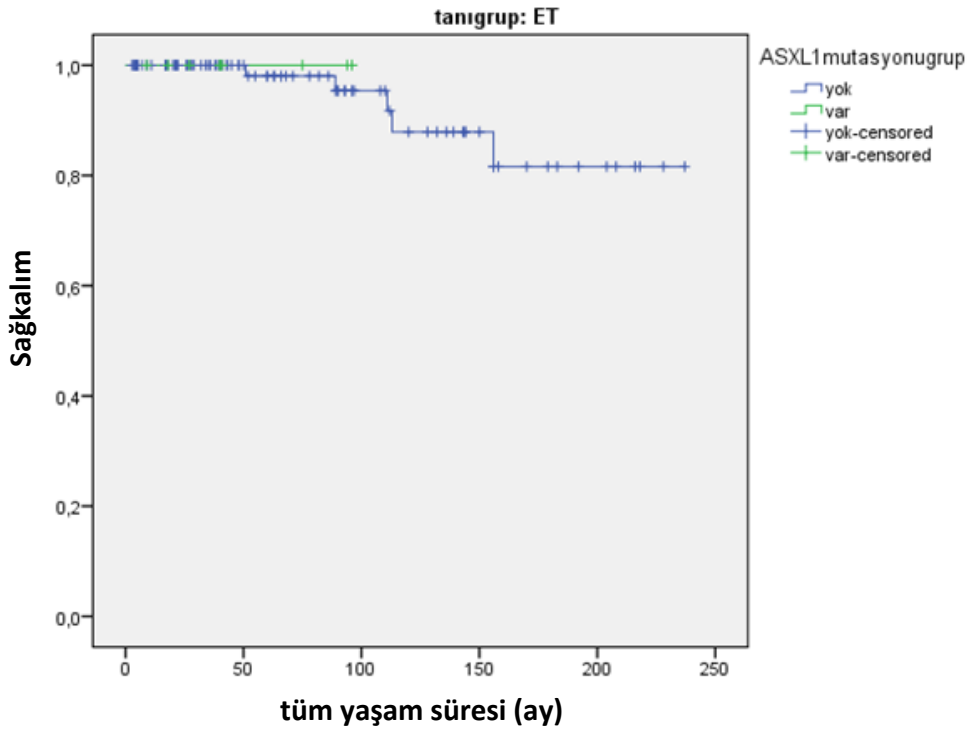
'Kaplan-Meier' analizi, ASXL1 mutasyonunu taşıyan ET olgularında (n=9) OS'nin ASXL1 mutasyonunu taşımayan olgularla (n=98) benzer olduğunu göstermiştir (p=0.737) (Şekil XXV).

ASXL1 mutasyonunu taşıyan ET olgularının 5'inde nonsense ve 4'ünde missense mutasyon saptanmıştır. Olgular mutasyon tiplerine göre gruplandırıldığı zaman OS açısından anlamlı bir fark saptanmamıştır (p=0.945) (Şekil XXVI).

IDH mutasyonunu taşıyan yalnızca 2 ET tanılı olgu olmasına rağmen yaşam analizi yapılmıştır. Gruplar arasında OS açısından bir fark gözlenmemiştir (p=0.845) (Şekil XXVII).

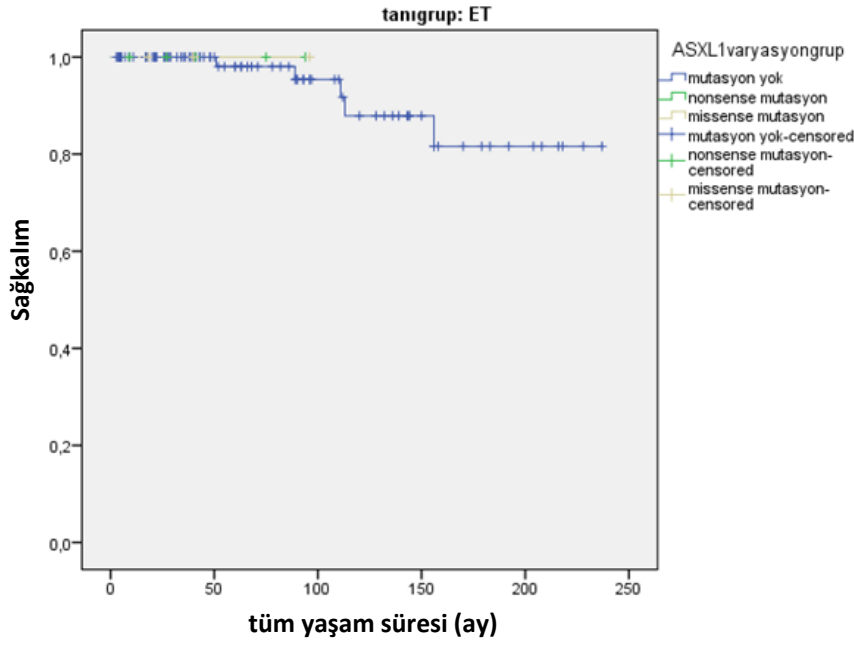
JAK2V617F mutasyonunu taşıyan ve taşımayan ET olguları arasında OS benzer bulunmuştur (sırasıyla ortalama 215 ay; %95 CI: 193-238 ve 200 ay; %95 CI: 177-223; p=0.958) (Şekil XXVIII).

JAK2V617F mutasyonunu taşımayan, JAK2V617F allel yükü düşük ve JAK2V617F allel yükü yüksek olan gruplar OS açısından karşılaştırıldığı zaman anlamlı bir fark saptanmamıştır (sırasıyla ortalama 200 ay; %95 CI: 177-223; 219 ay; %95 CI: 197-241 ve 169 ay; %95 CI: 74-263; p=0.249) (Şekil XXIX).



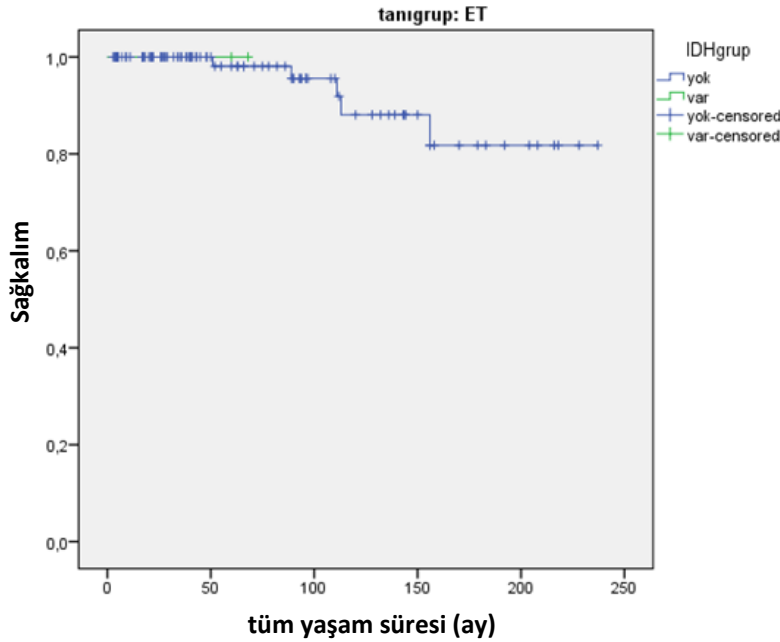
**Şekil XXV. ET olgularında ASXL1 mutasyon varlığına göre OS'nin 'Kaplan-Meier' analizindeki görünümü**

ASXL1 mutasyonunu taşıyan ET olgularında (n=9) OS, ASXL1 mutasyonunu taşımayan olgularla (n=98) benzer saptanmıştır (p=0.737). ASXL1 mutant ET olgularının hepsi hayattadır.



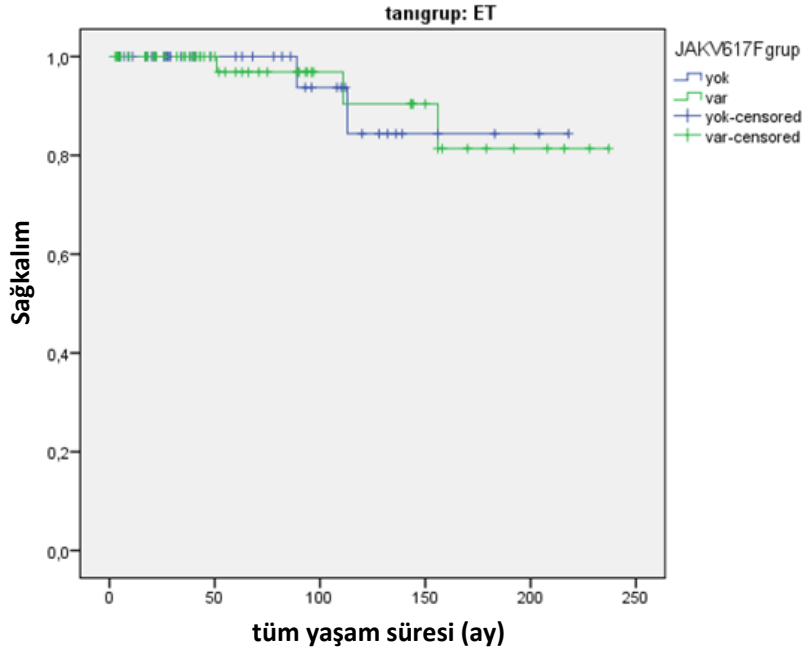
**Şekil XXVI. ET olgularında ASXL1 mutasyon tipine göre OS'nin 'Kaplan-Meier' analizindeki görünümü**

ASXL1 mutasyonunu taşıyan ET olgularının 5'inde nonsense ve 4'ünde missense mutasyon saptanmıştır. Olgular mutasyon tiplerine göre gruplandırıldığı zaman OS açısından anlamlı bir fark saptanmamıştır (p=0.945)



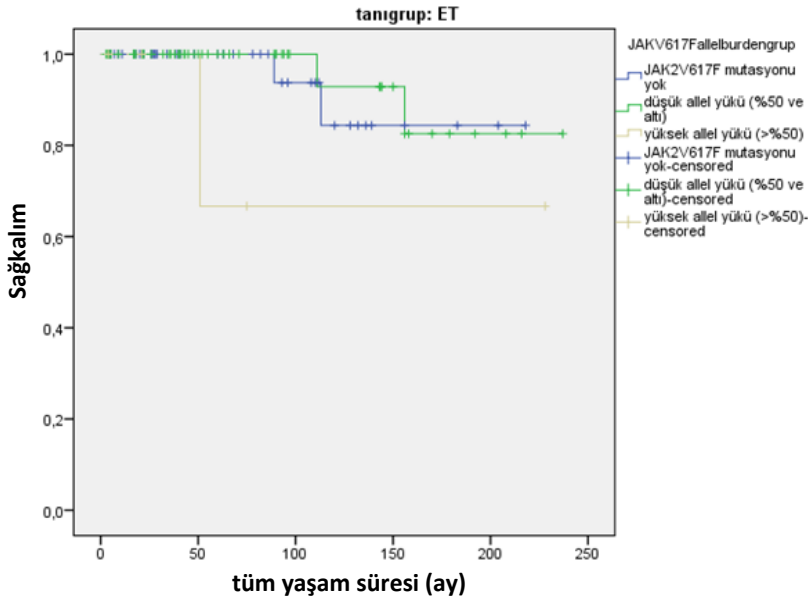
**Şekil XXVII. ET olgularında IDH mutasyon varlığına göre OS'nin 'Kaplan-Meier' analizindeki görünümü**

IDH mutasyonunu taşıyan ET olgularında (n=2) OS, IDH mutasyonunu taşımayan olgularla (n=105) benzer saptanmıştır (p=0.845). IDH mutasyonunu taşıyan ET olgularının ikisi de hayattadır.



**Şekil XXVIII. JAK2V617F mutasyon varlığına göre ET olgularında OS'nin 'Kaplan-Meier' analizindeki görünümü**

JAK2V617F mutasyonunu taşıyan (n=64) ve taşımayan (n=43) ET olguları arasında OS benzer bulunmuştur (sırasıyla ortalama 215 ay; %95 CI: 193-238 ve 200 ay; %95 CI: 177-223; p=0.958).



**Şekil XXIX. JAK2V617F mutasyonunu taşımayan (n=43), JAK2V617F allel yükü düşük (n=59) ve JAK2V617F allel yükü yüksek (n=5) ET olgularında OS'nin karşılaştırılması**

OS açısından anlamlı fark saptanmamıştır (sırasıyla ortalama 200 ay; %95 CI: 177-223; 219 ay; %95 CI: 197-241 ve 169 ay; %95 CI: 74-263; p=0.249).

#### 4.6.2. PMF olgularında yaşam eğrileri

PMF olgularında mutasyon durumuna (ASXL1, IDH, JAK2V617F), ASXL1 mutasyon tipine, JAK2V617F allel yükü ve ‘DIPSS-plus’ kriterlerine bağlı olarak OS’nin tahmini yapılmıştır.

ASXL1 mutasyonunu taşıyan PMF olgularında OS, ASXL1 mutasyonunu taşımayan olgulara göre anlamlı olarak kısa saptanmıştır (sırasıyla ortalama 108 ay; %95 CI: 62-153 ve 202 ay; %95 CI: 123-282;  $p=0.025$ ) (Şekil XXX).

ASXL1 mutasyonunu taşıyan PMF olgularının 14’ünde nonsense, 4’ünde missense ve bir olguda nonsense ve missense mutasyon birlikteliği saptanmıştır. Olgular mutasyon tiplerine göre gruplandırıldığı zaman nonsense mutasyon tipinde OS’nin diğer gruplara göre düşük olma eğiliminde olduğu görülmüştür ( $p=0.09$ ) (Şekil XXXI).

PMF’de IDH mutasyonunu taşıyan olgu sayısı az olmasına rağmen ( $n=5$ ) ‘Kaplan-Meier’ analizi yapılmıştır. Bu analize göre IDH mutasyonunu taşıyan ve taşımayan PMF olguları arasında OS benzer bulunmuştur (sırasıyla ortalama 125 ay; %95 CI: 11-238 ve 128 ay; %95 CI: 98-157;  $p=0.351$ ) (Şekil XXXII).

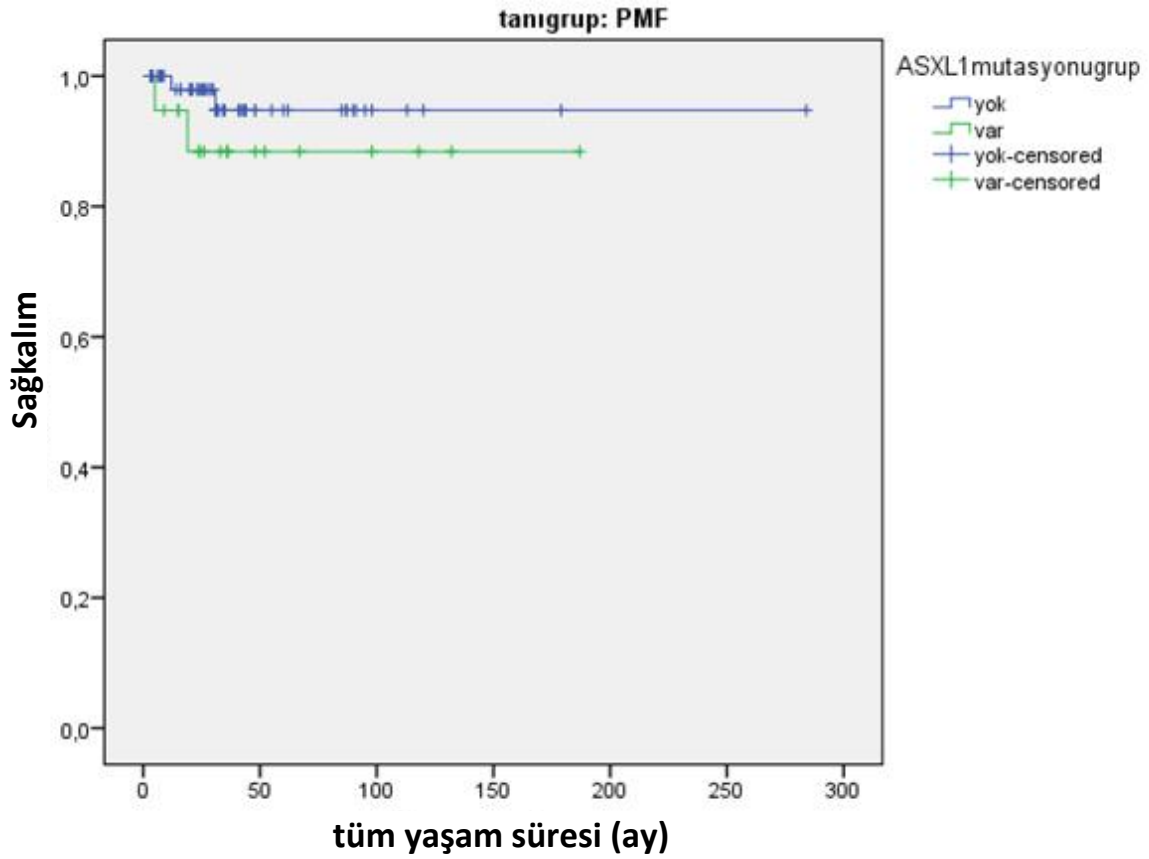
JAK2V617F mutasyonunu taşıyan ve taşımayan PMF olguları arasında OS benzer bulunmuştur (sırasıyla ortalama 170 ay; %95 CI: 112-229 ve 133 ay; %95 CI: 92-175;  $p=0.589$ ) (Şekil XXXIII).

JAK2V617F mutasyonunu taşımayan, JAK2V617F allel yükü düşük ve JAK2V617F allel yükü yüksek olan gruplar OS açısından karşılaştırıldığında anlamlı bir fark saptanmamıştır (ortalama 133 ay; %95 CI: 92-175; 167 ay; %95 CI: 104-230 ve 101 ay; %95 CI: 71-132;  $p=0.857$ ) (Şekil XXXIV).

PMF olguları ‘DIPSS-plus’ kriterlerine göre düşük, orta-1, orta-2 ve yüksek riskli olarak gruplandırıldığı zaman yüksek riskli grupta diğerlerine göre OS anlamlı olarak kısa bulunmuştur ( $p=0.007$ ) (Şekil XXXV).

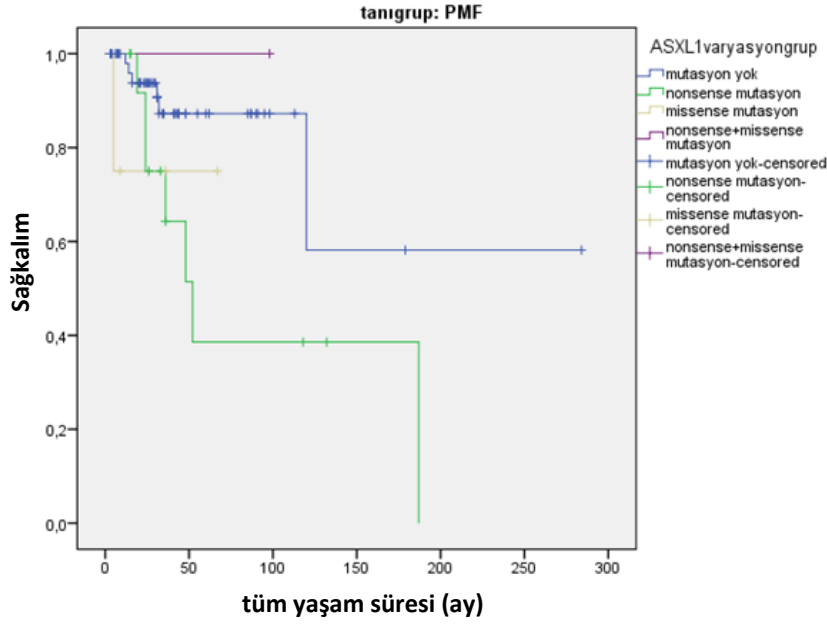
Cox regresyon modeline JAK2V617F mutasyonu, JAK2V617F allel yükü, ASXL1 mutasyonu, ASXL1 mutasyon tipi, IDH mutasyonu ve ‘DIPSS-plus’ kriterleri dahil edilerek çok değişkenli yaşam analizi yapılmıştır. Bunun sonucunda, ‘DIPSS-plus’ kriterlerine göre yüksek riskli grubun ve ASXL1 mutasyonunun OS üzerindeki olumsuz etkisinin sürdüğü gösterilmiştir (sırasıyla OR: 3.19; %95 CI: 1.09-9.2;  $p=0.002$  ve OR: 2.75; %95 CI: 1.37-5.5;  $p=0.033$ ). Tek değişkenli analizde ASXL1 mutasyon tipine göre yapılan yaşam analizinde nonsense mutasyon varlığında OS’nin düşük olma eğiliminde olduğu görülmesine rağmen çok değişkenli analizde önemini yitirmiştir (sırasıyla  $p=0.09$ ;  $p=0.131$ ). Sonuç olarak Cox

regresyon analizi ile PMF’de ‘DIPSS-plus’ kriterlerine göre yüksek riskli grubun, diğer risk gruplarına göre OS üzerine 3.19 kat olumsuz etkisi olduğu ve ASXL1 mutasyon varlığında ise ölüm riskinin 2.75 kat arttığı gösterilmiştir. Bunun sonucunda çok değişkenli analizde bu iki parametrenin OS üzerine bağımsız etkisi gösterilmiştir.



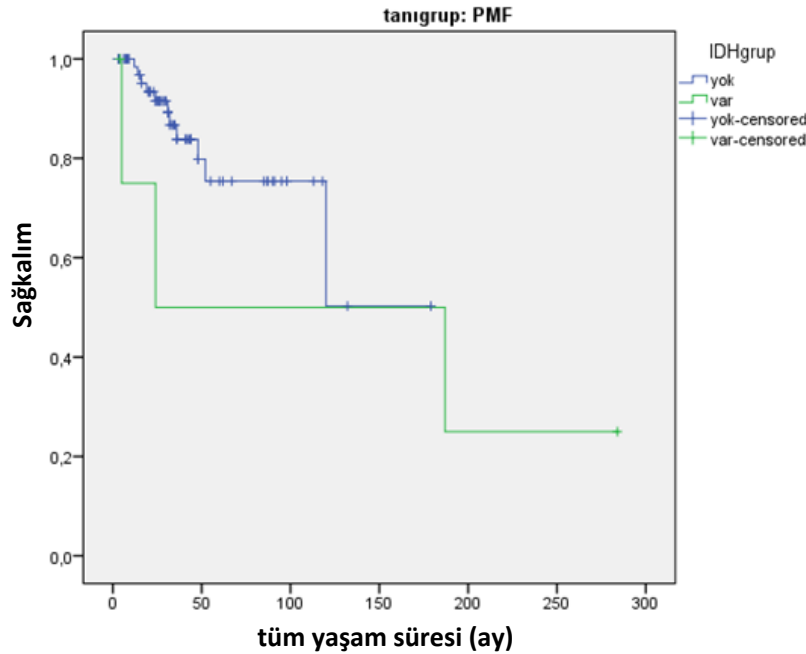
**Şekil XXX. PMF olgularında ASXL1 mutasyon varlığına göre OS'nin 'Kaplan-Meier' analizindeki görünümü**

ASXL1 mutasyonunu taşıyan PMF olgularında (n=19) OS, ASXL1 mutasyonunu taşımayan olgulara göre (n=58) anlamlı olarak kısa saptanmıştır (sırasıyla ortalama 108 ay; %95 CI: 62-153 ve 202 ay; %95 CI: 123-282; p=0.025)



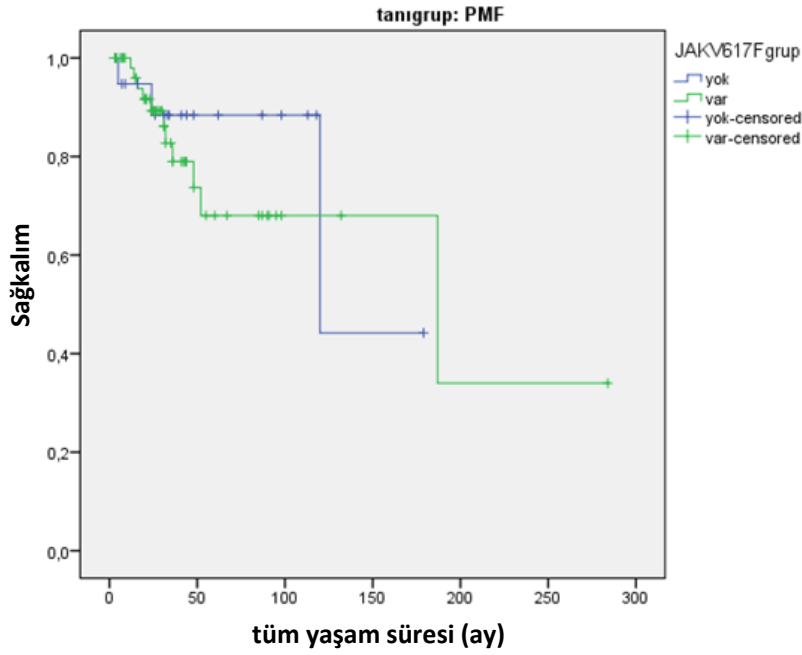
**Şekil XXXI.** Olgular mutasyon tiplerine göre gruplandırıldığı zaman nonsense mutasyon tipinde (çerçeve kayması mutasyonu dahil) OS'nin diğer gruplara göre düşük olma eğiliminde olduğu görülmüştür (p=0.09)

Nonsense ve missense mutasyonu birlikte taşıyan tek PMF olgusu halen hayattadır.



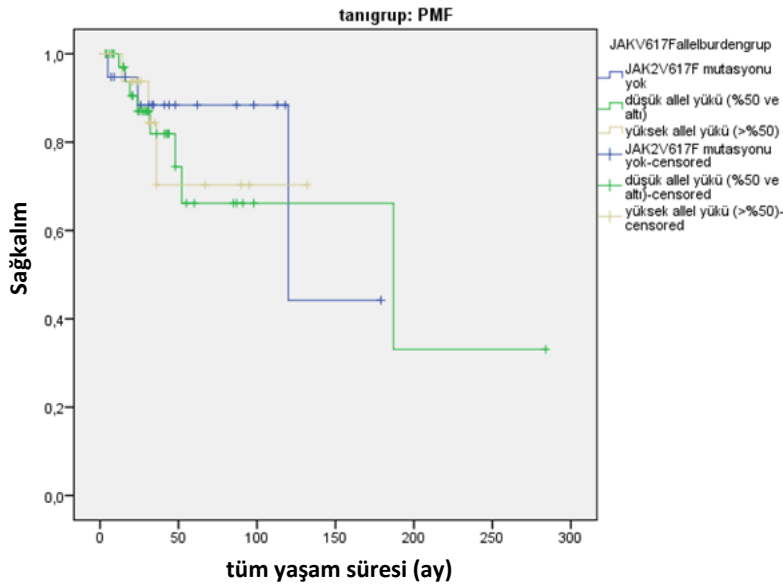
**Şekil XXXII.** IDH mutasyon varlığına göre PMF olgularında OS'nin 'Kaplan-Meier' analizindeki görünümü

IDH mutasyonunu taşıyan (n=5) ve taşımayan (n=72) PMF olguları arasında OS benzer bulunmuştur (sırasıyla ortalama 125 ay; %95 CI: 11-238 ve 128 ay; %95 CI: 98-157; p=0.351).



**Şekil XXXIII. JAK2V617F mutasyon varlığına göre PMF olgularında OS'nin 'Kaplan-Meier' analizindeki görünümü**

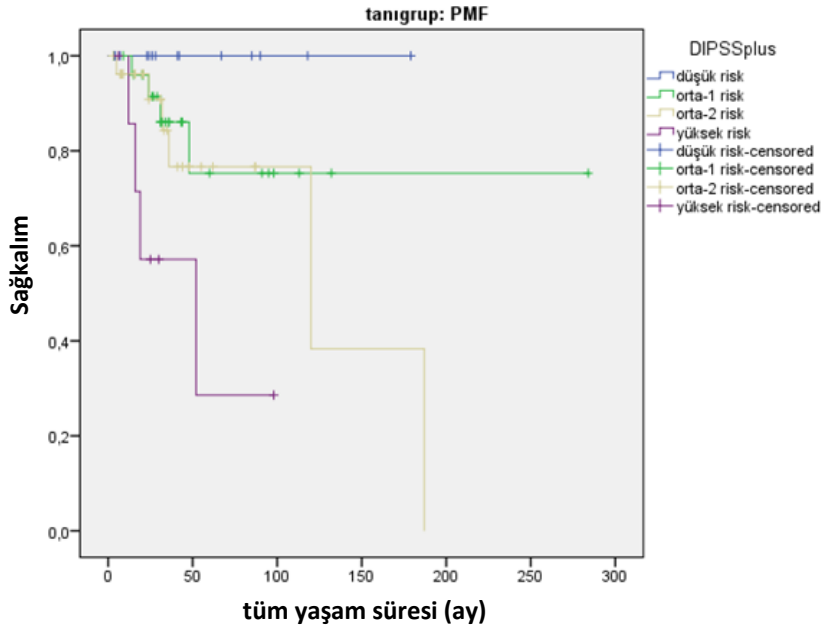
JAK2V617F mutasyonunu taşıyan (n=58) ve taşımayan (n=19) PMF olguları arasında OS benzer bulunmuştur (sırasıyla ortalama 170 ay; %95 CI: 112-229 ve 133 ay; %95 CI: 92-175; p=0.589).



**Şekil XXXIV. JAK2V617F allel yüküne göre PMF olgularında OS'nin 'Kaplan-Meier' analizindeki görünümü**

JAK2V617F mutasyonunu taşımayan (n=19), JAK2V617F allel yükü düşük (n=40) ve JAK2V617F allel yükü yüksek olan gruplar (n=18) OS açısından karşılaştırıldığında anlamlı bir fark saptanmamıştır (ortalama 133 ay; %95 CI: 92-175; 167 ay; %95 CI: 104-230 ve 101 ay; %95 CI: 71-132; p=0.857).





**Şekil XXXV. ‘DIPSS-plus’ kriterlerine göre PMF olgularında OS’nin ‘Kaplan-Meier’ analizindeki görünümü**

PMF olguları ‘DIPSS-plus’ kriterlerine göre düşük (n=15), orta-1 (n=27), orta-2 (n=27) ve yüksek riskli (n=8) olarak gruplandırıldığı zaman yüksek riskli grupta diğerlerine göre OS anlamlı olarak kısa bulunmuştur (p=0.007). Düşük risk grubunda olan 15 olgunun hepsi hayattadır.

#### 4.6.3. PMF’de lösemi ilişkisiz sağkalım eğrileri

PMF olgularında mutasyon durumuna (ASXL1, IDH, JAK2V617F), ASXL1 mutasyon tipine, JAK2V617F allel yüküne ve ‘DIPSS-plus’ kriterlerine göre LFS’in tahmini yapılmıştır.

ASXL1 mutasyonunu taşıyan ve taşımayan PMF olguları arasında LFS benzer bulunmuştur (sırasıyla ortalama 166 ay; %95 CI: 140-193 ve 270 ay; %95 CI: 251-289; p=0.275) (Şekil XXXVI).

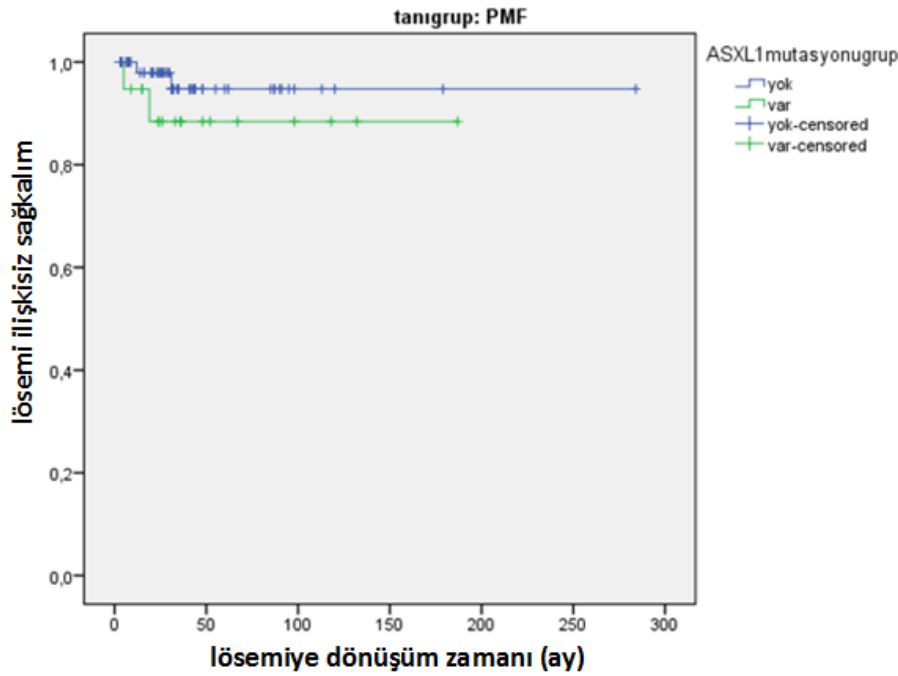
ASXL1 mutasyonunu taşıyan PMF olguları mutasyon tiplerine göre gruplandırıldığı zaman LFS açısından anlamlı bir fark saptanmamıştır (p=0.207) (Şekil XXXVII).

PMF’de IDH mutasyonunu taşıyan olgu sayısı az olmasına rağmen (n=5) ‘Kaplan-Meier’ analizi sonucunda IDH mutant grupta mutasyonu taşımayan gruba göre LFS anlamlı olarak düşük saptanmıştır (sırasıyla ortalama 169 ay; %95 CI: 159-180 ve 214 ay; %95 CI: 95-332; p=0.024) (Şekil XXXVIII).

JAK2V617F mutasyonunu taşıyan ve taşımayan PMF olguları arasında LFS benzer bulunmuştur (sırasıyla ortalama 264 ay; %95 CI: 242-286 ve 169 ay; %95 CI: 152-187; p=0.934) (Şekil XXXIX).

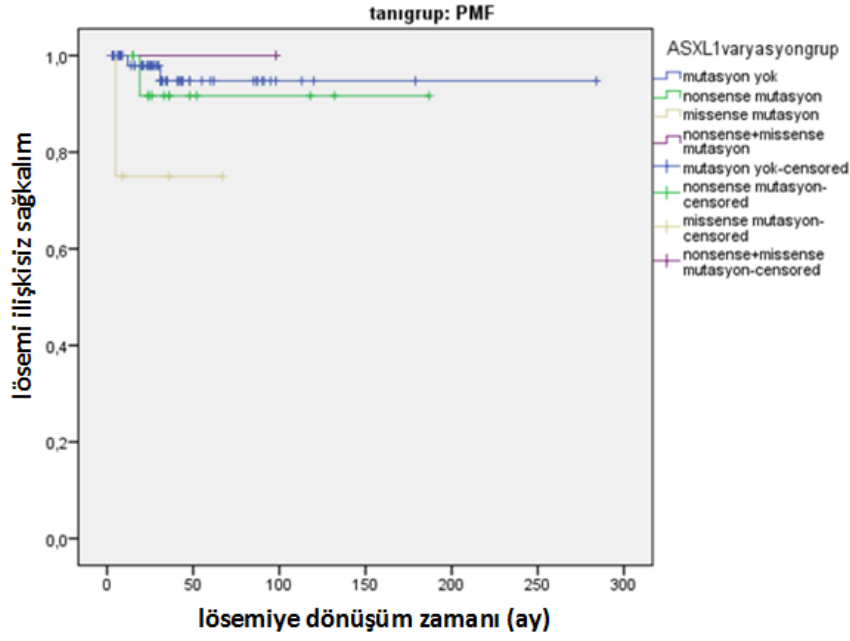
JAK2V617F mutasyonunu taşımayan, JAK2V617F allel yükü düşük ve JAK2V617F allel yükü yüksek olan gruplar LFS açısından karşılaştırıldığında anlamlı bir fark saptanmamıştır (ortalama 169 ay; %95 CI: 152-187; 266 ay; %95 CI: 243-289 ve 121 ay; %95 CI: 103-140; p=0.997) (Şekil XL).

PMF olguları 'DIPSS-plus' kriterlerine göre düşük, orta-1, orta-2 ve yüksek riskli olarak gruplandırıldığı zaman yüksek riskli grupta diğerlerine göre LFS anlamlı olarak kısa bulunmuştur (p=0.032) (Şekil XLI).



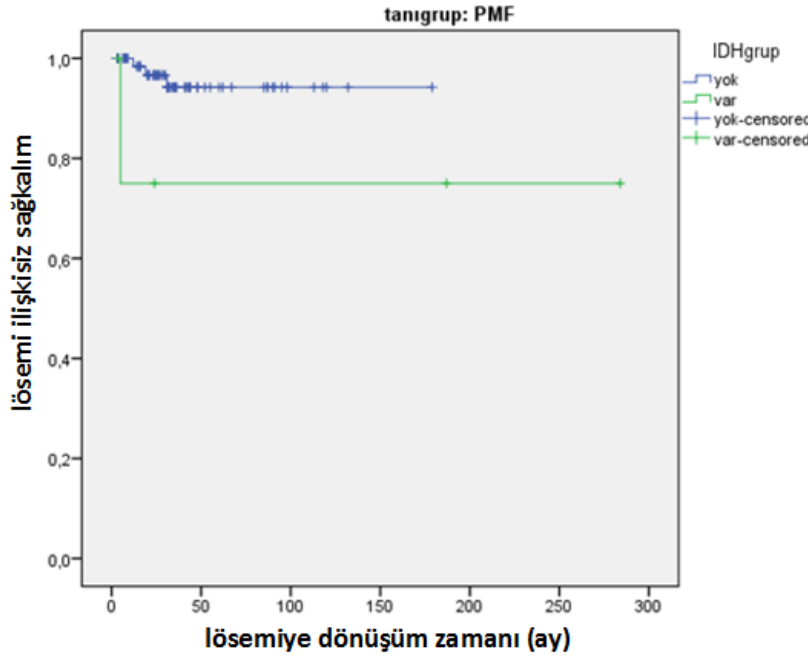
**Şekil XXXVI. PMF olgularında ASXL1 mutasyon varlığına göre LFS'in 'Kaplan-Meier' analizindeki görünümü**

ASXL1 mutasyonunu taşıyan PMF olguları ile (n=19) mutasyonu taşımayan olgular (n=58) arasında LFS benzer bulunmuştur (sırasıyla ortalama 166 ay; %95 CI: 140-193 ve 270 ay; %95 CI: 251-289; p=0.275).



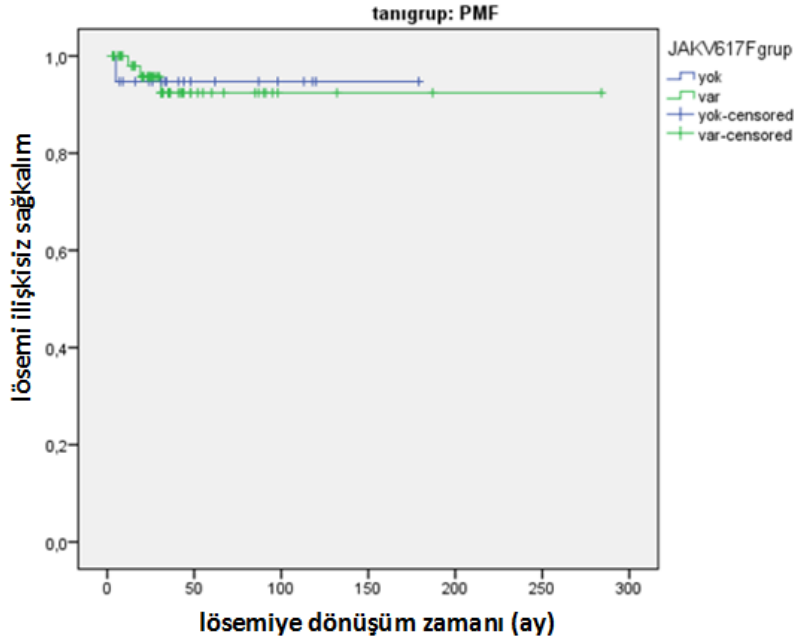
**Şekil XXXVII. PMF olgularında ASXL1 mutasyon tipine göre LFS'nin 'Kaplan-Meier' analizindeki görünümü**

Olgular mutasyon tiplerine göre gruplandırıldığı zaman LFS açısından anlamlı fark saptanmamıştır ( $p=0.207$ ). Nonsense ve missense mutasyonu birlikte taşıyan tek PMF olgusunda lösemiye dönüşüm saptanmamıştır.



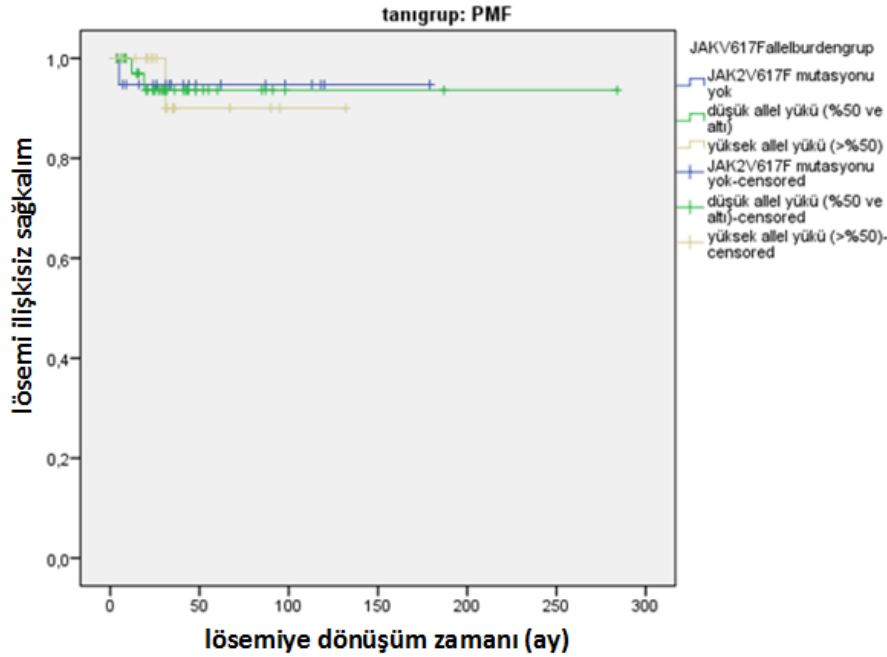
**Şekil XXXVIII. IDH mutasyon varlığına göre PMF olgularında LFS'nin 'Kaplan-Meier' analizindeki görünümü**

PMF'de IDH mutasyonunu taşıyan olgu sayısı az olmasına rağmen ( $n=5$ ) 'Kaplan-Meier' analizi sonucunda IDH mutant grupta mutasyonu taşımayan gruba göre LFS anlamlı olarak düşük saptanmıştır (sırasıyla ortalama 169 ay; %95 CI: 159-180 ve 214 ay; %95 CI: 95-332;  $p=0.024$ ).



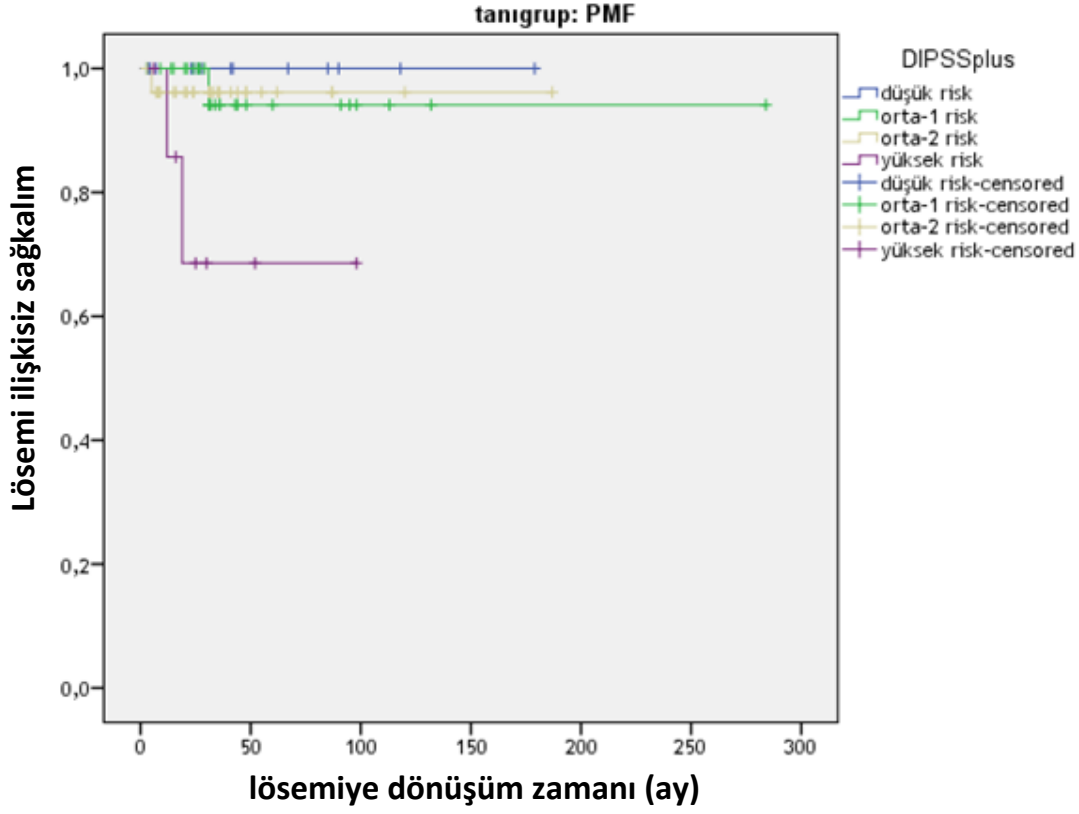
**Şekil XXXIX. JAK2V617F mutasyon varlığına göre PMF olgularında LFS'nin 'Kaplan-Meier' analizindeki görünümü**

JAK2V617F mutasyonunu taşıyan (n=58) ve taşımayan (n=19) PMF olguları arasında LFS benzer bulunmuştur (sırasıyla ortalama 264 ay; %95 CI: 242-286 ve 169 ay; %95 CI: 152-187; p=0.934).



**Şekil XL. JAK2V617F allel yüküne göre PMF olgularında LFS'nin 'Kaplan-Meier' analizindeki görünümü**

JAK2V617F mutasyonunu taşımayan, JAK2V617F allel yükü düşük ve JAK2V617F allel yükü yüksek olan gruplar LFS açısından karşılaştırıldığında anlamlı bir fark saptanmamıştır (ortalama 169 ay; %95 CI: 152-187; 266 ay; %95 CI: 243-289 ve 121 ay; %95 CI: 103-140; p=0.997).



**Şekil XLI. ‘DIPSS-plus’ kriterlerine göre PMF olgularında LFS’in ‘Kaplan-Meier’ analizindeki görünümü**

PMF olguları ‘DIPSS-plus’ kriterlerine göre düşük (n=15), orta-1 (n=27), orta-2 (n=27) ve yüksek riskli (n=8) olarak gruplandırıldığı zaman yüksek riskli grupta diğerlerine göre LFS anlamlı olarak kısa bulunmuştur (p=0.032). Düşük risk grubunda olan 15 olgunun hiçbirinde lösemiye dönüşüm olmamıştır.

## 5. TARTIŞMA

2005 yılında JAK2 somatik mutasyonunun keşfinden sonra, takip eden 8 yıl boyunca Ph-negatif MPN'lerin moleküler patogenezinin anlaşılmasında önemli ve hızlı gelişmeler yaşanmıştır (7, 9). JAK2 sinyalindeki regülasyon kusuru, bu hastalıklar için merkezi rol oynamasına rağmen genetik analizler beklenmeyen bir şekilde kompleks yapıyı ortaya çıkarmıştır. Tüm bu gelişmelere rağmen ET ve PMF olgularının önemli bir kısmında halen tespit edilemeyen mutasyonların varlığı bilinmektedir. Moleküler gelişmelere paralel olarak son yıllarda tedavide de gelişmeler sağlanmış ve 10'dan fazla JAK kinaz inhibitörü klinik çalışmalara dahil edilmiştir. Birçok JAK kinaz inhibitörünün PMF'de splenomegalide gerileme, konstitüsyonel semptomlar ve sitopenilerde iyileşmeye neden olduğu bilinmektedir. Fakat JAK2 inhibitörlerinin hastalığın progresyonu ve kemik iliğindeki histolojik özellikleri (örneğin fibrozis) geriletip geriletmediği veya JAK2 allel yükünü önemli bir şekilde etkileyip etkilemediği henüz bilinmemektedir. Ph-negatif MPN'lerdeki moleküler patogenezin ve kritik sinyal yollarının daha iyi anlaşılmasının tanı ve tedavide gelişmelere neden olacağını düşünmekteyiz.

Çalışmamızda İstanbul Üniversitesi İTİF İç Hastalıkları Anabilim Dalı Hematoloji Polikliniği'nde Ph-negatif MPN tanısı ile takip edilen 107 ET ve 77 PMF olmak üzere toplam 184 olguda ASXL1, IDH1, IDH2 mutasyonları ve JAKV617F allel yükünün klinik seyir, prognoz üzerine etkisi ve yaşam süresi ile olan ilişkisi değerlendirilmiştir. Çalışmaya dahil edilen 107 ET olgusunun 49'u erkek, 58'i kadın; 77 PMF olgusunun 34'ü erkek, 43'ü kadındır. ET için yaş ortalaması 56.3 (SD 14.5), PMF için yaş ortalaması 60.8 (SD 14.5) bulunmuştur. Çalışmamızda ET olgularının %8.4'ünde (9/107) ve PMF olgularının %24.7'sinde (19/77) ASXL1 mutasyonu saptanmıştır. IDH mutasyon sıklığı incelendiği zaman ise ET olgularının %1.9'unda (2/107) ve PMF olgularının %6.5'inde (5/77) IDH mutasyonu saptanmıştır. JAK2V617F mutant allel yükünü tespit etmek için 'JAK2 MutaScreen kit'i kullanılarak ve altı ölçekli standarda dayalı olarak (tespit etme eşiği %2) yapılan ölçümde ET olgularının %59.8'inde (64/107) ve PMF olgularının %75.3'ünde (58/77) JAK2V617F mutasyonu saptanmıştır. JAK2V617F allel yüküne bakıldığı zaman ET olgularının %55.1'i düşük allel yükü (allel yükü  $\leq$  %50), %4.7'si yüksek allel yükü (allel yükü  $>$  %50) taşımaktadır. PMF olgularının ise %51.9'i düşük allel yükü, %23.4'ü yüksek allel yükü taşımaktadır.

Ph-negatif MPN'lerde ASXL1 mutasyon sıklığını araştıran dünyada sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır (31, 36, 37). ASXL1, kromozom 20q11'de yerleşmiştir. Birçok

hematopoetik hücre tipinde ekprese olmakla beraber toplam 12 ekzon içermektedir. ASXL1 mutasyonları ağırlıklı olarak ekzon 12'de nonsense (anlamsız) ve çerçeve kayması mutasyonları şeklinde ortaya çıkmaktadır. ASXL1 mutasyonları ilk kez MDS'da, Gelsi-Boyer V. ve arkadaşları tarafından 2009 yılında tanımlanmıştır (34). Bu çalışmada 35 MDS'lu olgunun 4'ünde (%11) ASXL1 mutasyonları saptanmıştır. ASXL1'in ileri sekans analizleri, ASXL1 geninin malign myeloid neoplazilerde en çok mutasyona uğrayan genlerden biri olduğunu ortaya çıkarmıştır. Günümüzde, ASXL1 mutasyonunun MDS, MPN, KMML ve AML'yi içeren tüm malign myeloid hastalıklarda saptandığı bilinmektedir (581). Çalışmalar ASXL1 mutasyonlarının MPN'de yaklaşık %10, AML'de %17 ve KMML'de %49 oranında bulunduğunu bildirmiştir (31, 34, 553). Ph-negatif MPN'ler içinde ASXL1 mutasyonunun sıklığı PV için %2-5, ET için %5-10, PMF için %13-26 ve post-PV/ET miyelofibroзда %22-38.5 oranında bildirilmiştir (31, 36, 37). MPN olgularındaki çalışmalara ayrı ayrı bakıldığında zaman zaman Abdel-Wahab O. ve arkadaşlarının çalışmasında Mayo Kliniği'nden dahil edilen 46 PMF olgusunun 6'sında (%13) ve 22 post-PV/ET miyelofibro olgusunun 5'inde (%23) ASXL1 mutasyonu saptanmıştır (37). Aynı çalışmada Harvard Enstitüsü'nden dahil edilen 25 PMF olgusunun 3'ünde (%12) bu mutasyon tespit edilmiştir (37). Brecqueville M. ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ise 30 PV olgusunun 2'sinde (%7), 53 ET olgusunun 2'sinde (%4), 30 PMF olgusunun 6'sında (%20), 4 post-PV miyelofibro olgusunun ikisinde (%50) ve 10 post-ET miyelofibro olgusunun birinde (%10) ASXL1 mutasyonu saptanmıştır (38). Carbuccia N. ve arkadaşlarının bir çalışmasında ise 35 ET olgusunun 1'inde (%3) ve 10 PMF olgusunun 3'ünde (%30) ASXL1 mutasyonu saptanmıştır (31). Stein BL. ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ASXL1 mutasyonu 47 PMF olgusunun 15'inde (%32) saptanırken PV için sıklığı %2 (1/42) olarak bildirilmiştir. 41 ET olgusunda ise bu mutasyona rastlanmamıştır (582). Ricci N. ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 42 PMF olgusunun 23'ünde (%55) ve 23 post-PV/ET miyelofibro olgusunun 5'inde (%22) ASXL1 mutasyonu saptanmıştır (583). MPN'lerde ASXL1 mutasyonunu araştıran çalışmalardaki olgu serileri çoğunlukla küçüktür (31, 37, 38). PMF olgularında ASXL1 mutasyonunu araştıran tek geniş olgu serisini içeren çalışma Vannucchi AM. ve arkadaşlarının yaptığı çalışmadır (39). Bu çalışmaya Mayo Kliniği'nden dahil edilen 279 PMF olgusunun 85'inde (%31) ASXL1 mutasyonu saptanmıştır. Aynı çalışmada Avrupa Kohortu'nu oluşturan 483 PMF olgusunda ASXL1 mutasyon sıklığı %21.7 olarak bildirilmiştir. Bizim çalışmamız ise 107 ET ve 77 PMF olgusunu içermektedir. Sonuç olarak çalışmamız rölatif olarak büyük hasta grubunu içermekle beraber ülkemizde Ph-negatif MPN'de bu mutasyonun sıklığını araştıran ilk

çalışmadır. Bildiğimiz kadarı ile bugüne kadar ASXL1 mutasyonunun araştırıldığı en geniş sayıda ET olgusunu içeren çalışma bizim çalışmamızdır.

Çalışmamızda ASXL1 (ekzon 12) mutasyonlarını tespit etmek için konvansiyonel PZR yapılmış ve ardından aynı primerler kullanılarak DNA çift taraflı olarak dizilenmiştir (ileri primer: 5'CCACCCTGGGTGGTTAAAG-3'; geri primer: 5'TCGCTGTAGATCTGACGTAC-3'). Bu yaklaşımla ASXL1 (ekzon 12) mutasyonlarının %83'ünün tanımlandığı bilinmektedir (ASXL1'de P575-R687 aralığındaki amino asit bölgesine denk gelmektedir) (577, 580). Bizim çalışmamızda bu metod kullanılarak ET olgularının %8.4'ünde (9/107) ve PMF olgularının %24.7'sinde (19/77) ASXL1 mutasyonu saptanmıştır. Sonuç olarak PMF olgu grubumuzda ASXL1 mutasyonu, ET grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Çalışmamızda ASXL1 mutasyonlarının görülme sıklığı literatürle benzerdir.

Bugüne kadar yapılan çalışmalar ASXL1 mutasyonlarının ağırlıklı olarak PHD domainindeki protein kısmının C-terminal trunkasyonuna neden olduğunu ortaya koymaktadır. Tüm ASXL1 mutasyonlarının yarısından fazlasını oluşturan mutasyon guanin nükleotidinin duplikasyonudur (c.1934dupG) (553, 580, 582). Bu mutasyon, çerçeve kaymasına neden olmaktadır (p.Gly646TrpfsX12) (581). Abdel-Wahab O. ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada bu mutasyon 'PCR artefaktı' olarak tanımlanmıştır (584). Çünkü bu çalışmada ASXL1 mutasyonu taşıyan olguların normal dokularındaki DNA'sında ve kan hastalığı olmayan sağlıklı gönüllülerden elde edilen örneklerin %25'inden fazlasında p.Gly646TrpfsX12 mutasyonunu saptamışlardır (584). Abdel-Wahab O. ve arkadaşları bu mutasyonu gerçek bir mutasyon kabul etmedikleri için ardından yaptıkları bir çalışmada p.Gly646TrpfsX12 mutasyonunu hesaba katmamışlardır (37). Bu çalışmada Mayo Kliniği'nden dahil edilen 46 PMF olgusunun 6'sında (%13) ve Harvard Enstitüsü'nden dahil edilen 25 PMF olgusunun 3'ünde (%12) ASXL1 mutasyonu tespit edilmiştir. Fakat başka çalışmalarda myeloid malignitelerde p.Gly646TrpfsX12 mutasyonu saptanırken sağlıklı gönüllülerin DNA'sında ve germ-line DNA'larda bu mutasyon gözlenmemiştir (580, 582, 585). Thol F. ve arkadaşlarının 2011 yılında yaptığı bir çalışmada 193 MDS'lu olguda ve 65 sağlıklı gönüllüde ASXL1 mutasyonu çalışılmıştır (585). Bu çalışmada MDS olgularının 9'unda p.Gly646TrpfsX12 mutasyonu saptanmıştır. Fakat sağlıklı gönüllülerin hiçbirinde bu mutasyonu saptamamışlardır. Ardından Ricci C. ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada da miyelofibroz olgularında en sık p.Gly646TrpfsX12 mutasyonunu saptanmıştır (583). Aynı çalışmada mutasyonu taşıyan olguların pürifiye edilmiş CD3 lenfositlerinde bu mutasyonun var olmadığını göstermişlerdir (583). Sonuç olarak son dönemlerde yapılan çalışmaların sonucunda c.1934dupG sonucunda oluşan p.Gly646TrpfsX12 mutasyonu gerçek bir mutasyon



olarak kabul edilmiştir (580, 582, 583, 585). Stein BL. ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada MPN olgularında c.1934dupG sonrasında en sık ikinci mutasyon c.1900\_1922 del olarak bildirilmiştir (582). Bizim çalışmamızda 184 Ph-negatif MPN tanılı olgunun 28'inde (%15.2) toplam 29 ASXL1 mutasyonu saptanmıştır (PMF tanılı bir olguda çift mutasyon bulunmuştur). 29 mutasyonun 14'ü (%48.2) c.1934dupG, 6'sı (%20.6) c.1954G>A ve 4'ü (%13.7) c.1900\_1922 del adlı mutasyonlardan oluşmuştur. Aynı ayrı olgu gruplarına bakıldığı zaman c.1934dupG ve c.1954G>A mutasyonları ET'de eşit sıklıkta bulunmakla beraber PMF'de birinci sıklıkta c.1934dupG mutasyonu olmakla beraber takiben c.1900\_1922 del ve c.1954G>A mutasyonları eşit sıklıkta bulunmuştur. ASXL1 mutasyon dağılımına bakıldığı zaman PMF'de nonsense mutasyon (çerçeve kayması mutasyonları dahil) sıklığı, ET grubuna göre anlamlı derecede yüksek saptanmıştır.

Çalışmalarda ASXL1 mutasyonları için farklı insidenslerin gözlenmesi, analiz edilen olgu sayısına, gerçek mutasyonlardan ziyade polimorfizm ifade eden nükleotid değişimlerinin saptanmasına, tartışmalı kabul edilen p.Gly646TrpfsX12 çerçeve kaymasının varlığı gibi çeşitli faktörlere bağlanabilir.

Ph-negatif MPN olgularında ASXL1 varlığının cinsiyet ve yaşla ilişkisini araştıran kısıtlı sayıda çalışma bulunmaktadır (37, 38, 39, 581). Stein BL. ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ASXL1 mutasyonunu taşıyan miyelofibroz olguları ile taşımayan grup karşılaştırıldığı zaman yaş ve cinsiyet açısından farklılık saptanmamıştır (582). Benzer şekilde başka bir çalışmada ASXL1 mutasyonu taşıyan PMF olguları, taşımayan grupla yaş ve cinsiyet bakımından benzer bulunmuştur (37). Bundan farklı olarak Brecqueville M. ve arkadaşlarının yaptığı 127 Ph-negatif MPN olgusunu içeren bir çalışmada ASXL1 mutasyonu ileri yaşla ilişkili bulunmuştur (38). En büyük PMF'li olgu serisini içeren çalışmada da ASXL1 mutasyonu ileri yaş olgularda daha sık gözlenmiştir (39). Bizim çalışmamızda ise ASXL1 mutasyonu taşıyan ET olgularının tanı sırasındaki yaş ortalaması ileri olma eğiliminde iken mutasyonu taşıyan ve taşımayan olgular arasında cinsiyet açısından fark gözlenmemiştir. PMF olgu grubumuzda ASXL1 mutasyonu varlığında ileri yaşla anlamlı derecede ilişki saptanırken, cinsiyet açısından fark saptanmamıştır.

PMF'de ASXL1 mutasyonunun kısa OS ile ilişkisini bildiren çoğunlukla küçük olgu serilerini içeren kısıtlı sayıda çalışma bulunmaktadır (31, 37, 38). 44 miyelofibroz (30 PMF, 10 post-ET miyelofibroz, 4 post-PV miyelofibroz) olgusunu içeren bir çalışmada ASXL1 mutasyonunu taşıyan grupta 5 yıllık OS daha düşük bulunmuştur (38). Abdel-Wahab O. ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya Mayo Kliniği'nden 46 ve Harvard Enstitüsü'nden 25 olmak üzere toplam 71 PMF olgusu dahil edilmiştir. Bu çalışmada tek değişkenli analizde ASXL1

mutasyonunun varlığı kısa OS ile ilişkili bulunmuştur (37). ASXL1 mutasyonunun PMF’de prognozla ilişkisini araştıran tek büyük olgu serisini içeren çalışma Vannucchi AM. ve arkadaşlarının 2013 yılında yaptığı çalışmadır (39). Bu çalışmada Avrupa Kohortu’nu oluşturan 483 PMF olgusunda ASXL1 mutasyonu varlığı, kısa OS ve lösemik transformasyonla ilişkili bulunmuştur. Aynı çalışmada Mayo Kliniği’nden dahil edilen 374 PMF olgu grubunda ise ASXL1 mutasyonlarının LFS ile ilişkisi olmadığı fakat kısa OS ile ilişkisi olduğu saptanmıştır (39). 77 PMF olgusunu içeren çalışmamızda, tek değişkenli ve çok değişkenli analiz sonucunda ASXL1 mutasyonu varlığında kısa OS ile ilişki ve ölüm oranında artış saptanmıştır. Çalışmamızda, Vannucchi AM. ve arkadaşlarının çalışmasındaki Mayo Kliniği’nden dahil edilen olguların verileri ile paralel olarak ASXL1 mutasyonu varlığında lösemik transformasyonla ilişki saptanmamıştır (39). Ayrıca çalışmamızda PMF’de farklı ASXL1 mutasyon tiplerinin OS üzerine etkisi de araştırılmıştır. Bunun sonucunda, tek değişkenli analizde nonsense mutasyon tipinde (çerçeve kayması mutasyonu dahil) OS’nin, missense mutasyon taşıyan ve hiç mutasyon taşımayan gruba göre düşük olma eğiliminde olduğu, fakat çok değişkenli analizde önemini yitirdiği görülmüştür. ET olgu grubumuzda ise ASXL1 mutasyonu ve ASXL1 mutasyon tipi ile OS arasında bir ilişki bulunmamıştır.

ASXL1 mutasyonunu taşıyan MPN olgularının laboratuvar karakteristiklerini araştıran kısıtlı sayıda çalışma bulunmakla beraber farklı sonuçlar bildirilmiştir (38, 39, 582). Breckeville M. ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ASXL1 mutasyonunun varlığı lökosit veya trombosit sayısında anlamlı bir değişikliğe yol açmazken mutasyonu taşıyan olgularda Hgb düzeyi daha düşük saptanmıştır (38). Stein BL. ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise ASXL1 mutasyonunu taşıyan miyelofibroz olgularında lökosit, Hgb ve trombosit değerlerinde farklılık gözlenmemiştir (582). En büyük PMF olgu serisini içeren Vannucchi AM. ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada Avrupa Kohortu’nu oluşturan ASXL1 mutasyonunu taşıyan PMF olgularında lökositoz, anemi ve konstitüsyonel semptomlar daha belirgin ve dolaşımdaki blast yüzdesi daha fazla bulunmuştur. Aynı çalışmada Mayo Kliniği’nden dahil edilen ASXL1 mutasyonu taşıyan olgularda Hgb değerinde farklılık gözlenmezken lökositoz ve konstitüsyonel semptomlar daha belirgin ve dolaşımdaki blast yüzdesi daha fazla bulunmuştur (39). Bizim çalışmamızda ise Stein BL. ve arkadaşlarının çalışması ile paralel şekilde ASXL1 mutasyonu olan PMF olgularında Hgb, Htc, trombosit ve lökosit değerlerinde farklılık saptanmamıştır. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda küçük serili ET olgularında ASXL1 mutasyonu araştırılmakla beraber tek bir çalışmada ASXL1 mutasyonunun ET’deki laboratuvar özelliklerle ilişkisi bildirilmiştir (38). Bu çalışma 53 ET olgusunu kapsamakla beraber ASXL1 mutasyonunu taşıyan ET olgularında lökosit, Hgb ve trombosit değerlerinde

farklılık gözlenmezken, Htc değerleri düşük olma eğilimindedir (38). En geniş sayıda ET olgu serisinde ASXL1 mutasyonunu araştıran bizim çalışmamızda ASXL1 mutasyonu olan ET olgularında tanı sırasındaki ortalama lökosit değeri yüksek olma eğiliminde saptanmıştır. Hgb, Htc ve trombosit değerlerinde farklılık gözlenmemiştir.

MPN olgularında ASXL1 mutasyonu ile dalak büyüklüğü arasındaki ilişkiyi araştıran sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır (582). Stein BL. ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada PMF olgularında ASXL1 mutasyonu varlığında dalak boyutunda anlamlı bir değişiklik bulunmamıştır (582). Bu çalışmadan farklı olarak Vannucchi AM. ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada Avrupa Kohortu'nu oluşturan PMF olgularında ASXL1 mutasyonu splenomegali ile ilişkili bulunmuştur (39). Bizim çalışmamızda ise ASXL1 mutasyonunu taşıyan PMF olgularında Stein BL. ve arkadaşlarının çalışması ile benzer şekilde dalak boyutu ile ilişki saptanmamıştır. ASXL1 mutant ET olgularında ilk kez bizim çalışmamızda mutasyonun dalak boyutu ile ilişkisi araştırılmıştır. Bunun sonucunda çalışmamızda, ASXL1 mutasyonunu taşıyan ET olgu grubunda ortalama dalak boyutu ile ilişki saptanmamıştır.

MPN olgularında ASXL1 mutasyonunun tromboz ile ilişkisini araştıran sınırlı sayıda çalışma vardır (38). 53 ET ve 30 PV olgusundan oluşan bu çalışmada ASXL1 mutasyonu ile tromboz arasında ilişki saptanmamıştır (38). Bizim çalışmamızda ASXL1 mutasyonu olan ET grubunda total tromboz, arteriyel tromboz ve venöz tromboz sıklığında artış gözlenmemiştir. Fakat arteriyel tromboz lokalizasyonu açısından değerlendirildiğinde ASXL1 mutasyonu bulunan ET grubunda %11.1 oranında koroner arter hastalığı, %11.1 oranında SVO ve %11.1 oranında SVO ile birlikte periferik arter hastalığı, ASXL1 mutasyonu olmayan olgularda %10.2 oranında koroner arter hastalığı ve %5.1 oranında SVO varlığı gözlenmiştir. Bunun sonucunda mutant grupta SVO eğiliminin daha yüksek olduğu söylenebilir. ASXL1 mutasyonunu taşıyan PMF grubunda total tromboz, arteriyel tromboz ve venöz trombozla ilişki saptanmamıştır.

Bugüne kadar MPN olgularında ASXL1 mutasyonunun kanama, LDH düzeyi ve kemik iliğinde fibrozis ile ilişkisi araştırılmamıştır. Bizim çalışmamızda ASXL1 mutant PMF olgu grubunda serum LDH düzeyi ve kemik iliği fibrozis derecesi ile ilişki saptanmamıştır. ASXL1 mutant ET grubunda ise tanı sırasında ileri derecede fibrozis saptanırken mutasyonu taşımayan ET grubu ile karşılaştırıldığında serum LDH düzeyi açısından anlamlı fark bulunmamıştır. Çalışmamızda ASXL1 mutasyonunu taşıyan ET olgularında kanama sıklığında artış gözlenmemiştir. Bundan farklı olarak ASXL1 mutasyonunu taşıyan PMF grubunda kanama sıklığı, ASXL1 mutasyonu olmayan PMF grubuna göre anlamlı derecede yüksek saptanmıştır. Buna destekler tarzda korelasyon analizi sonucunda PMF olgu grubunda

ASXL1 mutasyonu varlığı ile kanama komplikasyonu arasında pozitif yönde hafif dereceli bir ilişki saptanmıştır. Kanama lokalizasyonu açısından değerlendirildiği zaman, ASXL1 mutasyonunu taşıyan PMF grubunda gastrointestinal kanama sıklığı %21.1 iken ASXL1 mutasyonunu taşımayan olgularda %1.7 saptanmıştır. ASXL1 mutant olguların %10.5'inde intrakranial kanama gözlenirken, ASXL1 mutasyonunu taşımayan PMF olgularında intrakranial kanamaya hiç rastlanmamıştır. Bundan yola çıkarak ASXL1 mutasyonunu taşıyan PMF olgularında kanamanın hayati organlarda görülme eğiliminin daha yüksek olduğu söylenebilir.

ASXL1 mutasyonunu taşıyan MPN olgularının sitogenetik özelliklerini araştıran kısıtlı sayıda çalışma bulunmaktadır (39). Vannucchi AM. ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada Mayo Kliniği'nden dahil edilen PMF olgularında ASXL1 mutasyonu, en sık normal karyotip varlığında saptanırken iyi karyotip anormalliği ve kötü karyotip anormalliği taşıyan gruplar arasında mutasyon sıklığında farklılık saptanmamıştır (39). Bizim çalışmamızda ise ASXL1 mutasyonu olan ve olmayan PMF olgularında karyotip anormalliklerinin dağılımı açısından anlamlı fark gözlenmemiştir.

PMF olgularında risk skorlaması olarak çeşitli skorlama sistemleri kullanılmaktadır (430, 431, 436). Brecqueville M. ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ASXL1 mutasyonunu taşıyan miyelofibroz olguları ile taşımayan olgular arasında 'DIPSS-plus' risk skorlamasında farklılık gözlenmemiştir (38). Bu çalışmadan farklı olarak Mayo Kliniği'nden dahil edilen PMF olgularını içeren bir çalışmada ASXL1 mutasyonları, 'DIPSS plus' skorlama sistemine göre yüksek riskli olan grupta daha sık saptanmıştır (39). Aynı çalışmada Avrupa Kohortu'nu oluşturan PMF olguları 'IPSS' skorlama sistemine göre gruplandırılmıştır. Buna göre ASXL1 mutasyonları 'IPSS' skorlama sistemine göre yüksek riskli grupta daha yüksek oranda bulunmuştur (39). Bizim çalışmamızda 'DIPSS plus' skorlama sistemleri kullanılmıştır (436). Çalışmamızda Brecqueville M. ve arkadaşlarının verileri ile benzer şekilde ASXL1 mutasyonunu taşıyan PMF olguları ile mutasyonu taşımayan PMF olgularının 'DIPSS-plus' kriterlerine göre risk dağılımlarında anlamlı bir fark saptanmamıştır.

Sonuç olarak çalışmamızda ASXL1 mutasyonunu taşıyan PMF olgularında kötü karyotip anormalliğinde artış saptanmamasına rağmen kötü prognozla ilişkili bulunmuştur. Bunun sonucunda ASXL1 mutasyonunun PMF olgularında bağımsız bir prognostik biyobelirteç olduğu düşünülebilir.

MPN olgularında yapılan çalışmalarda ASXL1 mutasyonu, JAK2V617F mutasyonunu taşıyan ve taşımayan gruplarda benzer sıklıkta bulunmuştur (38, 582). Bizim çalışmamızda JAK2V617F mutasyonunu taşıyan ET olguları ile JAK2V617F mutasyonunu taşımayan

olgular arasında ASXL1 mutasyon sıklığı açısından anlamlı fark saptanmamıştır (sırasıyla %9.4, %7). Buna benzer şekilde JAK2V617F mutasyonunu taşıyan PMF olguları ile JAK2V617F mutasyonunu taşımayan olgular arasında ASXL1 mutasyonu benzer sıklıkta bulunmuştur (sırasıyla %24.1, %26.3). Bu bulgular literatürü destekler tarzdadır. Ayrıca ET ve PMF olgu grupları, JAK2V617F allel yüküne göre gruplandırıldığı zaman, JAK2V617F mutasyonu taşımayan, düşük JAK2V617F allel yüküne sahip ve yüksek JAK2V617F allel yükü olan gruplar arasında ASXL1 mutasyon sıklığı açısından anlamlı bir fark saptanmamıştır.

ASXL1 mutasyonu ile JAK2V617F mutasyonu sıklığı ve JAK2V617F allel yükü arasındaki ilişkiyi araştıran az sayıda çalışma bulunmaktadır (582, 583). Ricci N. ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ASXL1 mutasyonunu taşıyan miyelofibroz olgularında JAK2V617F mutasyonu sıklığı, taşımayanlara göre daha düşük bulunmuştur (sırasıyla %48, %76) (583). Stein BL. ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ASXL1 mutasyonu taşıyan miyelofibroz olguları ile taşımayanlar arasında JAK2V617F allel yükü açısından fark bulunmamıştır (sırasıyla median %57, %61) (583). Ayrıca bu çalışmada her iki grup arasında JAK2V617F mutasyonu sıklığı açısından da fark gözlenmemiştir. Bizim çalışmamızda Stein BL. ve arkadaşlarının verileri ile benzer şekilde ASXL1 mutasyonunu taşıyan PMF olguları ile ASXL1 mutasyonu olmayan PMF olguları arasında JAK2V617F mutasyonunun sıklığı açısından anlamlı bir fark bulunmamıştır (sırasıyla %73.7, %75.9). Buna benzer şekilde ASXL1 mutasyonunu taşıyan ve taşımayan PMF olguları arasında JAK2V617F allel yükü açısından anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Bildiğimiz kadarı ile bugüne kadar ASXL1 mutasyonunu taşıyan ve taşımayan ET olguları arasında JAK2V617F mutasyon sıklığını ve JAK2V617F allel yükünün dağılımını araştıran bir çalışma bulunmamaktadır. Bizim çalışmamızda ASXL1 mutasyonu olan ve olmayan ET olguları arasında JAK2V617F mutasyonu sıklığı ve JAK2V617F allel yükü açısından anlamlı bir fark saptanmamıştır.

Ph-negatif MPN'lerde IDH1, IDH2 mutasyon sıklığını araştıran dünyada sınırlı sayıda çalışma mevcuttur (36, 40, 46). IDH1, sitoplazma ve peroksizomlarda bulunmakla beraber 10 ekzon içerir ve kromozom 2q33.3'de yerleşmiştir. IDH1 enzimini kodlamaktadır. IDH2, mitokondride bulunmakla beraber 11 ekzon içerir ve kromozom 15q26.1'de yerleşmiştir. IDH2 enzimini kodlamaktadır. IDH mutasyonları ekzon 4'de yer alırlar ve bir arginin kalıntısında tek aminoasit değişimini içeren missense (yanlış anlamlı) mutasyonlardır (40). Bu mutasyonlar, R132 (IDH1), R172 (IDH2) ve R140 (IDH2)'dan oluşan üç spesifik arginin kalıntısını etkilemektedir. IDH mutasyonları, 2-HG'nin birikimine neden olmaktadır (556). Bir 'onko-metabolit' olan 2-HG, TET2'nin katalitik aktivitesini bozarak global DNA

hipermetilasyonuna neden olur. Ayrıca hematopoetik farklılaşmayı inhibe ederek ‘prelösemik’ etki yarattığı bilinmektedir (562). IDH1 mutasyonları ilk olarak 2008 yılında Parsons DW. ve arkadaşları tarafından glioblastoma multiforme tanılı 22 tümör örneğinden yapılan sekans analizinde tanımlanmıştır (41). Ardından Yan H. ve arkadaşları tarafından 2009 yılında yapılan 445 santral sinir sistemi tümörünü içeren çalışmada, grade II-III astrositomlar, oligodendrogliomalar ve düşük dereceli lezyonlardan gelişen glioblastomaların %70’inden fazlasında IDH1 geninin 132.aminoasit pozisyonunda (R132) mutasyonlar saptanmıştır. IDH1 mutasyonunu taşımayan tümörlerin çoğunda IDH2’nin 172. aminoasit pozisyonunda (R172) mutasyon saptanmıştır (42). Aynı yılda tüm genomu içeren sekans analizinde 188 de novo AML olgusunun 16’sında (%9) IDH1 mutasyonları saptanırken hiçbir olguda IDH2 mutasyonu saptanmamıştır. 16 olgunun 8’inde R132C, 7’sinde R132H ve birinde R132S mutasyonu saptanmıştır (43). Ardından 493 AML olgusunu içeren bir çalışmada 27 olguda (%6) IDH1 mutasyonu saptanmıştır (%37 R132C, %26 R132H, %19 R132S, %15 R132G, %4 R132L) (586). Başka çalışmalarda de novo AML olgularında R172 veya R140’ı etkileyen IDH2 ekzon 4 mutasyonları bildirilmiştir (557, 561). Ward PS. ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 78 AML olgusunun 18’inde (%23) IDH1 ve 12’sinde (%15) IDH2 mutasyonları saptanmıştır (557). Genel olarak yapılan çalışmalarda de novo AML olgularında IDH mutasyonlarının varlığının yaşamı etkilemediği bildirilmiştir (43, 557, 586). IDH mutasyonları, de novo AML yanında MPN’den transforme olan AML’de de tanımlanmıştır (29, 36, 587). Green A. ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 180 kronik faz PV veya ET tanılı olguların hiçbirinde IDH mutasyonu saptanmamıştır (29). Aynı çalışmada MPN’den lösemiye transforme olan 16 olgunun 5’inde (%31) IDH mutasyonları saptanmıştır (3 olguda IDH1 R132C, 2 olguda IDH2 R140Q) (29). Abdel-Wahab O. ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada MPN’den AML’ye transforme olan 63 olgu incelenmiştir. Bu olguların %9.5’unda IDH1 mutasyonları saptanmıştır (36). Pardanani A ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 166 kronik faz MPN (77 PMF, 2 post-PV miyelofibroz, 2 post-ET miyelofibroz, 47 ET, 38 PV), 34 blastik faz MPN ve 27 de novo AML olgusu araştırılmıştır (587). Bu çalışmada 5 IDH1 ve 4 IDH2 olmak üzere toplam 9 IDH mutasyonu saptanmıştır (4 R132C, 1 R132S, 3 R140Q, 1 R140W). IDH mutasyonlarının sıklığı blastik faz MPN için %21 ve PMF için %4 olarak bildirilmiştir. Bu çalışmada 27 de novo AML olgusunun hiçbirinde IDH mutasyonu saptanmamıştır. Fakat bu durumun sayının az olması ile ilişkili olabileceği vurgulanmıştır. Bu çalışmada IDH mutasyonlarının blastik faz MPN’de rölatif olarak sık olmakla beraber sadece blastik faz MPN’ye sınırlı olmadığı ve kronik faz MPN’de de nadiren ortaya çıkabileceği vurgulanmıştır (587). Bu çalışmaya göre IDH mutasyonları, kronik faz

MPN grubu içerisinde PMF'e sınırlıdır (587). Shih AH. ve arkadaşlarının derlemesinde IDH1/IDH2 mutasyonları AML'de %15-33, MDS'da %3.5, MPN'de %2.5-5, MDS/MPN olgularında %5-10 oranında bildirilmiştir (588). Aynı derlemede IDH mutasyonları PV'da %1-2, ET'de %1-2 ve PMF'de %2-5 oranında bildirilmiştir (588). Brecqueville M. ve arkadaşlarının 149 Ph-negatif MPN olgudan oluşan çalışmasında (135 kronik faz, 14 blastik faz) kronik faz olgularda IDH mutasyonuna rastlanmazken, 2 post-ET blastik fazdaki olguda IDH2 mutasyonu saptanmıştır (38). Kronik faz MPN olgularında IDH mutasyon sıklığını en yüksek oranda bildirilen çalışma Pardani A. ve arkadaşlarının yaptığı çalışmadır (504). Bu çalışmada toplam 78 kronik faz MPN olgusunda IDH mutasyon sıklığı araştırılmış ve toplamda 9 olguda mutasyon saptanmıştır (%12). Aynı hastalık grupları incelendiği zaman PV'da %10 (4/39), PMF'de %16 (4/25) ve ET'de %7 (1/14) oranında bildirilmiştir (504). Martínez-Avilés L ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 62 kronik faz MPN tanılı olgunun (52 ET, 5 PMF, 5 PV) hiçbirinde IDH mutasyonu saptanmamıştır (589). Sonuç olarak kronik faz MPN hastalarında IDH mutasyonları sıklığını bildiren az sayıda çalışma mevcuttur. Bu çalışmalarda IDH mutasyon sıklıkları farklı oranlarda bildirilmektedir. Çalışmalar arasındaki sonuç farklılıklarının olgu sayısının çoğunlukla az olmasından kaynaklandığı düşünülebilir.

Bugüne kadar kronik faz MPN'de IDH mutasyon sıklığını araştıran tek geniş olgu serisini içeren çalışma Tefferi A. ve arkadaşlarının 2010 yılında yaptığı çalışmadır (40). Bu çalışmada çok merkezli bir araştırma kapsamında 1473 Ph-negatif MPN tanılı olguda (594 ET, 421 PV, 312 PMF, 95 post-PV/ET miyelofibroz, 51 blastik faz MPN) IDH1, IDH2 mutasyonlarına bakılmıştır. 5 ET (%0.8), 8 PV (%1.9), 13 PMF (%4.2), 1 post-PV/ET miyelofibroz (%1) ve 11 blastik faz MPN'de (%21.6) olmak üzere toplam 38 olguda IDH mutasyonları saptanmıştır (19 IDH2 R140, 18 IDH1 R132, 1 IDH2-R172) (40). Bu çalışmada IDH mutasyon sıklığı blastik faz MPN'de kronik faz MPN'ye göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (40). PMF olgularında IDH mutasyon sıklığını araştıran ek olarak iki geniş olgu serisi içeren çalışma bulunmaktadır (39, 46). Bu çalışmalardan birinde 301 kronik faz PMF olgusunda IDH mutasyon sıklığı araştırılmıştır ve 12'sinde (%4) mutasyon saptanmıştır (46). Vannucchi AM. ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada Mayo Kliniği'nden dahil edilen 374 PMF olgusunun 10'unda (%3) IDH1 mutasyonu ve 7'sinde (%2) IDH2 mutasyonu saptanmıştır (39). Aynı çalışmada Avrupa Kohortu'nu oluşturan 483 PMF olgusunda IDH1/IDH2 mutasyon sıklığı %2.6 olarak bildirilmiştir (39).

Bizim çalışmamız ise 107 ET ve 77 PMF olgusunu içermektedir. Sonuç olarak çalışmamız rölatif olarak büyük olgu grubunu içermekle beraber ülkemizde Ph-negatif MPN’de IDH1, IDH2 mutasyonlarının sıklığını ve prognostik önemini araştıran ilk çalışmadır. Bazı çalışmalarda YÇM analizinin IDH mutasyonlarının tespit edilmesinde direkt dizileme kadar güvenilir ve pratik bir yöntem olduğu bildirilmiştir (40, 587). Bununla birlikte direkt DNA dizileme yöntemine göre çok daha ucuz bir yöntem olması nedeniyle çalışmamızda IDH mutasyonlarını tespit etmek için YÇM analizi kullanılmıştır. Çalışmamızda ET olgularının %1.9’unda ve PMF’de %6.5 oranında IDH mutasyonu saptanmıştır. Çalışmamızda ET’deki IDH sıklığı literatürle benzer olmakla beraber PMF’deki sıklığı literatürde çoğunlukla bildirilen insidensten biraz fazladır. Bizim çalışmamız Pardanini A. ve arkadaşları ile benzer şekilde bu mutasyonun kronik faz Ph-negatif MPN’de ortaya çıkabileceğini göstermiştir (587). Sonuç olarak IDH mutasyonlarının MPN’nin rölatif olarak erken gelişim döneminde ortaya çıkabileceği düşünülebilir. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda IDH mutasyonlarının blastik faz MPN’de daha yüksek oranda saptandığı gösterilmiştir (29, 36, 587). Tüm bu gözlemler MPN’de IDH mutasyonlarının erken dönemdeki genetik olaylardan biri olduğu ve bunun sonucunda lösemik transformasyonun kolaylaştığı olasılığını desteklemektedir. Bu senaryo, IDH1 mutasyonlarının düşük dereceli lezyonlardan sekonder glioblastomalara transforme olan olgularda yüksek oranda görülmesi ve Yan H. ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada IDH1 mutasyonlarının hem düşük dereceli hem de yüksek dereceli gliomalarda tanımlanması ile benzerdir (42). Böylelikle IDH mutasyonlarının gliomalarda olduğu gibi MPN’lerde de hastalığın gelişimi sırasında erken dönemde ortaya çıkan genetik değişimler olduğu düşünülebilir.

Çalışmalar IDH mutasyonlarının missense (yanlış anlamlı) mutasyonlar olduğunu ve bir arginin kalıntısını etkilediğini göstermiştir (43, 557). Büyük MPN serisini içeren bir çalışmada IDH mutasyonları sırayla IDH2 R140, IDH1 R132 ve IDH2 R172 şeklinde bildirilmiştir (40). Kronik faz PMF olgularında IDH mutasyonunun sıklığını araştıran bir çalışmada IDH2 R140 ve IDH1 R132 mutasyonlarının en sık mutasyonlar olduğu ve bunları IDH2 R172 mutasyonunun takip ettiği bildirilmiştir (46). Bizim çalışmamızda ise 184 Ph-negatif MPN tanı olgunun 7’sinde (%3.8) IDH (ekzon 4) mutasyonu saptanmıştır. 7 olgunun 4’ünde (%57.1) IDH1 R132C, 2’sinde (%28.6) IDH2 R140Q ve birinde (%14.3) IDH1 R132S mutasyonu saptanmıştır. Sonuç olarak olguların 5’inde IDH1 (%71.4) ve ikisinde (%28.6) IDH2 mutasyonu bulunmuştur. Aynı ayrı olgu gruplarına bakıldığı zaman PMF’de saptanan 5 IDH mutasyonunun 3’ünün (%60) IDH1 R132C, birinin (%20) IDH1 R132S ve birinin (%20) IDH2 R140Q mutasyonu olduğu görülmüştür. Sonuç olarak PMF’de mutant olguların %80’i



IDH1 mutasyonundan oluşmaktaydı. ET'li mutant 2 olgunun birinde IDH1 R132C ve diğesinde IDH2 R140Q mutasyonu saptanmıştır. Çalışmamızda IDH2 R172 mutasyonuna rastlanmamıştır. Sonuç olarak bildirilen çalışmalardan farklı olarak bizim çalışmamızda Ph-negatif MPN'de IDH1 R132 mutasyonları, IDH2 R140 mutasyonlarından daha sık saptanmıştır.

Ph-negatif MPN olgularında IDH mutasyonunun cinsiyet ve yaşla ilişkisini araştıran kısıtlı sayıda çalışma bulunmaktadır (40, 46). Tefferi A. ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada kronik ve blastik faz PMF'de IDH mutasyonlarının varlığının yaş ve cinsiyetten etkilenmediği bildirilmiştir (40). Sonraki yıllarda yapılan bir çalışmada IDH mutasyonunu taşıyan PMF olgularında taşımayanlara göre yaş daha ileri bulunmuştur (46). Aynı çalışmada IDH mutasyonunu taşıyan olgularla taşımayanlar arasında cinsiyet farkı gözlenmemiştir (46). Bizim çalışmamızda ise IDH mutasyonunu taşıyan PMF olgularında yaşla ilişki gözlenmezken kadın cinsiyeti sıklığında artışa eğilim olduğu gösterilmiştir.

AML'li olgulardan farklı olarak MDS ve MPN'leri içeren kronik myeloid neoplazilerde IDH mutasyonlarının prognostik önemiyle ilgili bilgi kısıtlıdır (39, 40, 45, 46). Bu çalışmalardan birinde 1473 Ph-negatif MPN olgusunda IDH1 ve IDH2 mutasyon sıklığı araştırılmıştır. IDH mutasyonları kronik faz PMF'de yaşam üzerine etkisiz bulunurken blastik faz PMF ve blastik faz MPN'de kısa yaşam süresi ile ilişkili bulunmuştur. Fakat bu çalışmada klinik bilgisi tam olan sadece 111 kronik faz PMF olgusu bulunduğu için detaylı prognostik analizin yapılamadığı belirtilmiştir. Başka bir çalışmada 301 kronik faz PMF olgusunda IDH1 ve IDH2 mutasyonlarının prognostik etkileri araştırılmıştır (46). Bu çalışma, PMF'de IDH mutasyonlarının lösemik transformasyon için bağımsız risk faktörü olduğunu, JAK2V617F mutasyonu ile birlikte lökogenik riski arttırdığını ve yaşam süresini kısalttığını göstermiştir (46). Bu çalışmada tek değişkenli analizde, IDH mutasyonunu taşıyan PMF olgularının taşımayanlara göre yaşam süresinin daha kısa olduğu bildirilmiştir. Ayrıca IDH mutant olgularda LFS'da kısalma bildirilmiştir (46). Bu mutasyonun PMF'de prognozla ilişkisini araştıran son kapsamlı çalışma Vannucchi AM. ve arkadaşlarının 2013 yılında yaptığı çalışmadır (39). Bu çalışmada Avrupa Kohortu'nu oluşturan 483 PMF olgusunda yapılan araştırmada IDH1/IDH2 mutasyonlarının OS ile ilişkisi olmadığı fakat lösemik transformasyon riskini arttırdığı gösterilmiştir. Aynı çalışmada Mayo Kliniği'nden 374 PMF olgusunda IDH mutasyonlarının prognostik etkileri araştırılmıştır. Bu grupta IDH mutasyonları, yaşam süresinde kısalma ve lösemik transformasyonla ilişkili bulunmuştur (39). Farklı IDH mutasyon varyantlarının PMF'de farklı biyolojik veya prognostik özellikler taşıyıp taşımadığı henüz bilinmemektedir. Bizim çalışmamızda IDH mutasyonunu taşıyan PMF grubunda ölüm

oranı, IDH mutasyonu taşımayan grupla karşılaştırıldığında anlamlı olarak yüksek saptanmıştır (sırasıyla %60, %15.3). Fakat tek değişkenli analizde IDH mutasyonunu taşıyan ve taşımayan PMF grubu arasında OS açısından fark saptanmamıştır. IDH mutasyonunu taşıyan olgularımızda lösemi oranı %20 ve taşımayan olgularda %4.2 saptanmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmemiştir. Fakat çalışmamızda IDH mutant olgu sayısı az olmasına rağmen tek değişkenli analizde literatürle benzer şekilde mutasyon varlığında LFS'da kısalma saptanmıştır. Çalışmamızda IDH mutasyonlarının PMF'de OS ve LFS üzerine etkileri Vannucchi AM. ve arkadaşlarının çalışmasındaki Avrupa Kohortu'nun sonuçları ile benzerdir.

IDH1, IDH2 mutasyonlarını taşıyan MPN olgularının klinik ve laboratuvar karakteristiklerini araştıran bugüne kadar yapılmış tek bir çalışma bulunmaktadır (46). Tefferi A. ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada IDH mutasyonunu taşıyan ve taşımayan PMF olgu grupları arasında lökosit, trombosit ve Hgb değerleri, dolaşımdaki blast yüzdesi ve konstitüsyonel semptomların varlığı açısından fark gözlenmemiştir (46). Bizim çalışmamızda bu verilerle paralel şekilde PMF olgularında IDH mutasyonu ile Hgb, Htc, trombosit ve lökosit değerleri arasında bir ilişki saptanmamıştır.

MPN olgularında IDH mutasyonu ile dalak büyüklüğü arasındaki ilişkiyi araştıran tek bir çalışma bulunmaktadır (46). Bu çalışmada IDH mutant PMF grubu ile mutasyonu taşımayan grup arasında palpabl dalağın > 10 cm olması açısından fark gözlenmemiştir (sırasıyla %17, %33). Bizim çalışmamızda da IDH mutasyonunu taşıyan PMF olgularında mutasyon taşımayan grupla karşılaştırıldığı zaman tanı sırasındaki dalak boyutu açısından anlamlı fark saptanmamıştır.

IDH mutasyonlarının kronik faz MPN olgularında, özellikle ET ve PV'da az sıklıkta görüldüğü bilinmektedir. MPN olgularında bugüne kadar IDH mutasyonunun tromboz, kanama, LDH düzeyi ve kemik iliğinde fibrozis ile ilişkisi araştırılmamıştır. Bizim çalışmamızda PMF'de IDH mutasyonu varlığı ile tanı sırasındaki LDH düzeyi, kemik iliği fibrozis derecesi, total tromboz, venöz tromboz ve arteriyel tromboz varlığı arasında ilişki bulunmamıştır. Çalışmamızda IDH mutant PMF olgularında kanama sıklığı, mutasyon taşımayan gruba göre anlamlı derecede yüksek saptanmıştır. Her iki grup kanama lokalizasyonu açısından karşılaştırıldığı zaman IDH mutant olguların %20'sinde gastrointestinal kanama, %20'sinde mukozal kanama ve %20'sinde intrakranial kanama gözlenirken IDH mutasyonu taşımayan olguların %5.6'sında gastrointestinal kanama, %5.6'sında mukozal kanama ve birinde (%1.4) intrakranial kanama gözlenmiştir. Bundan yola çıkarak IDH mutasyonunu taşıyan olgularda kanamanın hayati organlarda görülme

eğiliminin daha yüksek olduğu söylenebilir. Korelasyon analizi sonucunda da, PMF olgu grubunda IDH mutasyonu ile kanama komplikasyonu arasında pozitif yönde zayıf bir ilişki saptanmıştır.

IDH mutasyonunu taşıyan MPN olgularının sitogenetik özelliklerini araştıran kısıtlı sayıda çalışma bulunmaktadır (39, 40, 46). Tefferi A. ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada IDH mutasyonunu taşıyan kronik fazdaki PMF olgularında sitogenetik bulguların sıklıkla düşük ve orta risk kategorisinde olduğu ama istatistiksel olarak anlamlı fark yaratmadığı belirtilmiştir (40). Aynı çalışmada IDH mutant blastik fazdaki PMF olgularındaki kompleks karyotip oranının bu mutasyonu taşımayanlara göre oldukça düşük olduğu gösterilmiştir (40). Başka bir çalışmada IDH mutasyonunu taşıyan ve taşımayan PMF olguları karşılaştırıldığı zaman sitogenetik kategorilerinde anlamlı farklılık saptanmamıştır (46). Vannucchi AM. ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada Mayo Kliniği'nden dahil edilen PMF olgularında IDH mutasyonunun sıklığı, normal ve anormal karyotipe sahip gruplar arasında farklılık göstermemiştir (39). Bizim çalışmamızda IDH mutant 5 PMF olgununun hepsi normal karyotipe sahip olmakla beraber IDH mutasyonunu taşımayan grupla karşılaştırıldığı zaman karyotip dağılımı açısından anlamlı bir fark saptanmamıştır.

PMF olgularında risk skorlaması ile IDH mutasyonlarının ilişkisini araştıran tek bir çalışma bulunmaktadır (46). Tefferi A. ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada IDH mutasyonunu taşıyan PMF olguları ile taşımayanlar arasında 'DIPSS-plus' risk skorlamasında farklılık gözlenmemiştir (46). Bizim çalışmamızda literatürle benzer şekilde IDH mutasyonunu taşıyan PMF olguları ile mutasyonu taşımayan PMF olgularının 'DIPSS-plus' kriterlerine göre risk dağılımlarında anlamlı bir fark saptanmamıştır.

Sonuç olarak çalışmamızda, IDH mutasyonunu taşıyan PMF olgularının hepsi normal karyotip taşımasına rağmen kötü prognozla ilişki bulunmuştur. Bunun sonucunda IDH mutasyonunun PMF olgularında bağımsız bir prognostik biyobelirteç olduğu düşünülebilir.

200 MPN olgusunu (166 kronik faz, 34 blastik faz) içeren Pardanini A ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, IDH mutasyonlarının sıklığı blastik faz MPN için %21 ve PMF için %4 olarak bildirilmiştir (587). Bu çalışmada 9 IDH mutasyonunu taşıyan olguların sadece 3'ünde JAK2V617F mutasyonu saptanmıştır. Tefferi A. ve arkadaşlarının yaptığı başka bir çalışmada IDH mutasyon sıklığı JAK2V617F mutasyonu pozitif olan MPN olgularında %3.6, JAK2V617F mutasyonu negatif olgularda %4.2 oranında saptanmıştır (p=0.42) (40). Bizim çalışmamızda JAK2V617F mutasyonunu taşıyan ile taşımayan PMF olguları arasında IDH mutasyon sıklığı açısından anlamlı bir fark gözlenmemiştir (sırasıyla %5.2, %10.5). Buna benzer şekilde JAK2V617F mutasyonu olan ile olmayan ET olguları

arasında IDH mutasyon sıklığı açısından anlamlı bir fark saptanmamıştır (sırasıyla %1.6, %2.3). Başka bir çalışmada 301 PMF olgusunun 12'sinde (%4) IDH mutasyonları saptanmıştır ve 12 IDH mutasyonu olan olgunun 6'sında (%50) JAK2V617F mutasyonu saptanmıştır (46). Bizim çalışmamızda ise IDH mutasyonu taşıyan ve taşımayan PMF olgu grubu arasında JAK2V617F mutasyon sıklığı açısından anlamlı bir fark saptanmamıştır (sırasıyla %60, %76.4). Bizim çalışmamız da literatürle benzer şekilde IDH mutasyonlarının JAK2V617F mutasyonundan bağımsız olarak kronik faz PMF'deki varlığını desteklemektedir. Tefferi A. ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 12 IDH mutasyonunu taşıyan PMF olgusunun 6'sında JAK2V617F mutasyonu saptanmıştır ve bu 6 olgudaki JAK2V617F allel yükü sırasıyla %1, %7, %22, %27, %30 ve %96 olarak bildirilmiştir (46). Çalışmamızda IDH mutasyonu taşıyan PMF olgusunun üçünde JAK2V617F allel yükü sırasıyla %31-50; %5-12.5 ve %31-50 olarak saptanmıştır. IDH mutant ET olgumuzun ise birinde JAK2V617F mutasyonu saptanmazken diğerinde JAK2V617F allel yükü %5 olarak bulunmuştur.

Bir çalışmada IDH1 veya IDH2 mutasyonunu taşıyan AML olgularında 2-HG'in yüksek oranda bulunduğu ve IDH mutant AML için bir biyobelirteç olabileceği belirtilmiştir (557). Biz de çalışmamızın devamı olarak PMF olgu grubunda 2-HG düzeylerinin araştırılmasını planlıyoruz. PMF olgu grubunu arttırarak bu düzeylerin hastalığın agresif gidişi üzerine bir etkisi olup olmadığının araştırılması hedeflenmektedir.

Abdel-Wahab O. ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada MPN'den AML'ye transforme olan 63 olgu incelenmiştir. Bu çalışmada IDH1 mutasyonları genellikle JAK2V617F mutasyonu, TET2 ve ASXL1 mutasyonu taşımayan olgularda saptanmıştır (36). Bizim çalışmamızda JAK2V617F mutasyonunu taşımayan PMF olgularında IDH1 sıklığı, JAK2V617F mutasyonu olan olgu grubuna göre daha yüksek olmakla beraber istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (sırasıyla %10.5, %3.4). Çalışmamızda ASXL1 mutasyonu olan PMF grubunda 3 olguda (%15.8) IDH1 mutasyonuna rastlanırken (IDH1 R132C), ASXL1 mutasyonunu taşımayan PMF grubunda bir olguda (%1.7) IDH1 mutasyonu (IDH1 R132S) saptanmıştır. Bizim çalışmamız, Abdel-Wahab O. ve arkadaşlarının yaptığı çalışmadan farklı olarak ASXL1 mutasyonu olan PMF grubunda IDH1 mutasyonunun sıklığını anlamlı olarak yüksek saptamıştır. ASXL1 mutasyonunu taşıyan ile taşımayan PMF grubu arasında IDH2 mutasyon sıklığı açısından anlamlı fark saptanmamıştır. Sonuç olarak ASXL1 mutasyonunu taşıyan PMF grubunda IDH mutasyon sıklığının (IDH1 veya IDH2) ASXL1 mutasyonu olmayan gruba göre yüksek olma eğiliminde olduğu görülmüştür (sırasıyla %15.8, %3.4). Bununla paralel olarak IDH mutasyonu olan PMF grubunda ASXL1 mutasyon sıklığı, IDH

mutasyonu olmayan PMF grubuna göre yüksek olma eğiliminde saptanmıştır (sırasıyla %60, %22.2). Ayrıca çalışmamızda korelasyon analizi sonucunda PMF’de ASXL1 mutasyonu ile IDH mutasyonu arasında pozitif yönde zayıf bir ilişki saptanmıştır. PMF olgu grubunda ASXL1 mutasyonu ve IDH mutasyonu birlikteliği ile ölüm ve kanama komplikasyonu arasında pozitif yönde zayıf bir ilişki saptanmıştır. Ph-negatif MPN olgularında ASXL1 ve IDH mutasyon birlikteliğinin hastalık seyri ve komplikasyonlar üzerine etkisini anlamak için ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Üç klasik Ph-negatif MPN’den biri olan ET en iyi prognoza sahip olmakla beraber yaşam süresi hemen hemen yaş ve cinsiyet uyumlu sağlıklı popülasyonla benzerdir. PV’da ise yaşam süresi oldukça uzundur. Buna rağmen PV ve ET tanılı olgularda yaşam beklentisinin tromboz ve daha az sıklıkta kanama gibi komplikasyonlardan güçlü bir şekilde etkilendiği bilinmektedir. Çalışmalarda tanı sırasında bildirilen tromboz sıklığı PV için %12-39 arasında ve ET için %11-25 arasında değişmektedir (590). Takip sırasında ek olarak PV’lı olguların %8-19’unda ve ET’li olguların %8-31’inde major tromboz geliştiği bilinmektedir (591). Tefferi A.’nın yaptığı derlemede PV ve ET’de tromboz riskinin %20’yi aştığı bildirilmiştir (592). Arteriyel tromboz, MPN’lerdeki trombozların %60-70’inden sorumludur (593). 494 PV ve ET tanılı olguyu içeren bir çalışmada olguların %39’unda serebrovasküler olay (SVO), %22’sinde koroner sendrom, %22’sinde alt ekstremitte derin ven trombozu (DVT) ve %9’unda diğer bölgelerde DVT bildirilmiştir (593). Çalışmaların çoğunda inme, geçici iskemik atak, miyokard infarktüsü, angina pectoris, periferik arter hastalığı, pulmoner emboli ve DVT, ET ve PV’da major trombotik olaylar olarak bildirilmiştir (137, 594, 595). Bizim çalışmamızda ise 107 ET olgusunun 41’inde (%38.3) majör trombotik olay, 21 olguda (%19.6) arteriyel tromboz, 18 olguda venöz tromboz (%16.8) ve iki olguda (%1.9) hem arteriyel hem venöz tromboz saptanmıştır. Arteriyel tromboz saptanan olguların %65.2’si koroner arter hastalığı ve venöz tromboz saptanan olgularının ise %60’ı batın içi tromboz şeklinde komplike olmuştur.

PMF, MPN’ler içinde ortalama 5 yıldan kısa yaşam süresi ile yaşam beklentisi en kısa olanıdır. Morbidite ve mortalitenin ana nedenleri arasında lösemik transformasyon, enfeksiyon, kanama, portal hipertansiyon yanında vasküler komplikasyonlar vardır (430). Bizim çalışmamızda literatür ile benzer şekilde PMF olgu grubu ET ile karşılaştırıldığı zaman OS anlamlı derecede kısa saptanmıştır. Buna ek olarak PMF grubu ET ile karşılaştırıldığı zaman ölüm ve lösemiye dönüşüm oranında artış saptanmıştır. PMF’de tromboz insidensi ile ilişkili çalışmalar genellikle tek merkezlidir (596). Cervantes F. ve arkadaşlarının yaptığı

çalışmada 155 PMF'li olgunun 18'inde (%11.6) tromboz gözlenmiştir (596). Bu çalışmada PMF olgularında 19 arteriyel ve 12 venöz tromboz gelişmiştir. Arteriyel tromboz olarak en sık SVO ve periferik arter hastalığı, venöz tromboz olarak en sık portal ven trombozu ve DVT bildirilmiştir (596). 707 PMF olgusunun dahil edildiği çok merkezli bir çalışmada tanı sırasında %9.5 olguda tromboz varlığı ve %7.2 olguda takip sırasında tromboz geliştiği bildirilmiştir (597). Bu çalışmada tanı sırasında başlıca trombotik olaylar arasında venöz tromboemboli, SVO ve miyokard infarktüsü ve takip sırasında gelişen başlıca tromboz nedenleri arasında venöz tromboemboli ve SVO bildirilmiştir (597). Bizim çalışmamızda ise 77 PMF olgusunun 11'inde (%14.3) majör trombotik olay, 7 olguda (%9.1) arteriyel tromboz, 3 olguda venöz tromboz (%3.9) ve bir olguda (%1.3) hem arteriyel hem venöz tromboz saptanmıştır. PMF'de arteriyel tromboz saptanan olguların %50'si koroner arter hastalığı ve venöz tromboz saptanan olguların ise %75'i batin içi tromboz şeklinde komplike olmuştur. PMF olgularımızda arteriyel tromboz sıklığı, venöz tromboza göre daha fazla olmakla beraber olgular başlıca koroner arter hastalığı ve periferik arter hastalığı ile komplike olmuştur. Sonuç olarak, ET olgu grubunda total tromboz ve venöz tromboz sıklığı PMF olgu grubuna göre belirgin yüksek saptanmıştır. Buna ek olarak, ET grubunda, PMF grubu ile kıyaslandığında arteriyel tromboz eğilimi daha yüksek bulunmuştur.

JAK2V617F mutasyonu, JAK2 ekzon 14'de 617. kodonda valin fenilalanin değişimi sonucunda ortaya çıkar (598). MPN'lerde JAK2V617F mutasyonu ile ilişkili çalışmalar, bu mutasyonun PV'da yaklaşık %95, ET'de %55 ve PMF'de %65 oranında görüldüğünü bildirmiştir (599, 600, 601). Bir çalışmada ise ET'li olgularda JAK2V617F mutasyon sıklığının %50-70 arasında değiştiği bildirilmiştir (62). Bizim çalışmamızda 'JAK2 MutaScreen kit'i kullanılarak JAK2V617F mutasyon taraması yapılmış ve kantitatif olarak mutant allel yükü belirlenmiştir (576). Bu yöntem oldukça duyarlı olup %2'ye kadar olan JAK2V617F mutant allel yükünü tespit edebilmektedir. Bizim çalışmamızda JAK2V617F mutasyonu ET'de %59.8 ve PMF'de %75.3 oranında saptanmıştır. Çalışmamızda ET'de JAK2V617F mutasyonunun sıklığı literatürle benzer olmakla beraber PMF grubunda literatürden daha yüksek oranda JAK2V617F mutasyonuna rastlanmıştır. Bu durumu çalışmamızda JAK2V617F mutasyonunu tespit etmek için oldukça duyarlı bir yöntem kullanmamıza bağlıyoruz. Ayrıca Hematoloji Polikliniğimize refere edilen hastaların büyük bir kısmı JAK2V617F pozitiflikleri önceden saptanmış olgulardan oluşmaktadır.

Çalışmalarda ET'de ve PMF'de JAK2V617F mutasyonunun cinsiyet ile ilişkisiz olduğunu bildirilmiştir (16, 19, 273). Bizim çalışmamızda literatürle paralel şekilde ET'de

JAK2V617F mutasyonu, cinsiyet ile ilişkisiz bulunurken literatürden farklı olarak JAK2V617F mutasyonunu taşımayan PMF olgularında kadın cinsiyet sıklığı daha yüksek saptanmıştır. JAK2V617F mutasyonu ile ET ve PMF'deki klinik ve laboratuvar özelliklerin ilişkisini araştıran çalışmalar yapılmıştır (48, 601). Bir çalışmada ET ve PMF'de JAK2V617F mutasyonu, tanı sırasında yaşın ileri olması, yüksek Hgb seviyesi ve lökositoz ile ilişkili bulunmuştur (601). Başka bir çalışmada PMF'de JAK2V617F mutasyon yokluğunda anemi daha derin bulunmuştur (15). 152 PMF'li olguyu içeren çok merkezli bir çalışmada da JAK2V617F mutasyonunu taşıyan olgularda eritrosit transfüzyon ihtiyacı daha az olmuştur (102). Ayrıca JAK2V617F mutasyonu, ET'de düşük trombosit değeri ile ilişkili bulunmuştur (601). Bizim çalışmamızda JAK2V617F mutasyonunu taşıyan ET grubu JAK2V617F mutasyonunu taşımayan grup ile karşılaştırıldığında tanı sırasındaki Hgb ve Htc düzeyi anlamlı olarak yüksek saptanırken, trombosit değeri anlamlı olarak düşük saptanmıştır. Bu bulgular literatürle paraleldir. JAK2V617F mutasyonu olan ve olmayan ET olguları arasında serum LDH düzeyi açısından fark saptanmamıştır. Her iki grup arasında ortalama lökosit değeri açısından anlamlı bir fark bulunmamasına rağmen korelasyon analizi sonucunda JAK2V617F mutasyonu ile tanı sırasındaki lökosit değerleri arasında pozitif yönde hafif dereceli bir ilişki saptanmıştır. Çalışmamızda JAK2V617F mutasyonunu taşıyan PMF grubunda mutasyonu taşımayan gruba göre ortalama lökosit sayısı, Hgb ve Htc düzeyi anlamlı olarak yüksek saptanırken trombosit değeri ve LDH düzeyi açısından fark saptanmamıştır. Korelasyon analizi sonucunda PMF olgu grubunda JAK2V617F mutasyonu ile tanı sırasındaki Htc düzeyi arasında pozitif yönde zayıf bir ilişki ve lökosit değeri ile pozitif yönde hafif dereceli bir ilişki saptanmıştır. Çalışmamızda PMF grubunda JAK2V617F mutasyon varlığı ile eritrosit transfüzyon ihtiyacı arasında bir ilişki gözlenmemiştir. Fakat PMF'de JAK2V617F mutasyonu varlığında kanamaya eğilim görülmekle birlikte korelasyon analizi sonucunda JAK2V617F mutasyonu ile kanama komplikasyonu arasında pozitif yönde zayıf bir ilişki saptanmıştır.

Bir çalışmada JAK2V617F mutasyonunu taşıyan ET olgularında venöz tromboz riskinin arttığı bildirilmiştir (273). JAK2V617F mutasyonu ile tromboz arasındaki ilişkiyi destekleyen çalışmalar bulunmakla birlikte bu mutasyonun tromboz riskini arttırmadığını bildiren çalışmalar da bulunmaktadır (18, 19, 50, 101, 313, 602, 603). Sonuç olarak güncel veriler, ET'de JAK2V617F mutasyonu ile tromboz arasındaki ilişkiyi net ortaya koymamıştır. Buna rağmen üç bağımsız meta-analizde ET'de JAK2V617F mutasyon varlığının arteriyel ve venöz tromboz riskini arttırdığı gösterilmiştir (281, 604, 605). Bizim çalışmamızda

JAK2V617F mutasyonunu taşıyan ve taşımayan ET grubu arasında total tromboz, arteriyel tromboz ve venöz tromboz sıklığı açısından anlamlı bir fark gözlenmemiştir.

Tefferi A. ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada PMF’de JAK2V617F mutasyonu trombozla ilişkili bulunmuştur (15). Başka bir çalışmada ise PMF’de mutasyon varlığında majör trombotik olayların artmadığı bildirilmiştir (16). Altı PMF çalışmasını içeren bir meta-analizde JAK2V617F mutasyonunun trombozla ilişkisinin net olmadığı bildirilmiştir (281). Bizim çalışmamızda JAK2V617F mutasyonunu taşıyan PMF grubunda total tromboz, arteriyel tromboz ve venöz tromboz ile ilişki gösterilmemiştir.

Kittur J ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ET’de JAK2V617F allel yükünün tanıdaki splenomegali ile korelasyonu gösterilmiştir (603). Barosi G. ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada JAK2V617F mutasyon varlığının PMF’de büyük dalak boyutu ile ilişkisi olduğu ve splenektomi ihtiyacını arttırdığı gösterilmiştir (16). Çalışmamızda JAK2V617F mutasyonunu taşıyan ET ve PMF olguları ile taşımayan olgular arasında tanı sırasındaki ortalama dalak boyutu açısından anlamlı fark saptanmamıştır. Fakat ET grubunda JAK2V617F mutasyonu varlığında masif splenomegali oranı belirgin yüksek saptanmıştır. Ayrıca JAK2V617F mutasyonunu taşıyan PMF grubunda masif splenomegali oranı yüksek olma eğiliminde bulunmuştur.

Çalışmamızda PMF grubu ET ile karşılaştırıldığında JAK2V617F mutasyonu ve ASXL1 mutasyonu birlikteliği anlamlı olarak yüksek saptanmıştır. Korelasyon analizi sonucunda, ET ve PMF’de JAK2V617F ve ASXL1 mutasyonu birlikteliği ile Htc, lökosit ve trombosit değerleri, LDH düzeyi, total tromboz, arteriyel tromboz ve venöz tromboz varlığı arasında ilişki saptanmamıştır. Bunun yanında ET’de JAK2V617F mutasyonu ve ASXL1 mutasyonu birlikteliği ile kanama arasında bir ilişki saptanmazken, PMF’de JAK2V617F mutasyonu ve ASXL1 mutasyonu birlikteliği ile kanama komplikasyonu arasında pozitif yönde hafif dereceli bir ilişki saptanmıştır. PMF’de JAK2V617F mutasyonu ve ASXL1 mutasyonu birlikteliği ile ölüm arasında bir ilişki saptanmamıştır. ET ve PMF grubu arasında JAK2V617F mutasyonu ve IDH mutasyonu birlikteliğinin sıklığı açısından anlamlı bir fark saptanmamıştır. ET ve PMF’de JAK2V617F mutasyonu ve IDH mutasyonu birlikteliği ile Htc, lökosit ve trombosit değerleri, LDH düzeyi, kanama komplikasyonu, total tromboz ve arteriyel tromboz arasında ilişki saptanmamıştır. Bunun yanında PMF’de JAK2V617F mutasyonu ve IDH mutasyonu birlikteliği ile ölüm arasında bir ilişki saptanmamıştır. PMF’de JAK2V617F mutasyonu ve IDH birlikteliği ile venöz tromboz arasında ilişki saptanmazken ET’de JAK2V617F mutasyonu ve IDH mutasyonu birlikteliği ile venöz tromboz arasında



pozitif yönde zayıf bir ilişki saptanmıştır. Ph-negatif MPN olgularında JAK2V617F mutasyonu ve ASXL1 mutasyonunun birlikteliğinin ve JAK2V617F mutasyonu ve IDH mutasyonu birlikteliğinin hastalık seyri ve komplikasyonlar üzerine etkisini anlamak için ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

JAK2V617F allel yükünün PV'da en yüksek, ET'de en düşük ve PMF'li olguların çoğunda orta-yüksek düzeyde olduğu bilinmektedir (47, 48). Bizim çalışmamızda, yüksek JAK2V617F allel yükü sıklığına sahip olgu sıklığı, PMF'de ET olgularına göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Bugüne kadar MPN'lerde JAK2V617F mutasyonunun allel yükünün hastalık üzerine fenotipik etkilerini araştıran çalışmalar da yapılmıştır (15, 16, 603, 606, 607). Yüksek JAK2V617F allel yükü, PV'da yüksek Hgb seviyesi, PV ve PMF'de pruritis, PV, ET ve PMF'de lökositöz ve dalak boyutunda artış ile ilişkili bulunmuştur. Bir çalışmada ET'de JAK2V617F allel yükünün %50'den fazla olması splenomegali ile ilişkili bulunmuştur (50). Passamonti F. ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada JAK2V617F allel yükü, PV ve ET'den miyelofibroza dönüşümle ilişkili bulunmuştur (608). Çalışmamızda ET ve PMF olgu grupları, JAK2V617F mutasyonunu taşımayan, düşük JAK2V617F allel yüküne sahip (allel yükü  $\leq$  %50) ve yüksek JAK2V617F allel yüküne sahip grup (allel yükü  $>$  %50) olarak üçe bölünerek ileri analiz yapılmıştır. ET'de JAK2V617F mutasyonunu taşımayan grubun ortalama Hgb ve Htc düzeyi düşük, JAK2V617F allel yüküne sahip gruba göre belirgin düşük saptanmıştır. Yüksek JAK2V617F allel yüke sahip ET grubunun ise Hg ve Htc değeri, düşük JAK2V617F allel yükü olan gruba göre anlamlı düşük saptanmıştır. Bu bulgu ile paralel olarak yüksek JAK2V617F allel yüküne sahip grupta diğer iki grup ile kıyaslandığında eritrosit transfüzyon ihtiyacı ve kanama komplikasyonu belirgin yüksek saptanmıştır. Ayrıca PMF'de yüksek JAK2V617F allel yükü varlığı ile kanama ciddiyeti arasında ilişki gösterilmiştir. Yüksek JAK2V617F allel yüküne sahip ET grubunun serum LDH düzeyi diğer iki gruba göre belirgin yüksek saptanmıştır. Her üç ET grubu arasında tanı sırasındaki ortalama lökosit değeri açısından anlamlı fark gözlenmemesine rağmen korelasyon analizi sonucunda JAK2V617F allel yükü ile lökosit değeri arasında pozitif yönde zayıf bir ilişki saptanmıştır. ET'de her 3 grup arasında dalak boyutu ortalaması açısından bir fark gözlenmemiştir. Splenomegali derecesi açısından karşılaştırma yapıldığı zaman ise yüksek JAK2V617F allel yüküne sahip ET grubunda diğer gruplar ile kıyaslandığında masif splenomegali oranı belirgin yüksek saptanmıştır. ET grubunda JAK2V617F allel yükü ile kemik iliği fibrozis derecesi arasında ilişki gösterilmemiştir. PMF'de JAK2V617F mutasyonunu taşımayan grupta tanı sırasındaki ortalama Hgb değerinin, düşük JAK2V617F

allel yükü olan gruba göre düşük olma eğiliminde olduğu gözlenmiştir. Yüksek JAK2V617F allel yükü olan PMF grubu, mutasyon taşımayan grupla karşılaştırıldığı zaman tanı sırasındaki Hgb, Htc ve lökosit değerleri anlamlı olarak yüksek saptanmıştır. Ayrıca yüksek JAK2V617F allel yüküne sahip PMF grubunda Hgb değeri, düşük allel yüküne sahip grupla karşılaştırıldığı zaman yüksek olma eğiliminde saptanmıştır. Bu bulgularla paralel olarak düşük JAK2V617F allel yükü olan PMF grubunda eritrosit transfüzyon ihtiyacı artmış saptanmıştır. Yüksek JAK2V617F allel yüküne sahip PMF olgularında, düşük JAK2V617F allel yüküne sahip gruba göre lökosit değeri anlamlı olarak yüksek saptanmıştır. PMF grubunda JAK2V617F allel yükü ile LDH düzeyi, dalak boyutu ve trombosit değeri arasında ilişki saptanmamıştır.

Vannucchi AM. ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada PV'da JAK2V617F mutant allel yükünün %75'in üzerinde olmasının tromboz riskinde artışa neden olduğu bildirilmiştir (606). Başka bir çalışmada PV'da yüksek allel yükünün yüksek lökosit sayısı, masif splenomegali ve miyelofibroz ile ilişkisi belirtilmiştir (609). Bundan farklı olarak 320 PV olgusunu içeren bir çalışmada JAK2V617F allel yükü ile tromboz arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır (608). 415 PV ve 867 ET olgusunu içeren retrospektif bir çalışmada JAK2V617F allel yükü ile ilişkili olarak tromboz riskinin arttığı gösterilmiştir (49). 2000'den fazla ET tanılı olguyu içeren üç bağımsız meta-analizde JAK2V617F mutasyon varlığının trombozdaki rolü tanımlanmıştır. 260 ET olgusunu içeren bir çalışmada JAK2V617F allel yükünün %25'den fazla olması özellikle arteriyel trombozla ilişkili bulunmuştur (50). Bizim çalışmamızda ET ve PMF tanılı olgularımızda JAK2V617F mutasyonunu taşımayan, düşük JAK2V617F allel yüküne sahip ve yüksek JAK2V617F allel yüküne sahip grup arasında total tromboz, arteriyel tromboz ve venöz tromboz sıklığı açısından anlamlı bir fark saptanmamıştır. Fakat korelasyon analizi sonucunda ET olgu grubunda, JAK2V617F allel yükü ile venöz tromboz arasında pozitif yönde zayıf bir ilişki saptanmıştır.

MPN'lerde JAK2V617F mutasyonu varlığı veya artmış mutant allel yükünün yaşam veya lösemiye dönüşüm üzerine etkisiyle ilişkili karışık görüşler olmasına rağmen çalışmaların çoğunda mutasyon varlığı veya yüksek allel yükünün yaşamı veya lösemik dönüşümü etkilemediği gösterilmiştir (12, 13, 16, 102, 273, 430, 603, 610). Çalışmalarda JAK2V617F mutasyon varlığının ET'de OS veya LFS üzerine etkisi olmadığı vurgulanmaktadır (19, 273, 603). JAK2V617F mutasyon varlığının PMF'de prognoz üzerine etkisi tartışmalıdır. Guglielmelli P.ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada JAK2V617F mutasyon varlığının PMF'de lösemik dönüşüm veya OS üzerine etkisi olmadığı bildirilmiştir. Aynı çalışmada düşük allel

yükü olan olgularda yüksek allel yükü olanlara ve mutasyon taşımayanlara göre OS daha düşük bulunmakla beraber anemiye progresyon zamanı daha kısa bulunmuştur (12). Tefferi A. ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada JAK2V617F mutasyon varlığının PMF’de yaşam üzerine etkisi olmadığı bildirilmiştir. PMF’de düşük mutant yükü olan olgularda yüksek allel yükü olan veya mutasyon olmayanlara göre OS daha düşük bulunmuştur (13). Bu çalışmalara göre tanıda düşük JAK2V617F allel yükünün PMF’de kısa yaşam süresi ile ilişkili olduğu söylenebilir. Bir çalışmada JAK2V617F mutasyon varlığı PMF’de prognoz ile ilişkisiz bulunurken başka bir çalışmada yaşam üzerine olumsuz etkisi olduğu bildirilmiştir (15, 102). Bizim çalışmamızda JAK2V617F mutasyonunu taşıyan ve taşımayan ET olguları arasında OS benzer bulunmuştur. Ayrıca ET’de JAK2V617F allel yükünün OS’ni etkilemediği gösterilmiştir. Çalışmamızda, PMF olgu grubunda JAK2V617F mutasyonu ile OS ve LFS arasında bir ilişki saptanmamıştır. Tefferi A. ve arkadaşlarının, ardından Guglielmelli P.ve arkadaşlarının yaptığı çalışmadan farklı olarak bizim çalışmamızda, PMF’de JAK2V617F allel yükü ile OS arasında ilişki saptanmamıştır. Ayrıca, PMF olgu grubumuzda JAK2V617F allel yükü ile LFS arasında ilişki gösterilmemiştir.

Sonuç olarak, PMF’de ASXL1 mutasyonunun OS üzerine olumsuz etkisi olduğunu bildiren kısıtlı sayıda çalışma bulunmaktadır (31, 37, 38). Bugüne kadar yapılan çalışmalar çoğunlukla küçük olgu serilerini içermektedir ve tek merkezlidir (31, 37, 38). Buna benzer şekilde PMF’de IDH mutasyonlarının potansiyel prognostik etkisini destekleyen tek merkezli çalışmalar vardır (40, 46). Son olarak Vannucchi AM. ve arkadaşlarının 2013 yılında yaptığı büyük bir olgu serisini içeren çok merkezli bir çalışmada da PMF’de ASXL1 mutasyonu ve IDH mutasyonu kötü prognozla ilişkili bulunmuştur (39). Çalışmamızda tek değişkenli analiz sonucunda, PMF’de ASXL1 mutasyonu varlığında ve ‘DIPSS-plus’ kriterlerine göre yüksek riskli grupta OS üzerine olumsuz etki gösterilmiştir. ASXL1 mutasyon tiplerine göre gruplandırıldığı zaman ise tek değişkenli analizde nonsense mutasyonu taşıyan gruptaki (çerçeve kayması mutasyonları dahil) OS’nin diğer mutasyon tiplerine göre daha kısa olma eğiliminde olduğu gösterilmiştir. PMF olgularımızda IDH mutasyonu, JAK2V617F mutasyonu ve JAK2V617F allel yükünün OS ile ilişkisi gösterilmemiştir. Çok değişkenli analizde ‘DIPSS-plus’ kriterlerine göre yüksek riskli grubun ve ASXL1 mutasyonunun OS üzerindeki olumsuz etkisinin sürdüğü gösterilmekle beraber, ASXL1 mutasyon tipi önemini yitirmiştir. Sonuç olarak PMF’de ‘DIPSS-plus’ kriterlerine göre yüksek riskli grubun, diğer risk gruplarına göre OS üzerine 3.19 kat olumsuz etkisi olduğu ve ASXL1 mutasyon varlığında ise ölüm riskinin 2.75 kat arttığı gösterilmiştir. Sonuç olarak çalışmamızda,

PMF’de bu iki parametrenin OS üzerine bağımsız etkisi gösterilmiştir. Bu bulgular literatürü desteklemektedir. Vannucchi AM. ve arkadaşlarının yaptığı çok merkezli çalışmada, Avrupa Kohortu’nu oluşturan 483 PMF olgusunda IDH1/IDH2 mutasyonlarının OS ile ilişkisi olmadığı fakat lösemik transformasyon riskini arttırdığı gösterilmiştir. Aynı çalışmada Mayo Kliniği’nden 374 PMF olgusunda IDH mutasyonlarının prognostik etkileri araştırılmıştır. Bu grupta IDH mutasyonları, yaşam süresinde kısalma ve lösemik transformasyonla ilişkili bulunmuştur (39). Bizim çalışmamızda IDH mutant PMF grubunda ölüm oranı, IDH mutasyonu taşımayan grupla karşılaştırıldığında anlamlı olarak yüksek saptanmıştır (sırasıyla %60, %15.3). Fakat tek değişkenli analizde IDH mutasyonunu taşıyan ve taşımayan PMF grubu arasında OS açısından fark saptanmamıştır. Bu bulgular Avrupa Kohortunu içeren gruptaki sonuçlarla paralel bulunmuştur (39). Farklı IDH mutasyon varyantlarının PMF’de farklı biyolojik veya prognostik özellikler taşıyıp taşımadığı henüz bilinmemektedir. Bunun anlaşılması için ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Vannucchi AM. ve arkadaşlarının çalışmasında Avrupa Kohortu’nu oluşturan 483 PMF olgusunda ASXL1 mutasyonu ve IDH1/IDH2 mutasyonlarının LFS ile ilişkisi gösterilmiştir (39). Aynı çalışmada Mayo Kliniği’nden dahil edilen 374 PMF olgu grubunda ASXL1 mutasyonlarının LFS ile ilişkisi olmadığı, bundan farklı olarak IDH mutasyonlarının LFS’da azalmaya neden olduğu bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda ASXL1, IDH mutasyon durumu ile LFS arasındaki ilişki araştırılmıştır. Bunun sonucunda IDH mutant olgu sayımız az olmasına rağmen, tek değişkenli analizde PMF olgu grubumuzda IDH mutasyonu varlığında LFS’da kısalma saptanmıştır. Tek değişkenli analizde ASXL1 mutasyonu ile LFS arasındaki ilişki gösterilememiştir. Bu bulgular Mayo Kliniği’nden dahil edilen gruptaki sonuçlarla paralel bulunmuştur (39). Bulgularımız, PMF’de JAK2V617F mutasyonunun, JAK2V617F allel yükünün ve ASXL1 mutasyon tiplerinin LFS üzerine etkisi olmadığını göstermiştir. Sonuç olarak PMF’de IDH mutasyonu dışında, ‘DIPSS-plus’ kriterlerine göre yüksek risk grubu varlığında LFS üzerine olumsuz etki göstermiştir.

Çalışmamızda ET olgu grubunda, ASXL1 mutasyonu, ASXL1 mutasyon tipi, IDH mutasyonu, JAK2V617F mutasyonu ve JAK2V617F allel yükü ile OS arasında ilişki gösterilmemiştir.

Sonuç olarak çalışmamızda ASXL1 mutasyonunu taşıyan ET olgularında tanı sırasındaki yaşın ileri olma eğiliminde olduğu ve mutasyonu taşıyan olgularda tanı sırasındaki ortalama lökosit değerinin yüksek olma eğiliminde olduğu gösterilmiştir. ET’de ASXL1 ile komplikasyonlar arasındaki ilişkiye bakıldığı zaman, mutasyon varlığında total tromboz, arteriyel tromboz ve venöz tromboz sıklığında değişiklik saptanmazken mutant grupta SVO

eğiliminin yüksek olduğu gösterilmiştir. Bunun yanında ET’de ASXL1 mutasyon varlığında kemik iliğinde ileri derecede fibrozis saptanmıştır. ASXL1 mutasyonu, ET’de OS üzerine etkisiz bulunmuştur. ASXL1 mutasyonunu taşıyan PMF grubunda ileri yaşla ilişki gösterilmiştir. Bunun yanında ASXL1 mutasyonu varlığında ölüm oranında artış ve kanama sıklığında artış görülmekle beraber kanamanın hayati organlarda görülme sıklığının yüksek olduğu gösterilmiştir. Korelasyon analizi sonucunda PMF olgu grubunda ASXL1 mutasyonu varlığı ile kanama sıklığı arasında pozitif yönde hafif dereceli bir ilişki saptanmıştır. Çalışmamızda, hem IDH1 hem IDH2 mutasyonunun kronik faz ET ve PMF’de nadir de olsa görülebileceği gösterilmiştir (total IDH sıklığı sırasıyla %1.9 ve %6.5). IDH mutasyonunu taşıyan PMF olgularında kadın cinsiyeti sıklığında artışa eğilim olduğu gösterilmiştir. IDH mutasyonunu taşıyan PMF olgularında kanama sıklığının, mutasyon taşımayan gruba göre anlamlı derecede yüksek olduğu ve IDH mutasyonu olan olgularda kanamanın hayati organlarda görülme eğiliminin daha yüksek olduğu görülmüştür. IDH mutasyonunu taşıyan PMF olgularında ölüm oranı, IDH mutasyonu olmayan PMF olgularına göre anlamlı derecede yüksek saptanmıştır (sırasıyla %60, %15.3). IDH mutasyonu olan PMF olgularında lösemiye dönüşüm oranı, IDH mutasyonu olmayan olgulara göre yüksek olmakla beraber istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (sırasıyla %20, %4.2). Çalışmamızda, JAK2V617F mutasyonunu taşıyan ET grubunda tanı sırasındaki Hgb ve Htc düzeyi anlamlı olarak yüksek saptanırken, ortalama trombosit değeri anlamlı olarak düşük saptanmıştır. Ayrıca JAK2V617F mutasyonunu taşıyan ET olgularında masif splenomegali oranı belirgin yüksek saptanmıştır. ET’de yüksek JAK2V617F allel yükü varlığında Hgb ve Htc değeri belirgin düşük ve LDH düzeyi belirgin yüksek saptanmıştır. Bunun yanında yüksek JAK2V617F allel yüküne sahip ET grubunda kanama sıklığında, ciddi kanama insidensinde, eritrosit transfüzyon ihtiyacında ve masif splenomegali oranında artış saptanmıştır. Ayrıca ET’de JAK2V617F allel yükü ile lökosit değeri, kanama komplikasyonu ve venöz tromboz arasında pozitif yönde zayıf bir ilişki saptanmıştır. JAK2V617F mutasyonunu taşımayan PMF grubunda kadın cinsiyet oranı belirgin yüksek saptanmıştır. JAK2V617F mutasyonu olan PMF grubunda, ortalama lökosit sayısı, Hgb ve Htc düzeyi yüksek saptanırken kanamaya eğilim olduğu ve masif splenomegali oranının yüksek olma eğiliminde olduğu gösterilmiştir. Ayrıca PMF’de yüksek JAK2V617F allel yükü varlığında Hgb, Htc düzeyi ve lökosit değeri belirgin yüksek saptanmıştır. PMF’de düşük allel yükü varlığında eritrosit transfüzyon ihtiyacının yüksek olduğu gösterilmiştir. Bunun yanında PMF’de JAK2V617F allel yükü ile tanı sırasındaki lökosit ve Htc değeri arasında pozitif yönde hafif dereceli bir ilişki saptanmıştır.

Çalışmamızda, ek olarak mutasyon kombinasyonlarının, Ph-negatif MPN olgularımız üzerine fenotipik ve prognostik etkileri araştırılmıştır. Çalışmamızda ASXL1 mutasyonu olan PMF grubunda IDH1 mutasyonunun sıklığı anlamlı olarak yüksek saptanırken IDH2 mutasyon sıklığı açısından anlamlı fark saptanmamıştır. PMF olgu grubumuzda ASXL1 mutasyonu ve IDH mutasyonu birlikteliği ile ölüm ve kanama komplikasyonu arasında pozitif yönde zayıf bir ilişki saptanmıştır. Bunun yanında PMF’de JAK2V617F mutasyonu ve ASXL1 mutasyonu birlikteliği ile kanama komplikasyonu arasında pozitif yönde hafif dereceli bir ilişki saptanmıştır. ET’de JAK2V617F mutasyonu ve IDH mutasyonu birlikteliği ile venöz tromboz arasında pozitif yönde zayıf bir ilişki saptanmıştır. Mutasyon kombinasyonlarının hastalık seyri ve komplikasyonları üzerine etkilerini araştırmak için ek çalışmalara ihtiyaç vardır.

Çalışmalarda, PMF’de TET2 mutasyon sıklığı %7-17, DNMT3A mutasyon sıklığı %10-15, EZH2 mutasyon sıklığı %5-7, IDH mutasyon sıklığı %2-5 olarak bildirilmiştir (588). Bizim çalışmamız, ASXL1 mutasyonunun PMF olgularında ET’ye göre daha sık görüldüğünü göstermiştir (sırasıyla %24.7 ve %8.4). Bugüne kadar yapılan çalışmaların verileri ile bulgularımız birleştirildiği zaman PMF olgularında JAK2V617F mutasyonu sonrasında görülen en sık ikinci genetik mutasyonun ASXL1 mutasyonu olduğu düşünülebilir.

Çalışmalarda PMF’de IDH mutasyon sıklığı %2-5 ve ET’de %1-2 olarak bildirilmiştir (588). Bizim çalışmamızda, kronik faz PMF’de IDH mutasyon sıklığı %6.5 ve kronik faz ET’de %1.9 olarak saptanmıştır. Çalışmamızda ET’deki IDH sıklığı literatürle benzer olmakla beraber PMF’deki sıklığı literatürde çoğunlukla bildirilen insidensten biraz fazla bulunmuştur. IDH mutasyonu taşıyan 5 PMF tanılı olgumuzun birinde (%20) seyir sırasında lösemiye dönüşüm gözlenmiştir. Sonuç olarak çalışmamız, IDH mutasyonlarının Ph-negatif MPN olgularında erken genetik değişimler olduğunu ve lösemiye dönüşümü kolaylaştırabileceğini desteklemektedir.

PMF’de günümüzde prognoz ve yaşam için kullanılan risk skorları ‘IPSS’, ‘DIPSS’ ve ‘DIPSS-plus’tır (430, 434, 436). Çalışmamızdaki gözlemlerden bazı pratik çıkarımlar yapılmalıdır. Çalışmamızda, ASXL1 mutasyonunu taşıyan ve taşımayan PMF olguları arasında karyotip anormalliklerinin dağılımında farklılık gözlenmezken IDH mutasyonunu taşıyan PMF olgularının hepsi normal karyotipe sahip olarak bulunmuştur. Buna rağmen çalışmamızda, ASXL1 mutasyonunun OS ve IDH mutasyonunun LFS ile ilişkisi gösterilmiştir. Bunun sonucunda bu iki mutasyonun PMF’de bağımsız biyobelirteçler olduğu düşünülebilir. Ayrıca bulgularımız hastalık prognozunda genetik değişikliklerin önemini

göstermektedir. Sonuç olarak ASXL1 ve IDH mutasyonlarının PMF’de gelecekteki klinik ve prospektif gözlemsel çalışmalara dahil edilmesinin gerekli olduğunu düşünmekteyiz.

Bu çalışma, PMF’de prognostik ve klinik öneme sahip mutasyonları ve kombinasyonlarını saptamıştır. Bulgularımız, PMF’de epigenetik regülasyonu sağlayan mutasyonların, JAK-STAT sinyal yolağını ilgilendiren mutasyonlara göre prognozla daha ilişkili olduğunu gösteren çalışmaların verileriyle paraleldir. PMF’de mutasyon profili analizi, hastalık heterojenitesinin nedenlerinin anlaşılmasını, güncel prognostik modellerin geliştirilmesini, tedavi kararlarının değerlendirilmesini, hastaların daha iyi sınıflanmasını ve yeni ilaçların etkilerinin takibini kolaylaştıracak çalışmaların yapılmasını sağlayabilecektir.

## 6. KAYNAKLAR

1. Anastasi J. The myeloproliferative and overlap, myeloproliferative/myelodysplastic neoplasms. In: Hsi ED, ed. In Hematopathology, ed 2. St. Louis: Elsevier; 2012: 479.
2. Druker BJ, Talpaz M, Resta DJ, Peng B, Buchdunger E, Ford JM, Lydon NB, Kantarjian H, Capdeville R, Ohno-Jones S, Sawyers CL. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2001 Apr 5;344(14):1031-7.
3. Campbell PJ, Baxter EJ, Beer PA, Scott LM, Bench AJ, Huntly BJ, Erber WN, Kusec R, Larsen TS, Giraudier S, Le Bousse-Kerdilès MC, Griesshammer M, Reilly JT, Cheung BY, Harrison CN, Green AR. Mutation of JAK2 in the myeloproliferative disorders: timing, clonality studies, cytogenetic associations, and role in leukemic transformation. *Blood*. 2006 Nov 15;108(10):3548-55. Epub 2006 Jul 27.
4. James C. The JAK2V617F mutation in polycythemia vera and other myeloproliferative disorders: one mutation for three diseases? *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2008:69-75.
5. Tefferi A. Challenges facing JAK inhibitor therapy for myeloproliferative neoplasms. *N Engl J Med*. 2012 Mar 1;366(9):844-6.
6. Jädersten M, Saft L, Smith A, Kulasekararaj A, Pomplun S, Göhring G, Hedlund A, Hast R, Schlegelberger B, Porwit A, Hellström-Lindberg E, Mufti GJ. TP53 mutations in low-risk myelodysplastic syndromes with del(5q) predict disease progression. *J Clin Oncol*. 2011 May 20;29(15):1971-9. Epub 2011 Apr 25.
7. Abdel-Wahab O. Genetics of the myeloproliferative neoplasms. *Curr Opin Hematol* 2011; 18:117.
8. Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, East C, Fourouclas N, Swanton S, Vassiliou GS, Bench AJ, Boyd EM, Curtin N, Scott MA, Erber WN, Green AR; Cancer Genome Project. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet*. 2005 Mar 19-25;365(9464):1054-61.
9. James C, Ugo V, Le Couédic JP, Staerk J, Delhommeau F, Lacout C, Garçon L, Raslova H, Berger R, Bennaceur-Griscelli A, Villeval JL, Constantinescu SN, Casadevall N, Vainchenker W. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature*. 2005 Apr 28;434(7037):1144-8.



10. Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, Teo SS, Tiedt R, Passweg JR, Tichelli A, Cazzola M, Skoda RC. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med*. 2005 Apr 28;352(17):1779-90.
11. Levine RL, Wadleigh M, Cools J, Ebert BL, Wernig G, Huntly BJ, Boggon TJ, Wlodarska I, Clark JJ, Moore S, Adelsperger J, Koo S, Lee JC, Gabriel S, Mercher T, D'Andrea A, Fröhling S, Döhner K, Marynen P, Vandenberghe P, Mesa RA, Tefferi A, Griffin JD, Eck MJ, Sellers WR, Meyerson M, Golub TR, Lee SJ, Gilliland DG. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell*. 2005 Apr;7(4):387-97.
12. Guglielmelli P, Barosi G, Specchia G, Rambaldi A, Lo Coco F, Antonioli E, Pieri L, Pancrazzi A, Ponziani V, Delaini F, Longo G, Ammatuna E, Liso V, Bosi A, Barbui T, Vannucchi AM. Identification of patients with poorer survival in primary myelofibrosis based on the burden of JAK2V617F mutated allele. *Blood*. 2009 Aug 20;114(8):1477-83. Epub 2009 Jun 23.
13. Tefferi A, Lasho TL, Huang J, Finke C, Mesa RA, Li CY, Wu W, Hanson CA, Pardanani A. Low JAK2V617F allele burden in primary myelofibrosis, compared to either a higher allele burden or unmutated status, is associated with inferior overall and leukemia-free survival. *Leukemia*. 2008 Apr;22(4):756-61. Epub 2008 Jan 24.
14. Tefferi A, Lasho TL, Schwager SM, Strand JS, Elliott M, Mesa R, Li CY, Wadleigh M, Lee SJ, Gilliland DG. The clinical phenotype of wild-type, heterozygous, and homozygous JAK2V617F in polycythemia vera. *Cancer*. 2006 Feb 1;106(3):631-5.
15. Tefferi A, Lasho TL, Schwager SM, Steensma DP, Mesa RA, Li CY, Wadleigh M, Gary Gilliland D. The JAK2(V617F) tyrosine kinase mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia: lineage specificity and clinical correlates. *Br J Haematol*. 2005 Nov;131(3):320-8.
16. Barosi G, Bergamaschi G, Marchetti M, Vannucchi AM, Guglielmelli P, Antonioli E, Massa M, Rosti V, Campanelli R, Villani L, Viarengo G, Gattoni E, Gerli G, Specchia G, Tinelli C, Rambaldi A, Barbui T; Gruppo Italiano Malattie Ematologiche Maligne dell'Adulto (GIMEMA) Italian Registry of Myelofibrosis. JAK2 V617F mutational status predicts progression to large splenomegaly and leukemic transformation in primary myelofibrosis. *Blood*. 2007 Dec 1;110(12):4030-6. Epub 2007 Aug 21.

17. Vannucchi AM, Antonioli E, Guglielmelli P, Rambaldi A, Barosi G, Marchioli R, Marfisi RM, Finazzi G, Guerini V, Fabris F, Randi ML, De Stefano V, Caberlon S, Tafuri A, Ruggeri M, Specchia G, Liso V, Rossi E, Pogliani E, Gugliotta L, Bosi A, Barbui T. Clinical profile of homozygous JAK2 617V>F mutation in patients with polycythemia vera or essential thrombocythemia. *Blood*. 2007 Aug 1;110(3):840-6. Epub 2007 Mar 22.
18. Antonioli E, Guglielmelli P, Pancrazzi A, Bogani C, Verrucci M, Ponziani V, Longo G, Bosi A, Vannucchi AM. Clinical implications of the JAK2 V617F mutation in essential thrombocythemia. *Leukemia*. 2005 Oct;19(10):1847-9.
19. Wolanskyj AP, Lasho TL, Schwager SM, McClure RF, Wadleigh M, Lee SJ, Gilliland DG, Tefferi A. JAK2 mutation in essential thrombocythaemia: clinical associations and long-term prognostic relevance. *Br J Haematol*. 2005 Oct;131(2):208-13.
20. Scott LM, Tong W, Levine RL, Scott MA, Beer PA, Stratton MR, Futreal PA, Erber WN, McMullin MF, Harrison CN, Warren AJ, Gilliland DG, Lodish HF, Green AR. JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis. *N Engl J Med*. 2007 Feb 1;356(5):459-68.
21. Pikman Y, Lee BH, Mercher T, McDowell E, Ebert BL, Gozo M, Cuker A, Wernig G, Moore S, Galinsky I, DeAngelo DJ, Clark JJ, Lee SJ, Golub TR, Wadleigh M, Gilliland DG, Levine RL. MPLW515L is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *PLoS Med*. 2006 Jul;3(7):e270.
22. Vannucchi AM, Antonioli E, Guglielmelli P, Pancrazzi A, Guerini V, Barosi G, Ruggeri M, Specchia G, Lo-Coco F, Delaini F, Villani L, Finotto S, Ammatuna E, Alterini R, Carrai V, Capaccioli G, Di Lollo S, Liso V, Rambaldi A, Bosi A, Barbui T. Characteristics and clinical correlates of MPL 515W>L/K mutation in essential thrombocythemia. *Blood*. 2008 Aug 1;112(3):844-7. Epub 2008 Jun 2.
23. Beer PA, Campbell PJ, Scott LM, Bench AJ, Erber WN, Bareford D, Wilkins BS, Reilly JT, Hasselbalch HC, Bowman R, Wheatley K, Buck G, Harrison CN, Green AR. MPL mutations in myeloproliferative disorders: analysis of the PT-1 cohort. *Blood*. 2008 Jul 1;112(1):141-9. Epub 2008 May 1.
24. Guglielmelli P, Pancrazzi A, Bergamaschi G, Rosti V, Villani L, Antonioli E, Bosi A, Barosi G, Vannucchi AM; GIMEMA--Italian Registry of Myelofibrosis; MPD Research

- Consortium. Anaemia characterises patients with myelofibrosis harbouring Mpl mutation. *Br J Haematol*. 2007 May;137(3):244-7.
25. Pardanani AD, Levine RL, Lasho T, Pikman Y, Mesa RA, Wadleigh M, Steensma DP, Elliott MA, Wolanskyj AP, Hogan WJ, McClure RF, Litzow MR, Gilliland DG, Tefferi A. MPL515 mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: a study of 1182 patients. *Blood*. 2006 Nov 15;108(10):3472-6. Epub 2006 Jul 25.
  26. Levine RL, Pardanani A, Tefferi A, Gilliland DG. Role of JAK2 in the pathogenesis and therapy of myeloproliferative disorders. *Nat Rev Cancer*. 2007 Sep;7(9):673-83.
  27. Oh ST, Simonds EF, Jones C, Hale MB, Goltsev Y, Gibbs KD Jr, Merker JD, Zehnder JL, Nolan GP, Gotlib J. Novel mutations in the inhibitory adaptor protein LNK drive JAK-STAT signaling in patients with myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2010 Aug 12;116(6):988-92. Epub 2010 Apr 19.
  28. Delhommeau F, Dupont S, Della Valle V, James C, Trannoy S, Massé A, Kosmider O, Le Couedic JP, Robert F, Alberdi A, Lécluse Y, Plo I, Dreyfus FJ, Marzac C, Casadevall N, Lacombe C, Romana SP, Dessen P, Soulier J, Viguié F, Fontenay M, Vainchenker W, Bernard OA. Mutation in TET2 in myeloid cancers. *N Engl J Med*. 2009 May 28;360(22):2289-301.
  29. Green A, Beer P. Somatic mutations of IDH1 and IDH2 in the leukemic transformation of myeloproliferative neoplasms. *N Engl J Med*. 2010 Jan 28;362(4):369-70.
  30. Ernst T, Chase AJ, Score J, Hidalgo-Curtis CE, Bryant C, Jones AV, Waghorn K, Zoi K, Ross FM, Reiter A, Hochhaus A, Drexler HG, Duncombe A, Cervantes F, Oscier D, Boulwood J, Grand FH, Cross NC. Inactivating mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myeloid disorders. *Nat Genet*. 2010 Aug;42(8):722-6. Epub 2010 Jul 4.
  31. Carbuccia N, Murati A, Trouplin V, Brecqueville M, Adélaïde J, Rey J, Vainchenker W, Bernard OA, Chaffanet M, Vey N, Birnbaum D, Mozziconacci MJ. Mutations of ASXL1 gene in myeloproliferative neoplasms. Epub 2009 Jul 16.
  32. Abdel-Wahab O, Tefferi A, Levine RL. Role of TET2 and ASXL1 mutations in the pathogenesis of myeloproliferative neoplasms. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2012 Oct;26(5):1053-64. Epub 2012 Aug 21. Review.
  33. Fisher CL, Pineault N, Brookes C, Helgason CD, Ohta H, Bodner C, Hess JL, Humphries RK, Brock HW. Loss-of-function Additional sex combs like 1 mutations

- disrupt hematopoiesis but do not cause severe myelodysplasia or leukemia. *Blood*. 2010 Jan 7;115(1):38-46. Epub 2009 Oct 27.
34. Gelsi-Boyer V, Trouplin V, Adélaïde J, Bonansea J, Cervera N, Carbuccia N, Lagarde A, Prebet T, Nezri M, Sainty D, Olschwang S, Xerri L, Chaffanet M, Mozziconacci MJ, Vey N, Birnbaum D. Mutations of polycomb-associated gene ASXL1 in myelodysplastic syndromes and chronic myelomonocytic leukaemia. *Br J Haematol*. 2009 Jun;145(6):788-800. Epub 2009 Apr 15.
  35. Calasanz MJ, Larrayoz MJ, Garcia-Delgado M, Giagounidis A, Malcovati L, Della Porta MG, Jädersten M, Killick S, Hellström-Lindberg E, Cazzola M, Wainscoat JS. Frequent mutation of the polycomb-associated gene ASXL1 in the myelodysplastic syndromes and in acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2010 May;24(5):1062-5. Epub 2010 Feb 25.
  36. Abdel-Wahab O, Manshouri T, Patel J, Harris K, Yao J, Hedvat C, Heguy A, Bueso-Ramos C, Kantarjian H, Levine RL, Verstovsek S. Genetic analysis of transforming events that convert chronic myeloproliferative neoplasms to leukemias. *Cancer Res*. 2010 Jan 15;70(2):447-52. Epub 2010 Jan 12.
  37. Abdel-Wahab O, Pardananani A, Patel J, Wadleigh M, Lasho T, Heguy A, Beran M, Gilliland DG, Levine RL, Tefferi A. Concomitant analysis of EZH2 and ASXL1 mutations in myelofibrosis, chronic myelomonocytic leukemia and blast-phase myeloproliferative neoplasms. *Leukemia*. 2011 Jul;25(7):1200-2. Epub 2011 Apr 1.
  38. Brecqueville M, Rey J, Bertucci F, Coppin E, Finetti P, Carbuccia N, Cervera N, Gelsi-Boyer V, Arnoulet C, Gisserot O, Verrot D, Slama B, Vey N, Mozziconacci MJ, Birnbaum D, Murati A. Mutation analysis of ASXL1, CBL, DNMT3A, IDH1, IDH2, JAK2, MPL, NF1, SF3B1, SUZ12, and TET2 in myeloproliferative neoplasms. *Genes Chromosomes Cancer*. 2012 Aug;51(8):743-55. Epub 2012 Apr 9.
  39. Vannucchi AM, Lasho TL, Guglielmelli P, Biamonte F, Pardananani A, Pereira A, Finke C, Score J, Gangat N, Mannarelli C, Ketterling RP, Rotunno G, Knudson RA, Susini MC, Laborde RR, Spolverini A, Pancrazzi A, Pieri L, Manfredini R, Tagliafico E, Zini R, Jones A, Zoi K, Reiter A, Duncombe A, Pietra D, Rumi E, Cervantes F, Barosi G, Cazzola M, Cross NC, Tefferi A. Mutations and prognosis in primary myelofibrosis. *Leukemia*. 2013 Apr 26. doi: 10.1038/leu.2013.119.
  40. Tefferi A, Lasho TL, Abdel-Wahab O, Guglielmelli P, Patel J, Caramazza D, Pieri L, Finke CM, Kilpivaara O, Wadleigh M, Mai M, McClure RF, Gilliland DG, Levine RL,

- Pardanani A, Vannucchi AM. IDH1 and IDH2 mutation studies in 1473 patients with chronic-, fibrotic- or blast-phase essential thrombocythemia, polycythemia vera or myelofibrosis. *Leukemia*. 2010 Jul;24(7):1302-9. Epub 2010 May 27.
41. Parsons DW, Jones S, Zhang X, Lin JC, Leary RJ, Angenendt P, Mankoo P, Carter H, Siu IM, Gallia GL, Olivi A, McLendon R, Rasheed BA, Keir S, Nikolskaya T, Nikolsky Y, Busam DA, Tekleab H, Diaz LA Jr, Hartigan J, Smith DR, Strausberg RL, Marie SK, Shinjo SM, Yan H, Riggins GJ, Bigner DD, Karchin R, Papadopoulos N, Parmigiani G, Vogelstein B, Velculescu VE, Kinzler KW. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science*. 2008 Sep 26;321(5897):1807-12. Epub 2008 Sep 4.
  42. Yan H, Parsons DW, Jin G, McLendon R, Rasheed BA, Yuan W, Kos I, Batinic-Haberle I, Jones S, Riggins GJ, Friedman H, Friedman A, Reardon D, Herndon J, Kinzler KW, Velculescu VE, Vogelstein B, Bigner DD. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N Engl J Med*. 2009 Feb 19;360(8):765-73.
  43. Mardis ER, Ding L, Dooling DJ, Larson DE, McLellan MD, Chen K, Koboldt DC, Fulton RS, Delehaunty KD, McGrath SD, Fulton LA, Locke DP, Magrini VJ, Abbott RM, Vickery TL, Reed JS, Robinson JS, Wylie T, Smith SM, Carmichael L, Eldred JM, Harris CC, Walker J, Peck JB, Du F, Dukes AF, Sanderson GE, Brummett AM, Clark E, McMichael JF, Meyer RJ, Schindler JK, Pohl CS, Wallis JW, Shi X, Lin L, Schmidt H, Tang Y, Haipek C, Wiechert ME, Ivy JV, Kalicki J, Elliott G, Ries RE, Payton JE, Westervelt P, Tomasson MH, Watson MA, Baty J, Heath S, Shannon WD, Nagarajan R, Link DC, Walter MJ, Graubert TA, DiPersio JF, Wilson RK, Ley TJ. Recurring mutations found by sequencing an acute myeloid leukemia genome. *N Engl J Med*. 2009 Sep 10;361(11):1058-66. Epub 2009 Aug 5.
  44. Paschka P, Schlenk RF, Gaidzik VI, Habdank M, Krönke J, Bullinger L, Späth D, Kayser S, Zucknick M, Götze K, Horst HA, Germing U, Döhner H, Döhner K. IDH1 and IDH2 mutations are frequent genetic alterations in acute myeloid leukemia and confer adverse prognosis in cytogenetically normal acute myeloid leukemia with NPM1 mutation without FLT3 internal tandem duplication. *J Clin Oncol*. 2010 Aug 1;28(22):3636-43. Epub 2010 Jun 21.
  45. Thol F, Weissinger EM, Krauter J, Wagner K, Damm F, Wichmann M, Göhring G, Schumann C, Bug G, Ottmann O, Hofmann WK, Schlegelberger B, Ganser A, Heuser

- M. IDH1 mutations in patients with myelodysplastic syndromes are associated with an unfavorable prognosis. *Haematologica*. 2010 Oct;95(10):1668-74. Epub 2010 May 21.
46. Tefferi A, Jimma T, Sulai NH, Lasho TL, Finke CM, Knudson RA, McClure RF, Pardanani A. IDH mutations in primary myelofibrosis predict leukemic transformation and shortened survival: clinical evidence for leukemogenic collaboration with JAK2V617F. *Leukemia*. 2012 Mar;26(3):475-80. Epub 2011 Sep 13.
  47. Passamonti F, Rumi E, Pietra D, Della Porta MG, Boveri E, Pascutto C, Vanelli L, Arcaini L, Burcheri S, Malcovati L, Lazzarino M, Cazzola M. Relation between JAK2 (V617F) mutation status, granulocyte activation, and constitutive mobilization of CD34+ cells into peripheral blood in myeloproliferative disorders. *Blood*. 2006 May 1;107(9):3676-82. Epub 2005 Dec 22.
  48. Vannucchi AM, Antonioli E, Guglielmelli P, Pardanani A, Tefferi A. Clinical correlates of JAK2V617F presence or allele burden in myeloproliferative neoplasms: a critical reappraisal. *Leukemia*. 2008 Jul;22(7):1299-307. Epub 2008 May 22.
  49. Carobbio A, Finazzi G, Antonioli E, Guglielmelli P, Vannucchi AM, Dellacasa CM, Salmoiraghi S, Delaini F, Rambaldi A, Barbui T. JAK2V617F allele burden and thrombosis: a direct comparison in essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Exp Hematol*. 2009 Sep;37(9):1016-21. Epub 2009 Jun 24.
  50. Antonioli E, Guglielmelli P, Poli G, Bogani C, Pancrazzi A, Longo G, Ponziani V, Tozzi L, Pieri L, Santini V, Bosi A, Vannucchi AM; Myeloproliferative Disorders Research Consortium (MPD-RC). Influence of JAK2V617F allele burden on phenotype in essential thrombocythemia. *Haematologica*. 2008 Jan;93(1):41-8.
  51. Bain B J, Matutes E. *Myeloid Malignancies: an Atlas of Investigation and Diagnosis*. ISBN 978 1 84692 005 4.
  52. Ebert BL, Pretz J, Bosco J, Chang CY, Tamayo P, Galili N, Raza A, Root DE, Attar E, Ellis SR, Golub TR. Identification of RPS14 as a 5q- syndrome gene by RNA interference screen. *Nature*. 2008 Jan 17;451(7176):335-9.
  53. Laszlo J. Myeloproliferative disorders (MPD): myelofibrosis, myeloscrosis, extramedullary hematopoiesis, undifferentiated MPD, and hemorrhagic thrombocythemia. *Semin Hematol*. 1975; 12(4):409-32.
  54. Vardiman JW, Harris NL, Brunning R. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood*. 2002; 100(7):2292-302. Comment in: *Blood*. 2003;101(7):2895-6.

55. Tefferi A, Vardiman JW. Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: The 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms. *Leukemia*. 2008; 22(1):14-22. Comment in: *Leukemia*. 2008;22(11):2118-9.
56. Vaquez H (1892) Sur une forme speciale de cyanose s'accompagnant d'hyperglobulie excessive et peristante. *C R Soc Biol (Paris)* 44:384-388.
57. Epstein E, Goedel A (1934) Hamorrhagische Thrombozythamie bei vascularer Schrumpfmilz (Hemorrhagic thrombocythemia with a vascular, sclerotic spleen). *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 293:233.
58. Dameshek W. Some speculations on the myeloproliferative syndromes. *Blood*. 1951 Apr;6(4):372-5.
59. Nowell PC, Hungerford DA. Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes. *J Natl Cancer Inst*. 1960 Jul;25:85-109.
60. de Klein A, van Kessel AG, Grosveld G, Bartram CR, Hagemeijer A, Bootsma D, Spurr NK, Heisterkamp N, Groffen J, Stephenson JR. A cellular oncogene is translocated to the Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia. *Nature*. 1982 Dec 23;300(5894):765-7.
61. Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood*. 2002 Oct 1;100(7):2292-302. Review.
62. Jones AV, Kreil S, Zoi K, Waghorn K, Curtis C, Zhang L, Score J, Sear R, Chase AJ, Grand FH, White H, Zoi C, Loukopoulos D, Terpos E, Vervessou EC, Schultheis B, Emig M, Ernst T, Lengfelder E, Hehlmann R, Hochhaus A, Oscier D, Silver RT, Reiter A, Cross NC. Widespread occurrence of the JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders. *Blood*. 2005 Sep 15;106(6):2162-8. Epub 2005 May 26.
63. Ugo V, James C, Vainchenker W. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Med Sci (Paris)*. 2005 Jun-Jul;21(6-7):669-70.
64. Laurent C, Demas V, Delabesse E, Brousset P. Detection of the MPL W515L mutation in bone marrow core biopsy specimens with essential thrombocythemia using the TaqMan assay. *Hum Pathol*. 2007 Oct;38(10):1581-2.
65. Toyama K, Karasawa M, Yokohama A, Mitsui T, Uchiumi H, Saitoh T, Handa H, Murakami H, Nojima Y, Tsukamoto N. Differences in the JAK2 and MPL mutation status in the cell lineages of the bcr/abl-negative chronic myeloproliferative neoplasm subtypes. *Intern Med*. 2011;50(21):2557-61. Epub 2011 Nov 1.

66. Lieu CH, Shen YJ, Lai WC, Tsai WH, Hsu HC. Prevalence of MPL W515L/K mutations in Taiwanese patients with Philadelphia-negative chronic myeloproliferative neoplasms. *J Chin Med Assoc.* 2010 Oct;73(10):530-2.
67. Daly S, Conneally E, Langabeer SE. Identification of MPL W515L/K mutations in patients with primary myelofibrosis and essential thrombocythaemia by allele-specific polymerase chain reaction. *Acta Haematol.* 2009;121(4):221-2. Epub 2009 Jun 10.
68. Johansson P, Kutti J, Andréasson B, Safai-Kutti S, Vilén L, Wedel H, Ridell B. Trends in the incidence of chronic Philadelphia chromosome negative (Ph-) myeloproliferative disorders in the city of Göteborg, Sweden, during 1983-99. *J Intern Med.* 2004 Aug;256(2):161-5.
69. Ruggeri M, Tosetto A, Frezzato M, Rodeghiero F. The rate of progression to polycythemia vera or essential thrombocythemia in patients with erythrocytosis or thrombocytosis. *Ann Intern Med.* 2003 Sep 16;139(6):470-5.
70. Berglund S, Zettervall O. Incidence of polycythemia vera in a defined population. *Eur J Haematol.* 1992 Jan;48(1):20-6.
71. Tefferi A, Spivak JL. Polycythemia vera: scientific advances and current practice. *Semin Hematol* 2005;42:206-220.
72. Modan B, Kallner H, Zemer D, Yoran C. A note on the increased risk of polycythemia vera in Jews. *Blood.* 1971 Feb;37(2):172-6.
73. Brubaker LH, Wasserman LR, Goldberg JD, Pisciotta AV, McIntyre OR, Kaplan ME, Modan B, Flannery J, Harp R. Increased prevalence of polycythemia vera in parents of patients on polycythemia vera study group protocols. *Am J Hematol.* 1984 May;16(4):367-73.
74. Gilbert HS. Familial myeloproliferative disease. *Baillieres Clin Haematol.* 1998 Dec;11(4):849-58. Review.
75. London IM, Shemin D, West R, Rittenberg D. Heme synthesis and red blood cell dynamics in normal humans and in subjects with polycythemia vera, sickle-cell anemia, and pernicious anemia. *J Biol Chem.* 1949 May;179(1):463-84.
76. Eaves AC, Henkelman DH, Eaves CJ. Abnormal erythropoiesis in the myeloproliferative disorders: an analysis of underlying cellular and humoral mechanisms. *Exp Hematol.* 1980;8 Suppl 8:235-47.
77. Lawrence JH, Elmlinger PJ, Fulton G. Oxygen and the control of red cell production in primary and secondary polycythemia; effects on the iron turnover patterns with Fe59 as tracer. *Cardiologia.* 1952;21(4):337-46.



78. Spivak JL, Cooke CR. Polycythemia vera in an anephric man. *Am J Med Sci.* 1976 Nov-Dec;272(3):339-44.
79. Prchal JF, Axelrad AA. Letter: Bone-marrow responses in polycythemia vera. *N Engl J Med.* 1974 Jun 13;290(24):1382.
80. Eaves CJ, Eaves AC. Erythropoietin (Ep) dose-response curves for three classes of erythroid progenitors in normal human marrow and in patients with polycythemia vera. *Blood.* 1978 Dec;52(6):1196-210.
81. Hess G, Rose P, Gamm H, Papadileris S, Huber C, Seliger B. Molecular analysis of the erythropoietin receptor system in patients with polycythaemia vera. *Br J Haematol.* 1994 Dec;88(4):794-802.
82. Dai CH, Krantz SB, Green WF, Gilbert HS. Polycythaemia vera. III. Burst-forming units-erythroid (BFU-E) response to stem cell factor and c-kit receptor expression. *Br J Haematol.* 1994 Jan;86(1):12-21.
83. Correa PN, Eskinazi D, Axelrad AA. Circulating erythroid progenitors in polycythemia vera are hypersensitive to insulin-like growth factor-1 in vitro: studies in an improved serum-free medium. *Blood.* 1994 Jan 1;83(1):99-112.
84. Mirza AM, Correa PN, Axelrad AA. Increased basal and induced tyrosine phosphorylation of the insulin-like growth factor I receptor beta subunit in circulating mononuclear cells of patients with polycythemia vera. *Blood.* 1995 Aug 1;86(3):877-82.
85. Mirza AM, Ezzat S, Axelrad AA. Insulin-like growth factor binding protein-1 is elevated in patients with polycythemia vera and stimulates erythroid burst formation in vitro. *Blood.* 1997 Mar 15;89(6):1862-9.
86. Michl P, Spoettl G, Engelhardt D, Weber MM. Alterations of the insulin-like growth factor system in patients with polycythemia vera. *Mol Cell Endocrinol.* 2001 Jul 5;181(1-2):189-97.
87. Ratajczak MZ, Ratajczak J, Marlicz W, Pletcher CH Jr, Machalinski B, Moore J, Hung H, Gewirtz AM. Recombinant human thrombopoietin (TPO) stimulates erythropoiesis by inhibiting erythroid progenitor cell apoptosis. *Br J Haematol.* 1997 Jul;98(1):8-17.
88. Solar GP, Kerr WG, Zeigler FC, Hess D, Donahue C, de Sauvage FJ, Eaton DL. Role of c-mpl in early hematopoiesis. *Blood.* 1998 Jul 1;92(1):4-10.
89. Villeval JL, Cohen-Solal K, Tulliez M, Giraudier S, Guichard J, Burstein SA, Cramer EM, Vainchenker W, Wendling F. High thrombopoietin production by hematopoietic cells induces a fatal myeloproliferative syndrome in mice. *Blood.* 1997 Dec 1;90(11):4369-83.

90. Elliot MA, Yoon SY, Kao P, Li CY, Tefferi A. Simultaneous measurement of serum thrombopoietin and expression of megakaryocyte c-Mpl with clinical and laboratory correlates for myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Eur J Haematol.* 2002 Mar;68(3):175-9.
91. Moliterno AR, Spivak JL. Posttranslational processing of the thrombopoietin receptor is impaired in polycythemia vera. *Blood.* 1999 Oct 15;94(8):2555-61.
92. Moliterno AR, Williams DM, Gutierrez-Alamillo LI, Salvatori R, Ingersoll RG, Spivak JL. Mpl Baltimore: a thrombopoietin receptor polymorphism associated with thrombocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Aug 3;101(31):11444-7. Epub 2004 Jul 21.
93. Carpinelli MR, Hilton DJ, Metcalf D, Antonchuk JL, Hyland CD, Mifsud SL, Di Rago L, Hilton AA, Willson TA, Roberts AW, Ramsay RG, Nicola NA, Alexander WS. Suppressor screen in Mpl<sup>-/-</sup> mice: c-Myb mutation causes supraphysiological production of platelets in the absence of thrombopoietin signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Apr 27;101(17):6553-8. Epub 2004 Apr 7.
94. Metcalf D, Carpinelli MR, Hyland C, Mifsud S, Dirago L, Nicola NA, Hilton DJ, Alexander WS. Anomalous megakaryocytopoiesis in mice with mutations in the c-Myb gene. *Blood.* 2005 May 1;105(9):3480-7. Epub 2005 Jan 21.
95. Cools J, DeAngelo DJ, Gotlib J, Stover EH, Legare RD, Cortes J, Kutok J, Clark J, Galinsky I, Griffin JD, Cross NC, Tefferi A, Malone J, Alam R, Schrier SL, Schmid J, Rose M, Vandenberghe P, Verhoef G, Boogaerts M, Wlodarska I, Kantarjian H, Marynen P, Coutre SE, Stone R, Gilliland DG. A tyrosine kinase created by fusion of the PDGFRA and FIP1L1 genes as a therapeutic target of imatinib in idiopathic hypereosinophilic syndrome. *N Engl J Med.* 2003 Mar 27;348(13):1201-14.
96. Cross NC, Reiter A. Tyrosine kinase fusion genes in chronic myeloproliferative diseases. *Leukemia.* 2002 Jul;16(7):1207-12. Review.
97. Röder S, Steimle C, Meinhardt G, Pahl HL. STAT3 is constitutively active in some patients with Polycythemia rubra vera. *Exp Hematol.* 2001 Jun;29(6):694-702.
98. Ugo V, Marzac C, Teyssandier I, Larbret F, Lécluse Y, Debili N, Vainchenker W, Casadevall N. Multiple signaling pathways are involved in erythropoietin-independent differentiation of erythroid progenitors in polycythemia vera. *Exp Hematol.* 2004 Feb;32(2):179-87.

99. Zhao R, Xing S, Li Z, Fu X, Li Q, Krantz SB, Zhao ZJ. Identification of an acquired JAK2 mutation in polycythemia vera. *J Biol Chem*. 2005 Jun 17;280(24):22788-92. Epub 2005 Apr 29.
100. McClure RF, Hoyer JD, Mai M. The JAK2 V617F mutation is absent in patients with erythrocytosis due to high oxygen affinity hemoglobin variants. *Hemoglobin* 2006; 30: 487–489.
101. Heller PG, Lev PR, Salim JP, Kornblihtt LI, Goette NP, Chazarreta CD, Glembotsky AC, Vassallu PS, Marta RF, Molinas FC. JAK2V617F mutation in platelets from essential thrombocythemia patients: correlation with clinical features and analysis of STAT5 phosphorylation status. *Eur J Haematol* 2006; 77: 210–216.
102. Campbell PJ, Griesshammer M, Döhner K, Döhner H, Kusec R, Hasselbalch HC, Larsen TS, Pallisgaard N, Giraudier S, Le Bousse-Kerdilès MC, Desterke C, Guerton B, Dupriez B, Bordessoule D, Fenaux P, Kiladjian JJ, Viallard JF, Brière J, Harrison CN, Green AR, Reilly JT. V617F mutation in JAK2 is associated with poorer survival in idiopathic myelofibrosis. *Blood* 2006; 107: 2098–2100.
103. H, Tiu R, Murugesan G, Aboudola S, Hsi ED, Theil KS, Sekeres MA, Maciejewski JP. Refractory anemia with ringed sideroblasts associated with marked thrombocytosis (RARS-T), another myeloproliferative condition characterized by JAK2 V617F mutation. *Blood* 2006; 108: 2173–2181.
104. Zecca M, Bergamaschi G, Kratz C, Bergsträsser E, Danesino C, De Filippi P, Hasle H, Lisini D, Locatelli F, Pession A, Sainati L, Starý J, Trebo M, van den Heuvel-Eibrink M, Wójcik D, Niemeyer CM. JAK2 V617F mutation is a rare event in juvenile myelomonocytic leukemia. *Leukemia* 2007; 21: 367–369.
105. Fiorini A, Farina G, Reddicono G, Palladino M, Rossi E, Za T, Laurenti L, Giammarco S, Chiusolo P, Leone G, Sica S. *Leukemia*. Screening of JAK2 V617F mutation in multiple myeloma. 2006 Oct;20(10):1912-3. Epub 2006 Jul 27.
106. Steinman HK, Greaves MW. Aquagenic pruritus. *J Am Acad Dermatol*. 1985 Jul;13(1):91-6.
107. Osler W. Chronic Cyanotic Polycythaemia with Enlarged Spleen. *Br Med J*. 1904 Jan 16;1(2246):121-2.
108. Parker RG. Occlusion of the hepatic veins in man. *Medicine (Baltimore)*. 1959 Dec;38:369-402.
109. Valla D, Casadevall N, Lacombe C, Varet B, Goldwasser E, Franco D, Maillard JN, Pariente EA, Leporrier M, Rueff B, et al. Primary myeloproliferative disorder and

- hepatic vein thrombosis. A prospective study of erythroid colony formation in vitro in 20 patients with Budd-Chiari syndrome. *Ann Intern Med.* 1985 Sep;103(3):329-34.
110. Spivak JL. Polycythemia vera: myths, mechanisms, and management. *Blood.* 2002 Dec 15;100(13):4272-90. Epub 2002 Aug 8.
  111. Anger B, Haug U, Seidler R, Heimpel H. Polycythemia vera. A clinical study of 141 patients. *Blut.* 1989 Dec;59(6):493-500.
  112. Gruppo Italiano Studio Policitemia. Polycythemia vera: the natural history of 1213 patients followed for 20 years. *Ann Intern Med.* 1995 Nov 1;123(9):656-64.
  113. Najean Y, Mugnier P, Dresch C, Rain JD. Polycythaemia vera in young people: an analysis of 58 cases diagnosed before 40 years. *Br J Haematol.* 1987 Nov;67(3):285-91.
  114. Landolfi R, Marchioli R, Kutti J, Gisslinger H, Tognoni G, Patrono C, Barbui T; European Collaboration on Low-Dose Aspirin in Polycythemia Vera Investigators. Efficacy and safety of low-dose aspirin in polycythemia vera. *N Engl J Med.* 2004 Jan 8;350(2):114-24.
  115. Wehmeier A, Daum I, Jamin H, Schneider W. Incidence and clinical risk factors for bleeding and thrombotic complications in myeloproliferative disorders. A retrospective analysis of 260 patients. *Ann Hematol.* 1991 Aug;63(2):101-6.
  116. Shibata J, Hasegawa J, Siemens HJ, Wolber E, Dibbelt L, Li D, Katschinski DM, Fandrey J, Jelkmann W, Gassmann M, Wenger RH, Wagner KF. Hemostasis and coagulation at a hematocrit level of 0.85: functional consequences of erythrocytosis. *Blood.* 2003 Jun 1;101(11):4416-22. Epub 2003 Feb 6.
  117. Ozer FL, Traux WE, Miesch DC, Levin WC. Primary hemorrhagic thrombocythemia. *Am J Med.* 1960 May;28:807-23.
  118. van Genderen PJ, Budde U, Michiels JJ, van Strik R, van Vliet HH. The reduction of large von Willebrand factor multimers in plasma in essential thrombocythaemia is related to the platelet count. *Br J Haematol.* 1996 Jun;93(4):962-5.
  119. Budde U, Scharf RE, Franke P, Hartmann-Budde K, Dent J, Ruggeri ZM. Elevated platelet count as a cause of abnormal von Willebrand factor multimer distribution in plasma. *Blood.* 1993 Sep 15;82(6):1749-57.
  120. Kurzrock R, Cohen PR. Erythromelalgia and myeloproliferative disorders. *Arch Intern Med.* 1989 Jan;149(1):105-9. Review.
  121. Kalgaard OM, Seem E, Kvernebo K. Erythromelalgia: a clinical study of 87 cases. *J Intern Med.* 1997 Sep;242(3):191-7.

122. Michiels JJ. Erythromelalgia and vascular complications in polycythemia vera. *Semin Thromb Hemost.* 1997;23(5):441-54. Review.
123. Michiels JJ, Abels J, Steketee J, van Vliet HH, Vuzevski VD. Erythromelalgia caused by platelet-mediated arteriolar inflammation and thrombosis in thrombocythemia. *Ann Intern Med.* 1985 Apr;102(4):466-71.
124. Perkins J, Israuels MC, Wilkinson JF. Polycythaemia vera: clinical studies on a series of 127 patients managed without radiation therapy. *Q J Med.* 1964 Oct;33:499-518.
125. Gilbert HS, Warner RR, Wasserman LR. A study of histamine in myeloproliferative disease. *Blood.* 1966 Dec;28(6):795-806.
126. Huang Z, Shiva S, Kim-Shapiro DB, Patel RP, Ringwood LA, Irby CE, Huang KT, Ho C, Hogg N, Schechter AN, Gladwin MT. Enzymatic function of hemoglobin as a nitrite reductase that produces NO under allosteric control. *J Clin Invest.* 2005 Aug;115(8):2099-107. Epub 2005 Jul 21.
127. Gutman AB, Kupfer S, Sharney L, Weissmann B, Yu TF. On the biosynthesis of uric acid from glycine-N15 in primary and secondary polycythemia. *Am J Med.* 1956 Dec;21(6):901-17.
128. 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 Jan;116(1):21-9.
129. Buchanan JG, Ameratunga RV, Hawkins RC. Polycythemia vera and water-induced pruritus: evidence against mast cell involvement. *Pathology.* 1994 Jan;26(1):43-5.
130. Westin J, Granerus G, Weinfeld A, Wetterquist H. Histamine metabolism in polycythaemia vera. *Scand J Haematol.* 1975 Aug;15(1):45-57.
131. Salem HH, Van der Weyden MB, Young IF, Wiley JS. Pruritus and severe iron deficiency in polycythaemia vera. *Br Med J (Clin Res Ed).* 1982 Jul 10;285(6335):91-2.
132. Rosenbaum DL, Murphy GW, Swisher SN. Hemodynamic studies of the portal circulation in myeloid metaplasia. *Am J Med.* 1966 Sep;41(3):360-8.
133. Towell BL, Levine SP. Massive hepatomegaly following splenectomy for myeloid metaplasia. Case report and review of the literature. *Am J Med.* 1987 Feb;82(2):371-5.
134. Tefferi A. Essential thrombocythemia, polycythemia vera, and myelofibrosis: Current management and the prospect of targeted therapy. *Am J Hematol.* 2008;83:491-497.
135. Gangat N, Wolanskyj AP, McClure RF, Li CY, Schwager S, Wu W, Tefferi A. Risk stratification for survival and leukemic transformation in essential thrombocythemia: A single institutional study of 605 patients. *Leukemia* 2007;21:270–276.

136. Gangat N, Strand J, Li CY, Wu W, Pardanani A, Tefferi A. Leucocytosis in polycythaemia vera predicts both inferior survival and leukaemic transformation. *Br J Haematol.* 2007 Aug;138(3):354-8.
137. Wolanskyj AP, Schwager SM, McClure RF, Larson DR, Tefferi A. Essential thrombocythemia beyond the first decade: Life expectancy, long-term complication rates, and prognostic factors. *Mayo Clin Proc* 2006;81:159–166.
138. Landolfi R, Marchioli R, Kutti J, Gisslinger H, Tognoni G, Patrono C, Barbui T; European Collaboration on Low-Dose Aspirin in Polycythemia Vera Investigators. Efficacy and safety of low-dose aspirin in polycythemia vera. *N Engl J Med.* 2004 Jan 8;350(2):114-24.
139. Chievitz E, Thiede T. Complications and causes of death in polycythemia vera. *Acta Med Scand* 1962;172:513–523.
140. Berk PD, Wasserman LR, Fruchtman SM, Goldberg JD. Treatment of polycythemia vera: A summary of clinical trials conducted by the polycythemia vera study group. In: Wasserman LR, Berk PD, Berlin NI, editors. *Polycythemia Vera and the Myeloproliferative Disorders.* Philadelphia: W.B. Saunders; 1995. pp 166–194.
141. Finazzi G, Barbui T. How I treat patients with polycythemia vera. *Blood* 2007;109:5104–5111.
142. Tefferi A, Gangat N, Wolanskyj AP. Management of extreme thrombocytosis in otherwise low-risk essential thrombocythemia: Does number matter? *Blood* 2006;108:2493–2494.
143. Di Nisio M, Barbui T, Di Gennaro L, Borrelli G, Finazzi G, Landolfi R, Leone G, Marfisi R, Porreca E, Ruggeri M, Rutjes AW, Tognoni G, Vannucchi AM, Marchioli R; European Collaboration on Low-dose Aspirin in Polycythemia Vera (ECLAP) Investigators. The haematocrit and platelet target in polycythemia vera. *Br J Haematol.* 2007 Jan;136(2):249-59. Epub 2006 Dec 8.
144. Bittencourt RI, Vassallo J, Chauffaille Mde L, Xavier SG, Pagnano KB, Nascimento AC, De Souza CA, Chiattonne CS. Philadelphia-negative chronic myeloproliferative neoplasms. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2012;34(2):140-9.
145. Crisà E, Venturino E, Passera R, Prina M, Schinco P, Borchiellini A, Gai V, Ciocca Vasino MA, Bazzan M, Vaccarino A, Boccadoro M, Ferrero D. A retrospective study on 226 polycythemia vera patients: impact of median hematocrit value on clinical outcomes and survival improvement with anti-thrombotic prophylaxis and non-alkylating drugs. *Ann Hematol.* 2010 Jul;89(7):691-9. Epub 2010 Feb 10.

146. Barosi G, Birgegard G, Finazzi G, Griesshammer M, Harrison C, Hasselbalch HC, Kiladjian JJ, Lengfelder E, McMullin MF, Passamonti F, Reilly JT, Vannucchi AM, Barbui T. Response criteria for essential thrombocythemia and polycythemia vera: result of a European LeukemiaNet consensus conference. *Blood*. 2009 May 14;113(20):4829-33. Epub 2009 Mar 10.
147. Barbui T, Carobbio A, Rambaldi A, Finazzi G. Perspectives on thrombosis in essential thrombocythemia and polycythemia vera: is leukocytosis a causative factor? *Blood*. 2009;114(4):759-63.
148. Tefferi A. Polycythemia vera: a comprehensive review and clinical recommendations. *Mayo Clin Proc*. 2003 Feb;78(2):174-94.
149. Pearson TC, Wetherley-Mein G. Vascular occlusive episodes and venous haematocrit in primary proliferative polycythaemia. *Lancet*. 1978 Dec 9;2(8102):1219-22.
150. Vongpatanasin W, Brickner ME, Hillis LD, Lange RA. The Eisenmenger syndrome in adults. *Ann Intern Med*. 1998 May 1;128(9):745-55.
151. Thorne SA. Management of polycythaemia in adults with cyanotic congenital heart disease. *Heart*. 1998 Apr;79(4):315-6.
152. Perloff JK, Marelli AJ, Miner PD. Risk of stroke in adults with cyanotic congenital heart disease. *Circulation*. 1993 Jun;87(6):1954-9.
153. Van de Pette JE, Guthrie DL, Pearson TC. Whole blood viscosity in polycythaemia: the effect of iron deficiency at a range of haemoglobin and packed cell volumes. *Br J Haematol*. 1986 Jun;63(2):369-75.
154. Nand S, Messmore H, Fisher SG, Bird ML, Schulz W, Fisher RI. Leukemic transformation in polycythemia vera: analysis of risk factors. *Am J Hematol*. 1990 May;34(1):32-6.
155. Hocking WG, Golde DW. Polycythemia: evaluation and management. *Blood Rev*. 1989 Mar;3(1):59-65.
156. Kaplan ME, Mack K, Goldberg JD, Donovan PB, Berk PD, Wasserman LR. Long-term management of polycythemia vera with hydroxyurea: a progress report. *Semin Hematol*. 1986 Jul;23(3):167-71.
157. Treatment of polycythaemia vera by radiophosphorus or busulphan: a randomized trial. "Leukemia and Hematosarcoma" Cooperative Group, European Organization for Research on Treatment of Cancer (E.O.R.T.C.). *Br J Cancer*. 1981 Jul;44(1):75-80.

158. Foa P, Massaro P, Caldiera S, LaTargia ML, Iurlo A, Clerici C, Fornier M, Bertoni F, Maiolo AT. Long-term therapeutic efficacy and toxicity of recombinant interferon-alpha 2a in polycythaemia vera. *Eur J Haematol*. 1998 May;60(5):273-7.
159. Silver RT. Interferon alfa: effects of long-term treatment for polycythemia vera. *Semin Hematol*. 1997 Jan;34(1):40-50.
160. Pettitt RM, Silverstein MN, Petrone ME. Anagrelide for control of thrombocytopenia in polycythemia and other myeloproliferative disorders. *Semin Hematol*. 1997 Jan;34(1):51-4.
161. Storen EC, Tefferi A. Long-term use of anagrelide in young patients with essential thrombocytopenia. *Blood*. 2001 Feb 15;97(4):863-6.
162. Harrison CN, Campbell PJ, Buck G, Wheatley K, East CL, Bareford D, Wilkins BS, van der Walt JD, Reilly JT, Grigg AP, Revell P, Woodcock BE, Green AR; United Kingdom Medical Research Council Primary Thrombocytopenia 1 Study. Hydroxyurea compared with anagrelide in high-risk essential thrombocytopenia. *N Engl J Med*. 2005 Jul 7;353(1):33-45.
163. Balan KK, Critchley M. Outcome of 259 patients with primary proliferative polycythaemia (PPP) and idiopathic thrombocythaemia (IT) treated in a regional nuclear medicine department with phosphorus-32--a 15 year review. *Br J Radiol*. 1997 Nov;70(839):1169-73.
164. Roberts BE, Smith AH. Use of radioactive phosphorus in haematology. *Blood Rev*. 1997 Sep;11(3):146-53.
165. Rambaldi A, Dellacasa CM, Finazzi G, Carobbio A, Ferrari ML, Guglielmelli P, Gattoni E, Salmoiraghi S, Finazzi MC, Di Tollo S, D'Urzo C, Vannucchi AM, Barosi G, Barbui T. A pilot study of the Histone-Deacetylase inhibitor Givinostat in patients with JAK2V617F positive chronic myeloproliferative neoplasms. *Br J Haematol*. 2010 Aug;150(4):446-55. Epub 2010 Jun 15.
166. Berk PD, Goldberg JD, Donovan PB, Fruchtman SM, Berlin NI, Wasserman LR. Therapeutic recommendations in polycythemia vera based on Polycythemia Vera Study Group protocols. *Semin Hematol*. 1986 Apr;23(2):132-43.
167. Rozman C, Giral M, Feliu E, Rubio D, Cortés MT. Life expectancy of patients with chronic nonleukemic myeloproliferative disorders. *Cancer*. 1991 May 15;67(10):2658-63.
168. Passamonti F, Malabarba L, Orlandi E, Baratè C, Canevari A, Brusamolino E, Bonfichi M, Arcaini L, Caberlon S, Pascutto C, Lazzarino M. Polycythemia vera in young



- patients: a study on the long-term risk of thrombosis, myelofibrosis and leukemia. *Haematologica*. 2003 Jan;88(1):13-8.
169. Camós M, Cervantes F, Montoto S, Hernández-Boluda JC, Villamor N, Montserrat E. Acute lymphoid leukemia following polycythemia vera. *Leuk Lymphoma*. 1999 Jan;32(3-4):395-8.
170. Higuchi T, Oba R, Endo M, Harada H, Mori H, Niikura H, Omine M, Fujita K. Transition of polycythemia vera to chronic neutrophilic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 1999 Mar;33(1-2):203-6.
171. Tefferi A, Gilliland G. Classification of chronic myeloid disorders: from Dameshek towards a semi-molecular system. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2006;19(3):365-85.
172. Ridell B, Carneskog J, Wedel H, Vilén L, Høgh Dufva I, Mellqvist UH, Brywe N, Wadenvik H, Kutti J. Incidence of chronic myeloproliferative disorders in the city of Göteborg, Sweden 1983-1992. *Eur J Haematol*. 2000 Oct;65(4):267-71.
173. Passamonti F, Rumi E, Pungolino E, Malabarba L, Bertazzoni P, Valentini M, Orlandi E, Arcaini L, Brusamolino E, Pascutto C, Cazzola M, Morra E, Lazzarino M. Life expectancy and prognostic factors for survival in patients with polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Am J Med*. 2004 Nov 15;117(10):755-61.
174. Mesa RA, Silverstein MN, Jacobsen SJ, Wollan PC, Tefferi A. Population-based incidence and survival figures in essential thrombocythemia and agnogenic myeloid metaplasia: an Olmsted County Study, 1976-1995. *Am J Hematol*. 1999 May;61(1):10-5.
175. Gugliotta LEA (1997) Epidemiological, diagnostic, therapeutic, and prognostic aspects of essential thrombocythemia in a retrospective study of the GIMMC group in two thousand patients. *Blood* 90:348a (abstract no 1551)
176. McNally RJ, Rowland D, Roman E, Cartwright RA. Age and sex distributions of hematological malignancies in the U.K. *Hematol Oncol*. 1997 Nov;15(4):173-89.
177. Jensen MK, de Nully Brown P, Nielsen OJ, Hasselbalch HC. Incidence, clinical features and outcome of essential thrombocythaemia in a well defined geographical area. *Eur J Haematol*. 2000 Aug;65(2):132-9.
178. Hasle H. Incidence of essential thrombocythaemia in children. *Br J Haematol*. 2000 Sep;110(3):751.
179. Falcetta R, Sacerdote C, Bazzan M, Pollio B, Ciocca Vasino MA, Ciccone G, Vineis P. Occupational and environmental risk factors for essential thrombocythemia: a case-control study. *G Ital Med Lav Ergon*. 2003 Jul-Sep;25 Suppl(3):9-12. Italian.

180. Mele A, Visani G, Pulsoni A, Monarca B, Castelli G, Stazi MA, Gentile G, Mandelli F. Risk factors for essential thrombocythemia: A case-control study. Italian Leukemia Study Group. *Cancer*. 1996 May 15;77(10):2157-61.
181. Tsukamoto N, Morita K, Maehara T, Okamoto K, Sakai H, Karasawa M, Naruse T, Omine M. Clonality in chronic myeloproliferative disorders defined by X-chromosome linked probes: demonstration of heterogeneity in lineage involvement. *Br J Haematol*. 1994 Feb;86(2):253-8.
182. el-Kassar N, Hetet G, Brière J, Grandchamp B. Clonality analysis of hematopoiesis in essential thrombocythemia: advantages of studying T lymphocytes and platelets. *Blood*. 1997 Jan 1;89(1):128-34.
183. Anger B, Janssen JW, Schrezenmeier H, Hehlmann R, Heimpel H, Bartram CR. Clonal analysis of chronic myeloproliferative disorders using X-linked DNA polymorphisms. *Leukemia*. 1990 Apr;4(4):258-61.
184. Shih LY, Lin TL, Dunn P, Wu JH, Tseng CP, Lai CL, Wang PN, Kuo MC. Clonality analysis using X-chromosome inactivation patterns by HUMARA-PCR assay in female controls and patients with idiopathic thrombocytosis in Taiwan. *Exp Hematol*. 2001 Feb;29(2):202-8.
185. Gilliland DG, Blanchard KL, Levy J, Perrin S, Bunn HF. Clonality in myeloproliferative disorders: analysis by means of the polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991 Aug 1;88(15):6848-52.
186. Prchal JT, Guan YL. A novel clonality assay based on transcriptional analysis of the active X chromosome. *Stem Cells*. 1993 May;11 Suppl 1:62-5.
187. Harrison CN, Gale RE, Machin SJ, Linch DC. A large proportion of patients with a diagnosis of essential thrombocythemia do not have a clonal disorder and may be at lower risk of thrombotic complications. *Blood*. 1999 Jan 15;93(2):417-24.
188. Champion KM, Gilbert JG, Asimakopoulos FA, Hinshelwood S, Green AR. Clonal haemopoiesis in normal elderly women: implications for the myeloproliferative disorders and myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol*. 1997 Jun;97(4):920-6.
189. Raskind WH, Jacobson R, Murphy S, Adamson JW, Fialkow PJ. Evidence for the involvement of B lymphoid cells in polycythemia vera and essential thrombocythemia. *J Clin Invest*. 1985 Apr;75(4):1388-90.
190. Chiusolo P, La Barbera EO, Laurenti L, Piccirillo N, Sorà F, Giordano G, Urbano R, Mazzucconi MG, De Stefano V, Leone G, Sica S. Clonal hemopoiesis and risk of

- thrombosis in young female patients with essential thrombocythemia. *Exp Hematol.* 2001 Jun;29(6):670-6.
191. Vannucchi AM, Grossi A, Pancrazzi A, Antonioli E, Guglielmelli P, Balestri F, Biscardi M, Bulgarelli S, Longo G, Graziano C, Gugliotta L, Bosi A. PRV-1, erythroid colonies and platelet Mpl are unrelated to thrombosis in essential thrombocythaemia. *Br J Haematol.* 2004 Oct;127(2):214-9.
  192. Bacher U, Haferlach T, Kern W, Hiddemann W, Schnittger S, Schoch C. Conventional cytogenetics of myeloproliferative diseases other than CML contribute valid information. *Ann Hematol.* 2005 Apr;84(4):250-7. Epub 2005 Feb 4.
  193. Steensma DP, Tefferi A. Cytogenetic and molecular genetic aspects of essential thrombocythemia. *Acta Haematol.* 2002;108(2):55-65. Review.
  194. Fialkow PJ, Faguet GB, Jacobson RJ, Vaidya K, Murphy S. Evidence that essential thrombocythemia is a clonal disorder with origin in a multipotent stem cell. *Blood.* 1981 Nov;58(5):916-9.
  195. Axelrad AA, Eskinazi D, Correa PN, Amato D. Hypersensitivity of circulating progenitor cells to megakaryocyte growth and development factor (PEG-rHu MGDF) in essential thrombocythemia. *Blood.* 2000 Nov 15;96(10):3310-21.
  196. Juvonen E, Ikkala E, Oksanen K, Ruutu T. Megakaryocyte and erythroid colony formation in essential thrombocythaemia and reactive thrombocytosis: diagnostic value and correlation to complications. *Br J Haematol.* 1993 Feb;83(2):192-7.
  197. Messinezy M, Westwood NB, El-Hemaidi I, Marsden JT, Sherwood RS, Pearson TC. Serum erythropoietin values in erythrocytoses and in primary thrombocythaemia. *Br J Haematol.* 2002 Apr;117(1):47-53.
  198. Harrison CN, Gale RE, Pezella F, Mire-Sluis A, MacHin SJ, Linch DC. Platelet c-mpl expression is dysregulated in patients with essential thrombocythaemia but this is not of diagnostic value. *Br J Haematol.* 1999 Oct;107(1):139-47.
  199. Yoon SY, Li CY, Tefferi A. Megakaryocyte c-Mpl expression in chronic myeloproliferative disorders and the myelodysplastic syndrome: immunoperoxidase staining patterns and clinical correlates. *Eur J Haematol.* 2000 Sep;65(3):170-4.
  200. Passamonti F, Pietra D, Malabarba L, Rumi E, Della Porta MG, Malcovati L, Bonfichi M, Pascutto C, Lazzarino M, Cazzola M. Clinical significance of neutrophil CD177 mRNA expression in Ph-negative chronic myeloproliferative disorders. *Br J Haematol.* 2004 Sep;126(5):650-6.

201. 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 May 1;103(9):3547-8. Epub 2003 Dec 30.
202. Koch CA, Lasho TL, Tefferi A. Platelet-rich plasma serotonin levels in chronic myeloproliferative disorders: evaluation of diagnostic use and comparison with the neutrophil PRV-1 assay. *Br J Haematol*. 2004 Oct;127(1):34-9.
203. Kobayashi S, Teramura M, Hoshino S, Motoji T, Oshimi K, Mizoguchi H. Circulating megakaryocyte progenitors in myeloproliferative disorders are hypersensitive to interleukin-3. *Br J Haematol*. 1993 Apr;83(4):539-44.
204. Taksin AL, Couedic JP, Dusanter-Fourt I, Massé A, Giraudier S, Katz A, Wendling F, Vainchenker W, Casadevall N, Debili N. Autonomous megakaryocyte growth in essential thrombocythemia and idiopathic myelofibrosis is not related to a c-mpl mutation or to an autocrine stimulation by Mpl-L. *Blood*. 1999 Jan 1;93(1):125-39.
205. Asimakopoulos FA, Hinshelwood S, Gilbert JG, Delibrias CC, Göttgens B, Fearon DT, Green AR. The gene encoding hematopoietic cell phosphatase (SHP-1) is structurally and transcriptionally intact in polycythemia vera. *Oncogene*. 1997 Mar 13;14(10):1215-22.
206. Le Couedic JP, Mitjavila MT, Villeval JL, Feger F, Gobert S, Mayeux P, Casadevall N, Vainchenker W. Missense mutation of the erythropoietin receptor is a rare event in human erythroid malignancies. *Blood*. 1996 Feb 15;87(4):1502-11.
207. Mittelman M, Gardyn J, Carmel M, Malovani H, Barak Y, Nir U. Analysis of the erythropoietin receptor gene in patients with myeloproliferative and myelodysplastic syndromes. *Leuk Res*. 1996 Jun;20(6):459-66.
208. Harrison CN, Gale RE, Wiestner AC, Skoda RC, Linch DC. The activating splice mutation in intron 3 of the thrombopoietin gene is not found in patients with non-familial essential thrombocythaemia. *Br J Haematol*. 1998 Sep;102(5):1341-3.
209. Wang JC, Chen C, Novetsky AD, Lichter SM, Ahmed F, Friedberg NM. Blood thrombopoietin levels in clonal thrombocytosis and reactive thrombocytosis. *Am J Med*. 1998 May;104(5):451-5.
210. Wang JC, Chen C, Lou LH, Mora M. Blood thrombopoietin, IL-6 and IL-11 levels in patients with agnogenic myeloid metaplasia. *Leukemia*. 1997 Nov;11(11):1827-32.
211. Cerutti A, Custodi P, Duranti M, Noris P, Balduini CL. Thrombopoietin levels in patients with primary and reactive thrombocytosis. *Br J Haematol*. 1997 Nov;99(2):281-4.

212. Horikawa Y, Matsumura I, Hashimoto K, Shiraga M, Kosugi S, Tadokoro S, Kato T, Miyazaki H, Tomiyama Y, Kurata Y, Matsuzawa Y, Kanakura Y. Markedly reduced expression of platelet c-mpl receptor in essential thrombocythemia. *Blood*. 1997 Nov 15;90(10):4031-8.
213. Moliterno AR, Hankins WD, Spivak JL. Impaired expression of the thrombopoietin receptor by platelets from patients with polycythemia vera. *N Engl J Med*. 1998 Feb 26;338(9):572-80.
214. Mesa RA, Hanson CA, Li CY, Yoon SY, Rajkumar SV, Schroeder G, Tefferi A. Diagnostic and prognostic value of bone marrow angiogenesis and megakaryocyte c-Mpl expression in essential thrombocythemia. *Blood*. 2002 Jun 1;99(11):4131-7.
215. Tefferi A, Yoon SY, Li CY. Immunohistochemical staining for megakaryocyte c-mpl may complement morphologic distinction between polycythemia vera and secondary erythrocytosis. *Blood*. 2000 Jul 15;96(2):771-2.
216. Budde U, van Genderen PJ. Acquired von Willebrand disease in patients with high platelet counts. *Semin Thromb Hemost*. 1997;23(5):425-31.
217. Sato K. Plasma von Willebrand factor abnormalities in patients with essential thrombocythemia. *Keio J Med*. 1988 Mar;37(1):54-71.
218. Budde U, Schaefer G, Mueller N, Egli H, Dent J, Ruggeri Z, Zimmerman T. Acquired von Willebrand's disease in the myeloproliferative syndrome. *Blood*. 1984 Nov;64(5):981-5.
219. Budde U, Dent JA, Berkowitz SD, Ruggeri ZM, Zimmerman TS. Subunit composition of plasma von Willebrand factor in patients with the myeloproliferative syndrome. *Blood*. 1986 Dec;68(6):1213-7.
220. Levy GG, Nichols WC, Lian EC, Foroud T, McClintick JN, McGee BM, Yang AY, Siemieniak DR, Stark KR, Gruppo R, Sarode R, Shurin SB, Chandrasekaran V, Stabler SP, Sabio H, Bouhassira EE, Upshaw JD Jr, Ginsburg D, Tsai HM. Mutations in a member of the ADAMTS gene family cause thrombotic thrombocytopenic purpura. *Nature*. 2001 Oct 4;413(6855):488-94.
221. López-Fernández MF, López-Berges C, Martín R, Pardo A, Ramos FJ, Batlle J. Abnormal structure of von Willebrand factor in myeloproliferative syndrome is associated to either thrombotic or bleeding diathesis. *Thromb Haemost*. 1987 Aug 4;58(2):753-7.

222. Tsai HM. Physiologic cleavage of von Willebrand factor by a plasma protease is dependent on its conformation and requires calcium ion. *Blood*. 1996 May 15;87(10):4235-44.
223. Murphy S, Davis JL, Walsh PN, Gardner FH. Template bleeding time and clinical hemorrhage in myeloproliferative disease. *Arch Intern Med*. 1978 Aug;138(8):1251-3.
224. Boneu B, Nouvel C, Sie P, Caranobe C, Combes D, Laurent G, Pris J, Bierme R. Platelets in myeloproliferative disorders. I. A comparative evaluation with certain platelet function tests. *Scand J Haematol*. 1980 Sep;25(3):214-20.
225. Waddell CC, Brown JA, Repinecz YA. Abnormal platelet function in myeloproliferative disorders. *Arch Pathol Lab Med*. 1981 Aug;105(8):432-5.
226. Löfvenberg E, Nilsson TK. Qualitative platelet defects in chronic myeloproliferative disorders: evidence for reduced ATP secretion. *Eur J Haematol*. 1989 Nov;43(5):435-40.
227. Zahavi J, Zahavi M, Firsteter E, Frish B, Turleanu R, Rachmani R. An abnormal pattern of multiple platelet function abnormalities and increased thromboxane generation in patients with primary thrombocytosis and thrombotic complications. *Eur J Haematol*. 1991 Nov;47(5):326-32.
228. Balduini CL, Bertolino G, Noris P, Piletta GC. Platelet aggregation in platelet-rich plasma and whole blood in 120 patients with myeloproliferative disorders. *Am J Clin Pathol*. 1991 Jan;95(1):82-6.
229. Burstein SA, Malpass TW, Yee E, Kadin M, Brigden M, Adamson JW, Harker LA. Platelet factor-4 excretion in myeloproliferative disease: implications for the aetiology of myelofibrosis. *Br J Haematol*. 1984 Jul;57(3):383-92.
230. Faurschou M, Nielsen OJ, Jensen MK, Hasselbalch HC. High prevalence of hyperhomocysteinemia due to marginal deficiency of cobalamin or folate in chronic myeloproliferative disorders. *Am J Hematol*. 2000 Oct;65(2):136-40.
231. Gersuk GM, Carmel R, Pattengale PK. Platelet-derived growth factor concentrations in platelet-poor plasma and urine from patients with myeloproliferative disorders. *Blood*. 1989 Nov 15;74(7):2330-4.
232. Jensen MK, de Nully Brown P, Lund BV, Nielsen OJ, Hasselbalch HC. Increased platelet activation and abnormal membrane glycoprotein content and redistribution in myeloproliferative disorders. *Br J Haematol*. 2000 Jul;110(1):116-24.

233. Kaywin P, McDonough M, Insel PA, Shattil SJ. Platelet function in essential thrombocythemia. Decreased epinephrine responsiveness associated with a deficiency of platelet alpha-adrenergic receptors. *N Engl J Med.* 1978 Sep 7;299(10):505-9.
234. Le Blanc K, Lindahl T, Rosendahl K, Samuelsson J. Impaired platelet binding of fibrinogen due to a lower number of GPIIb/IIIa receptors in polycythemia vera. *Thromb Res.* 1998 Sep 15;91(6):287-95.
235. Mazzucato M, De Marco L, De Angelis V, De Roia D, Bizzaro N, Casonato A. Platelet membrane abnormalities in myeloproliferative disorders: decrease in glycoproteins Ib and IIb/IIIa complex is associated with deficient receptor function. *Br J Haematol.* 1989 Nov;73(3):369-74.
236. Wehmeier A, Scharf RE, Fricke S, Schneider W. Bleeding and thrombosis in chronic myeloproliferative disorders: relation of platelet disorders to clinical aspects of the disease. *Haemostasis.* 1989;19(5):251-9.
237. Wehmeier A, Fricke S, Scharf RE, Schneider W. A prospective study of haemostatic parameters in relation to the clinical course of myeloproliferative disorders. *Eur J Haematol.* 1990 Oct;45(4):191-7.
238. Wehmeier A, Tschöpe D, Esser J, Menzel C, Nieuwenhuis HK, Schneider W. Circulating activated platelets in myeloproliferative disorders. *Thromb Res.* 1991 Feb 1;61(3):271-8.
239. Barbui T, Barosi G, Grossi A, Gugliotta L, Liberato LN, Marchetti M, Mazzucconi MG, Rodeghiero F, Tura S. Practice guidelines for the therapy of essential thrombocythemia. A statement from the Italian Society of Hematology, the Italian Society of Experimental Hematology and the Italian Group for Bone Marrow Transplantation. *Haematologica.* 2004 Feb;89(2):215-32. Review.
240. Landolfi R, Ciabattoni G, Patrignani P, Castellana MA, Pogliani E, Bizzi B, Patrono C. Increased thromboxane biosynthesis in patients with polycythemia vera: evidence for aspirin-suppressible platelet activation in vivo. *Blood.* 1992 Oct 15;80(8):1965-71.
241. Rocca B, Ciabattoni G, Tartaglione R, Cortelazzo S, Barbui T, Patrono C, Landolfi R. Increased thromboxane biosynthesis in essential thrombocythemia. *Thromb Haemost.* 1995 Nov;74(5):1225-30.
242. Schafer AI. Deficiency of platelet lipoxygenase activity in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med.* 1982 Feb 18;306(7):381-6.

243. van Genderen PJ, Michiels JJ, van Strik R, Lindemans J, van Vliet HH. Platelet consumption in thrombocythemia complicated by erythromelalgia: reversal by aspirin. *Thromb Haemost.* 1995 Feb;73(2):210-4.
244. van Genderen PJ, Lucas IS, van Strik R, Vuzevski VD, Prins FJ, van Vliet HH, Michiels JJ. Erythromelalgia in essential thrombocythemia is characterized by platelet activation and endothelial cell damage but not by thrombin generation. *Thromb Haemost.* 1996 Sep;76(3):333-8.
245. Thiele J, Kvasnicka HM, Diehl V. Standardization of bone marrow features - does it work in hematopathology for histological discrimination of different disease patterns? *Histol Histopathol.* 2005;20(2):633-44.
246. Thiele J, Kvasnicka HM. The 2008 WHO diagnostic criteria for polycythemia vera, essential thrombocythemia and primary myelofibrosis. *Curr Hematol Malig Rep.* 2009;4(1):33-40.
247. Besses C, Cervantes F, Pereira A, Florensa L, Solé F, Hernández-Boluda JC, Woessner S, Sans-Sabrafen J, Rozman C, Montserrat E. Major vascular complications in essential thrombocythemia: a study of the predictive factors in a series of 148 patients. *Leukemia.* 1999 Feb;13(2):150-4.
248. Harrison CN. Essential thrombocythaemia: challenges and evidence-based management. *Br J Haematol.* 2005 Jul;130(2):153-65. Review.
249. Fenaux P, Simon M, Caulier MT, Lai JL, Goudemand J, Bauters F. Clinical course of essential thrombocythemia in 147 cases. *Cancer.* 1990 Aug 1;66(3):549-56.
250. Tefferi A, Murphy S. Current opinion in essential thrombocythemia: pathogenesis, diagnosis, and management. *Blood Rev.* 2001 Sep;15(3):121-31.
251. Elliott MA, Tefferi A. Thrombocythaemia and pregnancy. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2003 Jun;16(2):227-42.
252. Wright CA, Tefferi A. A single institutional experience with 43 pregnancies in essential thrombocythemia. *Eur J Haematol.* 2001 Mar;66(3):152-9.
253. Harrison C. Pregnancy and its management in the Philadelphia negative myeloproliferative diseases. *Br J Haematol.* 2005 May;129(3):293-306. Review.
254. Michiels JJ, van Genderen PJ, Lindemans J, van Vliet HH. Erythromelalgic, thrombotic and hemorrhagic manifestations in 50 cases of thrombocythemia. *Leuk Lymphoma.* 1996 Sep;22 Suppl 1:47-56. Review.
255. Michiels JJ, Koudstaal PJ, Mulder AH, van Vliet HH. Transient neurologic and ocular manifestations in primary thrombocythemia. *Neurology.* 1993 Jun;43(6):1107-10.



256. Elliott MA, Tefferi A. Thrombosis and haemorrhage in polycythaemia vera and essential thrombocythaemia. *Br J Haematol.* 2005 Feb;128(3):275-90.
257. Anger BR, Seifried E, Scheppach J, Heimpel H. Budd-Chiari syndrome and thrombosis of other abdominal vessels in the chronic myeloproliferative diseases. *Klin Wochenschr.* 1989 Aug 17;67(16):818-25.
258. Bazzan M, Tamponi G, Schinco P, Vaccarino A, Foli C, Gallone G, Pileri A. Thrombosis-free survival and life expectancy in 187 consecutive patients with essential thrombocythemia. *Ann Hematol.* 1999 Dec;78(12):539-43.
259. Lengfelder E, Hochhaus A, Kronawitter U, Höche D, Queisser W, Jahn-Eder M, Burkhardt R, Reiter A, Ansari H, Hehlmann R. Should a platelet limit of  $600 \times 10^9/l$  be used as a diagnostic criterion in essential thrombocythaemia? An analysis of the natural course including early stages. *Br J Haematol.* 1998 Jan;100(1):15-23.
260. Teofili L, De Stefano V, Leone G, Micalizzi P, Iovino MS, Alfano G, Bizzi B. Hematological causes of venous thrombosis in young people: high incidence of myeloproliferative disorder as underlying disease in patients with splanchnic venous thrombosis. *Thromb Haemost.* 1992 Mar 2;67(3):297-301.
261. Kesler A, Ellis MH, Manor Y, Gadoth N, Lishner M. Neurological complications of essential thrombocytosis (ET). *Acta Neurol Scand.* 2000 Nov;102(5):299-302.
262. Mohamed A, McLeod JG, Hallinan J. Superior sagittal sinus thrombosis. *Clin Exp Neurol.* 1991;28:23-36.
263. Imasawa M, Iijima H. Multiple retinal vein occlusions in essential thrombocythemia. *Am J Ophthalmol.* 2002 Jan;133(1):152-5.
264. Tache JE, Saffra N, Marshak H, Aithal S, Novetsky A, Huang YW. Retinal vein thrombosis as the presenting symptom of essential thrombocythemia. *Am J Med Sci.* 2005 Mar;329(3):139-40.
265. Andersson PO, Ridell B, Wadenvik H, Kutti J. Leukemic transformation of essential thrombocythemia without previous cytoreductive treatment. *Ann Hematol.* 2000 Jan;79(1):40-2.
266. De Sanctis V, Mazzucconi MG, Spadea A, Alfò M, Mancini M, Bizzoni L, Peraino M, Mandelli F. Long-term evaluation of 164 patients with essential thrombocythaemia treated with pipobroman: occurrence of leukaemic evolution. *Br J Haematol.* 2003 Nov;123(3):517-21.

267. Tefferi A, Ho TC, Ahmann GJ, Katzmann JA, Greipp PR. Plasma interleukin-6 and C-reactive protein levels in reactive versus clonal thrombocytosis. *Am J Med* 97:374, 1994.
268. Graber M, Subramani K, Corish D, Schwab A. Thrombocytosis elevates serum potassium. *Am J Kidney Dis*. 1988 Aug;12(2):116-20.
269. Schafer AI. Bleeding and thrombosis in the myeloproliferative disorders. *Blood*. 1984 Jul;64(1):1-12. Review.
270. Hehlmann R, Jahn M, Baumann B, Köpcke W. Essential thrombocythemia. Clinical characteristics and course of 61 cases. *Cancer*. 1988 Jun 15;61(12):2487-96.
271. Walsh PN, Murphy S, Barry WE. The role of platelets in the pathogenesis of thrombosis and hemorrhage in patients with thrombocytosis. *Thromb Haemost*. 1977 Dec 15;38(4):1085-96.
272. Pareti FI, Gugliotta L, Mannucci L, Guarini A, Mannucci PM. Biochemical and metabolic aspects of platelet dysfunction in chronic myeloproliferative disorders. *Thromb Haemost*. 1982 Apr 30;47(2):84-9.
273. Campbell PJ, Scott LM, Buck G, Wheatley K, East CL, Marsden JT, Duffy A, Boyd EM, Bench AJ, Scott MA, Vassiliou GS, Milligan DW, Smith SR, Erber WN, Bareford D, Wilkins BS, Reilly JT, Harrison CN, Green AR; United Kingdom Myeloproliferative Disorders Study Group; Medical Research Council Adult Leukaemia Working Party; Australasian Leukaemia and Lymphoma Group. Definition of subtypes of essential thrombocythaemia and relation to polycythaemia vera based on JAK2 V617F mutation status: a prospective study. *Lancet*. 2005 Dec 3;366(9501):1945-53.
274. Wilkins BS, Erber WN, Bareford D, Buck G, Wheatley K, East CL, Paul B, Harrison CN, Green AR, Campbell PJ. Bone marrow pathology in essential thrombocythemia: interobserver reliability and utility for identifying disease subtypes. *Blood*. 2008 Jan 1;111(1):60-70. Epub 2007 Sep 20.
275. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW. WHO classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. IARC Press, Lyon, 2008.
276. 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.

277. Bellucci S, Janvier M, Tobelem G, Flandrin G, Charpak Y, Berger R, Boiron M. Essential thrombocythemas. Clinical evolutionary and biological data. *Cancer*. 1986 Dec 1;58(11):2440-7.
278. Watson KV, Key N. Vascular complications of essential thrombocythaemia: a link to cardiovascular risk factors. *Br J Haematol*. 1993 Feb;83(2):198-203.
279. Tefferi A, Thiele J, Orazi A, Kvasnicka HM, Barbui T, Hanson CA, Barosi G, Verstovsek S, Birgegard G, Mesa R, Reilly JT, Gisslinger H, Vannucchi AM, Cervantes F, Finazzi G, Hoffman R, Gilliland DG, Bloomfield CD, Vardiman JW. Proposals and rationale for revision of the World Health Organization diagnostic criteria for polycythemia vera, essential thrombocythemia, and primary myelofibrosis: recommendations from an ad hoc international expert panel. *Blood*. 2007 Aug 15;110(4):1092-7. Epub 2007 May 8.
280. Girodon F, Bonicelli G, Schaeffer C, Mounier M, Carillo S, Lafon I, Carli PM, Janoray I, Ferrant E, Maynadié M. Significant increase in the apparent incidence of essential thrombocythemia related to new WHO diagnostic criteria: a population-based study. *Haematologica*. 2009 Jun;94(6):865-9. Epub 2009 Apr 18.
281. Lussana F, Caberlon S, Pagani C, Kamphuisen PW, Buller HR, Cattaneo M. Association of V617F Jak2 mutation with the risk of thrombosis among patients with essential thrombocythaemia or idiopathic myelofibrosis: a systematic review. *Thromb Res*. 2009; 124(4):409-17.
282. McCarthy L, Eichelberger L, Skipworth E, Danielson C. Erythromelalgia due to essential thrombocythemia. *Transfusion*. 2002 Oct;42(10):1245.
283. Cortelazzo S, Finazzi G, Ruggeri M, Vestri O, Galli M, Rodeghiero F, Barbui T. Hydroxyurea for patients with essential thrombocythemia and a high risk of thrombosis. *N Engl J Med*. 1995 Apr 27;332(17):1132-6.
284. 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 Mar;8(3):556-62.
285. Alvarez-Larrán A, Cervantes F, Bellosillo B, Giralt M, Juliá A, Hernández-Boluda JC, Bosch A, Hernández-Nieto L, Clapés V, Burgaleta C, Salvador C, Arellano-Rodrigo E, Colomer D, Besses C. Essential thrombocythemia in young individuals: frequency and risk factors for vascular events and evolution to myelofibrosis in 126 patients. *Leukemia*. 2007 Jun;21(6):1218-23. Epub 2007 Apr 12.

286. Tefferi A, Fonseca R, Pereira DL, Hoagland HC. A long-term retrospective study of young women with essential thrombocythemia. *Mayo Clin Proc* 76:22, 2001.
287. Ruggeri M, Finazzi G, Tosetto A, Riva S, Rodeghiero F, Barbui T. No treatment for low-risk thrombocythaemia: results from a prospective study. *Br J Haematol.* 1998 Dec;103(3):772-7.
288. Lanzkron S, Strouse JJ, Wilson R, Beach MC, Haywood C, Park H, Witkop C, Bass EB, Segal JB. Systematic review: Hydroxyurea for the treatment of adults with sickle cell disease. *Ann Intern Med.* 2008 Jun 17;148(12):939-55. Epub 2008 May 5.
289. Weinfeld A, Swolin B, Westin J. Acute leukaemia after hydroxyurea therapy in polycythaemia vera and allied disorders: prospective study of efficacy and leukaemogenicity with therapeutic implications. *Eur J Haematol.* 1994 Mar;52(3):134-9.
290. Sterkers Y, Preudhomme C, Lai JL, Demory JL, Caulier MT, Wattel E, Bordessoule D, Bauters F, Fenaux P. Acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes following essential thrombocythemia treated with hydroxyurea: high proportion of cases with 17p deletion. *Blood.* 1998 Jan 15;91(2):616-22.
291. Nielsen I, Hasselbalch HC. Acute leukemia and myelodysplasia in patients with a Philadelphia chromosome negative chronic myeloproliferative disorder treated with hydroxyurea alone or with hydroxyurea after busulphan. *Am J Hematol.* 2003 Sep;74(1):26-31.
292. Passamonti F, Rumi E, Arcaini L, Boveri E, Elena C, Pietra D, Boggi S, Astori C, Bernasconi P, Varettoni M, Brusamolino E, Pascutto C, Lazzarino M. Prognostic factors for thrombosis, myelofibrosis, and leukemia in essential thrombocythemia: a study of 605 patients. *Haematologica.* 2008 Nov;93(11):1645-51. Epub 2008 Sep 11.
293. Finazzi G, Ruggeri M, Rodeghiero F, Barbui T. Second malignancies in patients with essential thrombocythaemia treated with busulphan and hydroxyurea: long-term follow-up of a randomized clinical trial. *Br J Haematol.* 2000 Sep;110(3):577-83.
294. Hanft VN, Fruchtman SR, Pickens CV, Rosse WF, Howard TA, Ware RE. Acquired DNA mutations associated with in vivo hydroxyurea exposure. *Blood.* 2000 Jun 1;95(11):3589-93.
295. Solberg LA Jr, Tefferi A, Oles KJ, Tarach JS, Pettitt RM, Forstrom LA, Silverstein MN. The effects of anagrelide on human megakaryocytopoiesis. *Br J Haematol.* 1997 Oct;99(1):174-80.

296. Campbell PJ, Bareford D, Erber WN, Wilkins BS, Wright P, Buck G, Wheatley K, Harrison CN, Green AR. Reticulin accumulation in essential thrombocythemia: prognostic significance and relationship to therapy. *J Clin Oncol*. 2009 Jun 20;27(18):2991-9. Epub 2009 Apr 13.
297. Harrison CN, Campbell PJ, Buck G, Wheatley K, East CL, Bareford D, Wilkins BS, van der Walt JD, Reilly JT, Grigg AP, Revell P, Woodcock BE, Green AR; United Kingdom Medical Research Council Primary Thrombocythemia 1 Study. Hydroxyurea compared with anagrelide in high-risk essential thrombocythemia. *N Engl J Med*. 2005 Jul 7;353(1):33-45.
298. Campbell PJ, Green AR. Management of polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2005:201-8.
299. Gisslinger H, Gotic M, Holowiecki J, et al: Final results of the ANAHYDRET study: Non-inferiority of anagrelide compared to hydroxyurea in newly diagnosed WHO-essential thrombocythemia patients. *ASH Annu Meet Abstr* 112:661, 2008.
300. Kiladjian JJ, Chomienne C, Fenaux P. Interferon-alpha therapy in bcr-abl-negative myeloproliferative neoplasms. *Leukemia*. 2008 Nov;22(11):1990-8. Epub 2008 Oct 9.
301. Michallet M, Maloisel F, Delain M, Hellmann A, Rosas A, Silver RT, Tendler C; PEG-Intron CML Study Group. Pegylated recombinant interferon alpha-2b vs recombinant interferon alpha-2b for the initial treatment of chronic-phase chronic myelogenous leukemia: a phase III study. *Leukemia*. 2004 Feb;18(2):309-15.
302. Finazzi G, Caruso V, Marchioli R, Capnist G, Chisesi T, Finelli C, Gugliotta L, Landolfi R, Kutti J, Gisslinger H, Marilus R, Patrono C, Pogliani EM, Randi ML, Villegas A, Tognoni G, Barbui T; ECLAP Investigators. Acute leukemia in polycythemia vera: an analysis of 1638 patients enrolled in a prospective observational study. *Blood*. 2005 Apr 1;105(7):2664-70. Epub 2004 Dec 7.
303. Nielsen I, Hasselbalch HC: Acute leukemia and myelodysplasia in patients with a Philadelphia chromosome negative chronic myeloproliferative disorder treated with hydroxyurea alone or with hydroxyurea after busulphan. *Am J Hematol* 74:26, 2003.
304. Passamonti F, Rumi E, Malabarba L, Arcaini L, Orlandi E, Brusamolino E, Pascutto C, Cazzola M, Lazzarino M. Long-term follow-up of young patients with essential thrombocythemia treated with pipobroman. *Ann Hematol*. 2004 Aug;83(8):495-7. Epub 2004 Jun 3.
305. Kiladjian JJ, Rain JD, Bernard JF, Briere J, Chomienne C, Fenaux P. Long-term incidence of hematological evolution in three French prospective studies of

- hydroxyurea and pipobroman in polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Semin Thromb Hemost*. 2006 Jun;32(4 Pt 2):417-21.
306. Landolfi R, Gennaro L. Prevention of thrombosis in polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Haematologica*. 2008;93(3):331-5.
307. Finazzi G, Ruggeri M, Rodeghiero F, Barbui T. Efficacy and safety of long-term use of hydroxyurea in young patients with essential thrombocythemia and a high risk of thrombosis. *Blood*. 2003;101(9):3749.
308. Beer P, Erber W, Campbell P, Green A. How I treat essential thrombocythemia. *Blood*. 2011;117(5):1472-82.
309. Kerbaux DM, Gooley TA, Sale GE, Flowers ME, Doney KC, Georges GE, Greene JE, Linenberger M, Petersdorf E, Sandmaier BM, Scott BL, Sorrow M, Stirewalt DL, Stewart FM, Witherspoon RP, Storb R, Appelbaum FR, Deeg HJ. Hematopoietic cell transplantation as curative therapy for idiopathic myelofibrosis, advanced polycythemia vera, and essential thrombocythemia. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2007 Mar;13(3):355-65.
310. Spivak J. Narrative review: Thrombocytosis, polycythemia vera, and JAK2 mutations: The phenotypic mimicry of chronic myeloproliferation. *Ann Intern Med*. 2010;152(5):300-6.
311. Radaelli F, Colombi M, Calori R, Zilioli VR, Bramanti S, Iurlo A, Zanella A. Analysis of risk factors predicting thrombotic and/or haemorrhagic complications in 306 patients with essential thrombocythemia. *Hematol Oncol*. 2007 Sep;25(3):115-20.
312. Carobbio A, Finazzi G, Antonioli E, Guglielmelli P, Vannucchi AM, Delaini F, Guerini V, Ruggeri M, Rodeghiero F, Rambaldi A, Barbui T. Thrombocytosis and leukocytosis interaction in vascular complications of essential thrombocythemia. *Blood*. 2008 Oct 15;112(8):3135-7. Epub 2008 Jun 27.
313. Finazzi G, Rambaldi A, Guerini V, Carobbo A, Barbui T. Risk of thrombosis in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera according to JAK2 V617F mutation status. *Haematologica*. 2007 Jan;92(1):135-6.
314. Carobbio A, Antonioli E, Guglielmelli P, Vannucchi AM, Delaini F, Guerini V, Finazzi G, Rambaldi A, Barbui T. Leukocytosis and risk stratification assessment in essential thrombocythemia. *J Clin Oncol*. 2008 Jun 1;26(16):2732-6. Epub 2008 Apr 28.
315. Cervantes F, Alvarez-Larrán A, Talam C, Gómez M, Montserrat E. Myelofibrosis with myeloid metaplasia following essential thrombocythaemia: actuarial probability,

- presenting characteristics and evolution in a series of 195 patients. *Br J Haematol*. 2002 Sep;118(3):786-90.
316. Finazzi G, Barbui T. Risk-adapted therapy in essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Blood Rev*. 2005 Sep;19(5):243-52.
317. Tefferi A. Myelofibrosis with myeloid metaplasia. *N Engl J Med*. 2000 Apr 27;342(17):1255-65.
318. Mesa RA, Verstovsek S, Cervantes F, Barosi G, Reilly JT, Dupriez B, Levine R, Le Bousse-Kerdiles MC, Wadleigh M, Campbell PJ, Silver RT, Vannucchi AM, Deeg HJ, Gisslinger H, Thomas D, Odenike O, Solberg LA, Gotlib J, Hexner E, Nimer SD, Kantarjian H, Orazi A, Vardiman JW, Thiele J, Tefferi A; International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment (IWG-MRT). 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 Jun;31(6):737-40. Epub 2007 Jan 8.
319. Dougan LE, Matthews ML, Armstrong BK. The effect of diagnostic review on the estimated incidence of lymphatic and hematopoietic neoplasms in Western Australia. 1981 Aug 1;48(3):866-72.
320. Chaiter Y, Brenner B, Aghai E, Tatarsky I. High incidence of myeloproliferative disorders in Ashkenazi Jews in northern Israel. *Leuk Lymphoma*. 1992 Jun;7(3):251-5.
321. Barosi G. Myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2003 Oct;17(5):1211-26.
322. Okamura T, Kinukawa N, Niho Y, Mizoguchi H. Primary chronic myelofibrosis: clinical and prognostic evaluation in 336 Japanese patients. *Int J Hematol*. 2001 Feb;73(2):194-8.
323. Cervantes F, Pereira A, Esteve J, Cobo F, Rozman C, Montserrat E. Idiopathic myelofibrosis: initial features, evolutive patterns and survival in a series of 106 patients. *Med Clin (Barc)*. 1997 Nov 15;109(17):651-5.
324. Ozen S, Ferhanoglu B, Senocak M, Tüzüner N. Idiopathic myelofibrosis (agnogenic myeloid metaplasia): clinicopathological analysis of 32 patients. *Leuk Res*. 1997 Feb;21(2):125-31.
325. Anderson RE, Hoshino T, Yamamoto T. Myelofibrosis with myeloid metaplasia in survivors of the atomic bomb in Hiroshima. *Ann Intern Med*. 1964 Jan;60:1-18.
326. Hu H. Benzene-associated myelofibrosis. *Ann Intern Med*. 1987 Jan;106(1):171-2.

327. Kahn A, Bernard JF, Cottreau D, Marie J, Boivin P. Gd(--) Abrami: a deficient G-6PD variant with hemizygous expression in blood cells of a woman with primary myelofibrosis. *Humangenetik*. 1975 Oct 20;30(1):41-6.
328. Kreipe H, Jaquet K, Felgner J, Radzun HJ, Parwaresch MR. Clonal granulocytes and bone marrow cells in the cellular phase of agnogenic myeloid metaplasia. *Blood*. 1991 Oct 1;78(7):1814-7.
329. Tsukamoto N, Morita K, Maehara T, Okamoto K, Sakai H, Karasawa M, Naruse T, Omine M. Clonality in chronic myeloproliferative disorders defined by X-chromosome linked probes: demonstration of heterogeneity in lineage involvement. *Br J Haematol*. 1994 Feb;86(2):253-8.
330. Wang JC, Lang HD, Lichter S, Weinstein M, Benn P. Cytogenetic studies of bone marrow fibroblasts cultured from patients with myelofibrosis and myeloid metaplasia. *Br J Haematol*. 1992 Feb;80(2):184-8.
331. Reeder TL, Bailey RJ, Dewald GW, Tefferi A. Both B and T lymphocytes may be clonally involved in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Blood*. 2003 Mar 1;101(5):1981-3. Epub 2002 Oct 24.
332. Buschle M, Janssen JW, Drexler H, Lyons J, Anger B, Bartram CR. Evidence for pluripotent stem cell origin of idiopathic myelofibrosis: clonal analysis of a case characterized by a N-ras gene mutation. *Leukemia*. 1988 Oct;2(10):658-60.
333. Carlo-Stella C, Cazzola M, Gasner A, Barosi G, Dezza L, Meloni F, Pedrazzoli P, Hoelzer D, Ascari E. Effects of recombinant alpha and gamma interferons on the in vitro growth of circulating hematopoietic progenitor cells (CFU-GEMM, CFU-Mk, BFU-E, and CFU-GM) from patients with myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Blood*. 1987 Oct;70(4):1014-9.
334. Han ZC, Briere J, Nedellec G, Abgrall JF, Sensebe L, Parent D, Guern G. Characteristics of circulating megakaryocyte progenitors (CFU-MK) in patients with primary myelofibrosis. *Eur J Haematol*. 1988 Feb;40(2):130-5.
335. Hibbin JA, Njoku OS, Matutes E, Lewis SM, Goldman JM. Myeloid progenitor cells in the circulation of patients with myelofibrosis and other myeloproliferative disorders. *Br J Haematol*. 1984 Jul;57(3):495-503.
336. Wolf BC, Neiman RS. Hypothesis: splenic filtration and the pathogenesis of extramedullary hematopoiesis in agnogenic myeloid metaplasia. *Hematol Pathol*. 1987;1(1):77-80. Review.



337. Craig JJ, Anthony RS, Parker AC. Circulating progenitor cells in myelofibrosis: the effect of recombinant alpha 2b interferon in vivo and in vitro. *Br J Haematol.* 1991 Jun;78(2):155-60.
338. Andréasson B, Swolin B, Kutti J. Patients with idiopathic myelofibrosis show increased CD34+ cell concentrations in peripheral blood compared to patients with polycythaemia vera and essential thrombocythaemia. *Eur J Haematol.* 2002 Apr;68(4):189-93.
339. Arora B, Sirhan S, Hoyer JD, Mesa RA, Tefferi A. Peripheral blood CD34 count in myelofibrosis with myeloid metaplasia: a prospective evaluation of prognostic value in 94 patients. *Br J Haematol.* 2005 Jan;128(1):42-8.
340. Barosi G, Viarengo G, Pecci A, Rosti V, Piaggio G, Marchetti M, Frassoni F. Diagnostic and clinical relevance of the number of circulating CD34(+) cells in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Blood.* 2001 Dec 1;98(12):3249-55.
341. Nakahata J, Takahashi M, Fuse I, Nakamori Y, Nomoto N, Saitoh H, Tatewaki W, Imanari A, Takeshige T, Koike T, et al. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria with myelofibrosis: progression to acute myeloblastic leukemia. *Leuk Lymphoma.* 1993 Dec;12(1-2):137-42.
342. Shaheen SP 2nd, Talwalkar SS, Simons R, Yam L. Acute lymphoblastic leukemic transformation in a patient with chronic idiopathic myelofibrosis and paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: a case report and review of the literature. *Arch Pathol Lab Med.* 2005 Jan;129(1):96-9.
343. Perianin A, Labro-Bryskier MT, Marquetty C, Hakim J. Glutathione reductase and nitroblue tetrazolium reduction deficiencies in neutrophils of patients with primary idiopathic myelofibrosis. *Clin Exp Immunol.* 1984 Jul;57(1):244-8.
344. Cunietti E, Gandini R, Mascaro G, Ferrari M, Pappalepore V, Scapellato L. Defective platelet aggregation and increased platelet turnover in patients with myelofibrosis and other myeloproliferative diseases. *Scand J Haematol.* 1981 Apr;26(4):339-44.
345. Demory JL, Dupriez B, Fenaux P, Lai JL, Beuscart R, Jouet JP, Deminatti M, Bauters F. Cytogenetic studies and their prognostic significance in agnogenic myeloid metaplasia: a report on 47 cases. *Blood.* 1988 Sep;72(3):855-9.
346. Reilly JT, Snowden JA, Spearing RL, Fitzgerald PM, Jones N, Watmore A, Potter A. Cytogenetic abnormalities and their prognostic significance in idiopathic myelofibrosis: a study of 106 cases. *Br J Haematol.* 1997 Jul;98(1):96-102.

347. Tefferi A, Mesa RA, Schroeder G, Hanson CA, Li CY, Dewald GW. Cytogenetic findings and their clinical relevance in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Br J Haematol.* 2001 Jun;113(3):763-71.
348. Bench AJ, Nacheva EP, Champion KM, Green AR. Molecular genetics and cytogenetics of myeloproliferative disorders. *Baillieres Clin Haematol.* 1998 Dec;11(4):819-48. Review.
349. Dingli D, Grand FH, Mahaffey V, Spurbeck J, Ross FM, Watmore AE, Reilly JT, Cross NC, Dewald GW, Tefferi A. Der(6)t(1;6)(q21-23;p21.3): a specific cytogenetic abnormality in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Br J Haematol.* 2005 Jul;130(2):229-32.
350. Reilly JT, Wilson G, Barnett D, Watmore A, Potter A. Karyotypic and ras gene mutational analysis in idiopathic myelofibrosis. *Br J Haematol.* 1994 Nov;88(3):575-81.
351. Mesa RA, Li CY, Ketterling RP, Schroeder GS, Knudson RA, Tefferi A. Leukemic transformation in myelofibrosis with myeloid metaplasia: a single-institution experience with 91 cases. *Blood.* 2005 Feb 1;105(3):973-7. Epub 2004 Sep 23.
352. Zojer N, Meran JG, Vesely M, Grüner H, Ackermann J, Dellinger C, Zimmer-Roth I, Heinz R, Drach J, Ludwig H. Trisomy 13 is associated with poor prognosis in idiopathic myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Leuk Lymphoma.* 1999 Oct;35(3-4):415-21.
353. Rege-Cambrin G, Speleman F, Kerim S, Scaravaglio P, Carozzi F, Dal Cin P, Michaux JL, Offner F, Saglio G, Van den Berghe H. Extra translocation +der(1q9p) is a prognostic indicator in myeloproliferative disorders. *Leukemia.* 1991 Dec;5(12):1059-63.
354. Cox MC, Panetta P, Venditti A, Abruzzese E, Del Poeta G, Cantonetti M, Amadori S. New reciprocal translocation t(6;10) (q27;q11) associated with idiopathic myelofibrosis and eosinophilia. *Leuk Res.* 2001 Apr;25(4):349-51.
355. Strasser-Weippl K, Steurer M, Kees M, Augustin F, Tzankov A, Dirnhofer S, Fiegl M, Gisslinger H, Zojer N, Ludwig H. Chromosome 7 deletions are associated with unfavorable prognosis in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Blood.* 2005 May 15;105(10):4146.
356. Caramazza D, Begna KH, Gangat N, Vaidya R, Siragusa S, Van Dyke DL, Hanson C, Pardanani A, Tefferi A. Refined cytogenetic-risk categorization for overall and leukemia-free survival in primary myelofibrosis: a single center study of 433 patients. *Leukemia.* 2011 Jan;25(1):82-8. Epub 2010 Oct 14.

357. Komura E, Chagraoui H, Mansat de Mas V, Blanchet B, de Sepulveda P, Larbret F, Larghero J, Tulliez M, Debili N, Vainchenker W, Giraudier S. Spontaneous STAT5 activation induces growth factor independence in idiopathic myelofibrosis: possible relationship with FKBP51 overexpression. *Exp Hematol*. 2003 Jul;31(7):622-30.
358. Abu-Duhier FM, Goodeve AC, Care RS, Gari M, Wilson GA, Peake IR, Reilly JT. Mutational analysis of class III receptor tyrosine kinases (C-KIT, C-FMS, FLT3) in idiopathic myelofibrosis. *Br J Haematol*. 2003 Feb;120(3):464-70.
359. Giraudier S, Chagraoui H, Komura E, Barnache S, Blanchet B, LeCouedic JP, Smith DF, Larbret F, Taksin AL, Moreau-Gachelin F, Casadevall N, Tulliez M, Hulin A, Debili N, Vainchenker W. Overexpression of FKBP51 in idiopathic myelofibrosis regulates the growth factor independence of megakaryocyte progenitors. *Blood*. 2002 Oct 15;100(8):2932-40.
360. Komura E, Tonetti C, Penard-Lacronique V, Chagraoui H, Lacout C, Lecouedic JP, Rameau P, Debili N, Vainchenker W, Giraudier S. Role for the nuclear factor kappaB pathway in transforming growth factor-beta1 production in idiopathic myelofibrosis: possible relationship with FK506 binding protein 51 overexpression. *Cancer Res*. 2005 Apr 15;65(8):3281-9.
361. Gaidano G, Guerrasio A, Serra A, Carozzi F, Cambrin GR, Petroni D, Saglio G. Mutations in the P53 and RAS family genes are associated with tumor progression of BCR/ABL negative chronic myeloproliferative disorders. *Leukemia*. 1993 Jul;7(7):946-53.
362. Wang JC, Chen C. P16 gene deletions and point mutations in patients with agnogenic myeloid metaplasia (AMM). *Leuk Res*. 1999 Jul;23(7):631-5.
363. Tsurumi S, Nakamura Y, Maki K, Omine M, Fujita K, Okamura T, Niho Y, Hashimoto S, Kanno K, Suzuki K, Hangaishi A, Ogawa S, Hirai H, Mitani K. N-ras and p53 gene mutations in Japanese patients with myeloproliferative disorders. *Am J Hematol*. 2002 Oct;71(2):131-3.
364. Kimura A, Nakata Y, Katoh O, Hyodo H. c-kit Point mutation in patients with myeloproliferative disorders. *Leuk Lymphoma*. 1997 Apr;25(3-4):281-7. Review.
365. Jones LC, Tefferi A, Vuong PT, Desmond JC, Hofmann WK, Koeffler HP. Detection of aberrant gene expression in CD34+ hematopoietic stem cells from patients with agnogenic myeloid metaplasia using oligonucleotide microarrays. *Stem Cells*. 2005 May;23(5):631-7.

366. Apaja-Sarkkinen M, Autio-Harminen H, Alavaikko M, Risteli J, Risteli L. Immunohistochemical study of basement membrane proteins and type III procollagen in myelofibrosis. *Br J Haematol.* 1986 Jul;63(3):571-80.
367. Gay S, Gay RE, Prchal JT. Immunohistological studies of bone marrow collagen. *Prog Clin Biol Res.* 1984;154:291-306. Review.
368. Reilly JT, Brindley L, Kay M, Fielding S, Kennedy A, Dolan G, Smith A. Bone marrow and serum connective tissue polypeptides in idiopathic myelofibrosis. *Clin Lab Haematol.* 1995 Mar;17(1):35-9.
369. Reilly JT, Nash JR, Mackie MJ, McVerry BA. Immuno-enzymatic detection of fibronectin in normal and pathological haematopoietic tissue. *Br J Haematol.* 1985 Mar;59(3):497-504.
370. Reilly JT, Nash JR, Mackie MJ, McVerry BA. Endothelial cell proliferation in myelofibrosis. *Br J Haematol.* 1985 Aug;60(4):625-30.
371. Reilly JT, Nash JR. Vitronectin (serum spreading factor): its localisation in normal and fibrotic tissue. *J Clin Pathol.* 1988 Dec;41(12):1269-72.
372. Mesa RA, Hanson CA, Rajkumar SV, Schroeder G, Tefferi A. Evaluation and clinical correlations of bone marrow angiogenesis in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Blood.* 2000 Nov 15;96(10):3374-80.
373. Castro-Malaspina H, Rabellino EM, Yen A, Nachman RL, Moore MA. Human megakaryocyte stimulation of proliferation of bone marrow fibroblasts. *Blood.* 1981 Apr;57(4):781-7.
374. Overall CM, Wrana JL, Sodek J. Independent regulation of collagenase, 72-kDa progelatinase, and metalloendoproteinase inhibitor expression in human fibroblasts by transforming growth factor-beta. *J Biol Chem.* 1989 Jan 25;264(3):1860-9.
375. Brogi E, Wu T, Namiki A, Isner JM. Indirect angiogenic cytokines upregulate VEGF and bFGF gene expression in vascular smooth muscle cells, whereas hypoxia upregulates VEGF expression only. *Circulation.* 1994 Aug;90(2):649-52.
376. Wang JC, Novetsky A, Chen C, Novetsky AD. Plasma matrix metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinase in patients with agnogenic myeloid metaplasia or idiopathic primary myelofibrosis. *Br J Haematol.* 2002 Dec;119(3):709-12.
377. Jacobson RJ, Salo A, Fialkow PJ. Agnogenic myeloid metaplasia: a clonal proliferation of hematopoietic stem cells with secondary myelofibrosis. *Blood.* 1978 Feb;51(2):189-94.

378. Schmitt A, Drouin A, Massé JM, Guichard J, Shagraoui H, Cramer EM. Polymorphonuclear neutrophil and megakaryocyte mutual involvement in myelofibrosis pathogenesis. *Leuk Lymphoma*. 2002 Apr;43(4):719-24.
379. Ahmed A, Chang CC. Chronic idiopathic myelofibrosis: clinicopathologic features, pathogenesis and prognosis. *Arch Pathol Lab Med*. 2006;130(8):1133-43.
380. Kvasnicka HM, Thiele J. Bone marrow angiogenesis: methods of quantification and changes evolving in chronic myeloproliferative disorders. *Histol Histopathol*. 2004 Oct;19(4):1245-60. Review.
381. Thiele J, Kvasnicka HM. CD34+ stem cells in chronic myeloproliferative disorders. *Histol Histopathol*. 2002 Apr;17(2):507-21. Review.
382. Kvasnicka HM, Thiele J, Regn C, Zankovich R, Diehl V, Fischer R. Prognostic impact of apoptosis and proliferation in idiopathic (primary) myelofibrosis. *Ann Hematol*. 1999 Feb;78(2):65-72.
383. Thiele J, Kvasnicka HM. Prefibrotic chronic idiopathic myelofibrosis--a diagnostic enigma? *Acta Haematol*. 2004;111(3):155-9.
384. Thiele J, Kvasnicka HM, Zankovich R, Diehl V. Clinical and morphological criteria for the diagnosis of prefibrotic idiopathic (primary) myelofibrosis. *Ann Hematol*. 2001 Mar;80(3):160-5.
385. Buhr T, Büsche G, Choritz H, Länger F, Kreipe H. Evolution of myelofibrosis in chronic idiopathic myelofibrosis as evidenced in sequential bone marrow biopsy specimens. *Am J Clin Pathol*. 2003 Jan;119(1):152-8.
386. Thiele J, Kvasnicka HM, Schmitt-Graeff A, Diehl V. Dynamics of fibrosis in chronic idiopathic (primary) myelofibrosis during therapy: a follow-up study on 309 patients. *Leuk Lymphoma*. 2003 Jun;44(6):949-53.
387. Tsao MS. Hepatic sinusoidal fibrosis in agnogenic myeloid metaplasia. *Am J Clin Pathol*. 1989 Mar;91(3):302-5.
388. Wanless IR, Peterson P, Das A, Boitnott JK, Moore GW, Bernier V. Hepatic vascular disease and portal hypertension in polycythemia vera and agnogenic myeloid metaplasia: a clinicopathological study of 145 patients examined at autopsy. *Hepatology*. 1990 Nov;12(5):1166-74.
389. 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 Aug;102(3):684-90.

390. Horwood E, Dowson H, Gupta R, Kaczmarek R, Williamson M. Myelofibrosis presenting as spinal cord compression. *J Clin Pathol*. 2003 Feb;56(2):154-6.
391. Price F, Bell H. Spinal cord compression due to extramedullary hematopoiesis. Successful treatment in a patient with long-standing myelofibrosis. *JAMA*. 1985 May 17;253(19):2876-7.
392. Cornfield DB, Shipkin P, Alavi A, Becker J, Peyster R. Intracranial myeloid metaplasia: diagnosis by CT and Fe52 scans and treatment by cranial irradiation. *Am J Hematol*. 1983 Nov;15(3):273-8.
393. Badon SJ, Ansell J, Smith TW, Coslovsky R, Gill L, Woda BA. Diabetes insipidus caused by extramedullary hematopoiesis. *Am J Clin Pathol*. 1985 Apr;83(4):509-12.
394. Ayyildiz O, Isikdogan A, Celik M, Muftuoglu E. Intracranial meningeal extramedullary hematopoiesis inducing serious headache in a patient with idiopathic myelofibrosis. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2004 Jan;26(1):28-9.
395. Landolfi R, Colosimo C Jr, De Candia E, Castellana MA, De Cristofaro R, Trodella L, Leone G. Meningeal hematopoiesis causing exophthalmus and hemiparesis in myelofibrosis: effect of radiotherapy. A case report. *Cancer*. 1988 Dec 1;62(11):2346-9.
396. Cameron WR, Ronnert M, Brun A. Extramedullary hematopoiesis of CNS in postpolycythemic myeloid metaplasia. *N Engl J Med*. 1981 Sep 24;305(13):765.
397. Ligumski M, Polliack A, Benbassat J. Myeloid metaplasia of the central nervous system in patients with myelofibrosis and agnogenic myeloid metaplasia. Report of 3 cases and review of the literature. *Am J Med Sci*. 1978 Jan-Feb;275(1):99-103.
398. Lundh B, Brandt L, Cronqvist S, Eyrich R. Intracranial myeloid metaplasia in myelofibrosis. *Scand J Haematol*. 1982 Jan;28(1):91-4.
399. Williams ME, Innes DJ, Hutchison WT, Hess CE. Extramedullary hematopoiesis. A cause of severe generalized lymphadenopathy in agnogenic myeloid metaplasia. *Arch Intern Med*. 1985 Jul;145(7):1308-9.
400. Kupferschmid JP, Shahian DM, Villanueva AG. Massive hemothorax associated with intrathoracic extramedullary hematopoiesis involving the pleura. *Chest*. 1993 Mar;103(3):974-5.
401. Jowitt SN, Burke DK, Leggat HM, Lewis PS, Cryer RJ. Pleural effusion secondary to extramedullary haemopoiesis in a patient with idiopathic myelofibrosis responding to pleurodesis and hydroxyurea. *Clin Lab Haematol*. 1997 Dec;19(4):283-5.
402. Yotsumoto M, Ishida F, Ito T, Ueno M, Kitano K, Kiyosawa K. Idiopathic myelofibrosis with refractory massive ascites. *Intern Med*. 2003 Jun;42(6):525-8.

403. MacKinnon S, McNicol AM, Lee FD, McDonald GA. Myelofibrosis complicated by intestinal extramedullary haemopoiesis and acute small bowel obstruction. *J Clin Pathol.* 1986 Jun;39(6):677-9.
404. Sharma BK, Pounder RE, Cruse JP, Knowles SM, Lewis AA. Extramedullary haemopoiesis in the small bowel. *Gut.* 1986 Jul;27(7):873-5.
405. Humphrey PA, Vollmer RT. Extramedullary hematopoiesis in the prostate. *Am J Surg Pathol.* 1991 May;15(5):486-90.
406. Schnuelle P, Waldherr R, Lehmann KJ, Woenckhaus J, Back W, Niemir Z, van der Woude FJ. Idiopathic myelofibrosis with extramedullary hematopoiesis in the kidneys. *Clin Nephrol.* 1999 Oct;52(4):256-62.
407. Thorns C, Rohrmoser B, Feller A, Horny HC. Chronic cholecystitis and myeloid metaplasia. *Histopathology.* 2002 Sep;41(3):273-5.
408. Heinicke MH, Zarrabi MH, Gorevic PD. Arthritis due to synovial involvement by extramedullary haematopoiesis in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Ann Rheum Dis.* 1983 Apr;42(2):196-200.
409. Loewy G, Mathew A, Distenfeld A. Skin manifestation of agnogenic myeloid metaplasia. *Am J Hematol.* 1994 Feb;45(2):167-70.
410. Gibson LE, Dicken CH, Flach DB. Neutrophilic dermatoses and myeloproliferative disease: report of two cases. *Mayo Clin Proc.* 1985 Nov;60(11):735-40.
411. Silverstein MN, Brown AL Jr, Linman JW. Idiopathic myeloid metaplasia. Its evolution into acute leukemia. *Arch Intern Med.* 1973 Nov;132(5):709-12.
412. Garcia S, Miguel A, Miguel A, Linares M, Navarro M, Colomina P. Idiopathic myelofibrosis terminating in erythroleukemia. *Am J Hematol.* 1989 Sep;32(1):70-1.
413. Polliack A, Prokocimer M, Matzner Y. Lymphoblastic leukemic transformation (lymphoblastic crisis) in myelofibrosis and myeloid metaplasia. *Am J Hematol.* 1980;9(2):211-20.
414. Sugimoto N, Ishikawa T, Gotoh S, Shinzato I, Matsushita A, Nagai K, Ohgoh N, Takahashi T. Primary myelofibrosis terminated in basophilic leukemia and successful allogeneic bone marrow transplantation. *Int J Hematol.* 2004 Aug;80(2):183-5.
415. Reilly JT, Barnett D, Dolan G, Forrest P, Eastham J, Smith A. Characterization of an acute micromegakaryocytic leukaemia: evidence for the pathogenesis of myelofibrosis. *Br J Haematol.* 1993 Jan;83(1):58-62.

416. Hernández JM, San Miguel JF, González M, Orfao A, Cañizo MC, Bascones C, Hernández J, López Borrascas A. Development of acute leukaemia after idiopathic myelofibrosis. *J Clin Pathol*. 1992 May;45(5):427-30.
417. Bird GW, Wingham J, Richardson SG. Myelofibrosis, autoimmune haemolytic anaemia and Tn-polyagglutinability. *Haematologia (Budap)*. 1985;18(2):99-103.
418. Rondeau E, Solal-Celigny P, Dhermy D, Vroclans M, Brousse N, Bernard JF, Boivin P. Immune disorders in agnogenic myeloid metaplasia: relations to myelofibrosis. *Br J Haematol*. 1983 Mar;53(3):467-75.
419. Gordon BR, Coleman M, Kohen P, Day NK. Immunologic abnormalities in myelofibrosis with activation of the complement system. *Blood*. 1981 Nov;58(5):904-10.
420. Cappio FC, Vigliani R, Novarino A, Camussi G, Campana D, Gavosto F. Idiopathic myelofibrosis: a possible role for immune-complexes in the pathogenesis of bone marrow fibrosis. *Br J Haematol*. 1981 Sep;49(1):17-21.
421. Lewis CM, Pegrum GD. Immune complexes in myelofibrosis: a possible guide to management. *Br J Haematol*. 1978 Jun;39(2):233-9.
422. Jack FR, Smith SR, Saunders PW. Idiopathic myelofibrosis: anaemia may respond to low-dose dexamethasone. *Br J Haematol*. 1994 Aug;87(4):877-8.
423. Mesa RA, Steensma DP, Pardanani A, Li CY, Elliott M, Kaufmann SH, Wiseman G, Gray LA, Schroeder G, Reeder T, Zeldis JB, Tefferi A. A phase 2 trial of combination low-dose thalidomide and prednisone for the treatment of myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Blood*. 2003 Apr 1;101(7):2534-41. Epub 2002 Nov 27.
424. Pietrasanta D, Clavio M, Vallebella E, Beltrami G, Cavaliere M, Gobbi M. Long-lasting effect of cyclosporin-A on anemia associated with idiopathic myelofibrosis. *Haematologica*. 1997 Jul-Aug;82(4):458-9.
425. Kaelin WG Jr, Spivak JL. Systemic lupus erythematosus and myelofibrosis. *Am J Med*. 1986 Nov;81(5):935-8.
426. Connelly TJ, Abruzzo JL, Schwab RH. Agnogenic myeloid metaplasia with polyarteritis. *J Rheumatol*. 1982 Nov-Dec;9(6):954-6.
427. Silverstein MN, Elveback LR. Letter: Leukocyte alkaline phosphatase in agnogenic myeloid metaplasia. *Am J Clin Pathol*. 1974 Feb;61(2):307.
428. Thiele J, Kvasnicka HM, Werden C, Zankovich R, Diehl V, Fischer R. Idiopathic primary osteo-myelofibrosis: a clinico-pathological study on 208 patients with special emphasis on evolution of disease features, differentiation from essential



- thrombocytopenia and variables of prognostic impact. *Leuk Lymphoma*. 1996 Jul;22(3-4):303-17.
429. Ballen KK, Shrestha S, Sobocinski KA, Zhang MJ, Bashey A, Bolwell BJ, Cervantes F, Devine SM, Gale RP, Gupta V, Hahn TE, Hogan WJ, Kröger N, Litzow MR, Marks DI, Maziarz RT, McCarthy PL, Schiller G, Schouten HC, Roy V, Wiernik PH, Horowitz MM, Giralt SA, Arora M. Outcome of transplantation for myelofibrosis. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2010 Mar;16(3):358-67.
430. Cervantes F, Dupriez B, Pereira A, et al. New prognostic scoring system for primary myelofibrosis based on a study of the International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment. *Blood* 2009;113:2895–2901.
431. Passamonti F, Cervantes F, Vannucchi AM, Morra E, Rumi E, Pereira A, Guglielmelli P, Pungolino E, Caramella M, Maffioli M, Pascutto C, Lazzarino M, Cazzola M, Tefferi A. A dynamic prognostic model to predict survival in primary myelofibrosis: a study by the IWG-MRT (International Working Group for Myeloproliferative Neoplasms Research and Treatment). *Blood*. 2010 Mar 4;115(9):1703-8. Epub 2009 Dec 14.
432. Hussein K, Pardanani AD, Van Dyke DL, Hanson CA, Tefferi A. International Prognostic Scoring System-independent cytogenetic risk categorization in primary myelofibrosis. *Blood*. 2010 Jan 21;115(3):496-9. Epub 2009 Nov 9.
433. Tefferi A, Siragusa S, Hussein K, Schwager SM, Hanson CA, Pardanani A, Cervantes F, Passamonti F. Transfusion-dependency at presentation and its acquisition in the first year of diagnosis are both equally detrimental for survival in primary myelofibrosis--prognostic relevance is independent of IPSS or karyotype. *Am J Hematol*. 2010 Jan;85(1):14-7.
434. Elena C, Passamonti F, Rumi E, Malcovati L, Arcaini L, Boveri E, Merli M, Pietra D, Pascutto C, Lazzarino M. Red blood cell transfusion-dependency implies a poor survival in primary myelofibrosis irrespective of IPSS and DIPSS. *Haematologica*. 2011 Jan;96(1):167-70. Epub 2010 Sep 30.
435. Patnaik MM, Caramazza D, Gangat N, Hanson CA, Pardanani A, Tefferi A. Age and platelet count are IPSS-independent prognostic factors in young patients with primary myelofibrosis and complement IPSS in predicting very long or very short survival. *Eur J Haematol*. 2010 Feb 1;84(2):105-8. Epub 2009 Nov 6.
436. Gangat N, Caramazza D, Vaidya R, George G, Begna K, Schwager S, Van Dyke D, Hanson C, Wu W, Pardanani A, Cervantes F, Passamonti F, Tefferi A. DIPSS plus: a refined Dynamic International Prognostic Scoring System for primary myelofibrosis

- that incorporates prognostic information from karyotype, platelet count, and transfusion status. *J Clin Oncol*. 2011 Feb 1;29(4):392-7. Epub 2010 Dec 13.
437. Cervantes F, Mesa R, Barosi G. New and old treatment modalities in primary myelofibrosis. *Cancer J*. 2007 Nov-Dec;13(6):377-83.
  438. Elliott MA, Mesa RA, Li CY, Hook CC, Ansell SM, Levitt RM, Geyer SM, Tefferi A. Thalidomide treatment in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Br J Haematol*. 2002 May;117(2):288-96.
  439. Thomas DA, Giles FJ, Albitar M, Cortes JE, Verstovsek S, Faderl S, O'Brien SM, Garcia-Manero G, Keating MJ, Pierce S, Zeldis J, Kantarjian HM. Thalidomide therapy for myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Cancer*. 2006 May 1;106(9):1974-84.
  440. Tefferi A, Cortes J, Verstovsek S, Mesa RA, Thomas D, Lasho TL, Hogan WJ, Litzow MR, Allred JB, Jones D, Byrne C, Zeldis JB, Ketterling RP, McClure RF, Giles F, Kantarjian HM. Lenalidomide therapy in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Blood*. 2006 Aug 15;108(4):1158-64. Epub 2006 Apr 11.
  441. Quintás-Cardama A, Kantarjian HM, Manshouri T, Thomas D, Cortes J, Ravandi F, Garcia-Manero G, Ferrajoli A, Bueso-Ramos C, Verstovsek S. Lenalidomide plus prednisone results in durable clinical, histopathologic, and molecular responses in patients with myelofibrosis. *J Clin Oncol*. 2009 Oct 1;27(28):4760-6. Epub 2009 Aug 31.
  442. Tefferi A, Lasho TL, Mesa RA, Pardanani A, Ketterling RP, Hanson CA. Lenalidomide therapy in del(5)(q31)-associated myelofibrosis: cytogenetic and JAK2V617F molecular remissions. *Leukemia*. 2007 Aug;21(8):1827-8. Epub 2007 Apr 26.
  443. Martínez-Trillos A, Gaya A, Maffioli M, Arellano-Rodrigo E, Calvo X, Díaz-Beyá M, Cervantes F. Efficacy and tolerability of hydroxyurea in the treatment of the hyperproliferative manifestations of myelofibrosis: results in 40 patients. *Ann Hematol*. 2010 Dec;89(12):1233-7. Epub 2010 Jun 22.
  444. Tefferi A, Elliot MA, Yoon SY, Li CY, Mesa RA, Call TG, Dispenzieri A. Clinical and bone marrow effects of interferon alfa therapy in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Blood*. 2001 Mar 15;97(6):1896.
  445. Eriksson KA, Sigvaldason A, Lindholm A, Safai-Kutti S, Kutti J. Platelet activation in response to phlebotomy. An experimental study of healthy blood donors. *Acta Med Scand*. 1982;212(3):121-3.
  446. Ballen KK, Shrestha S, Sobocinski KA, Zhang MJ, Bashey A, Bolwell BJ, Cervantes F, Devine SM, Gale RP, Gupta V, Hahn TE, Hogan WJ, Kröger N, Litzow MR, Marks DI,

- Maziarz RT, McCarthy PL, Schiller G, Schouten HC, Roy V, Wiernik PH, Horowitz MM, Giralt SA, Arora M. Outcome of transplantation for myelofibrosis. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2010 Mar;16(3):358-67. Epub 2009 Oct 30.
447. Kröger N, Holler E, Kobbe G, Bornhäuser M, Schwerdtfeger R, Baurmann H, Nagler A, Bethge W, Stelljes M, Uharek L, Wandt H, Burchert A, Corradini P, Schubert J, Kaufmann M, Dreger P, Wulf GG, Einsele H, Zabelina T, Kvasnicka HM, Thiele J, Brand R, Zander AR, Niederwieser D, de Witte TM. *Blood*. 2009 Dec 17;114(26):5264-70. Epub 2009 Oct 7.
448. Pardanani A. JAK2 inhibitor therapy in myeloproliferative disorders: rationale, preclinical studies and ongoing clinical trials. *Leukemia*. 2008 Jan;22(1):23-30. Epub 2007 Sep 20.
449. Tefferi A, Verstovsek S, Barosi G, Passamonti F, Roboz GJ, Gisslinger H, Paquette RL, Cervantes F, Rivera CE, Deeg HJ, Thiele J, Kvasnicka HM, Vardiman JW, Zhang Y, Bekele BN, Mesa RA, Gale RP, Kantarjian HM. Pomalidomide is active in the treatment of anemia associated with myelofibrosis. *J Clin Oncol*. 2009 Sep 20;27(27):4563-9. Epub 2009 Aug 3.
450. Verstovsek S, Kantarjian H, Mesa RA, Pardanani AD, Cortes-Franco J, Thomas DA, Estrov Z, Fridman JS, Bradley EC, Erickson-Viitanen S, Vaddi K, Levy R, Tefferi A. Safety and efficacy of INCB018424, a JAK1 and JAK2 inhibitor, in myelofibrosis. *N Engl J Med*. 2010 Sep 16;363(12):1117-27.
451. Pardanani A, Gotlib JR, Jamieson C, Cortes JE, Talpaz M, Stone RM, Silverman MH, Gilliland DG, Shorr J, Tefferi A. Safety and efficacy of TG101348, a selective JAK2 inhibitor, in myelofibrosis. *J Clin Oncol*. 2011 Mar 1;29(7):789-96. Epub 2011 Jan 10.
452. Guglielmelli P, Barosi G, Rambaldi A, Marchioli R, Masciulli A, Tozzi L, Biamonte F, Bartalucci N, Gattoni E, Lupo ML, Finazzi G, Pancrazzi A, Antonioli E, Susini MC, Pieri L, Malevolti E, Usala E, Occhini U, Grossi A, Caglio S, Paratore S, Bosi A, Barbui T, Vannucchi AM; AIRC-Gruppo Italiano Malattie Mieloproliferative (AGIMM) investigators. Safety and efficacy of everolimus, a mTOR inhibitor, as single agent in a phase 1/2 study in patients with myelofibrosis. *Blood*. 2011 Aug 25;118(8):2069-76. Epub 2011 Jul 1.
453. Mascarenhas J, Lu M, Li T, Petersen B, Hochman T, Najfeld V, Goldberg JD, Hoffman R. A phase I study of panobinostat (LBH589) in patients with primary myelofibrosis (PMF) and post-polycythaemia vera/essential thrombocythaemia myelofibrosis (post-PV/ET MF). *Br J Haematol*. 2013 Apr;161(1):68-75. Epub 2013 Jan 21.

454. Begna KH, Mesa RA, Pardanani A, Hogan WJ, Litzow MR, McClure RF, Tefferi A. A phase-2 trial of low-dose pomalidomide in myelofibrosis. *Leukemia*. 2011 Feb;25(2):301-4. Epub 2010 Nov 5.
455. Mesa RA, Pardanani AD, Hussein K, Wu W, Schwager S, Litzow MR, Hogan WJ, Tefferi A. Phase 1/2 study of Pomalidomide in myelofibrosis. *Am J Hematol*. 2010 Feb;85(2):129-30.
456. Tefferi A. Primary myelofibrosis: 2013 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol*. 2013 Feb;88(2):141-50.
457. Tefferi A, Litzow MR, Pardanani A. Long-term outcome of treatment with ruxolitinib in myelofibrosis. *N Engl J Med*. 2011 Oct 13;365(15):1455-7.
458. Santos FP, Kantarjian HM, Jain N, Manshour T, Thomas DA, Garcia-Manero G, Kennedy D, Estrov Z, Cortes J, Verstovsek S. Phase 2 study of CEP-701, an orally available JAK2 inhibitor, in patients with primary or post-polycythemia vera/essential thrombocythemia myelofibrosis. *Blood*. 2010 Feb 11;115(6):1131-6. Epub 2009 Dec 11.
459. Mishchenko E, Tefferi A. Treatment options for hydroxyurea-refractory disease complications in myeloproliferative neoplasms: JAK2 inhibitors, radiotherapy, splenectomy and transjugular intrahepatic portosystemic shunt. *Eur J Haematol*. 2010 Sep;85(3):192-9. Epub 2010 Jun 2.
460. Mesa RA, Nagorney DS, Schwager S, Allred J, Tefferi A. Palliative goals, patient selection, and perioperative platelet management: outcomes and lessons from 3 decades of splenectomy for myelofibrosis with myeloid metaplasia at the Mayo Clinic. *Cancer* 2006;107:361–370.
461. Barosi G, Ambrosetti A, Centra A, Falcone A, Finelli C, Foa P, Grossi A, Guarnone R, Rupoli S, Luciano L, Petti MC, Pogliani E, Russo D, Ruggeri M, Quaglini S. Splenectomy and risk of blast transformation in myelofibrosis with myeloid metaplasia. Italian Cooperative Study Group on Myeloid with Myeloid Metaplasia. *Blood*. 1998 May 15;91(10):3630-6.
462. Doki N, Irisawa H, Takada S, Sakura T, Miyawaki S. Transjugular intrahepatic portosystemic shunt for the treatment of portal hypertension due to idiopathic myelofibrosis. *Intern Med*. 2007;46(4):187-90. Epub 2007 Feb 15.
463. Angermayr B, Cejna M, Schoder M, Wrba F, Valent P, Gangl A, Peck-Radosavljevic M. Transjugular intrahepatic portosystemic shunt for treatment of portal hypertension

- due to extramedullary hematopoiesis in idiopathic myelofibrosis. *Blood*. 2002 Jun 1;99(11):4246-7.
464. Tanaka N, Yamakado K, Kihira H, Hashimoto A, Murayama T, Takeda K. Re: Transjugular intrahepatic portosystemic shunt for intractable esophageal-gastric variceal hemorrhage in a patient with idiopathic myelofibrosis. *Cardiovasc Intervent Radiol*. 2000 Nov-Dec;23(6):491-2.
465. Alvarez-Larrán A, Abraldes JG, Cervantes F, Hernández-Guerra M, Vizzutti F, Miquel R, Gilabert R, Giusti M, Garcia-Pagan JC, Bosch J. Portal hypertension secondary to myelofibrosis: a study of three cases. *Am J Gastroenterol*. 2005 Oct;100(10):2355-8.
466. Wiest R, Strauch U, Wagner H, Strotzer M, Woenckhaus M, Schröder G, Schölmerich J, Lock G. A patient with myelofibrosis complicated by refractory ascites and portal hypertension: to tips or not to tips? A case report with discussion of the mechanism of ascites formation. *Scand J Gastroenterol*. 2004 Apr;39(4):389-94.
467. Tefferi A, Mesa RA, Nagorney DM, Schroeder G, Silverstein MN. Splenectomy in myelofibrosis with myeloid metaplasia: a single-institution experience with 223 patients. *Blood*. 2000 Apr 1;95(7):2226-33.
468. Feldman LS, Demyttenaere SV, Polyhronopoulos GN, Fried GM. Refining the selection criteria for laparoscopic versus open splenectomy for splenomegaly. *J Laparoendosc Adv Surg Tech A*. 2008 Feb;18(1):13-9.
469. Iwase K, Higaki J, Mikata S, et al. Laparoscopically assisted splenectomy following preoperative splenic artery embolization using contour emboli for myelofibrosis with massive splenomegaly. *Surg Laparosc Endosc Percutan Tech* 1999;9:197–202.
470. Hiatt JR, Gomes AS, Machleder HI. Massive splenomegaly. Superior results with a combined endovascular and operative approach. *Arch Surg* 1990;125:1363–1367.
471. Hocking WG, Machleder HI, Golde DW. Splenic artery embolization prior to splenectomy in end-stage polycythemia vera. *Am J Hematol* 1980;8:123–127.
472. Demory JL, Dupriez B, Fenaux P, Lai JL, Beuscart R, Jouet JP, Deminatti M, Bauters F. Cytogenetic studies and their prognostic significance in agnogenic myeloid metaplasia: a report on 47 cases. *Blood*. 1988 Sep;72(3):855-9.
473. Rupoli S, Da Lio L, Sisti S, Campanati G, Salvi A, Brianzoni MF, D'Amico S, Cinciripini A, Leoni P. Primary myelofibrosis: a detailed statistical analysis of the clinicopathological variables influencing survival. *Ann Hematol*. 1994 Apr;68(4):205-12.

474. Varki A, Lottenberg R, Griffith R, Reinhard E. The syndrome of idiopathic myelofibrosis. A clinicopathologic review with emphasis on the prognostic variables predicting survival. *Medicine (Baltimore)*. 1983 Nov;62(6):353-71.
475. Barosi G, Berzuini C, Liberato LN, Costa A, Polino G, Ascari E. A prognostic classification of myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Br J Haematol*. 1988 Dec;70(4):397-401.
476. Dupriez B, Morel P, Demory JL, Lai JL, Simon M, Plantier I, Bauters F. Prognostic factors in agnogenic myeloid metaplasia: a report on 195 cases with a new scoring system. *Blood*. 1996 Aug 1;88(3):1013-8.
477. Iványi JL, Mahunka M, Papp A, Kiss A, Telek B. Prognostic significance of bone marrow reticulin fibres in idiopathic myelofibrosis: evaluation of clinicopathological parameters in a scoring system. *Haematologia (Budap)*. 1994;26(2):75-86.
478. Kreft A, Weiss M, Wiese B, Choritz H, Buhr T, Büsche G, Georgii A. Chronic idiopathic myelofibrosis: prognostic impact of myelofibrosis and clinical parameters on event-free survival in 122 patients who presented in prefibrotic and fibrotic stages. A retrospective study identifying subgroups of different prognoses by using the RECPAM method. *Ann Hematol*. 2003 Oct;82(10):605-11. Epub 2003 Aug 28.
479. Kvasnicka HM, Thiele J, Werden C, Zankovich R, Diehl V, Fischer R. Prognostic factors in idiopathic (primary) osteomyelofibrosis. *Cancer*. 1997 Aug 15;80(4):708-19.
480. Visani G, Finelli C, Castelli U, Petti MC, Ricci P, Vianelli N, Gianni L, Zuffa E, Aloe Spiriti MA, Latagliata R, et al. Myelofibrosis with myeloid metaplasia: clinical and haematological parameters predicting survival in a series of 133 patients. *Br J Haematol*. 1990 May;75(1):4-9.
481. Passamonti F, Vanelli L, Malabarba L, Rumi E, Pungolino E, Malcovati L, Pascutto C, Morra E, Lazzarino M, Cazzola M. Clinical utility of the absolute number of circulating CD34-positive cells in patients with chronic myeloproliferative disorders. *Haematologica*. 2003 Oct;88(10):1123-9.
482. Sagaster V, Jäger E, Weltermann A, Schwarzingler I, Gisslinger H, Lechner K, Geissler K, Oehler L. Circulating hematopoietic progenitor cells predict survival in patients with myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Haematologica*. 2003 Nov;88(11):1204-12.
483. Tefferi A, Lasho TL, Patnaik MM, Finke CM, Hussein K, Hogan WJ, Elliott MA, Litzow MR, Hanson CA, Pardanani A. JAK2 germline genetic variation affects disease susceptibility in primary myelofibrosis regardless of V617F mutational status:

- nullizygoty for the JAK2 46/1 haplotype is associated with inferior survival. *Leukemia*. 2010 Jan;24(1):105-9. Epub 2009 Oct 22.
484. Renard DC, Bolton MM, Rhee SG, Margolis BL, Zilberstein A, Schlessinger J, Thomas AP. Modified kinetics of platelet-derived growth factor-induced Ca<sup>2+</sup> increases in NIH-3T3 cells overexpressing phospholipase C gamma 1. *Biochem J*. 1992 Feb 1;281 ( Pt 3):775-84.
485. Baluda VP, Kirichuk VF, Kolesnikova LM, Chekalina SI. Changes in platelet aggregation and fibrinolytic activity of blood in healthy persons during the 23-day physical cycle. *Biull Eksp Biol Med* 1979;87:478–480.
486. Ludlam CA. Evidence for the platelet specificity of beta-thromboglobulin and studies on its plasma concentration in healthy individuals. *Br J Haematol* 1979;41:271–278.
487. Tefferi A, Pardanani A, Lim KH, Abdel-Wahab O, Lasho TL, Patel J, Gangat N, Finke CM, Schwager S, Mullally A, Li CY, Hanson CA, Mesa R, Bernard O, Delhommeau F, Vainchenker W, Gilliland DG, Levine RL. TET2 mutations and their clinical correlates in polycythemia vera, essential thrombocythemia and myelofibrosis. *Leukemia*. 2009 May;23(5):905-11. Epub 2009 Mar 5.
488. Pardanani A, Lasho TL, Finke CM, Rajkumar SV, Singh PP, Ketterling RP, Hanson CA, Katzmann JA, Tefferi A. Polyclonal immunoglobulin free light chain levels predict survival in myeloid neoplasms. *J Clin Oncol*. 2012 Apr 1;30(10):1087-94. Epub 2012 Feb 13.
489. Tefferi A, Vaidya R, Caramazza D, Finke C, Lasho T, Pardanani A. Circulating interleukin (IL)-8, IL-2R, IL-12, and IL-15 levels are independently prognostic in primary myelofibrosis: a comprehensive cytokine profiling study. *J Clin Oncol*. 2011 Apr 1;29(10):1356-63. Epub 2011 Feb 7.
490. Tam CS, Kantarjian H, Cortes J, Lynn A, Pierce S, Zhou L, Keating MJ, Thomas DA, Verstovsek S. Dynamic model for predicting death within 12 months in patients with primary or post-polycythemia vera/essential thrombocythemia myelofibrosis. *J Clin Oncol*. 2009 Nov 20;27(33):5587-93. Epub 2009 Sep 28.
491. Huang J, Li CY, Mesa RA, Wu W, Hanson CA, Pardanani A, Tefferi A. Risk factors for leukemic transformation in patients with primary myelofibrosis. *Cancer*. 2008 Jun 15;112(12):2726-32.
492. Lasho TL, Jimma T, Finke CM, Patnaik M, Hanson CA, Ketterling RP, Pardanani A, Tefferi A. SRSF2 mutations in primary myelofibrosis: significant clustering with IDH

- mutations and independent association with inferior overall and leukemia-free survival. *Blood*. 2012 Nov 15;120(20):4168-71. Epub 2012 Sep 11.
493. Levine RL, Wernig G. Role of JAK-STAT signaling in the pathogenesis of myeloproliferative disorders. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2006:233-9, 510. Review.
494. Lambert JR, Everington T, Linch DC, Gale RE. In essential thrombocythemia, multiple JAK2-V617F clones are present in most mutant-positive patients: a new disease paradigm. *Blood*. 2009 Oct 1;114(14):3018-23. Epub 2009 Jun 18.
495. Pietra D, Li S, Brisci A, Passamonti F, Rumi E, Theocharides A, Ferrari M, Gisslinger H, Kralovics R, Cremonesi L, Skoda R, Cazzola M. Somatic mutations of JAK2 exon 12 in patients with JAK2 (V617F)-negative myeloproliferative disorders. *Blood*. 2008 Feb 1;111(3):1686-9. Epub 2007 Nov 5.
496. Passamonti F, Elena C, Schnittger S, Skoda RC, Green AR, Girodon F, Kiladjian JJ, McMullin MF, Ruggeri M, Besses C, Vannucchi AM, Lippert E, Gisslinger H, Rumi E, Lehmann T, Ortman CA, Pietra D, Pascutto C, Haferlach T, Cazzola M. Molecular and clinical features of the myeloproliferative neoplasm associated with JAK2 exon 12 mutations. *Blood*. 2011 Mar 10;117(10):2813-6. Epub 2011 Jan 11.
497. Ruan GR, Jiang B, Li LD, Niu JH, Li JL, Xie M, Qin YZ, Liu YR, Huang XJ, Chen SS. MPL W515L/K mutations in 343 Chinese adults with JAK2V617F mutation-negative chronic myeloproliferative disorders detected by a newly developed RQ-PCR based on TaqMan MGB probes. *Hematol Oncol* 2010;28:33-39.
498. Ma W, Zhang X, Wang X, Zhang Z, Yeh CH, Uyeji J, Albitar M. MPL mutation profile in JAK-2 mutation-negative patients with myeloproliferative disorders. *Diagn Mol Pathol* 2011;20:34-39.
499. Schnittger S, Bacher U, Haferlach C, Beelen D, Bojko P, Bürkle D, Dengler R, Distelrath A, Eckart M, Eckert R, Fries S, Knoblich J, Köchling G, Laubenstein HP, Petrides P, Planker M, Pihusch R, Weide R, Kern W, Haferlach T. Characterization of 35 new cases with four different MPL W515 mutations and essential thrombocytosis or primary myelofibrosis. *Haematologica* 2009;94:141-144.
500. Tong W, Zhang J, Lodish HF. Lnk inhibits erythropoiesis and Epo-dependent JAK2 activation and downstream signaling pathways. *Blood*. 2005; 105(12):4604-4612.
501. Tong W, Lodish HF. Lnk inhibits Tpo-mpl signaling and Tpo-mediated megakaryocytopoiesis. *J Exp Med*. 2004;200(5):569-580.



502. Gery S, Cao Q, Gueller S, Xing H, Tefferi A, Koeffler HP. Lnk inhibits myeloproliferative disorder-associated JAK2 mutant, JAK2V617F. *J Leukoc Biol.* 2009 Jun;85(6):957-65. Epub 2009 Mar 17.
503. Gery S, Gueller S, Chumakova K, Kawamata N, Liu L, Koeffler HP. Adaptor protein Lnk negatively regulates the mutant MPL, MPLW515L associated with myeloproliferative disorders. *Blood.* 2007 Nov 1;110(9):3360-4. Epub 2007 Aug 10.
504. Pardanani A, Lasho T, Finke C, Oh ST, Gotlib J, Tefferi A. LNK mutation studies in blast-phase myeloproliferative neoplasms, and in chronic-phase disease with TET2, IDH, JAK2 or MPL mutations. *Leukemia.* 2010 Oct;24(10):1713-8. Epub 2010 Aug 19.
505. Gery S, Gueller S, Nowak V, Sohn J, Hofmann WK, Koeffler HP. Expression of the adaptor protein Lnk in leukemia cells. *Exp Hematol.* 2009 May;37(5):585-592.e2.
506. Fu JF, Hsu JJ, Tang TC, Shih LY. Identification of CBL, a proto-oncogene at 11q23.3, as a novel MLL fusion partner in a patient with de novo acute myeloid leukemia. *Genes Chromosomes Cancer.* 2003 Jun;37(2):214-9.
507. Grand FH, Hidalgo-Curtis CE, Ernst T, Zoi K, Zoi C, McGuire C, Kreil S, Jones A, Score J, Metzgeroth G, Oscier D, Hall A, Brandts C, Serve H, Reiter A, Chase AJ, Cross NC. Frequent CBL mutations associated with 11q acquired uniparental disomy in myeloproliferative neoplasms. *Blood.* 2009 Jun 11;113(24):6182-92. Epub 2009 Apr 22.
508. Bacher U, Haferlach C, Schnittger S, Kohlmann A, Kern W, Haferlach T. Mutations of the TET2 and CBL genes: novel molecular markers in myeloid malignancies. *Ann Hematol.* 2010;89(7):643-652.
509. Janiszewska H, Bak A, Pilarska M, Heise M, Junkiert-Czarnecka A, Kuliszkiwicz-Janus M, Całbecka M, Jaźwiec B, Wołowiec D, Kuliczowski K, Haus O. A risk of essential thrombocythemia in carriers of constitutional CHEK2 gene mutations. *Haematologica.* 2012 Mar;97(3):366-70. Epub 2011 Nov 4.
510. Bell DW, Varley JM, Szydlo TE, Kang DH, Wahrer DC, Shannon KE, Lubratovich M, Verselis SJ, Isselbacher KJ, Fraumeni JF, Birch JM, Li FP, Garber JE, Haber DA. Heterozygous germ line hCHK2 mutations in Li-Fraumeni syndrome. *Science.* 1999 Dec 24;286(5449):2528-31.
511. Rudd MF, Sellick GS, Webb EL, Catovsky D, Houlston RS. Variants in the ATM-BRCA2-CHEK2 axis predispose to chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2006;108(2):638-44.

512. Hangaishi A, Ogawa S, Qiao Y, Wang L, Hosoya N, Yuji K, Imai Y, Takeuchi K, Miyawaki S, Hirai H. Mutations of Chk2 in primary hematopoietic neoplasms. *Blood*. 2002 Apr 15;99(8):3075-7.
513. Sellick GS, Sullivan K, Catovsky D, Houlston RS. CHEK2\*1100delC and risk of chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2006;47(12):2659–60.
514. Aktas D, Arno MJ, Rassool F, Mufti GJ. Analysis of CHK2 in patients with myelodysplastic syndromes. *Leuk Res*. 2002;26(11):985–7.
515. Jäger R, Gisslinger H, Passamonti F, Rumi E, Berg T, Gisslinger B, Pietra D, Harutyunyan A, Klampfl T, Olcaydu D, Cazzola M, Kralovics R. Deletions of the transcription factor Ikaros in myeloproliferative neoplasms. *Leukemia*. 2010 Jul;24(7):1290-8. Epub 2010 May 27.
516. Schuettengruber B, Chourrout D, Vervoort M, Leblanc B, Cavalli G. Genome regulation by polycomb and trithorax proteins. *Cell*. 2007;128:735–745.
517. Kler CG. Carcinoma of the breast with medullary-like features: diagnostic challenges and relationship with BRCA1 and EZH2 functions. *Arch Pathol Lab Med*. 2009 Nov;133(11):1822-5.
518. Konstantinopoulos PA, Karamouzis MV, Papavassiliou AG. Post-translational modifications and regulation of the RAS superfamily of GTPases as anticancer targets. *Nat Rev Drug Discov*. 2007;6:541–555.
519. Parikh C, Subrahmanyam R, Ren R. Oncogenic NRAS rapidly and efficiently induces CMML- and AML-like diseases in mice. *Blood*. 2006;108:2349–2357.
520. Wang J, Liu Y, Li Z, Du J, Ryu MJ, Taylor PR, Fleming MD, Young KH, Pitot H, Zhang J. Endogenous oncogenic Nras mutation promotes aberrant GM-CSF signaling in granulocytic/monocytic precursors in a murine model of chronic myelomonocytic leukemia. *Blood*. 2010 Dec 23;116(26):5991-6002. Epub 2010 Oct 4.
521. Roberts PJ, Der CJ. Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene*. 2007;26:3291–3310.
522. Ayllon V, Rebollo A. Ras-induced cellular events. *Mol Membr Biol*. 2000;17:65–73.
523. Scheele JS, Ripple D, Lubbert M. The role of ras and other low molecular weight guanine nucleotide (GTP)-binding proteins during hematopoietic cell differentiation. *Cell Mol Life Sci*. 2000;57:1950–1963.
524. Shounan Y, MacKenzie K, Dolnikov A, Miller M, Symonds G. Myeloproliferative disease and myelodysplastic syndrome induced by transplantation of bone marrow cells expressing mutant p53. *Leukemia*. 1997 Oct;11(10):1641-9.

525. Harutyunyan A, Klampfl T, Cazzola M, Kralovics R. p53 lesions in leukemic transformation. *N Engl J Med*. 2011 Feb 3;364(5):488-90.
526. Osato M, Asou N, Abdalla E, Hoshino K, Yamasaki H, Okubo T, Suzushima H, Takatsuki K, Kanno T, Shigesada K, Ito Y. Biallelic and heterozygous point mutations in the runt domain of the AML1/PEBP2alphaB gene associated with myeloblastic leukemias. *Blood*. 1999 Mar 15;93(6):1817-24.
527. Ding Y, Harada Y, Imagawa J, Kimura A, Harada H. AML1/RUNX1 point mutation possibly promotes leukemic transformation in myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2009 Dec 10;114(25):5201-5.
528. Tahiliani M, Koh KP, Shen Y, Pastor WA, Bandukwala H, Brudno Y, Agarwal S, Iyer LM, Liu DR, Aravind L, Rao A. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science*. 2009 May 15;324(5929):930-5. Epub 2009 Apr 16.
529. Ito S, D'Alessio AC, Taranova OV, Hong K, Sowers LC, Zhang Y. Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification. *Nature*. 2010 Aug 26;466(7310):1129-33.
530. Ficiz G, Branco MR, Seisenberger S, Santos F, Krueger F, Hore TA, Marques CJ, Andrews S, Reik W. Dynamic regulation of 5-hydroxymethylcytosine in mouse ES cells and during differentiation. *Nature*. 2011 May 19;473(7347):398-402. Epub 2011 Apr 3.
531. Tefferi A, Lim KH, Abdel-Wahab O, Lasho TL, Patel J, Patnaik MM, Hanson CA, Pardanani A, Gilliland DG, Levine RL. Detection of mutant TET2 in myeloid malignancies other than myeloproliferative neoplasms: CMML, MDS, MDS/MPN and AML. *Leukemia*. 2009 Jul;23(7):1343-5. Epub 2009 Mar 19.
532. Langemeijer SM, Kuiper RP, Berends M, Knops R, Aslanyan MG, Massop M, Stevens-Linders E, van Hoogen P, van Kessel AG, Raymakers RA, Kamping EJ, Verhoef GE, Verburgh E, Hagemeijer A, Vandenberghe P, de Witte T, van der Reijden BA, Jansen JH. Acquired mutations in TET2 are common in myelodysplastic syndromes. *Nat Genet*. 2009 Jul;41(7):838-42. Epub 2009 May 31.
533. Jankowska AM, Szpurka H, Tiu RV, Makishima H, Afable M, Huh J, O'Keefe CL, Ganetzky R, McDevitt MA, Maciejewski JP. Loss of heterozygosity 4q24 and TET2 mutations associated with myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2009 Jun 18;113(25):6403-10. Epub 2009 Apr 16.

534. Delhommeau F, Dupont S, Della Valle V, James C, Trannoy S, Massé A, Kosmider O, Le Couedic JP, Robert F, Alberdi A, Lécluse Y, Plo I, Dreyfus FJ, Marzac C, Casadevall N, Lacombe C, Romana SP, Dessen P, Soulier J, Viguié F, Fontenay M, Vainchenker W, Bernard OA. Mutation in TET2 in myeloid cancers. *N Engl J Med*. 2009 May 28;360(22):2289-301.
535. Abdel-Wahab O, Mullally A, Hedvat C, Garcia-Manero G, Patel J, Wadleigh M, Malinge S, Yao J, Kilpivaara O, Bhat R, Huberman K, Thomas S, Dolgalev I, Heguy A, Paietta E, Le Beau MM, Beran M, Tallman MS, Ebert BL, Kantarjian HM, Stone RM, Gilliland DG, Crispino JD, Levine RL. Genetic characterization of TET1, TET2, and TET3 alterations in myeloid malignancies. *Blood*. 2009 Jul 2;114(1):144-7. Epub 2009 May 6.
536. Pronier E, Almiré C, Mokrani H, Vasanthakumar A, Simon A, da Costa Reis Monte Mor B, Massé A, Le Couédic JP, Pendino F, Carbonne B, Larghero J, Ravanat JL, Casadevall N, Bernard OA, Droin N, Solary E, Godley LA, Vainchenker W, Plo I, Delhommeau F. Inhibition of TET2-mediated conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine disturbs erythroid and granulomonocytic differentiation of human hematopoietic progenitors. *Blood*. 2011 Sep 1;118(9):2551-5. Epub 2011 Jul 6.
537. Pronier E, Delhommeau F. Role of TET2 mutations in myeloproliferative neoplasms. *Curr Hematol Malig Rep*. 2012 Mar;7(1):57-64.
538. Ley TJ, Ding L, Walter MJ, McLellan MD, Lamprecht T, Larson DE, Kandoth C, Payton JE, Baty J, Welch J, Harris CC, Lichti CF, Townsend RR, Fulton RS, Dooling DJ, Koboldt DC, Schmidt H, Zhang Q, Osborne JR, Lin L, O’Laughlin M, McMichael JF, Delehaunty KD, McGrath SD, Fulton LA, Magrini VJ, Vickery TL, Hundal J, Cook LL, Conyers JJ, Swift GW, Reed JP, Alldredge PA, Wylie T, Walker J, Kalicki J, Watson MA, Heath S, Shannon WD, Varghese N, Nagarajan R, Westervelt P, Tomasson MH, Link DC, Graubert TA, DiPersio JF, Mardis ER, Wilson RK. 2010. DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 363:2424–2433.
539. Yamashita Y, Yuan J, Suetake I, Suzuki H, Ishikawa Y, Choi YL, Ueno T, Soda M, Hamada T, Haruta H, Takada S, Miyazaki Y, Kiyoi H, Ito E, Naoe T, Tomonaga M, Toyota M, Tajima S, Iwama A, Mano H. Array-based genomic resequencing of human leukemia. *Oncogene*. 2010 Jun 24;29(25):3723-31. Epub 2010 Apr 19.
540. Yan XJ, Xu J, Gu ZH, Pan CM, Lu G, Shen Y, Shi JY, Zhu YM, Tang L, Zhang XW, Liang WX, Mi JQ, Song HD, Li KQ, Chen Z, Chen SJ. Exome sequencing identifies

- somatic mutations of DNA methyltransferase gene DNMT3A in acute monocytic leukemia. *Nat Genet.* 2011 Mar 13;43(4):309-15.
541. Ewalt M, Galili NG, Mumtaz M, Churchill M, Rivera S, Borot F, Raza A, Mukherjee S. DNMT3a mutations in high-risk myelodysplastic syndrome parallel those found in acute myeloid leukemia. *Blood Cancer J.* 2011 Mar;1(3):e9. Epub 2011 Mar 11.
542. Walter MJ, Ding L, Shen D, Shao J, Grillot M, McLellan M, Fulton R, Schmidt H, Kalicki-Veizer J, O'Laughlin M, Kandoth C, Baty J, Westervelt P, DiPersio JF, Mardis ER, Wilson RK, Ley TJ, Graubert TA. Recurrent DNMT3A mutations in patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia.* 2011 Jul;25(7):1153-8. Epub 2011 Mar 18.
543. Brecqueville M, Cervera N, Gelsi-Boyer V, Murati A, Adélaïde J, Chaffanet M, Rey J, Vey N, Mozziconacci MJ, Birnbaum D. Rare mutations in DNMT3A in myeloproliferative neoplasms and myelodysplastic syndromes. *Blood Cancer J.* 2011 May;1(5):e18. Epub 2011 May 13.
544. Abdel-Wahab O, Pardanani A, Rampal R, Lasho TL, Levine RL, Tefferi A. DNMT3A mutational analysis in primary myelofibrosis, chronic myelomonocytic leukemia and advanced phases of myeloproliferative neoplasms. *Leukemia.* 2011 Jul;25(7):1219-20. Epub 2011 Apr 26.
545. Gaebler C, Stanzl-Tschegg S, Heinze G, Holper B, Milne T, Berger G, Vécsei V. Fatigue strength of locking screws and prototypes used in small-diameter tibial nails: a biomechanical study. *J Trauma.* 1999 Aug;47(2):379-84.
546. Sinclair DA, Milne TA, Hodgson JW, Shellard J, Salinas CA, Kyba M, Randazzo F, Brock HW. The Additional sex combs gene of *Drosophila* encodes a chromatin protein that binds to shared and unique Polycomb group sites on polytene chromosomes. *Development.* 1998 Apr;125(7):1207-16.
547. Fisher CL, Lee I, Bloyer S, Bozza S, Chevalier J, Dahl A, Bodner C, Helgason CD, Hess JL, Humphries RK, Brock HW. Additional sex combs-like 1 belongs to the enhancer of trithorax and polycomb group and genetically interacts with Cbx2 in mice. *Dev Biol.* 2010 Jan 1;337(1):9-15. Epub 2009 Oct 13.
548. Park UH, Yoon SK, Park T, Kim EJ, Um SJ. Additional sex comb-like (ASXL) proteins 1 and 2 play opposite roles in adipogenesis via reciprocal regulation of peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ . *J Biol Chem.* 2011 Jan 14;286(2):1354-63. Epub 2010 Nov 3.
549. Fisher CL, Pineault N, Brookes C, Helgason CD, Ohta H, Bodner C, Hess JL, Humphries RK, Brock HW. Loss-of-function Additional sex combs like 1 mutations

- disrupt hematopoiesis but do not cause severe myelodysplasia or leukemia. *Blood*. 2010 Jan 7;115(1):38-46. Epub 2009 Oct 27.
550. Aravind L, Iyer LM. The HARE-HTH and associated domains: novel modules in the coordination of epigenetic DNA and protein modifications. *Cell Cycle* 2012; 11(1):119–31.
551. Scheuermann JC, de Ayala Alonso AG, Oktaba K, Ly-Hartig N, McGinty RK, Fraterman S, Wilm M, Muir TW, Müller J. Histone H2A deubiquitinase activity of the Polycomb repressive complex PR-DUB. *Nature*. 2010 May 13;465(7295):243-7. Epub 2010 May 2.
552. Carbuccia N, Trouplin V, Gelsi-Boyer V, Murati A, Rocquain J, Adélaïde J, Olschwang S, Xerri L, Vey N, Chaffanet M, Birnbaum D, Mozziconacci MJ. Mutual exclusion of ASXL1 and NPM1 mutations in a series of acute myeloid leukemias. *Leukemia*. 2010 Feb;24(2):469-73. Epub 2009 Oct 29.
553. Boultonwood J, Perry J, Pellagatti A, Fernandez-Mercado M, Fernandez-Santamaria C, Calasanz MJ, Larrayoz MJ, Garcia-Delgado M, Giagounidis A, Malcovati L, Della Porta MG, Jädersten M, Killick S, Hellström-Lindberg E, Cazzola M, Wainscoat JS. Frequent mutation of the polycomb-associated gene ASXL1 in the myelodysplastic syndromes and in acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2010 May;24(5):1062-5. Epub 2010 Feb 25.
554. Kosmider O, Gelsi-Boyer V, Slama L, Dreyfus F, Beyne-Rauzy O, Quesnel B, Hunault-Berger M, Slama B, Vey N, Lacombe C, Solary E, Birnbaum D, Bernard OA, Fontenay M. Mutations of IDH1 and IDH2 genes in early and accelerated phases of myelodysplastic syndromes and MDS/myeloproliferative neoplasms. *Leukemia*. 2010 May;24(5):1094-6. Epub 2010 Apr 8.
555. Plaut GW, Cook M, Aogaichi T. The subcellular location of isozymes of NADP-isocitrate dehydrogenase in tissues from pig, ox and rat. *Biochim Biophys Acta* 1983;760:300-8.
556. Dang L, White DW, Gross S, Bennett BD, Bittinger MA, Driggers EM, Fantin VR, Jang HG, Jin S, Keenan MC, Marks KM, Prins RM, Ward PS, Yen KE, Liao LM, Rabinowitz JD, Cantley LC, Thompson CB, Vander Heiden MG, Su SM. Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature*. 2010 Jun 17;465(7300):966.
557. Ward PS, Patel J, Wise DR, Abdel-Wahab O, Bennett BD, Collier HA, Cross JR, Fantin VR, Hedvat CV, Perl AE, Rabinowitz JD, Carroll M, Su SM, Sharp KA, Levine RL,

- Thompson CB. The common feature of leukemia-associated IDH1 and IDH2 mutations is a neomorphic enzyme activity converting alpha-ketoglutarate to 2-hydroxyglutarate. *Cancer Cell*. 2010 Mar 16;17(3):225-34. Epub 2010 Feb 18.
558. Bejar R, Levine R, Ebert BL. Unraveling the molecular pathophysiology of myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol*. 2011 Feb 10;29(5):504-15. Epub 2011 Jan 10.
559. Zhao S, Lin Y, Xu W, Jiang W, Zha Z, Wang P, Yu W, Li Z, Gong L, Peng Y, Ding J, Lei Q, Guan KL, Xiong Y. Glioma-derived mutations in IDH1 dominantly inhibit IDH1 catalytic activity and induce HIF-1alpha. *Science*. 2009 Apr 10;324(5924):261-5.
560. Dang L, White DW, Gross S, Bennett BD, Bittinger MA, Driggers EM, Fantin VR, Jang HG, Jin S, Keenan MC, Marks KM, Prins RM, Ward PS, Yen KE, Liao LM, Rabinowitz JD, Cantley LC, Thompson CB, Vander Heiden MG, Su SM. Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature*. 2009 Dec 10;462(7274):739-44.
561. Gross S, Cairns RA, Minden MD, Driggers EM, Bittinger MA, Jang HG, Sasaki M, Jin S, Schenkein DP, Su SM, Dang L, Fantin VR, Mak TW. Cancer-associated metabolite 2-hydroxyglutarate accumulates in acute myelogenous leukemia with isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations. *J Exp Med*. 2010 Feb 15;207(2):339-44. Epub 2010 Feb 8.
562. Figueroa ME, Abdel-Wahab O, Lu C, Ward PS, Patel J, Shih A, Li Y, Bhagwat N, Vasanthakumar A, Fernandez HF, Tallman MS, Sun Z, Wolniak K, Peeters JK, Liu W, Choe SE, Fantin VR, Paietta E, Löwenberg B, Licht JD, Godley LA, Delwel R, Valk PJ, Thompson CB, Levine RL, Melnick A. Leukemic IDH1 and IDH2 mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt TET2 function, and impair hematopoietic differentiation. *Cancer Cell*. 2010 Dec 14;18(6):553-67. Epub 2010 Dec 9.
563. Chou WC, Lei WC, Ko BS, Hou HA, Chen CY, Tang JL, Yao M, Tsay W, Wu SJ, Huang SY, Hsu SC, Chen YC, Chang YC, Kuo KT, Lee FY, Liu MC, Liu CW, Tseng MH, Huang CF, Tien HF. The prognostic impact and stability of Isocitrate dehydrogenase 2 mutation in adult patients with acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2011 Feb;25(2):246-53. Epub 2010 Nov 16.
564. Boissel N, Nibourel O, Renneville A, Gardin C, Reman O, Contentin N, Bordessoule D, Pautas C, de Revel T, Quesnel B, Huchette P, Philippe N, Geffroy S, Terre C, Thomas X, Castaigne S, Dombret H, Preudhomme C. Prognostic impact of isocitrate dehydrogenase enzyme isoforms 1 and 2 mutations in acute myeloid leukemia: a study

- by the Acute Leukemia French Association group. *J Clin Oncol*. 2010 Aug 10;28(23):3717-23. Epub 2010 Jul 12.
565. Abbas S, Lugthart S, Kavelaars FG, Schelen A, Koenders JE, Zeilemaker A, van Putten WJ, Rijneveld AW, Löwenberg B, Valk PJ. Acquired mutations in the genes encoding IDH1 and IDH2 both are recurrent aberrations in acute myeloid leukemia: prevalence and prognostic value. *Blood*. 2010 Sep 23;116(12):2122-6. Epub 2010 Jun 10.
566. Pardanani A, Patnaik MM, Lasho TL, Mai M, Knudson RA, Finke C, Ketterling RP, McClure RF, Tefferi A. Recurrent IDH mutations in high-risk myelodysplastic syndrome or acute myeloid leukemia with isolated del(5q). *Leukemia*. 2010 Jul;24(7):1370-2. Epub 2010 May 20.
567. Soverini S, Score J, Iacobucci I, Poerio A, Lonetti A, Gnani A, Colarossi S, Ferrari A, Castagnetti F, Rosti G, Cervantes F, Hochhaus A, Delledonne M, Ferrarini A, Sazzini M, Luiselli D, Baccarani M, Cross NC, Martinelli G. IDH2 somatic mutations in chronic myeloid leukemia patients in blast crisis. *Leukemia*. 2011 Jan;25(1):178-81. Epub 2010 Oct 21.
568. Caramazza D, Lasho TL, Finke CM, Gangat N, Dingli D, Knudson RA, Siragusa S, Hanson CA, Pardanani A, Ketterling RP, Tefferi A. IDH mutations and trisomy 8 in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2010 Dec;24(12):2120-2. Epub 2010 Sep 23.
569. Thol F, Damm F, Wagner K, Göhring G, Schlegelberger B, Hoelzer D, Lübbert M, Heit W, Kanz L, Schlimok G, Raghavachar A, Fiedler W, Kirchner H, Heil G, Heuser M, Krauter J, Ganser A. Prognostic impact of IDH2 mutations in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *Blood*. 2010 Jul 29;116(4):614-6.
570. Schnittger S, Haferlach C, Ulke M, Alpermann T, Kern W, Haferlach T. IDH1 mutations are detected in 6.6% of 1414 AML patients and are associated with intermediate risk karyotype and unfavorable prognosis in adults younger than 60 years and unmutated NPM1 status. *Blood* 2010; 116: 5486–5496.
571. Green CL, Evans CM, Hills RK, Burnett AK, Linch DC, Gale RE. The prognostic significance of IDH1 mutations in younger adult patients with acute myeloid leukemia is dependent on FLT3/ITD status. *Blood* 2010; 116: 2779–2782.
572. Marcucci G, Maharry K, Wu YZ, Radmacher MD, Mrózek K, Margeson D, Holland KB, Whitman SP, Becker H, Schwind S, Metzeler KH, Powell BL, Carter TH, Kolitz JE, Wetzler M, Carroll AJ, Baer MR, Caligiuri MA, Larson RA, Bloomfield CD. IDH1 and IDH2 gene mutations identify novel molecular subsets within de novo



- cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B study. *J Clin Oncol*. 2010 May 10;28(14):2348-55. Epub 2010 Apr 5.
573. Wagner K, Damm F, Göhring G, Görlich K, Heuser M, Schäfer I, Ottmann O, Lübbert M, Heit W, Kanz L, Schlimok G, Raghavachar AA, Fiedler W, Kirchner HH, Brugger W, Zucknick M, Schlegelberger B, Heil G, Ganser A, Krauter J. Impact of IDH1 R132 mutations and an IDH1 single nucleotide polymorphism in cytogenetically normal acute myeloid leukemia: SNP rs11554137 is an adverse prognostic factor. *J Clin Oncol*. 2010 May 10;28(14):2356-64. Epub 2010 Apr 5.
574. Green CL, Evans CM, Zhao L, Hills RK, Burnett AK, Linch DC, Gale RE. The prognostic significance of IDH2 mutations in AML depends on the location of the mutation. *Blood*. 2011 Jul 14;118(2):409-12. Epub 2011 May 19.
575. Thiele J, Kvasnicka HM, Facchetti F, Franco V, van der Walt J, Orazi A. European consensus on grading bone marrow fibrosis and assessment of cellularity. *Haematologica*. 2005 Aug;90(8):1128-32.
576. Chae H, Lee JH, Lim J, Jung SW, Kim M, Kim Y, Han K, Cho BS, Cho SG, Lee JW, Min WS. Usefulness of real-time semi-quantitative PCR, JAK2 MutaScreen kit for JAK2 V617F screening. *Korean J Lab Med*. 2009 Jun;29(3):243-8.
577. Pratcorona M, Abbas S, Sanders MA, Koenders JE, Kavelaars FG, Erpelinck-Verschueren CA, Zeilemakers A, Löwenberg B, Valk PJ. Acquired mutations in ASXL1 in acute myeloid leukemia: prevalence and prognostic value. *Haematologica*. 2012 Mar;97(3):388-92. Epub 2011 Nov 4.
578. Cankovic M, Whiteley L, Hawley RC, Zarbo RJ, Chitale D. Clinical performance of JAK2 V617F mutation detection assays in a molecular diagnostics laboratory: evaluation of screening and quantitation methods. *Am J Clin Pathol*. 2009 Nov;132(5):713-21.
579. Ibáñez M, Such E, Cervera J, Luna I, Gómez-Seguí I, López-Pavía M, Dolz S, Barragán E, Fuster O, Llop M, Rodríguez-Veiga R, Avaria A, Oltra S, Senent ML, Moscardó F, Montesinos P, Martínez-Cuadrón D, Martín G, Sanz MA. Rapid screening of ASXL1, IDH1, IDH2, and c-CBL mutations in de novo acute myeloid leukemia by high-resolution melting. *J Mol Diagn*. 2012 Nov;14(6):594-601. Epub 2012 Aug 25.
580. Chou WC, Huang HH, Hou HA, Chen CY, Tang JL, Yao M, Tsay W, Ko BS, Wu SJ, Huang SY, Hsu SC, Chen YC, Huang YN, Chang YC, Lee FY, Liu MC, Liu CW, Tseng MH, Huang CF, Tien HF. Distinct clinical and biological features of de novo

- acute myeloid leukemia with additional sex comb-like 1 (ASXL1) mutations. *Blood*. 2010 Nov 18;116(20):4086-94.
581. Gelsi-Boyer V, Brecqueville M, Devillier R, Murati A, Mozziconacci MJ, Birnbaum D. Mutations in ASXL1 are associated with poor prognosis across the spectrum of malignant myeloid diseases. *J Hematol Oncol*. 2012 Mar 21;5:12.
582. Stein BL, Williams DM, O'Keefe C, Rogers O, Ingersoll RG, Spivak JL, Verma A, Maciejewski JP, McDevitt MA, Moliterno AR. Disruption of the ASXL1 gene is frequent in primary, post-essential thrombocytosis and post-polycythemia vera myelofibrosis, but not essential thrombocytosis or polycythemia vera: analysis of molecular genetics and clinical phenotypes. *Haematologica*. 2011 Oct;96(10):1462-9. Epub 2011 Jun 28.
583. Ricci C, Spinelli O, Salmoiraghi S, Finazzi G, Carobbio A, Rambaldi A. ASXL1 mutations in primary and secondary myelofibrosis. *Br J Haematol*. 2012 Feb;156(3):404-7.
584. Abdel-Wahab O, Kilpivaara O, Patel J, Busque L, Levine RL. The most commonly reported variant in ASXL1 (c.1934dupG;p.Gly646TrpfsX12) is not a somatic alteration. *Leukemia*. 2010 Sep;24(9):1656-7. Epub 2010 Jul 1.
585. Thol F, Friesen I, Damm F, Yun H, Weissinger EM, Krauter J, Wagner K, Chaturvedi A, Sharma A, Wichmann M, Göhring G, Schumann C, Bug G, Ottmann O, Hofmann WK, Schlegelberger B, Heuser M, Ganser A. Prognostic significance of ASXL1 mutations in patients with myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol*. 2011 Jun 20;29(18):2499-506. Epub 2011 May 16.
586. Chou WC, Hou HA, Chen CY, Tang JL, Yao M, Tsay W, Ko BS, Wu SJ, Huang SY, Hsu SC, Chen YC, Huang YN, Chang YC, Lee FY, Liu MC, Liu CW, Tseng MH, Huang CF, Tien HF. Distinct clinical and biologic characteristics in adult acute myeloid leukemia bearing the isocitrate dehydrogenase 1 mutation. *Blood*. 2010 Apr 8;115(14):2749-54. Epub 2010 Jan 22.
587. Pardanani A, Lasho TL, Finke CM, Mai M, McClure RF, Tefferi A. IDH1 and IDH2 mutation analysis in chronic- and blast-phase myeloproliferative neoplasms. *Leukemia*. 2010 Jun;24(6):1146-51. Epub 2010 Apr 22.
588. Shih AH, Abdel-Wahab O, Patel JP, Levine RL. The role of mutations in epigenetic regulators in myeloid malignancies. *Nat Rev Cancer*. 2012 Sep;12(9):599-612. Epub 2012 Aug 17.

589. Martínez-Avilés L, Besses C, Álvarez-Larrán A, Torres E, Serrano S, Bellosillo B. TET2, ASXL1, IDH1, IDH2, and c-CBL genes in JAK2- and MPL-negative myeloproliferative neoplasms. *Ann Hematol*. 2012 Apr;91(4):533-41. Epub 2011 Sep 9.
590. Tefferi A. Polycythemia vera and essential thrombocythemia: 2012 update on diagnosis, risk stratification, and management. *Am J Hematol*. 2012 Mar;87(3):285-93. Review.
591. Tefferi A, Elliott M. Thrombosis in myeloproliferative disorders: prevalence, prognostic factors, and the role of leukocytes and JAK2V617F. *Semin Thromb Hemost*. 2007 Jun;33(4):313-20.
592. Tefferi A. Polycythemia vera and essential thrombocythemia: 2013 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol*. 2013 Jun;88(6):507-16.
593. De Stefano V, Za T, Rossi E, Vannucchi AM, Ruggeri M, Elli E, Micò C, Tieghi A, Cacciola RR, Santoro C, Gerli G, Vianelli N, Guglielmelli P, Pieri L, Scognamiglio F, Rodeghiero F, Pogliani EM, Finazzi G, Gugliotta L, Marchioli R, Leone G, Barbui T; GIMEMA CMD-Working Party. Recurrent thrombosis in patients with polycythemia vera and essential thrombocythemia: incidence, risk factors, and effect of treatments. *Haematologica*. 2008 Mar;93(3):372-80. Epub 2008 Feb 11.
594. Marchioli R, Finazzi G, Landolfi R, Kutti J, Gisslinger H, Patrono C, Marilus R, Villegas A, Tognoni G, Barbui T. Vascular and neoplastic risk in a large cohort of patients with polycythemia vera. *J Clin Oncol*. 2005 Apr 1;23(10):2224-32. Epub 2005 Feb 14.
595. Harrison CN, Campbell PJ, Buck G, Wheatley K, East CL, Bareford D, Wilkins BS, van der Walt JD, Reilly JT, Grigg AP, Revell P, Woodcock BE, Green AR; United Kingdom Medical Research Council Primary Thrombocythemia 1 Study. Hydroxyurea compared with anagrelide in high-risk essential thrombocythemia. *N Engl J Med*. 2005 Jul 7;353(1):33-45.
596. Cervantes F, Alvarez-Larrán A, Arellano-Rodrigo E, Granell M, Domingo A, Montserrat E. Frequency and risk factors for thrombosis in idiopathic myelofibrosis: analysis in a series of 155 patients from a single institution. *Leukemia*. 2006 Jan;20(1):55-60.
597. Barbui T, Carobbio A, Cervantes F, Vannucchi AM, Guglielmelli P, Antonioli E, Alvarez-Larrán A, Rambaldi A, Finazzi G, Barosi G. Thrombosis in primary myelofibrosis: incidence and risk factors. *Blood*. 2010 Jan 28;115(4):778-82. Epub 2009 Nov 20.

598. Kilpivaara O, Levine RL. JAK2 and MPL mutations in myeloproliferative neoplasms: discovery and science. *Leukemia*. 2008 Oct;22(10):1813-7. Epub 2008 Aug 28.
599. Delhommeau F, Pisani DF, James C, Casadevall N, Constantinescu S, Vainchenker W. Oncogenic mechanisms in myeloproliferative disorders. *Cell Mol Life Sci*. 2006 Dec;63(24):2939-53. Review.
600. Tefferi A. Molecular drug targets in myeloproliferative neoplasms: mutant ABL1, JAK2, MPL, KIT, PDGFRA, PDGFRB and FGFR1. *J Cell Mol Med*. 2009 Feb;13(2):215-37. Epub 2008 Oct 23.
601. Tefferi A. Novel mutations and their functional and clinical relevance in myeloproliferative neoplasms: JAK2, MPL, TET2, ASXL1, CBL, IDH and IKZF1. *Leukemia*. 2010 Jun;24(6):1128-38. Epub 2010 Apr 29.
602. Cheung B, Radia D, Pantelidis P, Yadegarfar G, Harrison C. The presence of the JAK2 V617F mutation is associated with a higher haemoglobin and increased risk of thrombosis in essential thrombocythaemia. *Br J Haematol*. 2006 Jan;132(2):244-5.
603. Kittur J, Knudson RA, Lasho TL, Finke CM, Gangat N, Wolanskyj AP, Li CY, Wu W, Ketterling RP, Pardanani A, Tefferi A. Clinical correlates of JAK2V617F allele burden in essential thrombocythemia. *Cancer*. 2007 Jun 1;109(11):2279-84.
604. Ziakas PD. Effect of JAK2 V617F on thrombotic risk in patients with essential thrombocythemia: measuring the uncertain. *Haematologica*. 2008 Sep;93(9):1412-4. Epub 2008 Jul 18.
605. Dahabreh IJ, Zoi K, Giannouli S, Zoi C, Loukopoulos D, Voulgarelis M. Is JAK2 V617F mutation more than a diagnostic index? A meta-analysis of clinical outcomes in essential thrombocythemia. *Leuk Res*. 2009 Jan;33(1):67-73. Epub 2008 Jul 15.
606. Vannucchi AM, Antonioli E, Guglielmelli P, Longo G, Pancrazzi A, Ponziani V, Bogani C, Ferrini PR, Rambaldi A, Guerini V, Bosi A, Barbui T; MPD Research Consortium. Prospective identification of high-risk polycythemia vera patients based on JAK2(V617F) allele burden. *Leukemia*. 2007 Sep;21(9):1952-9. Epub 2007 Jul 12.
607. Tefferi A, Strand JJ, Lasho TL, Knudson RA, Finke CM, Gangat N, Pardanani A, Hanson CA, Ketterling RP. Bone marrow JAK2V617F allele burden and clinical correlates in polycythemia vera. *Leukemia*. 2007 Sep;21(9):2074-5. Epub 2007 May 3.
608. Passamonti F, Rumi E, Pietra D, Elena C, Boveri E, Arcaini L, Roncoroni E, Astori C, Merli M, Boggi S, Pascutto C, Lazzarino M, Cazzola M. A prospective study of 338 patients with polycythemia vera: the impact of JAK2 (V617F) allele burden and

- leukocytosis on fibrotic or leukemic disease transformation and vascular complications. *Leukemia*. 2010 Sep;24(9):1574-9. Epub 2010 Jul 15.
609. Silver RT, Vandris K, Wang YL, Adriano F, Jones AV, Christos PJ, Cross NC. JAK2(V617F) allele burden in polycythemia vera correlates with grade of myelofibrosis, but is not substantially affected by therapy. *Leuk Res*. 2011 Feb;35(2):177-82. Epub 2010 Jul 22.
610. Palandri F, Ottaviani E, Salmi F, Catani L, Polverelli N, Fiacchini M, Martinelli G, Baccarani M, Vianelli N. JAK2 V617F mutation in essential thrombocythemia: correlation with clinical characteristics, response to therapy and long-term outcome in a cohort of 275 patients. *Leuk Lymphoma*. 2009 Feb;50(2):247-53.