



**T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

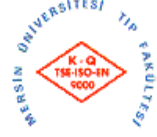
İÇ HASTALIKLARI HEMATOLOJİ BİLİM DALI

**PRİMER MİYELOFİBROZİS, POLİSİTEMİA VERA
ESANSİYEL TROMBOSİTEMİ HASTALARINDA
MikroRNA EKSPRESYON ANALİZİ**

**Dr. Anıl TOMBAK
UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Naci TİFTİK**

MERSİN-2013



**T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

İÇ HASTALIKLARI HEMATOLOJİ BİLİM DALI

**PRİMER MİYELOFİBROZİS, POLİSİTEMİA VERA
ESANSİYEL TROMBOSİTEMİ HASTALARINDA
MikroRNA EKSPRESYON ANALİZİ**

**Dr. Anıl TOMBAK
UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Naci TİFTİK**

**Bu tez, BAP BAP-TF DTB (AT) 2011-5 TU kodlu proje
olarak, Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Birimi tarafından desteklenmiştir.**

MERSİN-2013

TEŐEKKÜR

Bu tezin hazırlanmasında, çalıŐma sűresi boyunca desteęini esirgemeyen, ilk tanıdıęım gűnden itibaren her zaman yanımda olduęunu bildięim deęerli hocam Prof. Dr. Sayın Naci Tiftik'e en içten teŐekkűrlerimi sunarım.

Yan dal eęitimim sűresince akademik ve manevi anlamda desteklerini esirgemeyen İç Hastalıkları Ana Bilim Dalı'nın tűm űęretim űyelerine, çalıŐma arkadaşlarım Dr. Mehmet Ali Uçar'a, Dr. Aydan Akdeniz'e ve çalıŐmamıza olan katkılarından dolayı ve de dostluęuyla sűrekli yanımızda olduęunu bildięimiz arkadaşım Biyolog Pınar Alp Kirik'e yűrekten teŐekkűr ederim.

Ayrıca, çalıŐmamızın ortaya çıkmasında en bűyűk katkıya sahip olan Tıbbi Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı űęretim űyeleri Prof. Dr. Emin Erdal'a ve Yrd. Doç. Dr. Őzlem İzci Ay'a teŐekkűr ederim.

Tezin istatistiksel verilerinin oluŐturulması aŐamasında desteęini hiç esirgemeyen deęerli arkadaşım Yrd. Doç. Dr. Mehmet Ali Sungur'a teŐekkűrű bir borç bilirim.

Son olarak, benim hematolog olmama vesile olan, yetiŐmemde bűyűk katkıları olan, yakın zamanda kaybettięimiz, ancak űmrűm boyunca bűyűk saygıyla anacaęım ve hatırlayacaęım çok deęerli hocam Prof. Dr. Atilla Yalçın'ı rahmetle anıyorum.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZET	5
İNGİLİZCE ÖZET	6
GİRİŞ VE AMAÇ	7
GENEL BİLGİLER	8
Miyeloproliferatif Hastalıklar	8
Polisitemia Vera	10
Primer Miyelofibrozis	12
Esansiyel Trombositemi	15
MikroRNA	17
Normal Hematopoezde miRNA'lar	21
Lenfoid Diferansiyasyonda miRNA'lar	21
Granülosit ve Monosit Diferansiyasyonunda miRNA'lar	23
Eritroid ve Megakaryositik Diferansiyasyonda miRNA'lar	24
Normal Hematopoezden Malign Hematopoeze miRNA'lar	25
GEREÇ VE YÖNTEMLER	26
Hastalar	26
Yöntemler	26
MiRNA'ların Real-Time PCR-Comparative C _T ($\Delta\Delta C_t$)	
Yöntemi ile Ekspresyon Analizi	26
JAK2V617F (c.1849 G>T, rs77375493) Mutasyonunun	
RT-PCR Yöntemiyle Moleküler Genetik Analizi	27
İstatistiksel Yöntem	29
BULGULAR	30
Demografik Yapı	30
MikroRNA Ekspresyon Analizi	31
TARTIŞMA	38
SONUÇ VE ÖNERİLER	46
KAYNAKLAR	47

	Sayfa No
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	54
ŞEKİLLER VE RESİMLER DİZİNİ	56
TABLolar DİZİNİ	57

ÖZET

MikroRNA'lar, 19-22 nükleotid uzunluğunda küçük RNA molekülleridir. Eskiden fonksiyon görmediği düşünülen bu ufak moleküllerin günümüzde, hücre diferansiyasyonu, proliferasyonu ve apoptoziste önemli kritik roller üstlendiği anlaşılmıştır. MiRNA'ların, gen ekspresyonunun düzenlenmesinde kritik rollerinin olduğu düşünülmektedir. Bu çalışmada, Philadelphia kromozomu (-) miyeloproliferatif hastalıklar (MPH) olan primer miyelofibrozis (PMF), polisitemia vera (PV), esansiyel trombositemi (ET) etiopatogenezinde miRNA'ların rollerinin araştırılarak gelecekte, bu hastalıklarda hedefe yönelik tedavilerin geliştirilmesinde yeni bir kapı aralanması amaçlanmıştır.

Çalışmaya Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji polikliniğine başvuran yeni ve eski tanılı 49 ET, 33 PV ve 22 PMF'li hasta (46 erkek, 58 kadın) ve 40 sağlıklı birey dahil edildi. Hastaların ko-morbiditeleri, kullandıkları ilaçlar (hidroksiüre, anagrelid, interferon) kaydedildi, *JAK2* (+)'likleri belirlendi. Mir155, mir181a, mir221, mir222, mir223, mir451'in ekspresyon düzeyleri RT-PCR cihazı ile $\Delta\Delta CT$ yöntemi kullanılarak analiz edildi. Verilerin istatistiksel analizi, Kruskal Wallis ve Dunn testi ile yapıldı.

Mir155'in her 3 hastalıkta da kontrole göre daha yüksek düzeyde eksprese edildiği ($p<0,05$), mir221'in özellikle ET ve PMF grubunda daha yüksek düzeyde eksprese edildiği ($p<0,05$), mir222'nin PV'de kontrol grubuna göre daha düşük düzeyde ($p<0,05$), ET ve PMF'de ise daha yüksek düzeyde eksprese edildiği, mir223'ün ET ve PMF'de kontrol grubuna göre daha yüksek düzeyde eksprese edildiği ($p<0,05$), mir451'in her 3 hastalık grubunda kontrol grubuna göre daha düşük düzeyde eksprese edildiği ($p<0,05$) saptandı. Mir181a bakımından gruplar arasında fark saptanmadı. *JAK2* (+)'liğinin, ko-morbid hastalıkların, kullanılan ilaçların ve cinsiyetin, miRNA ekspresyonlarında farklılık oluşturmadığı da saptandı.

Belirtilen miRNA'ların ekspresyon farklılıklarının gösterildiği bu çalışmada, bu moleküllerin gelecekte, MPH'lerin ayırıcı tanısında ve tedavi sürecinde ise hedef moleküller olarak kullanılabilceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: MikroRNA, Miyeloproliferatif hastalıklar.

ABSTRACT

MicroRNA Expression Analysis in Patients with Primary Myelofibrosis, Polycythemia Vera and Essential Thrombocythaemia

MicroRNAs are 19-22 nucleotides in length, small RNA molecules. These small molecules are thought as non-functioning molecules in the past, but today it was understood that they have critical roles in cell differentiation, proliferation and apoptosis. It is thought that miRNAs have critical roles in regulating gene expression. In this study, we aimed to open a new door for the development of targeted therapies in Philadelphia chromosome (-) myeloproliferative disorders (MPD) consisting of primary myelofibrosis (PMF), polycythemia vera (PV) and essential thrombocythemia (ET) by researching the roles of miRNAs in the pathogenesis of these diseases.

Forty-nine patients with ET, 33 patients with PV, 22 patients with PMF (46 males, 58 females) and 40 healthy volunteers were included in the study. Co-morbidities and drugs used by patients (hydroxyurea, anagrelide, interferon) were noted. *JAK2* positivity was determined. The expression levels of mir155, mir181a, mir221, mir222, mir223, and mir451 were determined by RT-PCR and analyzed by $\Delta\Delta CT$ method. The statistical analysis of the data was performed by using Kruskal Wallis and Dunn tests.

It was determined that mir155 was expressed in higher levels in all 3 disorders compared to the control group ($p < 0.05$). Mir221 was found in higher levels especially in ET and PMF group ($p < 0.05$). Mir222 expression was found lower in PV patients ($p < 0.05$) and higher in ET and PMF patients compared to control group. Mir223 expression was found higher in ET and PMF group than the control group ($p > 0.05$). Mir451 levels were lower in all 3 groups compared to the control group ($p < 0.05$). Between the groups, there was no difference in expression levels of mir181a. It was also determined that *JAK2* positivity, co-morbidities, drugs used by the patients, and gender did not affect the miRNA expressions.

In this study, we showed the different expression levels of stated miRNAs. In the future, these molecules can be used for the differential diagnosis and as the targeted molecules in the treatment of MPDs.

Key Words: MicroRNA, Myeloproliferative diseases.

GİRİŞ VE AMAÇ

MikroRNA'lar (miRNA), hedef mRNA transkriptlerinde protein translasyonunun inhibisyonu ya da destabilizasyonu yoluyla transkripsiyon sonrası gen ekspresyonunu düzenleyen küçük (19–22 nükleotidli) RNA'lardır ve günümüzde 1.000 civarında miRNA tespit edilmiştir. Eskiden fonksiyon görmediği düşünülen bu ufak moleküllerin günümüzde, hücre diferansiyasyonu, proliferasyonu ve apoptoziste önemli kritik roller üstlendiği anlaşılmıştır. Son dönemlerde miRNA'larla ilgili olarak literatürde, hem benign, hem de malign hematopoezde düzenleyici rol aldıklarına dair sıklığı gittikçe artan sayıda çalışmaya rastlanılmaktadır. Hatta kronik miyeloid lösemi (KML), multiple myeloma gibi hastalıklarda, bu hastalıkların etiyopatogenezleriyle ilişkili olan miRNA'lar, büyük ölçüde belirlenmiştir. MiRNA'larla ilişkili çok sayıda araştırma, aslında günümüzde özellikle malign hastalıklarda, kemoterapi gibi yan etki sıklığı yüksek tedaviler yerine, hedefe yönelik tedavilerin arayışından kaynaklanmaktadır. Literatürde, nispeten nadir görülen primer miyelofibrozis (PMF), polisitemia vera (PV), esansiyel trombositemi (ET) hastalarında, bunların etiyopatogenezlerinde miRNA'ların rolüyle ilgili çok az sayıda çalışma vardır. Oysa günümüzde, bu hastalıklara yönelik mutlak tedaviler belirlenmemiştir ve etiyopatogenezlerini aydınlatacak daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

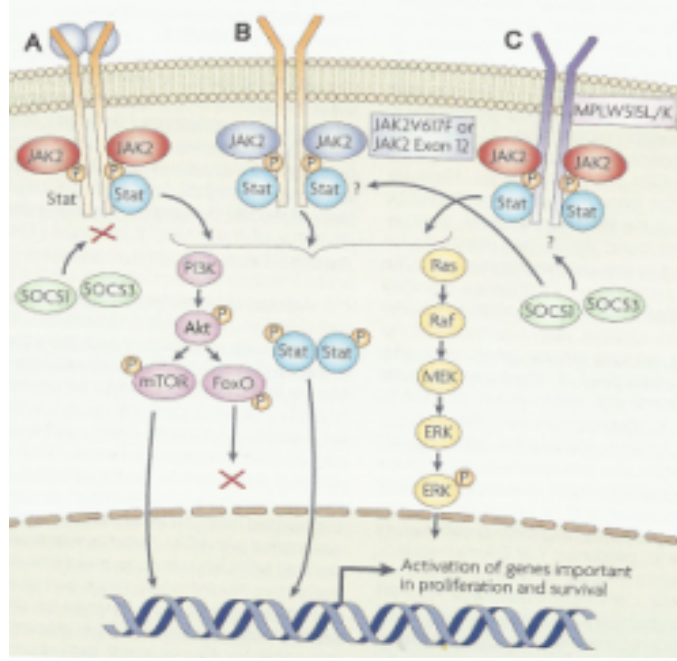
Bu çalışmada, son dönemlerde hem normal hematopoezde, hem de malign hastalıklarda oldukça fazla sayıda araştırma konusu olan miRNA'lardan, hematopoetik dönüşümle ilişkili miR155, miR181, miR221, miR222, miR223 ve miR451'in, Philadelphia kromozomu (-) miyeloproliferatif hastalıklardaki (MPH) rolleri, ekspresyonları ve *JAK2V617F* mutasyonu ile olan ilişkileri araştırılacaktır. Bu hastalıklarla ilişkili miRNA'ların ekspresyon paternlerinin saptanması, bu hastalıkların etiyopatogenezinin aydınlatılmasına ve gelecekte bu alanda yeni ilaç rejimlerinin geliştirilmesine ön ayak olacaktır.

GENEL BİLGİLER

Miyeloproliferatif Hastalıklar:

Miyeloproliferatif hastalıklar/neoplaziler, kronik miyeloproliferatif hastalıkları ve miyelodisplastik/miyeloproliferatif sendromları içerir. Bunlar klonal neoplazilerdir; kemik iliği (Kİ) selüleritesinde artış, olgunlaşmasını tamamlamış hücre grupları ve organomegali ile karakterizedirler. Miyeloproliferatif hastalıkların tanısı ve sınıflandırması için morfolojinin, klinik, hematolojik ve moleküler genetik bulgularla bağlantısı gerekir¹. Miyelodisplastik/miyeloproliferatif sendromların MPH'lerde ayırımında, miyelodisplazinin tanınması önemlidir. MPH grubunda 4 hastalık yer alır: 9;22 translokasyonu ve *BCR/ABL* füzyon proteini ile karakterize KML ile PV, ET ve PMF. Bu KML dışı MPH'lerdeki (PV, ET, PMF) ortak özellik, Janus kinaz 2 (*JAK2*) kinaz'daki aktiv V617F nokta mutasyonudur. *JAK2V617F* mutasyonu, PV'li hastaların hemen hepsinde, PMF'li ve ET'li hastaların ise yaklaşık yarısında saptanmakla beraber, herhangi bir MPH için özgül değildir ve yokluğu, MPH'i ekarte ettirmez. Bu mutasyonun olmadığı az sayıdaki PV hastasında *JAK2* ekzon 12 mutasyonu, az sayıdaki PMF ve ET hastasında ise *MPLW515L* veya *W515K* mutasyonu saptanmıştır. *JAK2* kinaz, hematopoetik çoğalmada önemli bir role sahip sitoplazmik tirozin kinazdır^{2,3}. *JAK2V617F* mutasyonu ile signal transducer and activator of transcription (STAT), mitogen activated protein kinase (MAPK) ve phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) sinyal yollarını sürekli aktive ederek hematopoetik progenitörlerin dönüşümünü ve çoğalmasını uyaran aktif sitoplazmik *JAK2* ortaya çıkar (şekil 1)³.

MPH'lerin geleneksel sınıflaması, hangi hücre grubunun en fazla çoğaldığına (granülositik, eritroid ve megakaryositik), Kİ fibrozisinin derecesine ve klinik, laboratuvar ve sitogenetik/moleküler genetik özelliklerin birleşimine dayanır (tablo 1). Aşırı hücre çoğalması ve etkin hücre olgunlaşması neticesinde, lökositoz, eritrositoz ve/veya trombositoz gelişir. Aşırı hücre birikimine, ekstramedüller hematopoeze veya neoplastik hücrelerle infiltrasyona bağlı hepatosplenomegali gelişir. Başlangıçtaki bu düzensiz hücre çoğalması, indolan olarak ortaya çıkabilirken, fibroziste artma ile son dönem miyelofibrozis ya da blastlarda artış ile aşikar lösemi açığa çıkabilmektedir.



Şekil 1. JAK2 mutasyonu ile JAK2 kinaz aktivasyonunun mekanizması.

A. Normalde; sitokin ligandlarının sitokin reseptörlere bağlanmasıyla JAK2 fosforilasyonu, STAT aktivasyonu ve fosforilasyonu, STAT transkripsiyon faktörlerinin, MAPK sinyal proteinlerinin ve PI3K'nin fosforilasyonu ve aktivasyonu gerçekleşir. **B.** *JAK2V617F* ve *JAK2* ekzon 12 mutant kinazlar, sitokin reseptöre bağlanırlar ve ligand yokluğunda fosforlanarak sinyal yolağının, ligand-bağımsız aktivasyonuna yol açarlar. **C.** *MPLW515L/K* mutant trombopoetin reseptörleri, trombopoetin olmadan wild-tip JAK2 fosforilasyonu yapabilir ve JAK2 sinyal yolağının aktivasyonuna yol açabilir. Normal JAK2 sinyalizasyonunun negatif düzenlenmesi, suppressor of cytokine signaling (SOCS) proteinleri aracılığıyla olurken –en önemlileri SOCS 1 ve SOCS 3–, *JAK2V617F* alleli, negatif geribeslemeden kaçabilir.

Tablo 1. Miyeloproliferatif hastalıklardaki moleküler, morfolojik, laboratuvar ve klinik bulgular (KML: kronik miyeloid lösemi, PV: polisitemia vera, PMF: primer miyelofibrozis, ET: esansiyel trombositemi, EPO: eritropoetin).

Hastalık	Moleküler bulgu	Kan yayması	Kemik iliği	Fibrozis	Splenomegali	Diğer
KML	<i>BCR/ABL</i>	Lökositoz, immatür granülositler, bazofili	Belirgin miyeloid hiperplazi	Değişken	++	
PV	<i>JAK2V617F</i>	Normo-hipokrom anemi, trombositoz, hafif bazofili olabilir	Panmiyelozis ±eritroid hiperplazi, atipik megakaryositik hiperplazi	İleri fazda artış	++	Düşük EPO
PMF	<i>JAK2V617F</i>	Lökoeritroblastik kan tablosu, dakrositler, dev plateletler	Panmiyelozis, atipik megakaryosit hiperplazisi	Fibrotik fazda belirgin	+++	
ET	<i>JAK2V617F</i>	Trombositoz	Atipik megakaryositik hiperplazi	Minimal	-/+	

Polisitemia Vera:

Polisitemia vera, sıklıkla yaşlı erkeklerde görülen, eritrosit hücre üretim artışına ikincil eritrosit hücre kütlelerinde artış ile karakterize klonal bir hastalıktır⁴. Toplam vücut kan hacmi de artmıştır ve sıklıkla lökositoz, trombositoz ve splenomegali vardır. Hastalığın sıklığı 100.000 kişi-yılda 1,9-2,6'dır^{5,6}. Erkeklerde bir miktar daha fazladır; erkek-kadın oranı 1,2-2,2'dir ve yaşlılarda daha fazladır; 60-80 yaşlarında pik yapar⁷.

Hastalığın klinik bulguları, toplam kan hacminin ve kan viskozitesinin artışına bağlı olarak kan akımının azalmasıyla ilişkilidir. Baş ağrısı, baş dönmesi, kulak çınlaması, görme bozuklukları, dispne, yorgunluk gibi belirtiler olabilir. Splenomegaliye bağlı karında dolgunluk ve şişlik hissi fark edilebilir. Ciltte ve konjonktival pletore, hepatomegali, hipertansiyon, eritromelalji, akuajenik pruritis, ayrıca hem arteriyel, hem de venöz trombotik olay gelişebilir.

Hemoglobin konsantrasyonu 18-24 g/dL ve eritrosit sayısı da sıklıkla 7-10 x 10¹² /L'dir. Lökosit sayısı 25 x 10⁹/L ve üzeri olabilir, trombosit sayısı da sıklıkla artmıştır ve sıklıkla 500-1.000 x 10⁹/L arasında bulunur. PV'nin 2 fazı vardır. Proliferatif veya eritrositik fazda tipik olarak eritrosit, lökosit ve platelet sayıları artmıştır⁸. Sola kaymanın olduğu nötrofili sıklıkla gözlemlenir. Platelet sayısı 600 x 10⁹ /L'yi aşabilir. Kemik iliği orta derecede hiperselülerdir ve sıklıkla her 3 serinin de proliferasyonunu görülür. Eritroid seri göreceli olarak artmıştır. Pleomorfik megakaryosit kümeleri göze çarpar; çok küçük ve dev megakaryositler birbirlerine komşu halde görülür. Hastalığın bu evresinde kemik iliği fibrozisi çok az seviyede olabilir. PV'nin postpolisitemik fazında ise, belirgin kemik iliği fibrozisi vardır. PMF'deki gibi lökoeritroblastik kan tablosu görülür.

Hastaların %20-43'ünde sitogenetik anormallik bulunur. En sık trizomi 8, trizomi 9, Y, 5q, 6q, 7q, 11q, 13q, 20q delesyonu gözlemlenir⁹.

Bu hastalarda %95'e varan oranda, 9. kromozomun kısa kolu üzerinde bulunan *JAK2* geninin 617. pozisyonundaki valin'in yerini fenilalanin'in almasıyla gelişen akkiz *JAK2* mutasyonu saptanır (*JAK2V617F*)¹⁰. *JAK2V617F* saptanmayan az sayıdaki PV hastasında ise *JAK2* ekzon 12 mutasyonu saptanabilir³. Hastalıkta tipik olarak eritropoetin seviyesi de azalmıştır¹¹. Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) PV tanı kriterleri, tablo 2'de gösterilmiştir. Tanı için 2 majör, 1 minör veya 1. majör kriter ile 2 minör kriterin birlikteliği gerekir.

Tablo 2. Dünya Sağlık Örgütü polisitemia vera tanı kriterleri.

Majör kriterler
Erkeklerde Hb>18,5 g/dL, kadınlarda Hb>16,5 g/dL ya da kırmızı hücre hacminin artışını gösteren delil
<i>JAK2</i> mutasyonunun varlığı
Minör kriterler
Belirgin eritroid, granülositik ve megakaryositik hiperplazinin olduğu hiperselüler kemik iliği biyopsisi
Azalmış serum eritropoetin seviyesi
In vitro endojen eritroid koloni oluşumu

Tedavi edilmeyen PV hastalarının ortalama yaşam süresi 18 aydır¹². Trombotik ve kardiyovasküler olaylar, en önemli ölüm sebebidir. Yaklaşık %10 PV hastasında, 15 yıl içinde, 20 yılı aşan hastaların ise yaklaşık yarısında akut miyeloid lösemi gelişir¹³. Nadir vakalarda da miyelodisplastik sendrom gelişebilmektedir.

Tedavide eritrosit hücre kütesinin azaltılması amaçlanır. Bu amaçla uygulanan flebotomi, etkin ve ucuz bir yöntemdir. Flebotomi ile demir eksikliği yaratılarak eritropoezis baskılanacaktır. Flebotomi ile hematokrit değerinin erkeklerde 0,42-0,46, kadınlarda ise 0,39-0,42 arasında olması hedeflenmelidir. Ayrıca, düşük doz aspirin tedavisinin trombotik olayları azaltmadaki etkinliği ispatlanmıştır¹⁴.

Alkalan ajan olmayan, kemik iliğini baskılayıcı ajan olan hidroksiüre, günümüzde PV tedavisinde en yaygın kullanılan kemoterapötik ajandır. Eritrosit, lökosit ve platelet sayısını azaltmadaki etkinliği açık şekilde gösterilmiştir¹⁵. Rekombinan human interferon- α 'nın etkinliği de PV'de gösterilmiştir¹⁶. İnterferon çoğu zaman, genç yaşta hastalarda tercih edilmektedir.

Primer Miyelofibrozis:

Primer miyelofibrozis, aynı zamanda miyeloid metaplazili miyelofibrozis, agnojenik miyeloid metaplazi ve kronik idiyopatik miyelofibrozis olarak da bilinir. Sıklıkla yaşlılarda görülür ve lökoeritroblastik kan tablosu, masif splenomegali ve Kİ fibrozisi ile karakterizedir¹⁷. Sıklığı, her 100.000'de 0,4 – 1,5 arasında değişir¹⁸. Patogenezinde, megakaryosit ağırlıklı klonal proliferasyon, reaktif Kİ stromal değişiklikleri ve ekstramedüller hematopoez vardır. Hastaların yaklaşık yarısında akkiz *JAK2V617F* mutasyonu saptanır. Bazı vakalarda ise, trombopoetin reseptör mutasyonu (*MPLW515L*) saptanmıştır^{19,20}. Hastaların %35-61'inde, sitogenetik anormallik saptanabilir; 20q ve 13q delesyonu, der(6)t(1;6)(q21-23;p21.3)¹⁷.

Kemik iliğindeki stromal değişikliklere (kollajen fibrozis, osteoskleroz, anjiyogenezis) en fazla aracılık eden asıl sitokin, megakaryosit kökenli transforme edici büyüme faktörü- β_1 (TGF- β_1) olduğu saptanmıştır²¹. Kemik iliğinde megakaryositlerin artışı ile aşırı miktarda P-selektin salınımı olur ve bu da megakaryositler ile nötrofiller arasında patolojik etkileşimi tetikler. Sonuçta TGF- β , platelet kökenli büyüme faktörü (PDGF), temel fibroblast büyüme faktörü (bFGF), vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), nötrofil kökenli

elastaz ve diğerk proteazlar gibi fibrojenik ve anjiyojenik sitokinler salınır²². Aşırı Kİ stromal reaksiyonu sonucunda çevresel kanda CD34 (+) miyeloid öncül hücreler ve endotelial hücreler artar²³.

Hastalarda tanı anında sıklıkla anemi, belirgin hepatosplenomegali vardır. Yorgunluk, gece terlemeleri, düşük derecede ateş olabilir. Özellikle trombositoz varlığında, trombotik komplikasyonlar veya kanamalar görülebilir²⁴. Hepatosplenomegali, kemik iliği dışı hematopoez ile ilişkilidir ve lenf nodlarında (lenfadenopatiler), plevrada (efüzyon), peritonda (asit), akciğerlerde, paraspinal ve epidural alanlarda da (bası bulguları) olabilir²⁵.

En belirgin çevresel kan yayması bulgusu, lökoeritroblastozis olarak adlandırılan miyelofitizistir (çekirdekli eritrositlerin, metamiyelositlerin, miyelositlerin, miyeloblastların ve megakaryositlerin varlığı). Gözyaşı hücreleri (dakrositler), granülositik sola kayma, dev trombositlerin olduğu trombosit artışı görülebilir. Tanı anında, vakaların 2/3'ünde anemi saptanır. Aynı zamanda, lökositoz, lökopeni, trombositoz, trombositopeni de görülebilir²⁶. Tanısı için Kİ biyopsisi şarttır. Kemik iliği aspirasyonunda sıklıkla örnek gelmez (dry tap). Biyopsi örneği, hem hematoksilen-eosin, hem de retikülin boyası ile boyanmalıdır. Kemik iliği, özellikle fibrozisin daha az olduğu hastalığın erken evresinde, hiperselüler olabilir (prefibrotik dönem). Bu dönemde, megakaryositler artmıştır ve atipik megakaryosit kümeleri belirgindir; farklı boyutlarda megakaryositlerin gevşek veya sıkı kümeleri, anormal nükleo-stoplazmik orana sahip megakaryositler, sıklıkla hiperkromatik, hiperlobule nükleusa sahip megakaryositler görülebilir²⁷. Prefibrotik evre PMF ile ET'nin ayırıcı tanısı çok zor olabilir. Çoğu hasta ise, belirgin miyelofibrozisin olduğu fibrotik evrede tanı alır. Atipik görünümlü megakaryosit kümeleri, fibrotik dönemde de belirgindir. Kemik trabeküllerinde skleroz da gelişir. Baskın olarak T hücrelerden oluşan lenfoid agregatlar da sıklıkla görülür. Tanı kriterleri, tablo 3'te gösterilmiştir. Tanı için 3 majör ve 2 minör kriter gereklidir.

Tablo 3. Dünya Sağlık Örgütü primer miyelofibrozis tanı kriterleri (KML: kronik miyeloid lösemi, PV: polisitemia vera, ET: esansiyel trombositemi, MDS: miyelodisplastik sendrom, MPH: miyeloproliferatif hastalık).

Majör kriterler
Sıklıkla retikülin ve/veya kollajen fibrozisin eşlik ettiği atipik megakaryositik hiperplazi veya fibrozis yokluğunda megakaryositik atipi ve miyeloid hiperplazi ve eritroid hipoplazinin olduğu kemik iliği hiperselüleritesi
PV, KML, MDS ve diğer MPH'lerin Dünya Sağlık Örgütü kriterlerine göre dışlanması
<i>JAK2V617F</i> mutasyonu veya diğer klonal işaretler ya da diğer klonal işaretlerin yokluğunda kemik iliği fibrozisinin inflamatuvar veya diğer neoplastik hastalıklara ikincil gelişmediğinin saptanması
Minör kriterler
Lökoeritroblastozis
Serum laktik dehidrogenaz seviyesinde artış
Anemi
Splenomegali

En önemli ölüm sebepleri, kemik iliği yetmezliğine bağlı anemi, enfeksiyonlar, hemoraji ve akut miyeloid lösemiye dönüşüm ve portal hipertansiyonla ilişkili masif splenomegalidir.

Günümüzde tek kür şansı olan tedavi seçeneği, allojenik kemik iliği naklidir, ancak tedavi ilişkili mortalite ve morbiditeden dolayı belirtisiz, düşük riskli hastalar, tedavisiz takip edilebilir. İlaç tedavisi için endikasyonlar, belirtilerin olduğu anemi ya da diğer sitopeniler, ağrılı splenomegali, belirgin lökositoz ve/veya trombositozdur. Anemi tedavisinde eritropoetin, androjenler, kortikosteroidler, danazol, talidomid ve lenalidomid kullanılabilir. Belirtili splenomegalide, trombositoz ve/veya lökositozda, hidroksiüre tedavisi (günde 3 kez 500 mg) tercih edilmelidir. Belirtilerin olduğu portal hipertansiyon (asit, varis kanaması), ağrılı veya kaşeksiyle ilişkili ve ilaç kullanımına dirençli masif

splenomegali ve sık kan transfüzyonlarının gerekmesi durumunda splenektomi yapılabilir²⁸. Zıt olarak, ciddi trombositopeni, lösemik dönüşümün bir işareti olabilir ve splenektominin bu duruma olumlu katkısı yoktur²⁸. Hepatosplenomegalinin sebep olduğu mekanik konfor bozukluğunu azaltmak için, tutulu alan radyoterapisi uygulanabilir. Lenf nodları, akciğer, vertebra gibi hepatosplenik bölgenin dışındaki ekstramedüller hematopoez odaklarının sebep olduğu mekanik bozukluklar için de tutulu alan radyoterapisi uygulanabilir²⁹. Son dönemlerde, *JAK2* inhibitörleri (ruxolitinib), klinik kullanıma girmiştir.

Esansiyel Trombositemi:

Esansiyel trombositemi, asıl olarak plateletlerde yükselme ile karakterize bir kemik iliği proliferasyonudur ve en sık tanı alan MPH'dir. Sıklığı 0,2 – 2,5/100.000'dir³⁰. Çoğu hasta belirtisiz olduğu için gerçek sıklığı olasılıkla daha fazladır. Tanı anındaki ortalama yaş 57'dir ve kadınlarda bir miktar daha fazla saptanır³¹.

Esansiyel trombositemi, kök hücre kaynaklı bir klonal hastalıktır. Bununla beraber, asıl klonojenik olay, %50 oranında *JAK2V617F* ve %1 oranında *MPLW515LK* adlı 2 GOF mutasyonu saptanmasına rağmen tanımlanmamıştır^{32,33}. Hastalıkta ayrıca, eritroid ve megakaryositik öncül hücrelerin in vitro olarak büyüme faktörlerinden bağımsızlığı da gösterilmiştir. Serum eritropoetin seviyesi azalmış, megakaryosit / platelet Mpl ekspresyonu azalmıştır^{34,35}. Esansiyel trombositemi hastalarında (PV ve PMF hastalarında da), serum trombopoetin düzeyi sıklıkla, normal ya da artmış megakaryosit sayısına rağmen artmış bulunur³⁶.

Klonal miyeloproliferasyona ek olarak, ET, mikrovasküler belirtiler (baş ağrısı, eritromelalji) ile de karakterizedir ve hem kanama, hem de tromboz riski artmıştır³⁷. Anormal trombaksan A₂ üretimi ve küçük damarlarda, platelet-endotelial hücre etkileşimi, tromboza yatkınlık yaratır ve bu durum aspirin tedavisiyle inhibe edilebilir³⁸. Gözlemsel çalışmalar sonucunda da lökositozun, ET'de tromboz gelişimi açısından bağımsız bir risk faktörü olduğu saptanmıştır³⁹. Kanama diyatezi ise asıl, aşırı trombositozu bağımlı gelişen akkiz von Willebrand sendromu ile ilişkilidir. Artmış platelet sayısı ile ilişkili olarak, yüksek moleküler ağırlıklı von Willebrand faktörünün proteolizisi artmaktadır⁴⁰.

Hastaların yaklaşık yarısı, tanı anında belirtisizdir ve trombositoz tesadüfen saptanır. Baş ağrısı, görme bozuklukları, eritromelalji, hemoraji, abdominal ven trombozu, splenomegali saptanabilir⁴¹.

Esansiyel trombositemi tanısı için DSÖ kriterleri tablo 4'te gösterilmiştir. Tanısında, reaktif trombositoz sebepleri ve diğer MPH'ler ekarte edilmelidir. Reaktif trombositoz sebepleri, demir eksikliği, splenektomi, cerrahi, inflamasyon, otoimmün hastalıklar, metastatik kanser ve lenfoproliferatif hastalıklardır. *JAK2* mutasyonu saptanması, reaktif trombositozu ekarte eder. Bununla beraber, ET'yi diğer MPH'lerden ayırmak için diğer kriterler de gereklidir. Çoğu vakada sitogenetik anormallik gösterilememekle beraber, del(20)q, trizomi 8 ve daha bir çok sitogenetik bozukluk rapor edilmiştir.

Tablo 4. Esansiyel trombositemi tanısında Dünya Sağlık Örgütü Kriterleri. Tanı için 4 kriter de olmalıdır (KML: kronik miyeloid lösemi, PV: polisitemia vera, ET: esansiyel trombositemi, PMF: primer miyelofibrozis, MDS: miyelodisplastik sendrom).

Platelet sayısının devamlı olarak $\geq 450 \times 10^9/L$ olması
Kemik iliği biyopsisinde büyük, olgun megakaryosit proliferasyonunun, granülopoeziste veya eritropoeziste belirgin artış olmadan görülmesi
PV, PMF, KML, MDS ve diğer miyeloid neoplazilerin Dünya Sağlık Örgütü kriterlerine göre ekarte edilmesi
<i>JAK2</i> mutasyonunun veya diğer klonal işaretlerin varlığı ya da klonal işaret yoksa reaktif trombositoz sebeplerinin dışlanması

Trombositozda anormal, büyük plateletler eşlik edebilir. Şayet varsa, lökositoz sıklıkla hafif düzeydedir ve belirgin sola kayma ya da KML'de görüldüğü gibi bazofil artışı yoktur. Kemik iliği selüleritesi sıklıkla az miktarda artmıştır ve megakaryosit sayısı artmıştır; gevşek kümeler oluşturmuşlardır veya kemik iliği boyunca dağılmışlardır. Megakaryositler büyük olma eğilimindedir, geniş bir stoplazmaya ve çok loblu nükleusa sahiptirler, reaktif

trombozda ve KML'de görüldenden daha büyüktürler. Miyeloid-eritroid oranı normale yakındır ve Kİ fibrozisi çok azdır.

Tedavide, mikrovasküler belirtileri ve trombotik komplikasyonları önlemek için aspirin gibi antiplatelet ajanlar ve trombohemorajik komplikasyonları önlemek için de hidroksiüre, interferon- α , anagrelide gibi ilaçlar kullanılır⁴².

Akut lösemiye dönüşüm, hastaların $\leq 5\%$ 'inde görülür³¹.

MikroRNA:

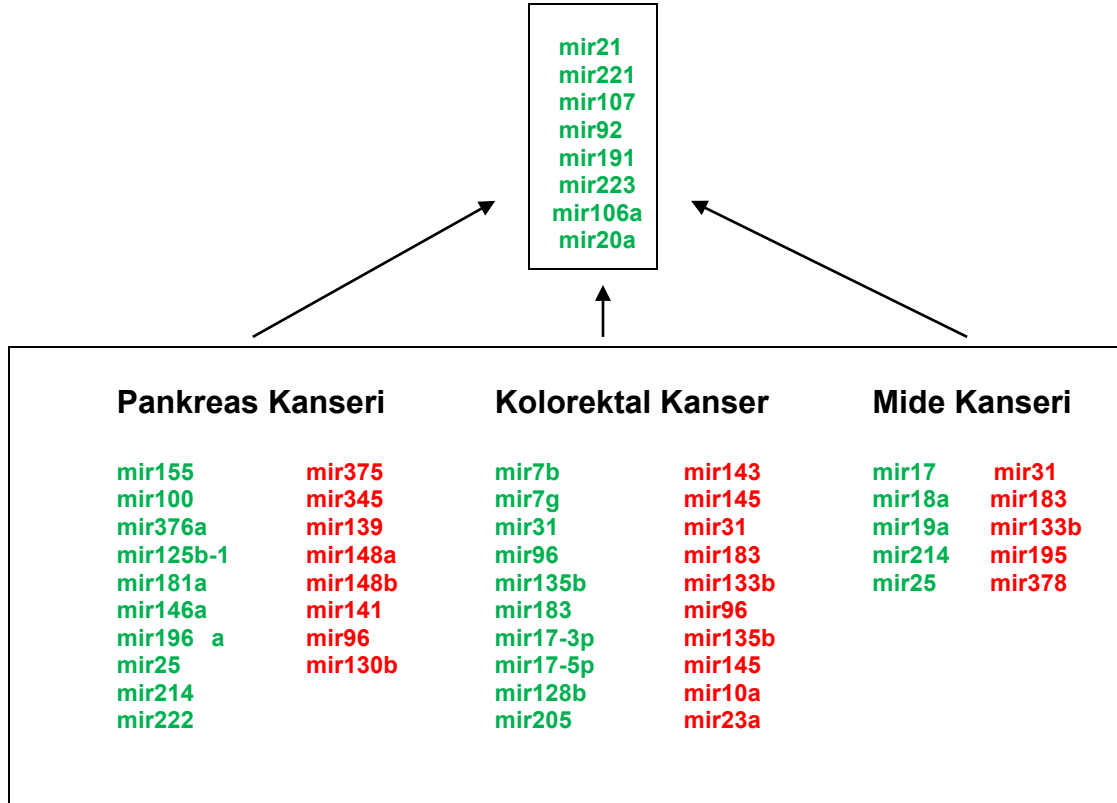
MikroRNA'lar, hedef mRNA transkriptlerinde protein translasyonunun inhibisyonu ya da destabilizasyonu yoluyla transkripsiyon sonrası gen ekspresyonunu düzenleyen küçük (19–24 nükleotidli) RNA'lardır ve günümüzde 1.000 civarında miRNA tespit edilmiştir, ancak sayılarının 2.000 ve hatta daha fazla olduğu tahmin edilmektedir⁴³. İlk miRNA olan lin-4, *Caenorhabditis elegans*'tan, 1993 yılında izole edilmiştir⁴⁴. İlk miRNA terimi ise, 2001 yılından itibaren kullanılmaya başlanmıştır. Eskiden, fonksiyon görmediği düşünülen bu ufak moleküllerin günümüzde, hücre diferansiyasyonu, proliferasyonu ve apoptoziste önemli kritik roller üstlendiği anlaşılmıştır. Son dönemlerde mikroRNA'larla ilgili olarak literatürde, hem benign, hem de malign hematopoezde düzenleyici rol aldıklarına dair sıklığı gittikçe artan sayıda çalışmaya rastlanılmaktadır. Mir155 ekspresyonunun romatoid artritte arttığı, mir146a ekspresyonunun psöriasisinde arttığı, mir17-92 kümesinin ekspresyonunun primer biliyer sirozda, sistemik lupus eritematozusta, immün trombositopenide arttığı, mir383 ekspresyonunun, sistemik lupus eritematozusta, immün trombositopenide azaldığı gösterilmiştir. Kronik miyeloid lösemi, multiple myeloma gibi hematolojik malignitelerde, bu hastalıkların etiyopatogeneziyle ilişkili olan miRNA'lar, büyük ölçüde belirlenmiştir (tablo 5)^{45,46,47}. Şekil 2'de de pankreas, kolorektal ve mide kanserlerinde miRNA ekspresyon profilleri görülmektedir.

MiRNA'larla ilişkili çok sayıda araştırma, aslında günümüzde özellikle malign hastalıklarda, kemoterapi gibi yan etki sıklığı yüksek tedaviler yerine, hedefe yönelik tedavilerin arayışından kaynaklanmaktadır.

Çoğu insan miRNA'sı, protein kodlayan genlerin içinde ve mRNA benzeri kodlamayan RNA'ların intronları ile ekzonları içinde kodlanır⁴⁵. MiRNA'ların biyosentezi nükleusta başlar ve stoplazmada tamamlanır⁴⁶. RNA polimeraz II tarafından, uzun, poliadenile birincil prekürsörler (pri-miRNA), nükleusta

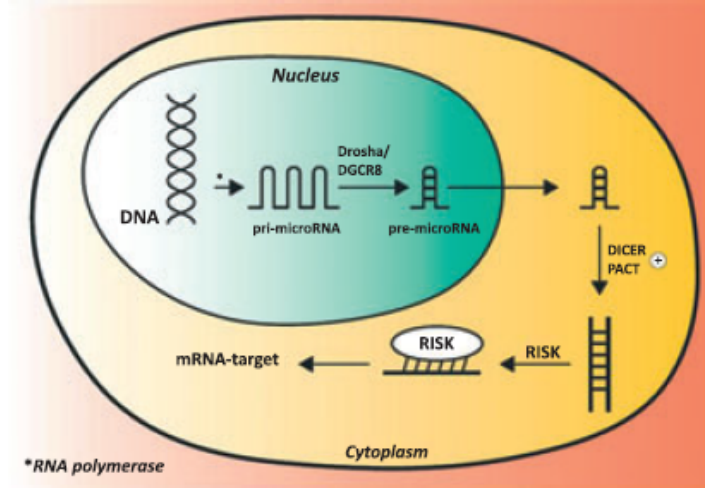
Tablo 5. Hematolojik malignitelerde miRNA'lar (AML: akut miyeloid lösemi, APL: akut promiyelositik lösemi, ALL: akut lenfositik lösemi, DLBCL: diffüz büyük B hücreli lenfoma, HL: Hodgkin lenfoma, KLL: kronik lenfositik lösemi, KML: kronik miyeloid lösemi, MCL: mantle hücreli lenfoma, MM: multipl miyelom, UR: up-regüle, DR: down-regüle, OG: onkogen, TSG: tümör süpresör gen, TCL-1: T-hücreli lösemi/lenfoma).

	MiRNA	Durum	Görev	Hedef
Lenfomalar				
HL	Mir155	UR	OG	PU.1
	Mir9	UR	OG	PRDM1/BLIMP1
DLBCL	Mir155	UR	OG	PU.1, SHIP1
	Mir15a	DR	TSG	BCL-2
	Mir21	UR	OG	BCL-2
	Mir221	UR	OG	E2F1
MCL	Mir17-92	UR	OG	E2F1
Lösemiler				
AML	Mir181a	M1,M2'de UR M4,M5'te DR	OG/TSG	TCL-1
APL	Mir15a, 16-1	UR	TSG	BCL-2
	Mir181b	DR		
ALL	Mir17-92	UR	OG	BIM
	Mir128b	UR		
	Mir204	UR		
KLL	Mir15a	DR	TSG	BCL-2
	Mir16-1	DR	TSG	BCL-2
	Mir29b	DR	TSG	TCL-1
	Mir181b	DR	TSG	TCL-1
	Mir155	UR	OG	
KML	Mir203	DR	TSG	ABL-1
	Mir17-92	DR	OG	
MM	Mir15a, 16	DR	TSG	



Şekil 2. Pankreas, kolorektal ve mide kanserlerinde miRNA ekspresyon profilleri (yeşil; her kanser tipi için up-regüle miRNA'lar, kırmızı; her kanser tipi için down-regüle miRNA'lar, en üst; her 2 kanser tipi için up-regüle miRNA'lar).

transkibe edilirler, sonrasında Drosha tarafından (bir nükleer RNase III) 70-100 nükleotidli prekürsöre (pre-miRNA) yıkılırlar. Pre-miRNA'lar stoplazmaya çıkar ve TRBP (transactivation-responsive RNA-binding protein) ve PACT denilen dsDNA-bağlayıcı proteinle ilişkili Dicer (bir başka RNase III) tarafından 19-24 nükleotidli miRNA dubleksine yıkılırlar. Bir protein kompleksi olan RISC (RNA-induced silencing complex), dubleke bağlanır. RISC'e bağlı miRNA kompleks dizisi, olgun miRNA'yı temsil eder ve RISC'i, hedef mRNA'ya taşır (şekil 3)⁴⁷. Protein kodlayan mRNA'ların 3'-untranslated bölgesindeki (UTR) hedef bölgeyi tanırlar ve hedef transkripte 2-8. nükleotidleri ile bağlanırlar. Sonuçta, posttranskripsiyonal baskılanmaya ve/veya mRNA degradasyonuna yol açarlar⁴³.



Şekil 3. miRNA sentezi.

Her hücre tipi, özgül bir miRNA profiline sahip gözükmektedir. Her miRNA, bir ya da daha fazla hedef transkriptte sahip olabilirken, her transkript bir veya daha çok miRNA tarafından düzenlenebilir. Her insan miRNA'sı da, yaklaşık 1000 veya daha fazla mRNA ekspresyonunu düzenleyebilir. MiRNA'lar, dokuya özgül olup, insanlarda bütün hücre tiplerinde bulunurlar ve farklı hücre tiplerinde farklı miRNA'lar eksprese edilmektedir. Örneğin, miRNA1 kalp, miRNA122 karaciğer için özgüldür. MiRNA'lar, insan protein ekspresyonunda görevli oldukça fazla sayıdaki yolağa katılır⁴⁷. İnsan genlerinin 1/3'ünden fazlası miRNA'ların varsayılan hedefidir. Böylece, her hücre tipinde bulunan miRNA'ların tekli birleşimleri, binlerce mRNA hedefini gerektirir⁴³. MiRNA'ları kodlayan genlerin çoğu, paralog denilen çeşitli izoformlara sahiptir; bunlar gen duplikasyonu yoluyla üretilir. Paraloglar sıklıkla aynı mRNA hedeflerine bağlanır, ancak ekspresyonları dokuya özgül olduğu için sıklıkla in vivo olarak değişik fonksiyonel rollere sahiptirler⁴³.

MiRNA'lar, hematopoetik dönüşümün hemen her evresinde rol alır ve bu nedenle normal hematopoezde çok önemli roller üstlenirler. Anormal ekspresyonları ise, hematolojik maligniteler dahil, birçok malign hastalık ile ilişkilidir. Onkogen ve tümör baskılayıcı olarak rol alabilirler. Tümör oluşumunda; hedef transkriptlerinin ekspresyonunu baskılayarak ya da degradasyonunu indükleyerek hedef mRNA tarafından kodlanan protein miktarının azalmasına yol açarlar. Onkojenik miRNA'lar, tümör baskılayıcı mRNA'ların ekspresyonunu baskılar. Onkojenik miRNA'ların seviyesinin artmasıyla tümör baskılayıcı

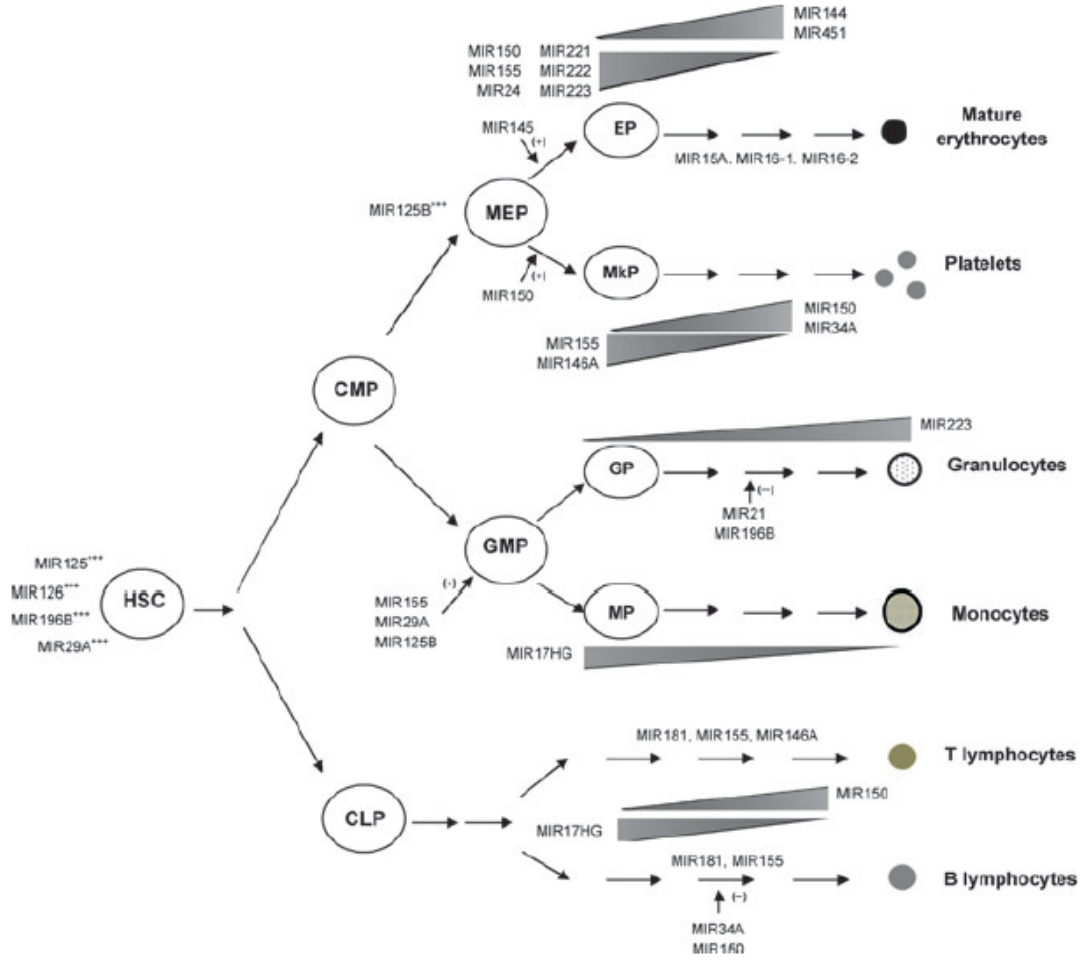
proteinlerin salınımı baskılanır, hücre çoğalması artar ve hücre ölümü inhibe olur. Diğer yandan, tümör baskılayıcı miRNA'lar, onkoproteinleri kodlayan mRNA'ları hedef alır; seviyelerinin azalmasıyla hücrenin onkoproteinlerle ilişkili yaşam süresi uzar ve hücre çoğalması artar⁴⁷. MiRNA'lar, tümör gelişimine direk olarak katkıda bulunabilir. Constinean ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, mir155'in aşırı eksprese edildiği transgenik sıçanda, B hücreli malignensi geliştiği gösterilmiştir ve sadece bu miRNA'nın aşırı ekspresyonunun, tümör gelişimi için yeterli olduğu görülmüştür⁴⁸. Bu veriler, onkogenenezdeki karmaşık yolların anlaşılmasında, miRNA'ların yararlı moleküller olacağını düşündürmektedir.

Normal Hematopoezde miRNA'lar:

MiRNA'lar, hematopoezin hemen her evresinde kritik rollere üstlenirler. Örneğin mir150 ve mir155, B ve T lenfosit diferansiyasyonunu kontrol eder, mir221 ve mir222, c-KIT'yi hedef alarak eritroid diferansiyasyonu bloke eder, mir223, granülopoezisi indükler (şekil 4)⁴⁹⁻⁵¹.

Lenfoid Diferansiyasyonda miRNA'lar:

MiRNA'lar ile hematopoezisin ilişkisini gösteren ilk çalışma, 2004 yılında yayınlanmıştır. Bu yayında Chen ve arkadaşları, sıçan kemik iliğinden 150 miRNA'yı klonlamıştır ve mir181'in, mir223'ün ve mir142'nin baskın olarak hematopoetik hücrelerde eksprese edildiğini, mir181'in ise özellikle kemik iliğinin B-lenfoid hücrelerinde yüksek miktarlarda eksprese edildiğini göstermiştir. Hematopoetik kök hücrelerde mir181'in ektopik ekspresyonu, in vivo ve in vitro olarak, B- lenfoid hücrelerin miktarında artışla sonuçlanmıştır. Ek olarak, mir223 ve mir142'nin, miyeloid hücrelerde de yüksek miktarda eksprese edildiği görülmüştür. Bununla beraber, bu 2 miRNA'nın ektopik ekspresyonu, beklenenin aksine, B veya miyeloid hücrelerde değil, T hücrelerin miktarında artışla ilişkili bulunmuştur⁵². Diğer yandan başka bir çalışmada, mir142, mir181, mir223 ve mir155'in insan ve fare hematopoetik hücrelerindeki ekspresyon biçimleri farklı bulunmuştur⁵³. Bu nedenle hayvan çalışmalarının sonuçlarının insanlarda yorumlanması çok dikkatli yapılmalıdır.



Şekil 4. Normal hematopoezde miRNA ekspresyonu (HSC: hematopoetik kök hücre, CMP: common miyeloid progenitör, CLP: common lenfoid progenitor, MEP: megakaryosit-eritrosit progenitör, GMP: granülosit-monosit progenitör, EP: eritroid progenitör, MkP: megakaryosit progenitör, GP: granülosit progenitör, MP: monosit progenitör).

Hematopoeziste mir150, çok önemlidir. Asıl, olgun T ve B lenfositlerde (öncüllerinde değil) eksprese olur. Sıçan hematopoetik dokusunda, B ve T hücre olgunlaşması esnasında ekspresyonu artar, olgun T lenfositlerin Th₁ ve Th₂ hücrelere dönüşümü esnasında ise azalır⁵⁴. Hematopoetik kök hücrelerde ektopik mir150 ekspresyonu, dolaşımında, dalakta, lenf nodlarında, T hücre ve miyeloid hücre seviyelerini çok az etkileyerek olgun B lenfosit miktarını azaltır. Mir150 aynı zamanda, B hücre olgunlaşması esnasında, pro-B lenfositlerin, pre-B hücrelere dönüşümünü baskılar⁴⁹. Mir150'nin, lenfosit gelişimini kontrol eden bir transkripsiyon faktörü olan c-MYB'yi hedef aldığı gösterilmiştir. Mir150 asıl,

olgun B lenfositlerde eksprese edilir (öncüllerinde değil), c-MYB ise asıl, lenfosit öncüllerinde eksprese edilir ve olgun hücrelerde ekspresyonu baskılanır. Mir150, direk olarak mRNA'sına bağlanarak c-MYB'yi baskılar ve dolayısıyla da protein ekspresyonunu kontrol altında tutar⁵⁵.

Lenfoid hücre dönüşümünde diğer bir önemli miRNA, mir155'tir. Mir155'in yüksek seviyeleri, aktif B ve T lenfositlerde ve aktif monositlerde bulunur⁵⁶. Mir155, sitokin üretimini etkileyerek germinal merkez reaksiyonunu ve T-yardımcı hücre dönüşümünü düzenler⁵⁷.

Georgantas ve arkadaşları, kemik iliği ve çevresel kandaki insan kök-progenitör hücrelerinde eksprese edilen 33 adet miRNA buldular. Otörler, bu sonuçları, insan kök-progenitör hücrelerdeki mRNA ekspresyon verileri ile ve miRNA-mRNA hedef tespit verileri ile birleştirecek biyoinformatik teknikleri kullanarak miRNA-mRNA etkileşim veri tabanını yarattılar (Transcriptome Interaction Database). Sonra da hematopoez kontrolü için bir miRNA modeli oluşturdular. Bu modele göre, mir181 ve mir128, tüm hematopoetik serinin diferansiyasyonunu inhibe ederken, mir146, multipotent progenitör hücrenin genel lenfoid öncül hücrelere diferansiyasyonunu inhibe eder⁵⁸.

Granülosit ve Monosit Diferansiyasyonunda miRNA'lar:

Mir223, miyeloid diferansiyasyonda önemli roller üstlenir. Fazi ve arkadaşları, akut promiyelositik lösemi hücrelerinde (APL) miyeloid diferansiyasyonu araştırmışlardır ve farelerde mir223'ün, granülopoezisi, transkripsiyon faktörleri "negatif nükleer faktör IA (NFIA) ve CCAAT/enhancer binding protein a (CEBPA)" ile ilişkili olarak arttırdığını bulmuşlardır. Her 2 transkripsiyon faktörü de mir223 promotere bağlanabilir. NFIA, mir223 ekspresyonunu baskımlarken, CEBPA artırır. APL hücrelerinin retinoik asit ile tedavisi, NFIA'nın yerini CEBPA'nın alması, mir223 ekspresyonunun artması ve granülositik diferansiyasyonun çoğalması ile sonuçlanmıştır. Mir223'ün, NFIA translasyonunu inhibe ettiği ve granülositik diferansiyasyonu kolaylaştırdığı bulunmuştur⁵⁹.

Fontana ve arkadaşları, monositik diferansiyasyon ve olgunlaşmada, mir17-5p, mir20a ve mir106a'yı araştırmışlardır. Monositik hücre kültüründe, bu miRNA ekspresyonlarının azaldığını, M-CSFR transkripsiyonunu (M-CSF reseptör) indükleyen akut miyeloid lösemi 1 (AML-1) transkripsiyon faktörünün ise protein düzeyinde artarken, mRNA seviyesinde artmadığını bulmuşlardır.

Mir17-5p, mir20a ve mir106a ile transfeksiyon, AML-1 protein ekspresyonunda zıt yönde etki göstermiştir ve blast proliferasyonu artarken, monositik diferansiyasyon ve olgunlaşma, inhibe olmuştur. Bu miRNA'lar, AML-1'i hedef alır. Ek olarak, AML-1, mir17-5p-92 ve mir106a-92 demetlerinin promoterine bağlanır ve negatif geri besleme ile mir17-5p-20a-106a ekspresyonunu inhibe eder. Bu da monositopoezisin, mir17-5p, mir20a, mir106a, AML-1 ve M-CSF'yi içeren devreler sistemiyle kontrol edildiğini işaret eder⁶⁰.

Mir155, mir24a ve mir17, multipotent progenitör hücrelerin, genel miyeloid progenitörlere olan diferansiyasyonunu inhibe edebilirken, mir16, mir103 ve mir107, genel miyeloid progenitör hücrelerin granülosit-makrofaj progenitörlerine olan diferansiyasyonunu inhibe edebilir⁵⁸.

Eritroid ve Megakaryositik Diferansiyasyonda miRNA'lar:

Eritroid diferansiyasyonu ve olgunlaşması esnasında mir221 ve mir222 ekspresyonu baskılanır. Bu iki miRNA'nın 5' ucundaki ilk sekiz nükleotid aynıdır; bu da bu miRNA'ların aynı hedef olan KIT reseptörüne bağlandığını düşündürür. KIT reseptörü, hematopoetik hücrelerin çoğalmasının kontrolünde, anahtar bir faktördür. Mir221 ve mir222'nin ekspresyonlarının azalması, olasılıkla eritroblastların ekspansiyonu ile sonuçlanan KIT ekspresyon blokajı yapar⁶¹.

Normal eritropoez esnasında, mir150, mir155, mir221 ve mir222 ekspresyonu ilerleyici olarak azalır, mir451 (eritroid hücrelere özgüdür), mir144 ve mir16 (retikülositlerde) ekspresyonu artar, mir339 ve mir378 ekspresyonu ise bifazik patern gösterir⁶². Mir155 de, eritroid ve miyeloid koloni oluşumunu baskılar⁵⁸. Son dönemlerde mir223'ün de eritroid olgunlaşmayı kontrol ettiği saptanmıştır. Eritroid serinin progenitör ve prekürsör hücrelerinde ekspresyonunun azalması, eritroid olgunlaşması için gereklidir. Mir223'ün ekspresyon seviyesi, hematopoetik diferansiyasyonda kritik rollere sahip bir protein olan LIM-only protein 2 (LMO2, RBNT2) seviyesi ile ters orantılıdır. Mir223, LMO2 proteininin 3'-UTR bölgesine bağlanarak, bu proteini baskılar ve eritroid hücrelerin diferansiyasyonu ve maturasyonu inhibe olur⁶³.

MiRNA'lar, megakaryosit olgunlaşmasında da önemli roller üstlenir. Garzon ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, *in vitro* ortamda, CD34+ progenitör hücrelerden megakaryositlerin diferansiyasyonu esnasında 20 miRNA'nın ekspresyonunun (mir10a, mir126, mir106, mir10b, mir17 ve mir20)

azaldığını göstermişlerdir. Aynı zamanda megakaryopoezde, mir130a'nın GPIIB promotörünün (platelet fizyolojisinde anahtar protein) aktivasyonunda rol alan MAFB transkripsiyon faktörünü hedef aldığını ve mir10a'nın da HOXA1'i hedef aldığını göstermişlerdir. Bu iki gen, megakaryopoezde aşırı miktarda eksprese edilir, bu da miRNA'ların ekspresyonlarının azalmasıyla, bu genlerin okunmasının arttığını akla getirmektedir⁶⁴.

Transkripsiyon faktörü RUNX1'in (AML1 proteini olarak da bilinir), erken hematopoez sırasında miktarı artar ve mir27a'nın ekspresyonunu artırır. Megakaryositik serinin dönüşümü esnasında mir27a, RUNX1 ekspresyonunu geri besleme ile negatif yönde düzenler⁶⁵.

Normal Hematopoezden Malign Hematopoeze miRNA'lar:

Günümüzde, hematolojik malignitelerde miRNA'ların direk rollerini işaret eden çok az sayıda çalışma olmakla beraber, normal hematopoezde ve hematolojik malignitelerde miRNA'ların rollerini araştıran çalışmaların sayısı gitgide artmaktadır. Örneğin; mir155, germinal merkez reaksiyonlarını düzenler ve sıçanlarda B hücreli malignensilerle ilişkili bulunmuştur^{66,67}. Ek olarak mir155 ekspresyonunun diffüz büyük B hücreli lenfomada, kronik lenfositik lösemide, Hodgkin lenfomada artmasının, bu miRNA'nın lenfomageneziste önemli bir rol üstlendiğini işaret eder^{68,69}. Mir155, miyelopoeziste de düzenleyici olarak rol alır; miyeloid ve eritroid diferansiyasyonu baskılar⁵⁸. Diğer yandan, sıçanlarda aşırı ekspresyonunun MPH ile sonuçlandığı ve eritroid/megakaryositik seride azalma ile ilişkili olduğu gösterilmiştir⁷⁰. Bu verilere göre mir155, çeşitli şekillerde etkindir, aşırı salınımı ise, miyeloid ve lenfoid malignitelerle ilişkilidir.

Literatürde, nispeten nadir görülen ET, PMF ve PV'nin etiyopatogenezinde miRNA'ların rolüyle ilgili çok az sayıda çalışma vardır. Oysa günümüzde, bu hastalıklara yönelik mutlak tedaviler belirlenmemiştir ve etiyopatogenezlerini aydınlatacak daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Hastalar:

Mersin Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından “BAP-TF DTB (AT) 2011-5 TU” kodlu proje olarak desteklenen ve Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından onaylanan, “Primer Miyelofibrozis, Esansiyel Trombositemi ve Polisitemia Vera Hastalarında mikroRNA Ekspresyon Analizi” isimli çalışmaya, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi İç Hastalıkları Hematoloji Bilim Dalı’nda takip edilmekte olan ve tanıları DSÖ 2008 kriterlerine göre konulmuş olan PV, PMF ve ET hastaları ile herhangi bir ko-morbid hastalığı olmayan sağlıklı bireyler kontrol grubu olarak çalışmaya alındı. Buna göre; toplam 33 PV, 22 PMF ve 49 ET hastasından alınan kan örnekleri ile kontrol grubu olarak da 40 sağlıklı bireyden alınan kan örnekleri çalışıldı. Hem hasta, hem de kontrol grubunu oluşturan bireylere ait bilgiler, etik kurul tarafından uygun görülen aydınlatılmış onam formları kullanılarak alındı.

Yöntemler:

Çalışmada; hastalara ait kan örneklerinde, *JAK2V617F* mutasyonu araştırılırken, bunun yanında hem hasta, hem de kontrol grubuna ait kan örneklerinde, mir155, mir181a, mir221, mir222, mir223 ve mir451 ekspresyon düzeyleri analiz edildi.

MiRNA’ların Real-Time PCR-Comparative C_T ($\Delta\Delta C_t$) Yöntemi ile Ekspresyon Analizi:

Çalışmaya dahil olmayı kabul eden her bireyin onayı alındıktan sonra, 4-5 ml çevresel kan alınarak 1 ml, %2’lik EDTA içeren santrifüj tüplerine konuldu. Bu örneklerinden RNA izolasyonu, “Single Step Asit Guanidinyum-Fenol-Kloroform Yöntemi (AGPC)” ile manuel olarak yapıldı⁷¹. Elde edilen RNA’lardan cDNA oluşturulması ve mikroRNA ekspresyon düzeylerinin belirlenmesinde “Taqman MicroRNA Assay Human (Applied Biosystems) Kitleri” kullanıldı.

MiRNA (hsa-miR155, hsa-miR181a, hsa-miR221, hsa-miR222, hsa-miR223 ve hsa-miR451) ekspresyon düzeyleri, Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction [qRT-PCR]) yöntemiyle “Comparative C_T ($\Delta\Delta C_t$)” analizi yapılarak belirlendi. qRT-PCR yönteminde amaç, endojen bir kontrol ve referans eşliğinde analiz edilecek örneklerin karşılaştırmalı olarak ifadesinin tesbit edilmesidir. Bu yüzden,

endojen kontrol mikroRNA olarak hsa-miR26b kullanıldı. Referans olarak ise standart bir RNA'dan (TaqMan Control, Human RNA 50ng/µl, Applied Biosystems) hazırlanan cDNA referans örnek olarak kullanıldı.

RT-PCR reaksiyon ortamını, total 20 µl olacak şekilde hazırlandı:

- a) 10 µl, 2X TaqMan Master Mix (Applied Biosystems)
- b) 1 µl, TaqMan MicroRNA Assay Human Assay Mix (Applied Biosystems Foster City, CA, TaqMan MicroRNA ekspresyon Sistemine göre üretilen bir çift 900 nmol primer ve 200nmol FAM işaretli MGB prop içeren karışım)
- c) 5 µl cDNA örneği (30 ng)
- d) 4 µl Distile Su

RT-PCR Reaksiyon Şartları:

- 50°C'de 2 dakika ön inkübasyon (1 döngü)
95°C'de 10 dakika aktivasyon (1 döngü)
95°C'de 15 saniye denatürasyon (40 döngü)
60°C'de 1 dakika bağlanma/uzama (40 döngü)

RT-PCR işlemi ve kantitasyon "ABI Prism 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems)" cihazı ve "7500 Software; SDS 2.0.6 software for 7500 Real Time PCR Product (Applied Biosystems)" programı kullanılarak gerçekleştirildi.

JAK2V617F (c.1849 G>T, rs77375493) Mutasyonunun RT-PCR

Yöntemiyle Moleküler Genetik Analizi:

DNA İzolasyonu:

Hasta ve kontrol bireylerine ait EDTA'lı tüplere alınmış periferik kandan, tuz çöktürme yöntemi kullanılarak DNA'lar elde edildi (Miller 1988).

Genotiplerin Belirlenmesi:

JAK2 geni V617F (c.1849 G>T, rs77375493) Mutasyonu için primerler ve TaqMan problemleri, Primer Express 3.0 (Applied Biosystems) programı kullanılarak, İnsan COMT genine ait NG_009904.1 dizisinden oluşturuldu. *JAK2* geni V617F (c.1849 G>T, rs77375493) mutasyonuna ait genotipler, "Metabion International AG, D-82152 Martinsried/Deutschland" tarafından sentezlenen bir çift 900 nmol primer (*JAK2*-F 5'-AAGCTTTCTCACAAGCATTGGTTT-3' ve *JAK2*-R 5'-AGAAAGGCATTAGAAAGCCTGTAGTT-3') ve bir çift 200nmol TaqMan prop (*JAK2*-PrWT; 5'-Yakima Yellow T(pdC)T(pdC)CA(pdC)AGACA(pdC)ATA(pdC)TC- BHQ-1-3' ve *JAK2*-PrMU; 5'-FAM-TC(pdC)A(pdC)AGAAA(pdC)ATA(pdC)TC(pdC)AT- BHQ-1-3') kullanılarak RT-PCR yöntemiyle belirlendi.

RT-PCR reaksiyon ortamı (total 25 µl):

12.5 µl, 2X TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems)

2.5 µl, 900 nmol primer (*JAK2*-F)

2.5 µl, 900 nmol primer (*JAK2*-R)

0.4 µl, 200nmol Yakima Yellow işaretli prop (*JAK2*-PrWT)

0.4 µl, 200nmol FAM işaretli prop (*JAK2*-PrMU)

4.2 µl Distile Su

2.5 µl DNA örneği (30 ng)

RT-PCR reaksiyon Şartları:

50°C'de 2 dakika ön inkübasyon (1 döngü)

95°C'de 10 dakika aktivasyon (1 döngü)

95°C'de 15 saniye denatürasyon (40 döngü)

60°C'de 1 dakika bağlanma/uzama (40 döngü)

RT-PCR işlemi ve genotiplerin belirlenmesi "ABI Prism 7500 RT-PCR System (Applied Biosystems)" cihazı ve "SDS 2.0.3 software for allelic discrimination (Applied Biosystems)" programı kullanılarak gerçekleştirildi⁷².

İstatistiksel Yöntem:

Hasta gruplarında miRNA ekspresyonları bakımından kontrol grupları ve hastalıkların karşılaştırılmasında Kruskal-Wallis H test kullanılmıştır. Her hastalık için bireylerin miRNA değerlerinin JAK, cinsiyet ve komorbidite bakımından karşılaştırılmasında Mann-Whitney U test, ilaç kullanımı bakımından karşılaştırılmasında ise Kruskal-Wallis H test kullanılmıştır. Anlamli farklılık gösteren alt grupların belirlenmesi için Dunn post-hoc testinden yararlanılmıştır. miRNA düzeyleri ortanca [%25-%75] şeklinde özetlenmiştir.

İstatistik analizler SPSS v.11.5 ve Statistica v.6.1 paket programları ile yapılmıştır. İstatistik analizlerde $p < 0,05$ ise sonuçlar anlamlı kabul edilmiştir.

BULGULAR

Demografik Yapı:

Bu çalışmaya; 49 ET, 33 PV ve 22 PMF hastası dahil edilmiştir. ET hastalarının %46,9'u (n:23) erkek, %53,1'i (n:26) kadın, PV hastalarının %42,4'ü (n:14) erkek, %57,6'sı (n:19) kadın, PMF hastalarının ise %40,9'u (n:9) erkek, %59,1'i (n:13) kadın idi. Esansiyel trombositemi hastalarının ortalama yaşı $60,9 \pm 15,32$, PV hastalarının $59,88 \pm 14,74$, PMF hastalarının ise $54,82 \pm 16,56$ idi. Araştırmaya dahil edilen 40 sağlıklı bireyin %50'si (n:20) erkek, %50'si (n:20) kadın ve yaş ortalamaları $49,45 \pm 9,33$ idi.

Esansiyel trombositemili hastaların %34,7'sinde (n:17), PV'li hastaların %45,5'inde (n:15), PMF'li hastaların ise %36,4'ünde (n:8) eşlik eden ek bir hastalık vardı. Bunlar; hipertansiyon (n:14), tip 2 diabetes mellitus (n:9), koroner arter hastalığı (n:5), kalp yetmezliği (n:3), kronik böbrek hastalığı (n:3), kronik HCV taşıyıcılığı (n:2), Parkinson hastalığı (n:2), HCV'ye bağlı karaciğer sirozu (n:1) ve pemfigus (n:1) idi.

Vakaların çalışmaya dahil edildikleri esnada %47,1'i (n:49) yeni tanı hastalar olduğu ya da gerek görülmediği için birincil hastalıkları ile ilgili bir ilaç kullanmıyorken, %42,3'ü (n:44) hidroksiüre, %7,7'si (n:8) anagrelid, %2,9'u (n:3) ise interferon- α 2a kullanıyordu (tablo 6).

Tablo 6. Miyeloproliferatif hastalık için kullanılan ilaçlar.

			TANI			Toplam
			PV	ET	PMF	
İlaç	yok	n	8	28	13	49
		%	24,2%	57,1%	59,1%	47,1%
	anagrelid	n	0	7	1	8
		%	,0%	14,3%	4,5%	7,7%
	hidroksiüre	n	23	13	8	44
		%	69,7%	26,5%	36,4%	42,3%
	interferon-2a	n	2	1	0	3
		%	6,1%	2,0%	,0%	2,9%
Toplam		n	33	49	22	104

JAK2V617F mutasyonu, vakaların %55,8'inde (n:53) saptanmazken (NN), %44,2'sinde (n:42) ise heterozigot (+) (NM) bulundu (tablo 7). Dokuz hastada ise *JAK2V617F* mutasyonu analizi yapılamadı.

Tablo 7. Hastaların *JAKV617F* mutasyon analizi
(NN:mutasyon yok, NM: heterozigot (+)).

		TANI			Toplam	
		PV	ET	PMF		
<i>JAK2V617F</i>	NN	n	14	27	12	53
		%	42,4%	61,4%	66,7%	55,8%
	NM	n	19	17	6	42
		%	57,6%	38,6%	33,3%	44,2%
Toplam		n	33	44	18	95

mikrRNA Ekspresyon Analizi:

Vakalara ve kontrol grubuna ait kan örneklerinde mir155, mir181a, mir221, mir222, mir223 ve mir451'in ekspresyon düzeyleri, RT-PCR cihazı ile ve $\Delta\Delta CT$ yöntemi kullanılarak analiz edildi.

Mir155'in ekspresyon düzeyi bakımından gruplar arasında fark bulundu ($p=0,001$). Bu farklılık, kontrol grubundan kaynaklanmaktadır. Buna göre, mir155'in, ET, PV ve PMF hastalarında kontrol grubuna göre belirgin olarak daha yüksek düzeyde eksprese edildiği ($p<0,05$), bununla beraber 3 hastalık grubunda ise birbirlerine benzer oranda eksprese edildiği belirlendi (tablo 8).

Mir181a ekspresyonunun ET, PV ve PMF hastalarında kontrol grubuna göre olarak daha yüksek düzeyde eksprese edildiği belirlenmekle beraber, gruplar arasında istatistikî açıdan bir fark olmadığı görüldü ($p=0,932$) (tablo 8).

Mir221'in ekspresyon düzeyi bakımından gruplar arasında fark bulundu ($p=0,002$). Bu farklılık, kontrol grubundan kaynaklanmakta olup, mir221'in, ET, PV ve PMF hastalarında kontrol grubuna göre daha yüksek düzeyde eksprese edildiği saptandı. Bununla beraber, ET hastaları ile kontrol grubu arasında ve PMF hastaları ile kontrol grubu arasında önemli bir farklılık varken ($p<0,05$), PV hastaları ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak önemli bir farklılık saptanmadı (tablo 8).

Mir222'nin ekspresyon düzeyi bakımından gruplar arasında fark bulundu ($p=0,001$). Bu farklılık, ET ve PV hasta gruplarından kaynaklanmakta olup, buna göre; ET hastalarında mir222'nin kontrol grubuna göre belirgin olarak daha yüksek oranda eksprese edildiği, PV hastalarında ise kontrol grubuna göre daha az oranda eksprese edildiği ve bu nedenle ET ile PV hastaları arasında istatistiksel açıdan önemli bir farklılık ortaya çıktığı saptandı ($p<0,05$). PMF hastalarında da mir222 ekspresyonunun kontrol grubuna göre daha fazla olduğu belirlenmekle beraber, bu durumun istatistiksel olarak önemli bir fark yaratmadığı görüldü (tablo 8).

Mir223'ün ekspresyon düzeyi bakımından gruplar arasında fark bulundu ($p=0,001$). Buna göre; ET ve PMF hastalarında mir223'ün kontrol grubuna göre belirgin olarak daha yüksek düzeyde eksprese edildiği –özellikle PMF vakalarında- görüldü ($p<0,05$). Polisitemia vera'lı hastalarda ise, mir223'ün kontrol grubuna kıyasla daha az oranda eksprese edildiği saptanmakla beraber, bu durumun istatistiksel olarak önemli bir fark yaratmadığı görüldü (tablo 8).

Mir451'in ekspresyon düzeyi bakımından gruplar arasında fark bulundu ($p=0,001$). Bu farklılık, kontrol grubundan kaynaklanmaktadır. Buna göre, mir451'in, ET, PV ve PMF hastalarında kontrol grubuna göre belirgin olarak daha düşük düzeyde eksprese edildiği ($p<0,05$) belirlendi (tablo 8).

Tablo 8. Kontrol ve hastalık gruplarında miRNA ekspresyon sonuçları
(PV: polisitemia vera, ET: esansiyel trombositemi, PMF: primer miyelofibrozis).

TANI		mir155	mir181a	mir221	mir222	mir223	mir451
Kontrol	n	40	40	40	40	40	40
	%25	0,00019	0,11933	0,86799	0,01627	5,14917	1490195,13331
	Ortanca	0,00037	0,25122	2,42670	0,02892	23,23962	5020982,30299
	%75	0,00064	0,82563	8,87502	0,07839	89,72211	42569739,79780
PV	n	33	31	29	26	27	33
	%25	0,00036	0,13490	1,75430	0,00593	2,73777	7017,45668
	Ortanca	0,00126	0,30166	10,32450	0,01972	13,00505	78532,38002
	%75	0,00365	0,84206	71,99002	0,03853	39,50600	519464,01602
ET	n	49	49	42	48	44	46
	%25	0,00073	0,09216	1,40092	0,03147	28,03377	7689,33057
	Ortanca	0,00187	0,33681	22,32815	0,10972	87,81531	73275,06169
	%75	0,00782	1,60078	140,63741	1,88131	1593,01057	578232,88609
PMF	n	19	19	15	17	18	17
	%25	0,00061	0,09929	3,49429	0,01447	42,00267	27086,65632
	Ortanca	0,00358	0,45470	16,98277	0,04694	385,39057	538654,24585
	%75	0,05991	1,31859	51,95862	2,63616	22702,64884	4604225,53575

Cinsiyetlere göre miRNA ekspresyonları kıyaslandığında, hem ET'li, hem PV'li, hem de PMF'li hastalarda erkek ve kadın cinsiyet arasında bir fark tespit edilmedi (tablo 9).

Tablo 9. Cinsiyetlere göre miRNA ekspresyon analizi

(PV: polisitemia vera, ET: esansiyel trombositemi, PMF: primer miyelofibrozis).

TANI	CİNSİYET		mir155	mir181a	mir221	mir222	mir223	mir451
PV	erkek	n	14	12	12	9	10	14
		%25	,00022	,09430	,70334	,00463	5,75848	2192,83602
		ortanca	,00167	,16340	4,12379	,01301	15,23264	82115,96476
	kadın	%75	260,46084	,46936	121,38800	,03017	236,13084	663854,07480
		n	19	19	17	17	17	19
		%25	,00038	,18314	2,61090	,00623	2,05475	13644,19823
ET	erkek	ortanca	,00095	,49277	17,79007	,02820	5,20176	67471,93891
		%75	,00202	1,67830	71,99002	,05075	36,57177	377993,00208
		n	23	23	19	22	20	22
	kadın	%25	,00075	,08699	1,48658	,00778	23,23036	10795,61792
		ortanca	,00178	,32534	18,37917	,11233	103,10335	159305,88820
		%75	,00770	2,83235	175,46020	2,02798	1476,98884	902954,49218
PMF	erkek	n	26	26	23	26	24	24
		%25	,00062	,12806	1,14393	,03813	28,03377	7427,48102
		ortanca	,00214	,35708	23,83484	,10111	87,81531	45782,44903
	kadın	%75	,01199	1,05889	139,61821	2,39789	3939,03199	408065,67344
		n	9	9	6	9	8	6
		%25	,00089	,04894	3,62330	,02530	55,65519	302647,05392
PMF	erkek	ortanca	,00486	,30864	29,19772	,04694	333,04558	1623134,58681
		%75	5,10264	1,07887	71132261,58431	2,63616	16763,55523	4994866,27943
		n	10	10	9	8	10	11
PMF	kadın	%25	,00054	,16017	2,92814	,00020	25,74753	1554,24692
		ortanca	,00307	,46634	11,02437	,08101	1102,16445	466979,59947
		%75	,03583	2,80934	137,33257	4,66214	81300,33097	4479791,01324

Eşlik eden hastalıklara göre miRNA ekspresyonları kıyaslandığında, hasta ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak bir fark olmadığı görüldü (tablo 10).

Tablo 10. Eşlik eden hastalıklara göre miRNA ekspresyon analizi (PV: polisitemia vera, ET: esansiyel trombositemi, PMF: primer miyelofibrozis).

TANI	Komorbidite		mir155	mir181a	mir221	mir222	mir223	mir451
PV	var	n	15	15	13	13	13	15
		%25	,00017	,08591	1,12237	,00832	2,99114	7962,46825
		ortanca	,00095	,19345	10,32450	,01395	8,18510	39676,57849
	yok	%75	,00202	,84206	22,15037	,04471	36,57177	377993,00208
		n	18	16	16	13	14	18
		%25	,00055	,15525	3,20291	,00375	1,21919	5177,93966
ET	var	ortanca	,00167	,35633	10,01792	,02768	20,82293	91042,50528
		%75	51,32008	1,55593	149,43662	,03619	162,35570	735469,76218
		n	17	17	16	17	17	17
	yok	%25	,00056	,08645	1,27232	,00583	13,94690	12586,50495
		ortanca	,00118	,32534	14,47078	,05852	70,47306	73782,95758
		%75	,00299	1,52924	148,19387	,22299	1376,29561	1111172,61618
PMF	var	n	32	32	26	31	27	29
		%25	,00075	,09890	1,36843	,04022	32,02219	6552,62891
		ortanca	,00214	,35708	28,60844	,16099	143,80799	72767,16580
	yok	%75	,04294	1,66506	140,63741	2,72017	1604,60224	419632,87312
		n	8	8	5	6	8	8
		%25	,00075	,19910	,84026	,00009	29,61733	479522,32178
PMF	var	ortanca	,01406	,57390	2,36199	,03398	198,12294	1623134,58680
		%75	,10886	12,70119	142264462,86624	1,01463	193453,98544	4666442,79701
		n	11	11	10	11	10	9
	yok	%25	,00058	,07916	7,08742	,01725	86,27292	2832,05531
		ortanca	,00256	,45470	41,92114	,13985	1176,93651	187171,33763
		%75	,01796	,74846	94,64560	4,81474	14197,67126	3166069,59440

JAK2 mutasyonuna göre miRNA ekspresyonları karşılaştırıldığında, her 3 hastalık grubunda da mutasyonun olup olmamasının miRNA ekspresyonlarını etkilemediği ve istatistiksel bir fark oluşturmadığı görüldü (tablo 11).

Tablo 11. *JAK2* mutasyonuna göre miRNA ekspresyon analizi (PV: polisitemia vera, ET: esansiyel trombositemi, PMF: primer miyelofibrozis).

TANI	JAK2		mir155	mir181a	mir221	mir222	mir223	mir451	
PV	NN	n	14	13	13	13	13	14	
		%25	,00034	,10784	,95286	,00430	2,30812	12223,76574	
		Ortanca	,00075	,49141	11,36874	,01066	7,61582	91042,50528	
		%75	,00246	1,97154	71,99002	,08263	66,89901	693841,58107	
		NM	n	19	18	16	13	14	19
			%25	,00035	,14085	2,20276	,01168	2,32614	1568,31539
Ortanca	,00165		,18829	8,53751	,02768	23,05051	67471,93891		
		%75	,00865	,56580	107,32150	,03940	73,92229	395686,96109	
		ET	n	27	27	23	27	25	25
			%25	,00077	,11859	,29463	,00858	29,36324	35961,42677
Ortanca	,00216		,49655	20,82147	,11352	85,74615	191236,71456		
		%75	,00794	3,08075	143,69502	,51513	1517,89727	2986765,08176	
		NM	n	17	17	16	17	16	17
			%25	,00050	,08911	4,10464	,02139	8,18915	3987,74619
Ortanca	,00104		,32534	17,68097	,08184	73,51605	72767,16580		
		%75	,00546	1,19152	153,65810	,97912	1564,75536	632327,93305	
		PMF	n	10	10	8	8	10	10
			%25	,00049	,25414	3,96522	,01431	29,33003	302647,05392
Ortanca	,00097		,50378	29,70620	,03398	95,15941	955171,09772		
		%75	,07623	4,74467	213396737,23892	,18863	96579,14033	5102052,22745	
		NM	n	5	5	3	5	4	5
			%25	,00199	,24834	2,36199	,00027	85,10836	27086,65632
Ortanca	,00546		1,31859	3,49429	,01725	385,39057	466979,59947		
		%75	5,10756	4,19758	41,41266	,12024	1535,32345	5136637,97809	

Ek olarak, ET'li, PV'li ve PMF'li hastalarda hidroksiüre, anagrelid ve interferon- α 2a kullanımının, ilaç kullanmayan hastalara kıyasla miRNA ekspresyonlarını etkilemediği ve istatistiksel bir fark oluşturmadığı saptandı (tablo 12).

Tablo 12. Kullanılan ilaçların miRNA ekspresyonuna etkisi

(PV: polisitemia vera, ET: esansiyel trombositemi, PMF: primer miyelofibrozis).

TANI	İlaç		mir155	mir181a	mir221	mir222	mir223	mir451
PV	yok	n	8	7	7	7	7	8
		ortanca	,00182	,16346	3,27842	,02820	103,25015	235369,58329
	hidroksiüre	n	23	22	20	18	19	23
		ortanca	,00095	,35243	10,84662	,01151	7,61582	78532,38002
	interferon	n	2	2	2	1	1	2
		ortanca	,00165	,32181	77,20719	,03492	,76154	6845,21044
ET	yok	n	28	28	23	27	25	25
		ortanca	,00249	,24292	16,98277	,08870	71,60557	97424,70247
	hidroksiüre	n	13	13	12	13	11	13
		ortanca	,00152	,37736	34,46876	,11352	75,42652	191236,71456
	interferon	n	1	1	1	1	1	1
		ortanca	,00063	1,47223	14,20178	,04934	845239,11112	164189,23330
anagrelid	n	7	7	6	7	7	7	
	ortanca	,00060	,90963	120,53587	,24827	217,82111	13786,79984	
PMF	yok	n	10	10	10	9	9	9
		ortanca	,00229	,36666	29,19772	,04694	104,69146	1015669,78639
	hidroksiüre	n	8	8	4	7	8	7
		ortanca	,01141	,38167	28,12615	,02217	2953,65396	538654,24585
	anagrelid	n	1	1	1	1	1	1
		ortanca	,00040	,47797	3,49429	,13985	9,93831	5545,10860

TARTIŞMA

Kronik miyeloproliferatif hastalıklar, Kİ'deki multipotent kök hücrede ortaya çıkan genetik mutasyonlar sonucunda hücre yapımının anormal şekilde artması ve çevresel kanda olgun hücre yapımının anormal bir şekilde artması ile karakterizedir. İlk kez 1951 yılında William Damashek tarafından öne sürülmüştür ve klinik ve biyolojik benzerlikleri olan 4 klasik MPH'yi –PV, ET, PMF– tarif etmek için kullanılmıştır. Daha nadir görülen kronik nötrofilik lösemi, kronik eosinofilik lösemi, sistemik mastositoz, atipik kronik miyeloid lösemi gibi hastalıklar da KMH kapsamına alınmıştır. Dünya Sağlık Örgütü 2008'e göre, PV, ET ve PMF tanısı için *JAK2* ve benzeri aktive edici mutasyonlar (trombopoetin reseptörü MPL mutasyonu) kullanılmış ve Kİ morfolojik bulguları tanı ölçütleri içinde ağırlık kazanmıştır.

Kronik miyeloproliferatif hastalıklarda, hematopoetik sitokinlere bağımlı olmadan veya aşırı sitokin duyarlılığı nedeniyle her 3 hücre dizisinde altta yatan hastalığa bağlı olarak devamlı bir artış görülebilir. Bu hastalıklarda, stoplazmik veya reseptör protein tirozin kinazları kodlayan genlerde gelişen mutasyonlara bağlı olarak hücre içi sinyal molekülleri aktive olur ve bu da anormal hücre çoğalmasına yol açar. Polisitemia vera, ET ve PMF hastalıklarına neden olan özgül mutasyonlar henüz tanımlanmamıştır. Kronik miyeloid lösemide ise, özgül olarak görülen Philadelphia kromozomu olan t(9;22)(q34;q11) translokasyonu, ABL1 tirozin kinazın aktivasyonuna ve hastalığın tüm klinik bulgularına yol açar.

JAK2 geninin 14. ekzonunda görülen *JAK2V617F* mutasyonunun PV'de %95, ET'de ve PMF'de ise yaklaşık %50 oranında görülebildiği saptanmıştır. Böylece, *JAK2V617F*'nin altta yatan bir KMH göstergesi olduğu, fakat özgül bir hastalığın tanısını koymada tek başına yeterli olmadığı anlaşılmıştır. Polisitemia vera düşünülen olgularda *JAK2V617F* negatif ise *JAK2* ekzon 12 mutasyonu %3 oranında, ET ve PMF düşünülen olgularda ise *MPL-W515L/K* mutasyonu %5 oranında pozitif olabilir.

BCR-ABL1 mutasyonunun KML'ye neden olduğunun bilinmesi ve bu mutasyonun ürünü olan tirozin kinaz'ı hedefleyen imatinib ve diğer tirozin kinaz inhibitörlerinin bu hastalığı hematolojik, sitogenetik ve moleküler remisyona sokması, diğer MPH'lerde benzer genetik bozuklukların araştırılmasına yol açmıştır. Bununla beraber, *JAK2* mutasyonlarının bu hastalıkları tek başına

başlatan mutasyonlar olmadıkları ortaya çıkmıştır. Kronik miyeloproliferatif hastalıklarda FDA'dan onay almış olan ruxolitinib gibi yeni tirozin kinaz inhibitör tedavileri, daha çok *JAK2* inhibisyonu üzerine eğilmiştir.

Miyeloproliferatif hastalıkların tanı ve tedavisindeki bilimsel gelişmelere rağmen, günümüzde ayırıcı tanıda zaman zaman karışıklıklar olabilmektedir ve bu konuda bilimsel tartışmalar da sürmektedir. Örneğin, PV ile ET'nin ayırıcı tanısında, eritrositözün ölçülmesi ve gösterilmesi için DSÖ kriterlerinde yer alan hemoglobin değerleri değil, eritrosit kitlesi ve plazma hacminin ölçülmesi gerektiği vurgulanmıştır. Esansiyel trombositemi ile erken pre-fibrotik PMF ayırıcı tanısının prognoz açısından önemli olabileceği gösterilmiştir ve bu nedenle ayırıcı tanı için karmaşık hematopatolojik ölçütlere bağlı olarak güvenilir ve tekrarlanabilir bir şekilde farklı hematopatologlar tarafından prospektif olarak değerlendirilmesi önerilmektedir. Kronik miyeloproliferatif hastalıkların klinik, laboratuvar ve moleküler olarak daha da etkin şekilde sınıflandırılması ve hastalıkların moleküler mekanizmalarının daha detaylı bir şekilde anlaşılması, yeni tedavi hedeflerinin de geliştirilmesini sağlayacaktır. Son dönemlerde, *JAK2* ve *MPL* dışında, *TET2*, *LNK*, *IDH1/IDH2*, *ASXL1*, *EZH2*, *CBL*, *IKZF1* ve *DNMT3A* genlerinde mutasyonlar bulunmuştur.

MiRNA'lar, 19-24 nükleotidli tek iplikli kısa RNA molekülleri olup, son dönemlerde özellikle malign hematolojik hastalıklarda yoğun araştırmalara maruz kalmaktadırlar. Bunlar, DNA'dan transkripsiyonu yapılan, ama proteine çevirisi yapılmayan genler tarafından kodlanırlar ve mRNA'lardan farklı olarak protein sentezine sebep olmazlar, gen ifadesini transkripsiyon sonrası düzenlerler. Dokular arasında farklı şekilde eksprese olurlar ve kan dolaşımında saptanabilirler. Tek bir miRNA, yaklaşık 200 hedef gene bağlanabilir ve gen ekspresyonunun post-transkripsiyonal düzenlenmesi neticesinde, anjiyogenezis, proliferasyon, farklılaşma, apoptozis ve tümörögenez dahil, birçok metabolik yolda kritik roller üstlenirler. Bu nedenle anormal miRNA üretimi, kardiyovasküler, inflamatuvar, müsküler, nörodejeneratif hastalıklar ve kanser dahil, birçok hastalıkla bağlantılı bulunmuştur. Örneğin mir126, mir17-92, let-7, mir130a, mir210, mir378 ve mir 296, pro-anjiyojenik miRNA'lar arasında yer alırken, mir221, mir222, mir328, mir92a ve mir214, anti-anjiyojenik miRNA'lar arasında yer alır. Mir122, hepatit C virüs replikasyonu için gereklidir ve bu miRNA eksikliğinde, virüsün replikasyonu durur. Mir122'yi inhibe edici

ajan olan miravirsen'in kullanıldığı faz 2 çalışmada, hepatit C virüs replikasyonunun durduğu gösterilmiştir. MiRNA türleri ile kanser tipleri arasında da ilişki saptanmış olup, plazmada serbestçe dolaşan miRNA profillerinin kanserlerin tanısında, sınıflandırılmasında, takibinde ve tedavisinde faydalanıldığına dair araştırmalar mevcuttur.

MiRNA'ların, ilişkili oldukları protein ekspresyonlarında artış veya azalmaya neden olarak kanserlerde önemli etiyolojik ve tanısal etken olarak görülmektedirler. Aynı zamanda, mRNA üzerindeki tamamlayıcı bölgeye özgül olarak bağlandıkları için, yeni tedavi arayışları içinde hedef moleküller olarak da ön plana çıkmaktadırlar. Örneğin, p53 yolağının bir parçası olduğu gösterilen mir34'ü taklit eden bir ajan geliştirilmiş ve bu ajanın, akciğer ve prostat kanseri oluşturulmuş fare modellerinde tümör büyümesini ve metastazı inhibe ettiği gösterilmiştir. MiRNA'lar, hedefledikleri mRNA'nın moleküler yolaklarındaki özelliğine göre onkojenik ya da tümör baskılayıcı olarak rol alabilirler. Dolayısıyla tümör baskılayıcı miRNA'ların ekspresyonlarının azalması veya "onkomirler" olarak adlandırılan ve onkojenik aktivite gösteren miRNA'ların ekspresyonunun artması onkojenik ekspresyonun artmasına ve tümör oluşumuna sebep olur. Günümüzde, KML, multiple myeloma gibi hematolojik malignitelerde, bu hastalıkların etiyopatogenezleriyle ilişkili olan miRNA'lar büyük ölçüde belirlenmiştir. Bununla beraber literatürde, nispeten nadir görülen ET, PV ve PMF'nin etiyopatogenezinde miRNA'ların rolüyle ilişkili az sayıda çalışma vardır. Oysa günümüzde, bu hastalıklara yönelik mutlak tedaviler belirlenmemiştir ve etiyopatogenezlerini aydınlatacak daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

Bu çalışmada, Ph kromozomu (-) miyeloproliferatif hastalıklar olan ET, PV ve PMF'nin etiyopatogenezinde miRNA'ların rolleri araştırılarak, gelecekte, bu hastalıklarda hedefe yönelik tedavilerin geliştirilmesinde yeni bir kapı aralanması amaçlanmıştır. Bu amaçla, bu hastalıklarla ilişkisi olabileceği düşünülen ve hematopoetik yolda görevli mir155, mir181, mir221, mir222, mir223 ve mir451 ekspresyonlarının araştırılması planlanmıştır.

Mir155, normal hematopoezde, B ve T lenfosit diferansiyasyonunu kontrol eder, germinal merkez reaksiyonlarını düzenler; yüksek seviyeleri, aktif T ve B lenfositler ile aktif monositlerde bulunur⁵⁶. Sitokin üretimini etkileyerek T-yardımcı hücre dönüşümünü düzenler⁵⁷. Ayrıca, eritroid ve miyeloid koloni

oluşumunu baskılar⁵⁸. Normal eritropoez sırasında, mir155 ekspresyonu düzenli olarak azalır⁶². Mir155 ekspresyonunun, diffüz büyük B hücreli lenfoma, kronik lenfositik lösemi ve Hodgkin lenfomada arttığı gösterilmiş olup, lenfomageneziste önemli bir rol üstlendiği düşünülmektedir^{68,69}. Diğer yandan, sıçanlarda aşırı ekspresyonunun, miyeloproliferatif hastalıkla sonuçlandığı ve eritroid/megakaryositik seride azalma ile ilişkili olduğu gösterilmiştir⁷⁰. Transgenik fare çalışmaları, inflamatuvar stres sinyalizasyonunun ve kök hücre deregülasyonunun, MPH patogenezinde önemli olduğunu göstermiştir⁷³. İnflamatuvar stresin, çeşitli sitokinler ile büyüme faktörleri aracılığıyla kan hücresi gelişiminde ve kan hastalıklarının ortaya çıkmasında açık bir etkisi vardır⁷⁴. Dolaşımdaki artmış sitokin seviyeleri, PV ve PMF hastalarında rapor edilmiştir⁷⁵. İnflamatuvar uyarılarla mir155 ekspresyonu da artmaktadır⁷⁰.

Bizim çalışmamızda, mir155'in ekspresyon düzeyi bakımından gruplar arasında fark saptandı ve bu farkın kontrol grubundan kaynaklandığı görüldü. Buna göre, mir155'in, ET, PV ve PMF hastalarında kontrol grubuna göre belirgin olarak daha yüksek düzeyde, ancak 3 hastalık grubunda da benzer oranlarda eksprese edildiği belirlendi (tablo 8). İnflamatuvar uyarıların tetiklediği mir155 ekspresyonunun aşırı artışı, olasılıkla MPH patogenezinde önemli bir rol almaktadır ve böylece mir155, bu hastalıkların tedavisinde bir hedef molekül olabilir.

Mir181 asıl, hematopoetik dokularda eksprese edilir (ör: timüs, kemik iliği, dalak). Tüm hematopoetik serinin diferansiyasyonunu baskılar, B hücre diferansiyasyonunda ise ekspresyonu artar^{52,58}. Mir181A, T hücre reseptör sinyallerini düzenler ve T hücre duyarlılığını düzenler⁷⁶. Bir çalışmada, *JAK2V617F* mutasyonlu hücre dizisi olan SET2 hücrelerinde, mir181A'yı da içeren 21 miRNA'nın aşırı düzeyde eksprese edildiği gösterilmiştir⁷⁷. Bizim çalışmamızda da, mir181a ekspresyonunun ET, PV ve PMF hastalarında kontrol grubuna göre olarak daha yüksek düzeyde eksprese edildiği belirlenmekle beraber, gruplar arasında istatistikî açıdan bir fark saptanmadı (tablo 8).

Normalde, eritroid diferansiyasyon sırasında mir221, mir222 ve mir223'ün ekspresyonları azalır. Mir221 ve mir222, c-KIT'yi, mir223 ise LMO2'yi hedef alarak eritroid diferansiyasyonu bloke eder^{50,63}. Mir223, granülopoezisi ise indükler⁵⁹. Bruchova ve arkadaşları, hem sağlıklı, hem de PV'li bireylerin

çevresel kanındaki CD34⁺ hücrelerinde, eritroid diferansiyasyon sırasında mir221 ve mir222 ekspresyonunun tedrici olarak azaldığını in vitro göstermişlerdir⁶². Ekspresyonları azalmakla beraber, PV grubunda kontrol grubuna göre mir221'in daha fazla eksprese edildiği, mi222'nin ise hücre inkübasyonunun 7-9. günlerinde daha az düzeyde, 11-21. günler arasında ise daha fazla düzeyde eksprese olduğu görülmüştür⁶². Bruchova ve arkadaşlarının yaptığı başka bir çalışmada, PV, ET ve PMF'li hastaların çevresel kan mononükleer hücrelerinde, kontrol grubuna göre mir223 ekspresyonunun daha fazla olduğu gösterilmiştir⁷⁸.

Bizim çalışmamızda, mir221'in ekspresyon düzeyi bakımından gruplar arasında fark saptandı ve bu farkın kontrol grubundan kaynaklandığı görüldü. Buna göre, özellikle ET ve PMF hastalarında olmak üzere, her 3 hastalıkta da mir221 ekspresyonunun daha fazla olduğu görüldü (tablo 8). Mir222'nin ekspresyon düzeyi bakımından da gruplar arasında fark bulundu (p=0,001); ET hastalarında mir222'nin kontrol grubuna göre belirgin olarak daha yüksek oranda eksprese edildiği, PV hastalarında ise kontrol grubuna göre daha az oranda eksprese edildiği görüldü. Primer miyelofibrozis hastalarında da mir222 ekspresyonunun kontrol grubuna göre daha fazla olduğu belirlendi (tablo 8). Mir223'ün ekspresyon düzeyi bakımından da gruplar arasında fark bulundu (p=0,001). Buna göre; ET ve PMF hastalarında mir223'ün kontrol grubuna göre belirgin olarak daha yüksek düzeyde eksprese edildiği –özellikle PMF vakalarında- saptandı. Polisitemia veralı hastalarda ise, mir223'ün kontrol grubuna kıyasla daha az oranda eksprese edildiği görüldü (tablo 8).

Çalışmamızda, normalde eritropoezi baskılayan mir222 ve mir223 ekspresyonunun PV grubunda, kontrol grubuna göre daha düşük düzeyde saptanması, gelişen polisitemiden sorumlu olabilir. Bruchova ve arkadaşlarının yaptığı çalışmadaki ekspresyon düzeyindeki farklılıklar, bu miRNA ekspresyonlarının, bizim çalışmamızdaki gibi çevresel kandan değil de özgül hücre kültüründen bakılmasından kaynaklanıyor olabilir⁶². Bununla beraber, miRNA ekspresyon düzeylerinin araştırılmasında standardize yöntemlerin gerektiği de açıktır. Mir222 ve mir223 ekspresyonunu arttırmayı hedefleyen tedavi yöntemleri, eritropoezi baskılayarak PV hastalarındaki polisitemiyi kontrol altına alabilir, ancak bu alanda daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır.

Normal hematopoezde, eritropoezi baskılayan mir221, mir222 ve mir223'ün, ET ve PMF'deki yüksek seviyeleri olasılıkla MPH'lerde görülen "aşırı hücre çoğalmasından" kaynaklanmaktadır. Mir221'in ve mir223'ün oldukça yüksek seviyeleri, PMF'de, eritropoezi baskılayarak anemiye katkıda bulunuyor olabilir. Bu nedenle bu miRNA'lar, PMF'de anemi tedavisinde hedef molekül olarak kullanılabilir. Ayrıca mir223, ET'ye kıyasla PMF'de oldukça yüksek düzeyde eksprese olduğu için, erken dönem PMF hastalarının ET ile olan ayırıcı tanısında da kullanılabilir.

Mir451, eritroid hücrelere özgüdür ve normal eritropoez sırasında ekspresyonu, mir144 ile beraber tedrici olarak artarak eritroid olgunlaşmayı sağlar⁷³. Mir451, *GATA1*'in direk transkripsiyonel hedefidir ve zebra balığında *gata2*'yi, farelerde ise 14-3-3'ü hedef alır⁷³.

Bruchova ve arkadaşları, eritroid diferansiyasyon sırasında mir451 ekspresyonunun, hem sağlıklı, hem de PV'li bireylerin çevresel kanlarındaki CD34⁺ hücrelerinde tedrici olarak arttığını in vitro olarak göstermişlerdir. Ekspresyonun, hücrelerin erken inkübasyonu döneminde (1-11. günler) PV grubunda daha fazla olduğu, 11. günden sonra ise, eritropoetin varlığı (diferansiyasyon dönemi) ile kontrol grubunda daha fazla olduğu saptanmıştır; mir451, erken PV progenitörlerinde (eritropoetin bağımsız progenitörler) sağlıklı progenitörlere göre daha fazla eksprese olmakta ve PV progenitörleri, sağlıklı eritroid progenitörlerden daha hızlı diferansiye olmaktadır⁶². Zhan ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, PV'li hastaların çevresel kan CD34⁺ hücrelerinde, sağlıklı bireylere kıyasla mir451 ekspresyonunun daha fazla olduğu gösterilmiştir⁷⁹. Aynı zamanda, Burst Forming Unit-Erythroid (BFU-E) kolonilerindeki çekirdekli eritroid hücreler incelendiğinde, PV BFU-E koloni hücrelerindeki mir451 ekspresyonunun, ET BFU-E koloni hücrelerine (*JAK2V617F* hem pozitif, hem negatif olduğu grupta) kıyasla daha fazla olduğu saptanmıştır⁷⁹. Başka bir çalışmada, mir451 ekspresyonunun artışı ile K562 hücrelerde eritroid diferansiyasyonun uyarıldığı görülmüştür⁸⁰. Mir451 eksik farelerde, geç eritroblastik maturasyonun azaldığı, eritroid hiperplazi, splenomegali ve hafif anemi geliştiği gözlenmiştir⁸¹.

Çalışmamızda, mir451'in ekspresyon düzeyi bakımından gruplar arasında fark bulundu (p=0,001). Bu farklılık, kontrol grubundan kaynaklanmakta idi; mir451'in, ET, PV ve PMF hastalarında kontrol grubuna

göre belirgin olarak daha düşük düzeyde ($p < 0,05$), bununla beraber 3 hastalık grubunda ise benzer oranda eksprese edildiği belirlendi (tablo 8). Diğer çalışmalardan farklı olarak mir451 ekspresyonunun bizim çalışmamızda özellikle PV ve ET grubunda sağlıklı bireylere göre düşük düzeyde saptanması, ekspresyonun, özgül hücre kültürlerinde değil de çevresel kandan bakılmasından kaynaklanıyor olabilir. Diğer bir deyişle progenitör hücrelerdeki artmış mir451 ekspresyonu, çevresel kanda yeterince tespit edilemiyor olabilir. Bu alanda daha çok çalışmaya ihtiyaç olduğu ve standardize ölçüm yöntemlerinin geliştirilmesi gerekliliği açıktır. Öte yandan, PMF grubunda ortanca mir451 ekspresyon düzeyinin (538654,24585), ET ve PV grubuna kıyasla (73275,06169 ve 78532,38002, sırasıyla) oldukça yüksek düzeyde olması nedeniyle bu molekül, erken dönem PMF hastalarının, özellikle ET ile olan ayırıcı tanısında kullanılabilir. Ayrıca, kontrol grubuna kıyasla, saptanan bu düşük ekspresyon düzeyi, mir451 baskılanmış fare modellerinde tespit edildiği gibi, PMF hastalarında gelişen anemiye ve masif splenomegaliye katkıda bulunuyor olabilir.

Cinsiyetlere göre miRNA ekspresyonları kıyaslandığında, her 3 hastalık grubunda da erkek ve kadın cinsiyet arasında bir fark tespit edilmedi (tablo 9). Bu sonuç, cinsiyetin miRNA ekspresyonunu etkilemediğini göstermektedir.

Çalışmamızda, eşlik eden hastalıkların, araştırdığımız miRNA ekspresyonlarını etkilemediği görüldü. Bunun sebebinin, ekspresyon düzeylerini araştırdığımız miRNA'ların hematopoeze özgül olup, ekspresyon düzeylerinin, diğer organ sistemlerini etkileyen hastalıklarda değil, miyeloproliferatif hastalıklarda değişmesinden kaynaklandığını düşünmekteyiz.

Kullanılan ilaçların da (hidroksiüre, interferon- α 2a ve anagrelid), araştırdığımız miRNA ekspresyonlarını etkilemediği görüldü. Bunun sebebi, az sayıda hastanın ilaç kullanıyor olması olabilir. Bununla beraber bu ilaçlar, miyeloproliferatif hastalıklarda sadece sitoredüksiyon yapmakta olup, mevcut genetik bozukluğu tedavi etmemektedir. Dolayısıyla ilaçların kesilmesiyle, hücre sayısı yeniden artmaktadır. Bu hastalıklar, kök hücredeki edinsel genetik bozukluklardan kaynaklandığı ve genetik bozukluklar da bu ilaçlarla tamir edilmediği için olasılıkla miRNA ekspresyonları, ilaçlardan etkilenmemektedir.

JAK2V617F mutasyonu, PV'de $>90\%$, ET ve PMF'de ise 50% oranında saptanmakla beraber, aynı mutasyonun, ne şekilde 3 farklı MPH fenotipine yol

açtığı tam olarak anlaşılamamıştır. Büyük olasılıkla hastalık özgül miRNA'lar, PV, ET ve PMF fenotiplerinin ortaya çıkmasına yol açmaktadır ve bu özgül miRNA'lar, bu 3 hastalığın ayırıcı tanısında kullanılabilir. Bazı miRNA ekspresyon düzeylerinin bazı çalışmalarda, *JAK2V617F* allel yükü ile ilişkili olduğu, birçok başka çalışmada ise, *JAK2V617F* allel yüküyle ya da aktivitesiyle ilişkisiz olduğu görülmüştür. Girardot ve arkadaşlarının, PV, ET ve PMF tanısı olan vakalarda yaptığı çalışmada, mir28 ekspresyonunun, hastaların %30'unda arttığı, CD34⁺ hücrelerde megakaryositik diferansiyasyonu baskıladığı ve ekspresyon düzeyinin *JAK2V617F* allel yükü ile ilişkili olabileceği gösterilmiştir⁸². Zhan ve arkadaşlarının PV'li hastalarda yaptığı çalışmada ise, miRNA ekspresyon seviyeleri ile CD34⁺ *JAK2V617F* allel yükü arasında bir ilişki saptanmamıştır⁷⁹. Bizim çalışmamızda da *JAK2* mutasyonuna göre miRNA ekspresyonları karşılaştırıldığında, her 3 hastalık grubunda da mutasyonun olup olmamasının miRNA ekspresyonlarını etkilemediği ve istatistiksel bir fark oluşturmadığı görüldü (tablo 11). Olasılıkla, MPH patogenezinde, ekspresyonu bozulmuş birçok miRNA, anormal *JAK2* sinyalizasyonundan bağımsız hareket etmektedir. *JAK2V617F* pozitif ve negatif hastalıklar arasındaki farklı ve ortak miRNA'ların araştırılması, *JAK2* negatif kişilerde bu hastalıkların nasıl geliştiğine dair deliller ortaya koyabilir.

SONUÇ VE ÖNERİLER

MiRNA fonksiyonları, indüklendiği hücre tipiyle oldukça ilişkilidir; aynı miRNA, farklı hücre tiplerinde ve stres durumlarında çok farklı fonksiyonlara bürünebilirler. Fonksiyonları, eksprese edilen mRNA'lara bağlıdır. Bu özel davranış şekilleri, özgül hastalıklarda miRNA'ların, miRNA-tabanlı tedavilerde kullanılabileceği fikrini de doğrulamaktadır. Bununla beraber, son dönemlerde hematopoezde, miRNA biyolojisi ile ilgili oldukça fazla sayıda çalışmanın literatürde yer almasıyla beraber, miyeloproliferatif neoplazilerin etiyopatogenezinde miRNA'ların rolünü gösteren bilgiler oldukça sınırlıdır. Literatürde son dönemlerde yer alan çalışmalarda, bazı miRNA'ların anormal ekspresyonlarının MPH patogenezinde rol oynadığı belirtilmektedir.

Bu çalışmada, araştırılan miRNA'ların ekspresyon farklılıkları gösterilmiştir. Eşlik eden hastalıkların ekspresyon farkı oluşturmadığı saptanmıştır ve bu durumun, MPH'lere özgül miRNA'ların ekspresyonlarının araştırılmasından kaynaklandığını düşünmekteyiz. Bu hastalıklarda kullanılan ilaçların da miRNA ekspresyonlarını etkilemediğini gördük. Bu sonuç da az sayıda hastanın ilaç kullanmasından kaynaklanıyor olabileceği gibi, olasılıkla bu ilaçların kök hücredeki genetik yapıyı tedavi etmemesinden kaynaklanmaktadır.

MiRNA'ların, *JAK2V617F* pozitif ve negatif klonun genişlemesindeki rollerini, farklı MPH'lerde gelişen hematopoezisteki farklı etkilerini, hastalık ilerlemesinde ve lösemik transformasyondaki rollerini gösterecek araştırmaların, MPH'lerin patogenezini daha çok anlamamıza ve de yeni, miRNA-tabanlı tedavilerin gelişimine yol açacağını, aynı zamanda da hastalık özgül miRNA'ların, MPH'lerin ayırıcı tanısında kullanılabileceğini düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. George TI, Arber DA. Pathology of the myeloproliferative diseases. *Hematol Oncol Clin North Am* 2003;17:1101–27.
2. Levine RL, Wadleigh M, Cools J, et al. Activating mutation in the tyrosinekinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell* 2005;7:387–97.
3. Levine RL, Pardanani A, Tefferi A, Gilliland DG. Role of JAK2 in the pathogenesis and therapy of myeloproliferative disorders. *Nat Rev Cancer* 2007;7(9):673–83.
4. Tefferi A, Spivak JL. Polycythemia vera: scientific advances and current practice. *Semin Hematol* 2005;42:206–20.
5. Ania BJ, Suman VJ, Sobell JL, et al. Trends in the incidence of polycythemia vera among Olmstead County, Minnesota, residents, 1935–1989. *Am J Hematol* 1994;47:89–93.
6. Berglund S, Zettervall O. Incidence of polycythemia vera in a defined population. *Eur J Haematol* 1992;48:20–2
7. Berlin NI. Diagnosis and classification of the polycythemias. *Semin Hematol* 1975;12:339–51.
8. Ellis JT, Peterson P, Geller SA, et al. Studies of the bone marrow in polycythemia vera and the evolution of myelofibrosis and second hematologic malignancies. *Semin Hematol* 1986;23:144–55.
9. Westwood NB, Gruszka-Westwood AM, Pearson CE, et al. The incidences of trisomy 8, trisomy 9 and D20S108 deletion in polycythemia vera: an analysis of blood granulocytes using interphase fluorescence in situ hybridization. *Br J Haematol* 2000;110:839–46.
10. Tefferi A, Gilliland DG. The JAK2V617F tyrosine kinase mutation in myeloproliferative disorders: status report and immediate implications for disease classification and diagnosis. *Mayo Clin Proc* 2005;80:947–58.
11. Johansson P, Safai-Kutti S, Lindstedt G, et al. Red cell mass, spleen size and plasma erythropoietin in polycythemia vera and apparent polycythemia. *Acta Haematol* 2002;108:1–7.
12. Chievitz E, Thiede T. Complications and causes of death in polycythemia vera. *Acta Med Scand* 1962;172:513.

13. Murphy S. Diagnostic criteria and prognosis in polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Semin Hematol* 1999;36:9–13.
14. Landolfi R, Marchioli R, Kutti J, et al. Efficacy and safety of low-dose aspirin in polycythemia vera. *N Engl J Med* 2004;350:114–24.
15. Kaplan ME, Mack K, Goldberg JD, et al. Long-term management of polycythemia vera with hydroxyurea: a progress report. *Semin Hematol* 1986;23:167–71.
16. Silver RT. A new treatment for polycythemia vera: recombinant interferon alfa. *Blood* 1990;76:664–65.
17. Tefferi A. Myelofibrosis with myeloid metaplasia. *N Engl J Med* 2000;342:1255–65.
18. Mesa RA, Silverstein MN, Jacobsen SJ, et al. Population-based incidence and survival figures in essential thrombocythemia and agnogenic myeloid metaplasia: an Olmsted County study, 1976–1995. *Am J Hematol* 1999;61:10–15.
19. Michiels JJ, Thiele J. Clinical and pathological criteria for the diagnosis of essential thrombocythemia, polycythemia vera, and idiopathic myelofibrosis (agnogenic myeloid metaplasia). *Int J Hematol* 2002;76:133–45.
20. Lasho TL, Pardanani A, McClure RF, et al. Concurrent MPL515 and JAK2V617F mutations in myelofibrosis: chronology of clonal emergence and changes in mutant allele burden over time. *Br J Haematol* 2006;135:683–87.
21. Chagraoui H, Komura E, Tulliez M, et al. Prominent role of TGF-beta 1 in thrombopoietin-induced myelofibrosis in mice. *Blood* 2002;100:3495–03.
22. Schmitt A, Jouault H, Guichard J, et al. Pathologic interaction between megakaryocytes and polymorphonuclear leukocytes in myelofibrosis. *Blood* 2000;96:1342–1347.
23. Massa M, Rosti V, Ramajoli I, et al. Circulating CD34+, CD133+, and vascular endothelial growth factor receptor 2-positive endothelial progenitor cells in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *J Clin Oncol* 2005;23:5688–95.

24. Cervantes F, Alvarez-Larran A, Arellano-Rodrigo E, et al. Frequency and risk factors for thrombosis in idiopathic myelofibrosis: analysis in a series of 155 patients from a single institution. *Leukemia* 2006;20:55–56.
25. Koch CA, Li CY, Mesa RA, Tefferi A. Nonhepatosplenic extramedullary hematopoiesis: associated diseases, pathology, clinical course, and treatment. *Mayo Clin Proc* 2003;78:1223–33.
26. Strasser-Weippl K, Steurer M, Kees M, et al. Age and hemoglobin level emerge as most important clinical prognostic parameters in patients with osteomyelofibrosis: introduction of a simplified prognostic score. *Leuk Lymphoma* 2006;47:441–50.
27. Thiele J, Kvasnicka HM. Hematopathologic findings in chronic idiopathic myelofibrosis. *Semin Oncol* 2005;32:380–94.
28. Tefferi A, Mesa RA, Nagorney DM, et al. Splenectomy in myelofibrosis with myeloid metaplasia: a single-institution experience with 223 patients. *Blood* 2000;95:2226–33.
29. Elliott MA, Chen MG, Silverstein MN, Tefferi A. Splenic irradiation for symptomatic splenomegaly associated with myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Br J Haematol* 1998;103:505–11.
30. Jensen MK, de Nully Brown P, Nielsen OJ, Hasselbalch HC. Incidence, clinical features and outcome of essential thrombocythemia in a well defined geo-graphical area. *Eur J Haematol* 2000;65:132–39.
31. Gangat N, Wolanskyj AP, McClure RF, et al. Risk stratification for survival and leukemic transformation in essential thrombocythemia: A single institutional study of 605 patients. *Leukemia* 2007;21:270–76.
32. Wolanskyj AP, Lasho TL, Schwager SM, et al. JAK2 mutation in essential thrombocythemia: Clinical associations and long-term prognostic relevance. *Br J Haematol* 2005;131:208–13.
33. Pardanani AD, Levine RL, Lasho T, et al. MPL515 mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: A study of 1182 patients. *Blood* 2006;108:3472–76.
34. Juvonen E, Ikkala E, Oksanen K, Ruutu T. Megakaryocyte and erythroid colony formation in essential thrombocythemia and reactive thrombocytosis: Diagnostic value and correlation to complications. *Br J Haematol* 1993;83:192–97.

35. Yoon SY, Li CY, Tefferi A. Megakaryocyte c-Mpl expression in chronic myeloproliferative disorders and the myelodysplastic syndrome: Immunoperoxidasestaining patterns and clinical correlates. *Eur J Haematol* 2000;65:170–74.
36. Wang JC, Chen C, Novetsky AD, et al. Blood thrombopoietin levels in clonal thrombocytosis and reactive thrombocytosis. *Am J Med* 1998;104:451–55.
37. Elliott MA, Tefferi A. Thrombosis and haemorrhage in polycythaemia vera and essential thrombocythaemia. *Br J Haematol* 2005;128:275–90.
38. Rocca B, Ciabattini G, Tartaglione R, et al. Increased thromboxane biosynthesis in essential thrombocythemia. *Thromb Haemost* 1995;74:1225–30.
39. Wolanskyj AP, Schwager SM, McClure RF, et al. Essential thrombocythemia beyond the first decade: Life expectancy, long-term complication rates, and prognostic factors. *Mayo Clin Proc* 2006;81:159–66.
40. Budde U, Schaefer G, Mueller N, et al. Acquired von Willebrand's disease in the myeloproliferative syndrome. *Blood* 1984;64:981–85.
41. Fenaux P, Simon M, Caulier MT, et al. Clinical course of essential thrombocythemia in 147 cases. *Cancer* 1990;66:549–56.
42. Harrison CN. Essential thrombocythaemia: Challenges and evidence-based management. *Br J Haematol* 2005;130:153–65.
43. Pelosi E, Labbaye C, Testa U. MicroRNAs in normal and malignant myelopoiesis. *Leuk Res* 2009;33:1584–93.
44. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 1993;75:843–54.
45. Rodriguez A, Griffiths-Jones S, Ashurst JL et al. Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res* 2004;14:1902–10.
46. Bryant A, Lutherborrow M, Ma D. The clinicopathological relevance of microRNA in normal and malignant haematopoiesis. *Pathology* 2009;41:204–13.

47. Vasilatou D, Papageorgiou S, Pappa V et al. The role of microRNAs in normal and malignant hematopoiesis. *Eur J Haematol* 2010;84(1):1-16.
48. Costinean S, Zanesi N, Pekarsky Y et al. Pre B-cell proliferation and lymphoblastic leukemia/high-grade lymphoma in E(mu)-miR-155 transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:7024-29.
49. Zhou B, Wang S, Mayr C, Bartel DP, Lodish HF. miR-150, a microRNA expressed in mature B and T cells, blocks early B cell development when expressed prematurely. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:7080-85.
50. Felli N, Fontana L, Pelosi E, et al. MicroRNAs 221 and 222 inhibit normal erythropoiesis and erythroleukemic cell growth via kit receptor down-modulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:18081-86.
51. Johnnidis JB, Harris MH, Wheeler RT, Stehling-Sun S, Lam MH, Kirak O, Brummelkamp TR, Fleming MD, Camargo FD. Regulation of progenitor cell proliferation and granulocyte function by microRNA-223. *Nature* 2008;451:1125-29.
52. Chen C, Li L, Lodish HF, Bartel DP. MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science* 2004;303:83-86.
53. Ramkinssoon SH, Mainwaring LA, Ogasawara Y, et al. Hematopoietic-specific microRNA expression in human cells. *Leuk Res* 2005;30:643-47.
54. Monticelli S, Ansel KM, Xiao C, et al. MicroRNA profiling of the murine hematopoietic system. *Genome Biol* 2005;6:R71.
55. Xiao C, Calado DP, Galler G, et al. MiR-150 controls B cell differentiation by targeting the transcription factor c-Myb. *Cell* 2007;131:146-59.
56. Fabbri M, Croce CM, Calin GA. MicroRNAs in the ontogeny of leukemias and lymphomas. *Leuk Lymphoma* 2009;50:160-70.
57. Thai TH, Calado DP, Casola S, et al. Regulation of the germinal center response by microRNA-155. *Science* 2007;316:604-08.
58. Georgantas RW III, Hildreth R, Morisot S, et al. CD34+ hematopoietic stem-progenitor cell microRNA expression and function: a circuit diagram of differentiation control. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:2750-55.
59. Fazi F, Rosa A, Fatica A, et al. A microcircuitry comprised of micro-RNA-223 and transcription factors NFI-A and C/EBPalpha regulates human granulopoiesis. *Cell* 2005;123:819-31.

60. Fontana L, Pelosi E, Greco P, et al. MicroRNAs 17-5p-20a-106a control monocytopoiesis through AML1 targeting and M-CSF receptor upregulation. *Nat Cell Biol* 2007;9:775–87.
61. Felli N, Fontana L, Pelosi E, et al. MicroRNAs 221 and 222 inhibit normal erythropoiesis and erythroleukemic cell growth via kit receptor down-modulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:18081–86.
62. Bruchova H, Yoon D, Agarwal AM, Mendell J, Prchal JT. Regulated expression of microRNAs in normal and polycythemia vera erythropoiesis. *Exp Hematol* 2007;35: 1657–67.
63. Felli N, Pedini F, Romania P, et al. MicroRNA 223-dependent expression of LMO2 regulates normal erythropoiesis. *Haematologica* 2009;94:479–86.
64. Garzon R, Pichiorri F, Palumbo T, et al. MicroRNA fingerprints during human megakaryocytopoiesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:5078–83.
65. Ben-Ami O, Pencovich N, Lotem J, Levanon D, Groner Y. A regulatory interplay between miR-27a and Runx1 during megakaryopoiesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106:238–43.
66. Costinean S, Zanesi N, Pekarsky Y, et al. Pre-B cell proliferation and lymphoblastic leukemia / high-grade lymphoma in E(mu)-miR155 transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:7024–29.
67. Thai TH, Calado DP, Casola S, et al. Regulation of the germinal center response by microRNA-155. *Science* 2007;316:604–08.
68. Kluiver J, Poppema S, de Jong D, et al. BIC and miR-155 are highly expressed in Hodgkin, primary mediastinal and diffuse large B cell lymphomas. *J Pathol* 2005;207:243–49.
69. Eis PS, Tam W, Sun L, et al. Accumulation of miR-155 and BIC RNA in human B cell lymphomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:3627–32.
70. O’Connell RM, Rao DS, Chaudhuri AA, et al. Sustained expression of microRNA-155 in hematopoietic stem cells causes a myeloproliferative disorder. *J Exp Med* 2008;205:585–94.
71. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162(1):156-59.

72. Miller SA, Dykes, DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research* 1988;16:1215.
73. Zhan H, Cardozo C, Raza A. MicroRNAs in myeloproliferative neoplasms. *Br J Haematol* 2013;161(4):471-83.
74. Mendell JT, Olson EN. MicroRNAs in stress signaling and human disease. *Cell* 2012;148(6):1172-87.
75. 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. *Journal of Clinical Oncology* 2011; 29(10):1356–63.
76. Ebert PJ, Jiang S, Xie J, Li QJ, Davis MM. An endogenous positively selecting peptide enhances mature T cell responses and becomes an autoantigen in the absence of microRNA miR-181a. *Nat Immunol* 2009;10(11):1162–69.
77. Bortoluzzi S, Bisognin A, Biasiolo M, et al. Characterization and discovery of novel miRNAs and moRNAs in JAK2V617F-mutated SET2 cells. *Blood* 2012;119(13):120–30.
78. Bruchova H, Merkerova M, Prchal JT. Aberrant expression of microRNA in polycythemia vera. *Haematologica* 2008;93(7):1009-16.
79. Zhan H, Cardozo C, Yu W, et al. MicroRNA deregulation in polycythemia vera and essential thrombocythemia patients. *Blood Cells Mol Dis* 2013;50(3):190–95.
80. Bruchova-Votavova H, Yoon D, Prchal JT. miR-451 enhances erythroid differentiation in K562 cells. *Leuk Lymphoma* 2010;51(4):686-93.
81. Rasmussen KD, Simmini S, Abreu-Goodger C, et al. The miR-144/451 locus is required for erythroid homeostasis. *J Exp Med* 2010;207(7):1351–58.
82. Girardot M, Pecquet C, Boukour S, et al. miR-28 is a thrombopoietin receptor targeting microRNA detected in a fraction of myeloproliferative neoplasm patient platelets. *Blood* 2010;116(3):437–45.

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Kİ	:	Kemik iliği
MPH	:	Miyeloproliferatif hastalık
KML	:	Kronik miyeloid lösemi
PV	:	Polisitemia vera
ET	:	Esansiyel Trombositemi
PMF	:	Primer miyelofibrozis
JAK2	:	Janus kinaz 2
STAT	:	Signal transducer and activator of transcription
MAPK	:	Mitogen activated protein kinase
PI3K	:	Phosphotidylinositol 3-kinase
SOCS	:	Suppressor of cytokine signaling
EPO	:	Eritropoetin
DSÖ	:	Dünya Sağlık Örgütü
TGF	:	Transforme edici büyüme faktörü
PDGF	:	Platelet kökenli büyüme faktörü
bFGF	:	temel fibroblast büyüme faktörü
g	:	Gram
dL	:	Desilitre
MDS	:	Miyelodisplastik sendrom
APL	:	Akut promiyelositik lösemi
AML	:	Akut miyeloid lösemi
ALL	:	Akut lenfositik lösemi
DLBCL	:	Diffüz büyük B hücreli lenfoma
HL	:	Hodgkin lenfoma
KLL	:	Kronik lenfositik lösemi
MCL	:	Mantle hücreli lenfoma
MM	:	Multipl miyelom
UR	:	Up-regüle
DR	:	Down-regüle
OG	:	Onkogen
TSG	:	Tümör süpresör gen
TCL-1	:	T-hücreli lösemi/lenfoma

HSC	:	Hematopoetik kök hücre
CMP	:	Common miyeloid progenitör
CLP	:	Common lenfoid progenitor
MEP	:	Megakaryosit-eritrosit progenitör
GMP	:	Granülosit-monosit progenitör
EP	:	Eritroid progenitör
MkP	:	Megakaryosit progenitör
GP	:	Granülosit progenitör
MP	:	Monosit progenitör
RT-PCR	:	Real Time Polimeraz Zinzir Reaksiyonu
μ l	:	Mikrolitre
ng	:	Nanogram

ŞEKİLLER VE RESİMLER DİZİNİ

Şekiller	Sayfa No
Şekil 1 (<i>JAK2</i> mutasyonu ile <i>JAK2</i> kinaz aktivasyonunun mekanizması)	9
Şekil 2 (Pankreas, kolorektal ve mide kanserlerinde miRNA ekspresyon profilleri)	19
Şekil 3 (MiRNA sentezi)	20
Şekil 4 (Normal hematopoezde miRNA ekspresyonu)	22

TABLolar DİZİNİ

Tablolar		Sayfa No
Tablo 1	(Miyeloproliferatif hastalıklardaki moleküler, morfolojik, laboratuvar ve klinik bulgular)	10
Tablo 2	(Dünya Sağlık Örgütü polisitemia vera tanı kriterleri)	11
Tablo 3	(Dünya Sağlık Örgütü primer miyelofibrozis tanı kriterleri)	14
Tablo 4	(Esansiyel trombositemi tanısında Dünya Sağlık Örgütü Kriterleri)	16
Tablo 5	(Hematolojik malignitelerde miRNA'lar)	18
Tablo 6	(Miyeloproliferatif hastalık için kullanılan ilaçlar)	30
Tablo 7	(Hastaların <i>JAKV617F</i> mutasyon analizi)	31
Tablo 8	(Kontrol ve hastalık gruplarında miRNA ekspresyon sonuçları)	33
Tablo 9	(Cinsiyetlere göre miRNA ekspresyon analizi)	34
Tablo 10	(Eşlik eden hastalıklara göre miRNA ekspresyon analizi)	35
Tablo 11	(<i>JAK2</i> mutasyonuna göre miRNA ekspresyon analizi)	36
Tablo 12	(Kullanılan ilaçların miRNA ekspresyonuna etkisi)	37