

TC
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
PATOLOJİ ANABİLİMDALI

**KEMİK İLİĞİNDE, MYELODİSPLASTİK SENDROM ve
MYELOPROLİFERATİF NEOPLAZM VAKALARINDA, CD34, CD117
ve B-KATENİN EKSPRESYONLARININ ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Işık İkbal AKGÜN

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Hüseyin BÜYÜKBAYRAM

DİYARBAKIR - 2010

ÖNSÖZ

Asistanlık eğitimim ve tez çalışmalarım boyunca her türlü yardım ve toleransı benden esirgemeyen, anabilim dalı başkanımız, hocam Prof. Dr. Hüseyin Büyükbayram'a, bilgi ve tecrübeleriyle mesleki eğitimime yardımcı olan, hocalarım Prof.Dr. Bülent Mızrak, Yrd. Doç. Dr. Selver Özekinci ve Yrd. Doç. Dr. Uğur Fırat'a, istatistiksel çalışmalarımda yardımcı olan Prof. Dr. Melikşah Etem'e, patoloji eğitimimdeki en büyük kazançlarım, dostluklarıyla hep yanımda olan, uzman arkadaşlarım Dr. Asuman Çelik ve Dr. Ayşe Nur Keleş, asistan arkadaşlarım Dr. Yeliz Arman Karakaya, Dr. Ulaş Alabalık, Dr. Bülent Aral, Dr. Gülseren Özel, Dr. Songül Yerlikaya Kavak ve Dr. Yılmaz Yıldız'a

Tezimin mutfak aşamasında yardımlarını esirgemeyen biolog arkadaşım Cemal Çavuş ve teknisyen arkadaşım Neval Tanış başta olmak üzere, asistanlık eğitimim boyunca birlikte çalıştığımız tüm laboratuvar teknisyeni, arşiv görevlisi, sekreter ve danışma görevlisi arkadaşlarıma,

Ayrıca tezimin hazırlanmasında maddi destek sağlayan 'Dicle Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Koordinatörlüğü (DUBAP)'ne,

Hayatım boyunca, benim için hiçbir fedakarlıktan çekinmeyen anne ve babama, beni cennetten gururla izleyen, çok özlediğim dedeme,

En zor günlerimde bile beni terk etmeyen aklıma, sabrıma ve yaşama sevincime,

Ve her zaman benimle olan, beni ben yapan Tanrıma çok teşekkür ederim.

Işık İkbal AKGÜN

Kısaltmalar

ALIP.....	Anormal lokalizasyonlu İmmatür Prekürsörler
CFU.....	Coloni Forming Unit
ET.....	Esansiel Trombositemi
ECM.....	Eksrasellüler Matriks
FAB sınıflaması	French-American-British sınıflaması
G-CSF.....	Granülsit koloni stimule edici faktör
GM-CSF....	Granülosit-Monosit stimule edici faktör
HKH.....	Hematopoetik kök hücre
IL.....	İnterlökin
IPSS.....	Uluslararası Prognostik Skorlama Sistemi
İHK.....	İmmunhistokimya
JMML.....	Juvenil Myelomonositik Lösemi
kDA.....	Kilo dalton
KHF.....	Kök Hücre Faktörü
KML.....	Kronik Myeloid Lösemi
KMML.....	Kronik Myelomonositik Lösemi
M-CSF.....	Monosit Koloni Stimule Edici Faktör
MDR-1 geni....	Multidrug Resistance Geni
MDS.....	Myelodisplastik Sendrom
MDS-f.....	Fibrozisle Seyreden MDS
MDS-h.....	Hiposellüler MDS
MDS-U.....	Sınıflandırılmayan MDS
MPN.....	Myeloproliferatif Neoplazm
MPO.....	Myeloperoksidaz
MVD.....	Mikrovasküler Dansite
PAS/AGM....	Paraaortik Splanknoplörük/ Aorto-gonado- nefroz
PCD.....	Programlı Hücre Ölümü
Ph.....	Philadelphia Kromozomu
PMF.....	Primer Myelofibrozis
PV.....	Polisitemia Vera
RA.....	Refrakter Anemi
RARS.....	Ringed Sideroblastlı Refrakter Anemi
RAEB.....	Artmış Blastla Seyreden Refrakter Anemi
RAEB-t...	Transformasyonlu artmış blast ile seyreden refrakter anemi
RCMLD.....	Multiseride displazi ile seyreden refrakter sitopeni
RCULD.....	Tek Seride Displazi ile Seyreden Refrakter Sitopeni
SM.....	Sistemik Mastositozis
TGF.....	Transforming Growth Faktör
t-MDS.....	Tedavi sonrası gelişen MDS
TNF.....	Tümör Nekroz Faktör
VEGF.....	Vasküler Endotelial Growth Faktör
vWF.....	Von Willabrand Faktör
WHO.....	Dünya Sağlık Örgütü

İçindekiler

Sayfa No

1- Giriş	4
2- Genel Bilgiler	5
2.1- Kemik iliği Histolojisi	5
2.2- Kemik iliğindeki Konnektif Doku Elemanları	5
2.3- Kemik iliğindeki Stromal Hücreler	7
2.4- Hematopoetik Hücrelerin Embriolojik Gelişimi	9
2.5- Hematopoesis ve Hematopoetik Hücreler	11
2.6- Myeloproliferatif Neoplazmlar	19
2.7- Myelodisplastik Sendromlar	22
2.8- MDS'nin Subtipleri	30
2.9- MDS Patogenezinde Apoptozisin Önemi	35
2.10- MDS'de Anjiogenezisin Önemi	39
2.11- Wnt Sinyal İletim Sistemi ve B-katenin	40
2.12- CD34	45
2.13- CD117 (C-Kit)	46
3- Materyal, Metod	48
4- Bulgular	51
5- Resimler	64
6- Tartışma	68
7- Sonuçlar	78
8- Özet	81
9- Summary	83
10- Kaynaklar	85

1-GİRİŞ

MDS ve MPN, kemik iliğinde hipersellülarite ile karakterli klonal kök hücre hastalıklarıdır. Her iki hastalıkta da artmış blast ve progenitör hücrelerin gösterilmesi, gerek tanı gerek gradeleme gerekse gruplama açısından büyük önem taşımaktadır.

Bugüne kadar blast ve progenitör hücrelerin varlığını göstermek için, immunhistokimyasal olarak birçok marker denenmiştir. Bunlar içerisinde en çok kullanılanlardan bir tanesi CD34'tür. Bir yüzey antijeni olan CD34'ün kök hücrelere yüksek duyarlılık gösterdiği çeşitli çalışmalarla kanıtlanmıştır. CD117 de bu amaçla kullanılan bir başka markerdir. CD34 kadar blastlara yüksek affinite göstermese de, CD117, myeloid seriye gösterdiği yüksek spesivite ile özellikle myeloid kökenli hematolojik neoplazilerde kendine önemli bir yer edinmiştir. Son zamanlarda adını duyuran bir başka marker olan b-katenin, non-hematolojik dokularda, neoplastik süreçteki rolü kanıtlanmış, önemli bir moleküldür. B-katenin stoplazmik bir adezyon molekülü olmakla birlikte, aynı zamanda Wnt sinyal sisteminin bir elemanı olarak, gerek embriolojik gerek rejeneratif gerek se neoplastik olaylarda etkin rol oynamaktadır. Hematolojik neoplaziler içerisinde en çok AML vakalarında denenmiş b-kateninin MDS ve MPN vakalarındaki işlevselliğine ilişkin literatürde çok az sayıda çalışma mevcuttur.

Çalışmamızda, CD34 ve CD117 ile hematolojik hastalıklardaki durumu netlik kazanmamış bir marker olan b-kateninin, MDS ve MPN vakalarındaki boyanma oranları, yoğunlukları ve patternlerini karşılaştırmayı, birbirlerine üstünlüklerini ve varsa eğer aralarındaki korelasyonu incelemeyi amaçladık. Eğer varsa, yeni bir marker olan b-kateninin bu hastalıklardaki tanısal önemini araştırmayı düşündük.

Bu amaçla, 2007-2010 yılları arasında DÜTF Patoloji ABD'da tanı almış, 30 MDS, 29 MPN ve 30 kontrol vakasını, CD34, CD117 ve b-katenin ile boyanma özellikleri açısından karşılaştırdık. Aralarında bir korelasyon olup olmadığını inceledik.

2-GENEL BİLGİLER

2.1 - Kemik İliği Histolojisi

Kemik iliği, iskelet kemiklerinin medulla kısmında bulunan geniş ve kompleks bir organdır. Toplam vücut ağırlığının yaklaşık olarak %2.5'unu (1600-3700 gr) oluşturur (1). Bu kitlenin yaklaşık yarısı hematopoetik olarak inaktif, yağlı iliktir (sarı ilik). Diğer yarısı ise hematopoetik olarak aktif olan iliktir (kırmızı ilik). Yenidoğandan erişkinliğe doğru geçiş sürecinde baskın olan kırmızı ilik yerini sarı iliğe bırakır.

Yenidoğanda tüm ilikler kırmızı ilik iken erişkin çağda kırmızı ilik, kalvarium, vertebra, kosta, klavikula, sternum, pelvis kemikleri, femur ve humerus proksimal kısımlarına sınırlıdır. Yenidoğanlarda kemik iliği sellülaritesi yaklaşık % 100 iken, ilk dekatta hemapoetik hücreler/yağ hücreleri oranı 4:1'e düşer. Bu oran 30 yaş civarında 1/1 iken, 70 yaşında 1/4'e kadar düşer. Hematopoetik hücrelerin tuttuğu alanın yüzdesindeki bu azalma hem hematopoetik dokunun miktarındaki gerçek azalmaya, hem de yaşla ilerleyen kemik kaybı sonucu daha da genişlemiş olan ilik kavitesini doldurmak üzere yağ dokusunun artmasına bağlıdır (1,2).

İleri derecede yaşlılar dışında, < %20 sellülarite hipoplazi, 20 yaşın altındakiler dışında, >%80 sellülarite hiperplazi lehinedir. %25-75 arasındaki sellülarite genç ve ileri yaş olgular dışında normal kabul edilir.

Çoğu ilik kavitesinde kemik trabekülaları bulunur. Kemik korteksinin iç yüzeyi ve trabekülaların dış yüzeyi endosteum ile kaplıdır. Endosteum, çoğu alanda endosteal dölşeyici hücrelerle, bazı alanlarda ise osteoklast ve osteoblastlarla dölşelidir. Trabekülalar arasında yer alan kemik iliği, yaygın bir mikrovasküler ağ ve myelinli, myelinsiz sinir lifleri ile desteklenmektedir.

Kemik iliğinin lenfatik drenajı yoktur. Kemik iliğinde bulunan sinusoidler, iç yüzeyi yassı endotelial hücrelerle dölşeli ince bir duvara sahiptir. Endotelial hücreler, luminal ve alumininal yüzeyleri boyunca, çok sayıda küçük piknostotik veziküllerin varlığıyla karakterizedir. Bu hücreler; ekstrasellüler matriks, kök hücre faktörü, IL6, GM-CSF, IL-1a, IL11 ve G-CSF gibi hematopoesisin regölasyonunu sağılayan maddeleri üretirler.

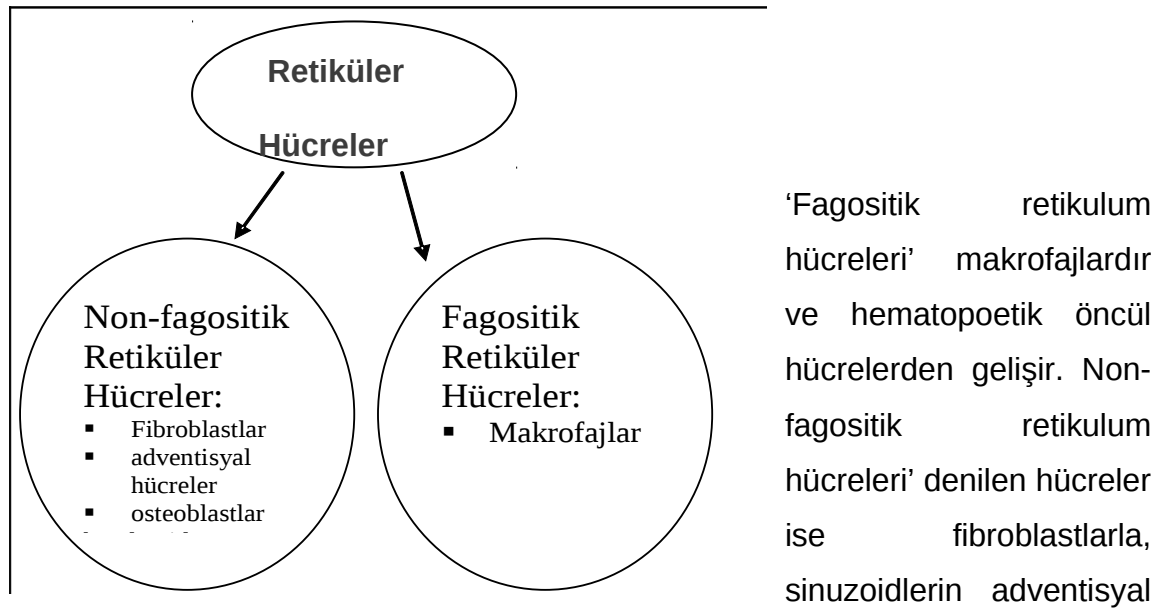
Endotelial hücreler, progenitör hücrelerin ve hematopoetik kök hücrelerin, spesifik binding moleküller vasıtasıyla migrasyonuna izin verir. Duvarın dölşeyici basal membranı fenestralıdır. Sinuzoidlerin dış yüzeyi adventisyal hücrelerle dölşelidir. Bu hücrelerin perivasküler alana uzantıları bulunur, bu sayede

hematopoetik hücrelerin, mast hücrelerinin ve makrofajların yerleşebileceği oyuklar oluştururlar. Adventisiyal hücrelerin fibroblastlardan kaynaklandığı düşünülmektedir. Adventisial hücreler ve fibroblastların her ikisinin de retikülin lif sentezlemesi muhtemeldir (3).

2.2-Kemik iliğindeki bağ doku elemanları

Hematopoetik hücreler, medulladaki intertrabeküler boşlukları doldururken, konnektif dokudan oluşmuş bir stroma içerisinde bulunurlar. Stroma, yağ hücreleri ve bir ağ sisteminden oluşur. Bu ağ sisteminde kan damarları, dallanmalar yapan fibroblastlar, makrofajlar, bir miktar sinir lifleri ve az miktarda retikülin lif bulunur. Stromal hücreler içerisinde 'retikulum' veya 'retiküler hücreler' diye adlandırılan hücreler yer alır. Burada farklı hücre kökenli iki hücre tipi söz konusudur (3).

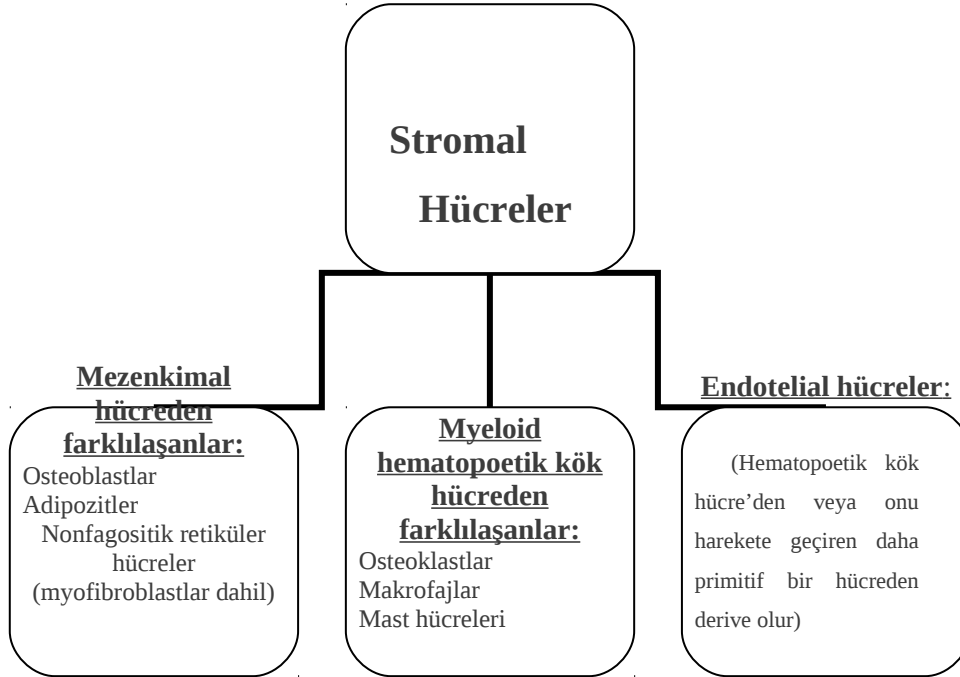
Tablo.1: Retiküler hücreler ve tipleri



hücreleri ile ve muhtemelen osteoblastlarla, kondrositlerle alakalıdır (Tablo.1). Bu hücrelerin çoğunda Alkalen Fosfataz pozitifdir. Bu özellik fagositik retikulum hücrelerinde bulunmaz. Hematopoetik hücrelerle bunların mikroçevresini oluşturan diğer hücreler arasında açık bir etkileşim söz konusudur (1,2,4).

Kemik iliğindeki stromal hücreler ayrı kök hücrelerden farklılaşırlar (Tablo.2) Non-fagositik retiküler hücreler, yağ hücreleri ve osteoblastlar mezenkimal kök hücreden farklılaşırken, osteoklastlar, fagositik retiküler hücreler (makrofajlar) ve mast hücreleri myeloid hematopoetik kök hücreden farklılaşırlar.

Tablo.2: Stromal hücrelerin differansiyasyonu



2.3 Kemik İliğindeki Stromal Hücreler

A- Osteoblastlar ve Osteoklastlar

Osteoblastlar, endosteumda, osseöz matriksin (osteoid) birikim alanlarında bulunurlar. IL6, G-CSF ve GM-CSF gibi hematopoesiste etkili sitokinler üretirler, Alkalen Fosfataz aktivitesi gösterirler. Osteoklastlar myeloid hematopoetik hücre'den köken alırlar (3).

Yetişkin kemik iliğinde, hematopoetik kök hücre ve onun soyları stromal hücrelerle yakın ilişkili olarak gelişir. Bu stromal hücreler mezenkimal orijinli hücreleri de kapsar (fibroblast, osteosit, adiposit ve vasküler düz kas hücreleri). Bunlar, hematopoetik hücrelerin survey, proliferasyon ve differansiasyonu için destekleyici bir mikroçevre oluştururlar (5). Hematopoetik kök hücre havuzunun homeostazında stromal elemanların rolü halen net olarak bilinmese de iki eski çalışma, osteoblastların kemik iliği için önemli bir komponent olduğunu ortaya koymuştur (6,7). Yolk salk'tan izole edilen mezodermal ve endodermal hücre serileri ile yaptıkları çalışmada, bunların kemik iliği hematopoetik progenitör hücrelerinin proliferasyon ve differansiyanunda etkili bir destek olduğu gösterilmiş (8).

B-Yağ Hücreleri

Kemik iliğindeki yağ hücre sayısı yaşla birlikte belirgin değişkenlik gösterir. Yağ hücreleri kemik iliğindeki en geniş hücrelerdir. Kemik iliği yağ hücrelerinin etrafında az sayıda retikülin ve kollagen fibriller bulunur. Kemik iliği yağ hücrelerinin, adventisial hücreler, diğer non-fagositik retiküler hücreler ve hatta sinus endotelial hücrelerin içine lipid birikimi ile şekillendiği bilinmektedir. Hematopoetik hücrelerin sayısında bir artış ya da düşüş olduğu zaman, orantılı olarak yağ hücre sayısında değişim olur ve böylelikle intersinusoidal boşluk her zaman hücre ile dolu olur.

C- Makrofajlar (Fagositik Retiküler Hücreler)

Makrofajlar hematopoetik kök hücre'den, monositlerden farklılaşırlar. PAS pozitif materyal içerirler. Çoğu makrofaj Sudan Black ile boyanmaz. Bazı makrofajlar Alkalen Fosfataz aktivitesi gösterebilir. Makrofajlar, kemik iliği parankimi içersinde her yerde bulunabilirler. Bazıları sinusoidlerin endotelial hücrelerine komşu olarak bulunur, adventisial hücre tabakasının parçası olabilir.

Makrofajların tek fonksiyonu fagositoz değildir. Eritroid progenitörleri tarafından çevrelenmiş santral makrofajlar mevcuttur. Kök hücre faktörü, M-CSF, IL-1 ve G-CSF gibi hematopoetik growth faktörler üretirler.

D- Non-Fagositik Retiküler Hücreler

Makrofajlara benzerler fakat farkları intrastoplazmik inklüzyonlarının olmamasıdır. PAS negatif, Alkalen Fosfataz ile güçlü pozitif, Asid Fosfataz negatif ve demir negatif boyanırlar. Non-fagositik retiküler hücreler hematopoesisin düzenlenmesinde önemli bir role sahiptir. Primitif hematopoetik hücreleri bağlarlar ayrıca monokinlerin stimülasyonu ile belli hematopoetik büyüme faktörlerinin üretimini yaparlar.

E- Mast Hücreleri

Kemik iliğinde hematopoetik kök hücre tarafından oluşturulan mast hücre progenitörleri morfolojik olarak tanınamazlar. Bu hücrelerden en matürleri dolaşıma salınır. Dolaşıma geçen hücrelerin hala mast hücre granülleri yoktur. Dokuların içine göç ederler ve burada matür mast hücrelerine prolifere olurlar. Mast hücreleri ve bazofiller ortak bir öncü progenitör hücreden köken almazlar. Bazofil granülositlerinin aksine, mast hücrelerinin mitoz yeteneği vardır.

2.4- Hematopoetik Hücrelerin Embriolojik Gelişimi

Yetişkin memelilerde matür kan hücreleri sabit olarak kemik iliğindeki az sayıda hematopoetik kök hücreden (HKH) gelişirler. HKH'ler multipotent hücrelerdir ve kendi kendini yenileme kapasitesine sahiptirler (9) .Hematopoetik kök hücreler tüm matür kan hücrelerin nesillerinin devamından sorumludurlar. HKH'lerin sellüler orijini ve varsa eğer diğer hücrelerle ilişkisi hep merak uyandırmıştır. Araştırmacılar nihai hematopoetik hücreleri oluşturan HKH'lerin gelişim esnasında nasıl ve nerden köken aldıklarını araştırmışlar. Bugünkü elde edilen verilerle primitif hematopoesisin, embriolojik gelişimin erken safhalarında yolk salk'ta başladığı ve burada eritroid, myeloid hücrelerin primitif formlarının üretildiği artık kesin olarak bilinmektedir.

Yaklaşık olarak bir yüzyıl önce bir kuş yolk salk'ında yapılan deneyde, ilk hematopoetik hücrelerin yolk salk'ta üretildiği ortaya atılmış (10,11,12). Daha sonraki çalışmalarda, primitif ve nihai hematopoesisin farklı embrionik orijinlerden köken aldığı ve ilk hipotezin aksine yolk salk'ta farklılaşan progenitörlerin sadece geçici bir hematopoesis oluşturduğu, hayat boyu devam eden nihai hematopoesisi başlatan nihai HKH'leri ise embrionun kendisinin ürettiği bulunmuş (13) .

Günümüze kadar yapılan çalışmalarda hematopoetik seri ile endotelial seri arasında yakın bir ilişki olduğu sonucuna varılmış. Bunun bir ispatı olarak; insan kord kanından elde edilen hematopoetik hücreler in vitro ortamda hem hematopoetik hem de endotelial hücreleri türetebilme özelliğine sahiptirler (14). Hematopoetik hücreler ve endotelial hücreler, yolk salk'ta, mezodermal aggregatlarla eşzamanlı olarak ortaya çıkarlar. Birbirleriyle yakın ilişkilidirler (10,15). İlk HKH'ler midgestasyonda major vasküler alana lokalizedir. Yapılan araştırmalarda hematopoetik ve endotelial hücrelerin "hemanjioblast" ismi verilen ortak bir ata öncül hücreden köken aldıkları keşfedilmiştir (9,14,16) .

2.5- Hematopoesis

Hematopoetik kök hücre'ler, yüksek self-renewal potansiyeli ve multiseri differansiasyon kapasitesine sahip somatik hücre popülasyonlarıdır. Primordial HKH'ler embriolojik gelişim esnasında kademeli olarak yetişkin HKH özellikleri kazanırlar. Primordial hücrelerden yetişkin tip hematopoetik hücrelerin oluşması belli bir hiyerarşi içindedir (10). Yetişkin hematopoetik kök hücreler, matür kan hücreleri

oluşturana kadar progressif olarak pluripotent, multipotent ve unipotent sellüler araçlara differansiye olurlar (14)(Tablo.3).

Erken kök hücreler, kemik iliğinde çok az sayıda bulunan pluripotent hücrelerdir. Hem kanda hem kemik iliğinde bulunurlar ancak morfolojik olarak tanınamazlar. Bu hücreler self-renewal kapasitesine sahiptirler fakat mitotik olarak çok aktif değildirler. Pluripotent kök hücreler daha az self-renewal kapasitesi olan ve daha az multipotensialitesi olan kök hücre'lerin yapımına öncülük ederler (myeloid multipotent kök hücre, lenfoid multipotent kök hücre...). Bu multipotent kök hücreler morfolojik olarak tanınamazlar ve kemik iliğinde az sayıda bulunurlar. Bunlar da düşük mitotik aktiviteye sahip olmakla beraber yüksek self-renewal kapasitesine sahip hücrelerdir.

Bu hücreler, "colony forming-unit" (CFU) veya "colony forming cell"(CFC) olarak bahsedilen hematopoetik hücre kolonilerinin oluşumuna öncülük etme kapasitesine sahiptirler.

Kemik iliğinde çok daha fazla sayıda olup da morfolojik olarak lenfositten ayırtedilemeyen bir hücre grubu ise 'Progenitör Hücreler'dir. Bu hücreler de self-renewal kapasiteye sahip olmakla beraber yüksek mitotik aktiviteye sahiptirler. Tek bir seriye spesifik transkripsiyon faktörlerinin etkisiyle progenitör hücreler tek bir hematopoetik hücre serisi yönünde farklılaşırlar. Alt koloniler oluşturarak granülositer, eritroid ve megakaryositer serilere öncülük ederler.

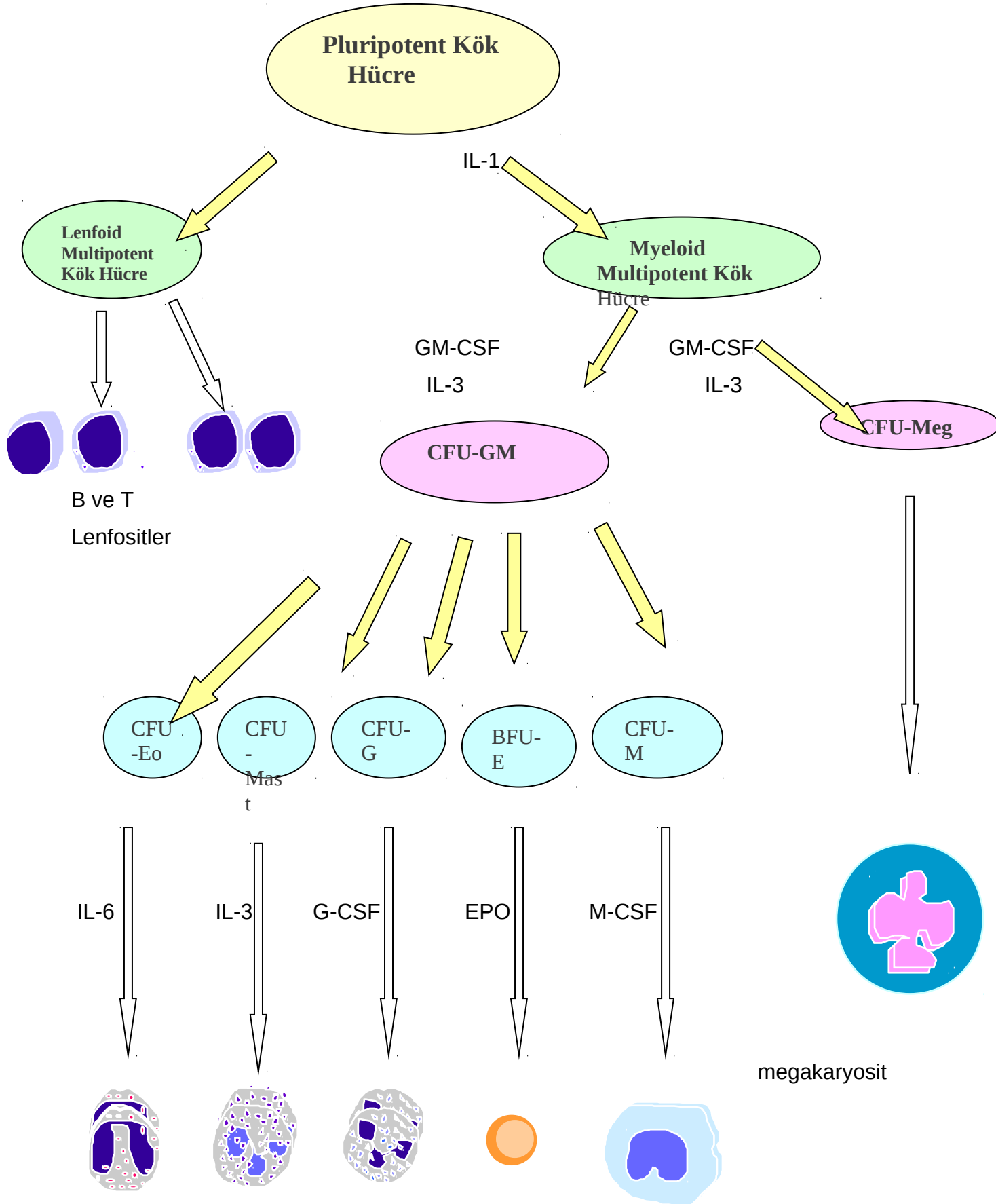
Bu aşamadan sonra artık morfolojik differansiyasyon başlamıştır. Monopotansiele sahip prokürsör hücreler yüksek mitotik aktivite gösterirler ve kendilerinden sonra gelecek matür kan hücrelerine diferansiye olurlar. Bu hücrelerin self-renewal kapasitesi bulunmamaktadır.

Prekürsör hücreler çeşitli sitokinler ve büyüme faktörlerinin etkisiyle işlevsel aktiviteye sahip olgun hücrelere differansiye olurlar. Bu hücreler belirgin morfolojik özelliklere sahiptirler. Bu hücrelerin mitotik aktivitesi yoktur .

Kemik iliği stromal hücreleri (makrofaj, non-fagositik retiküler veya fibroblastoid hücreler, adipositler, endotelial hücreler, vs) bu sinyallari oluşturmada major rol oynarlar. Kök hücrenin duvarında delikler açarak ECM komponentlerinin penetrasyonu ve çeşitli membran bağımlı, çözünebilir, stimulatör hematopoetik büyüme faktörü ve inhibitör sitokinlerin salımına yardım ederler.

Kök hücre ve hematopoetik progenitör hücrelerinin hücre yüzeyi reseptörleri, kök hücre faktörü, IL-1, IL-6, trombopoetin, IL-3 ve GM-CSF gibi multiseri hematopoetik

Tablo.3: Hematopoesiste kök hücreler



büyüme faktörleri ile etkileşir. Daha ileri progenitör hücrelerin ve morfolojik olarak tanınabilir hematopoetik hücrelerin regülasyonu, hem multiseri büyüme faktörlerine hem de G-CSF, M-CSF, IL-5, Trombopoetin, IL-11 ve Eritropoetin gibi seri–spesifik büyüme faktörlerine bağlıdır.

Hematopoetik büyüme faktörleri glikoprotein yapısındadır. Hedef hücrelerin devamı, proliferasyonu ve differansiasyonunda rol alırlar. Bu fonksiyonu sekonder mesajcılar yardımıyla yaparlar. Yokluklarında hedef hücreler apoptozise giderler. G-CSF ve GM-CSF gibi bazı büyüme faktörleri sadece hematopoesisi regüle etmez aynı zamanda matür hücrelerin fonksiyonlarına yardımcı olurlar. Çoğu hematopoetik büyüme faktörü kemik iliği stromal hücreleri ve T lenfositler ve çeşitli sinyaller tarafından aktive edilerek yapılır. M-CSF, fibroblastoid hücreler ve endotelial hücreler tarafından yapılır. IL-1 ve TNF ile aktive olmuş fibroblastoid hücreler, endotelial hücreler ve endotoksin ile stimule makrofajlar M-CSF, GM-CSF, G-CSF, IL-6 ve Kök Hücre Faktörü üretirler. Antijen veya IL-1 ile aktive T hücreleri IL-3, IL-5 ve GM-CSF üretirler. BFU-E ve CFU-E aşamalarında eritropoetin reseptörleri upregüle edilir ve sinyal duyarlılığı artar.

A- Nötrofil Prekürsörler

Morfolojik olarak en erken tanınabilen nötrofil prekürsörleri “myeloblastlar”dır. Myeloblastlar, dolaşımdaki nötrofillere matüre olurken sırasıyla promyelosit, myelosit, metamyelosit, juvenil nötrofil ve ilik nötrofil granülosit aşamalarından geçer. Myeloblast, promyelosit ve myelositlerde hücre bölünmesi izlenirken daha matür hücrelerde izlenmez. Myeloblastlar geniş yuvarlak nukleuslu, düzgün dağılmış kromatinlidir. 2-5 adet nukleolusu vardır. Nukleus/stoplazma oranı oldukça yüksektir. Stoplazmaları bazofilik ve non-granülerdir. Sadece bazı myeloblastlar promyelosite dönüşürken diğerleri eozinofil ve bazofil promyelosite dönüşürler. Belirgin nukleolus olabilir. Nötrofil myelositler, stoplazmalarında azurofilik granüllere ek olarak çok sayıda açık pembe (nötrofilik) granüller bulunur. Bunlara “spesifik granüller” de denir. Nukleus genelde ekzantirik yerleşimli, oval-yuvarlak şekillidir. Nukleer kromatin kaba granülerdir ve nukleolus belirsizdir. Promyelosite göre stoplazma volümü daha fazladır. Stoplazmik RNA'nın azalmasına bağlı olarak gittikçe soluk mavi renkten pembe renge dönerler.

Metamyelositlerin C-şekilli nukleusu, çok sayıda nötrofilik granül içeren asidofilik stoplazması vardır. Azurofilik granül ya çok seyrek ya da yoktur.

Juvenil nötrofiller, Band veya stab form olarak da bilinir. U-şekilli veya uzun, relatif olarak dar, bandlike, çeşitli konfigürasyonlarda olabilen nukleusa sahiptir.

Nötrofil granülositlerin 2-5 adet, birbirine bağlanan nuklear segmentleri vardır.

PAS ile boyandığında myeloblast stoplazması diffüz, soluk kırmızı-mor tanecikler içerir. Myeloblastlar Sudan Black ile boyanmaz veya nukleus çevresinde birkaç adet sudanofilik granülleri bulunur. Nötrofil promyelositler ve daha matür nötrofil seri hücreleri PAS ve Sudan Black aktivitesi gösterirler. Matürasyon arttıkça PAS ile boyanma yoğunluğu artar.

Promyelositlerden sonraki hücrelerde asid fosfataz aktivitesi vardır. İmmatür hücreler daha kuvvetli boyanırlarken, nötrofiller daha zayıf boyanırlar. Birkaç nötrofil metamyelosit zayıf Alkalen Fosfataz gösterirken, nötrofiller değişken yoğunlukta aktivite gösterirler.

B- Eozinofil ve Bazofil Prekürsörler

En erken eozinofil ve basofil prekürsörü; Eozinofil Promyelosit ve Basofil Promyelosit'tir. Eozinofil promyelositler yuvarlak nukleuslu, dağınık kromatinli ve nukleoluslu hücrelerdir. 2 tip granül içerirler: Geniş kırmızı-turuncu (eozinofilik) granüller ve geniş mavimsi granüller. Eozinofil myelositler, metamyelositler ve granülositler sadece geniş eozinofilik granüllere sahiptir. Bazofil myelositler, metamyelositler ve granülositler geniş, yuvarlak yoğun bazofilik granüllerle karakterizedirler.

Eozinofil ve bazofil granülositleri ve prekürsörleri PAS ile boyanmazlar. Bununla birlikte PAS pozitif depozitler her iki hücre serisinde bulunabilir. Bazofil granülleri, promyelosit ve myelositler güçlü sudanofiliktir. Eozinofil prekürsörlerin hepsinde ve eozinofillerde asid fosfataz aktivitesi vardır. Bazofil granüller asid fosfataz ile pozitif boyanır.

C- Monosit Prekürsörler

Morfolojik olarak tanınabilen monositer seri hücreleri: Monoblastlar, promonositler, ilik monositleri ve kan monositleridir. Kan monositleri son hücre değildir, dokuda makrofaja dönüşürler. Monoblastlar ve promonositler hücre bölünmesi özelliğine sahiptirler. Monoblastlar myeloblastlara görünüş olarak benzerler fakat monoblastların nukleusları çentiklenmiş veya lobuledir.

Promonositler daha geniştirler, daha düşük nukleus/stoplazma oranı vardır, monoblastlara göre daha az bazofilik stoplazmaları vardır. Stoplazmalarında birkaç azurofilik granül içerirler. Promonositler genelde geniş, yuvarlak, yarıklı veya lobule nukleusludurlar. Nukleolus görünebilir ya da görünmeyebilir. İlik ve kan monositleri promonositlere göre daha düşük nukleus/stoplazmik orana (<1), daha az bazofilik stoplazmaya ve daha fazla sayıda azurofilik granüllere sahiptirler. Nukleus ekzanterik yerleşimlidir, böbrek, at nalı şekilli veya lobüle görünümde olabilirler

Bazı normal monositler PAS pozitif granüller ve sudanofilik granüller içerirler. Monositler alkalen fosfatazla negatif fakat asid fosfatazla güçlü pozitif boyanırlar.

D- Kırmızı Hücre Prekürsörler

“Eritroblast” terimi herhangi bir çekirdekli kırmızı hücre prekürsörü için kullanılırken, “normoblast” terimi kemik iliğinde morfolojik olarak eritroblast karakteri taşıyan tüm hücreler için kullanılır. Kemik iliğindeki kırmızı hücre prekürsörleri artan matürasyon sırasına göre: Pronormoblast, bazofilik normoblast, erken polikromatik normoblast, geç polikromatik normoblast, ilik retikülositleri ve kan retikülositleridir.

Pronormoblastlar geniş hücrelerdir. Yuvarlak nukleuslu agranüler stoplazmalı hücrelerdir. Nukleusa komşu, soluk bir alan (golgi aparatına bağlı) dışında yoğun bazofilik stoplazmalıdırlar. Bir ya da daha fazla belirgin nukleolusu mevcuttur.

Basofilik normoblastlar pronormoblastlara benzer fakat nukleer kromatin daha yoğundur ve kaba granüler bir görünüşü vardır.

Erken polikromatik normoblastlar bazofilik normoblastlardan daha küçüktürler, daha küçük nukleuslar ve nukleus/stoplazmik oranları vardır. Stoplazma polikromatik ve agranülerdir. Nukleus özellikle nukleer membrana yakın alanlarda çok sayıda orta boy kondense kromatin kümesi içerir. Polikromazi, sitoplazmik RNA (mavi boyanır) kadar hemoglobinin de (kırmızı boyanır) varlığından ileri gelir.

Geç polikromatik normoblastlar daha küçüktürler ve nukleus/stoplazma oranları belirgin derecede düşüktür. Stoplazma ağırlıklı olarak ortokromatiktir fakat halen grimsi görünümü vardır. Nukleus küçük, ekzanterikdir. Geniş kromatin kümecikleri içerir. Geç polikromatik normoblast matürleştikçe ilik retikülositi halini alır.

İlik retikülositi düzensiz şekilli, oldukça polikromatik stoplazmalı bir hücredir. Motilitesinden dolayı sinusoidlere geçebilir. Retikülosit dolaşımında 1-2 gün dolaştıktan sonra matür eritrosite dönüşür. Retikülositin ortalama hacmi eritrosite göre % 20 daha büyüktür.

Normal eritroblastlar PAS negatiftirler. Sudan Black boyanmazlar. Asid fosfataz pozitif paranükleer granüller her tip eritroblastlarda görülür. Perl's asid ferrosiyaniid ile boyalı normal kemik iliği yaymalarında %20-90 polikromatik eritroblastlar, 1-5 küçük mavi-siyah granüller içerir. Bu demir içeren (siderotik) granüller randomize olarak kemik iliğine dağılmıştır. Siderotik granüller içeren eritroblastlara "sideroblastlar" denir. Demir Eksikliği anemisi ve kronik hastalık anemisinde sideroblastların yüzdesi düşer. Artmış transferrin saturasyonu ile seyreden (hemolitik anemi) durumlarda siderotik granüllerin hücre başına ortalama sayısı artar.

E- Megakaryosit Prekürsörler

Megakaryositik seri hücrelerinin çoğu diğer hematopoetik hücrelerden daha büyüktür. En erken tanınabilen megakaryositik seri hücreleri megakaryoblastlardır. Tek bir geniş, oval-böbrek şekilli ya da lobule nükleuslu, yoğun bazofilik agranüler stoplazmalı hücrelerdir. Çok sayıda nükleolusu vardır. Matür granüler megakaryositlerin stoplazmik çıkıntılarının fragmentasyonu ile plateletler oluşur.

Matür plateletler irregüler şekillidir. Stoplazma soluk mavi renkte ve merkezde azurofilik granülleri vardır. Yeni oluşmuş plateletler matürlerine göre daha geniştirler. Hücre bölünmesi megakaryoblastlarda seyrek ve diğer iki hücre tiplerinde görülmez. Megakaryoblastların %40'ı, promegakaryositlerin %20'si, granüler megakaryositlerin %2'si DNA sentez eder. Nükleer alan ve megakaryositin DNA içeriği arasında pozitif bir korelasyon vardır. PAS boyama ile megakaryositlerde diffüz ve granüler pozitivite izlenir. Megakaryositler ve plateletler genelde Sudan Black ile boyanmazlar, asid fosfataz ile güçlü pozitiflik gösterirler.

F- Lenfosit ve Plazma Hücresi Prekürsörleri

Tüm lenfositler, kemik iliğinde pluripotent kök hücreden derive olan lenfoid kök hücrelerden oluşurlar. Lenfoid kök hücreleri hem B hücre hem de T hücre prekürsörleridir. B hücrelerinin matürasyonu kemik iliğinde gerçekleşir. Yeni oluşmuş B hücreleri kan içersinde periferik lenfoid dokuların B hücre zonuna yolculuk ederler. Lenfoid kök hücreler veya erken T hücre progenitörleri kan ile kemik iliğinden timusa doğru göç eder. Burada matür T hücreleri oluştuktan sonra kanla periferik lenfoid organların T hücre zonuna göç ederler. B hücreleri antijen bağımlı proliferasyonla plazma hücrelerine farklılaşırlar. Normal bir yetişkinde T hücre/B hücre oranı: 3:1

'dir. Bazı T ve B lenfositlerin, nukleus etrafında halkalar şeklinde dizilmiş PAS pozitif granülleri vardır. Asid fosfataz ile boyandığında normal lenfositler ya paranükleer noktalanma ya da diffüz granüler pozitivite gösterirler.

G- Plazma Hücreleri Prekürsörleri

Plazma hücreleri kemik iliğinde değişken boyut ve görünümde bulunabilirler. Nukleus, stoplazma volümüne göre relatif olarak küçüktür, kondense kromatin içerir ve ekzanterik yerleşimlidir. Çoğu plazma hücreleri uninükleer ise de, nadir olarak binükleer veya muktinükleer olabilir.

Bazı plazma hücreleri bir ya da birkaç geniş, yuvarlak asidofilik PAS pozitif stoplazmik inklüzyonlar (Russel Body) ya da çok sayıda küçük, yuvarlak, bazofilik inklüzyonlar (Mott hücresi, üzüm hücresi, morula hücresi) içerirler. Az sayıda plazma hücresi AML'deki Auer Rod'lara benzeyen azurofilik rodlar içerir. Fakat bunlar farklı olarak PAS ve Sudan Black negatiftir. Plazma hücreleri özellikle nukleus etrafında güçlü asid fosfataz aktivitesi gösterirler.

2.6- Myeloproliferatif Neoplazmlar

Kronik Myeloproliferatif Neoplazmlar (MPN), ortak olarak, mutajen bir hematopoetik kök hücreden farklılaşan, neoplastik myeloid hücrelerin proliferasyonu ile sonuçlanan bir grup hastalıktır. 2008'de WHO'nun hematopoetik ve lenfoid doku tümörlerinin sınıflamasında yaptığı revizyonla, bu hastalıklar artık "neoplazm" olarak isimlendirilmektedirler (17) (Tablo.4). Değişken derecelerde fibrozis ile beraber hipersellülite ve bir veya daha çok hücre serisinde artmış üretim ile karakterizedir (4,18). Bu differansiye elemanlar kemik iliğinde, periferik kanda ve diğer organlarda (örn. dalak) kümelenebilirler. Bütün MPN tipleri myelofibrozis veya akut lösemiye transformasyonla sonuçlanabilecek bir progresyona girmeye eğilimlidirler. MPN'de nihai tanıyı tek başına morfolojik inceleme ile vermek doğru bir yaklaşım olmaz (4,19). Kemik iliği histolojisinin de değerlendirilmesi tanıyı doğrulamada çok önemli bir rol oynamaktadır.

Myeloproliferatif neoplazmların sınıflamasında, morfolojik bulguların yanı sıra klinik, hematolojik ve sitogenetik bulgulardan yararlanılabilir (4,20).

MPN'de neoplastik hücrelerin matürasyonu görece normaldir. Bu sebeple bunlar görece "benign neoplazmlar" olarak düşünülürler. Polistemia Vera (PV), Primer

Myelofibrozis (PMF) ve Sistemik Mastositozis (SM) sıklıkla uzun bir kronik fazdan sonra akut transformasyona girerken, Esansiyel Trombositemi'de (ET) ise akut transformasyon oldukça nadirdir.

MPN, MDS'den hastalığın daha ilk ortaya çıkışında ayrılır. Meydana gelen genetik hasar hematopoetik kök hücrelerde, geç myeloid differansiasyonda, selektif bir proliferasyon ile sonuçlanır (21). Meydana gelen hematopoesis efektiftir. En az bir seride, hücrelerde aşırı üretim izlenir. Daha az bahsi geçen bir hadise ise dalakta izlenen kemik iliği metaplazisidir. Displastik özellikler belirgin değildir ya da yoktur. Bununla birlikte, hastalığın progresyonuyla birlikte hematopoesis ineffectif hale dönüşür ve displastik özellikler izlenmeye başlar. Kemik iliği ve periferik kanda ineffectif hematopoesis ve blast formlarının izlenmesi yıllar sürer ve bu genellikle akut lösemiye transformasyonla sinonimdir.

Bazı hastalar, hem myelodisplastik hem de myeloproliferatif özellikler taşımalarından dolayı her iki kategoriye de dahil edilemezler. Bunlar WHO sınıflamasıyla düzenlenen yeni bir kategori olan "Myelodisplastik sendrom/myeloproliferatif neoplazm" (MDS/MPN) başlığı altında değerlendirilir. Kemik iliği retikülin veya kollajen fibrozisi, MPN vakalarında belirgin bir özellik olabilir. 2008 WHO sınıflamasında ayrıca fibrozisin derecesi için ayrı bir skala oluşturulmuştur (2,22)(Tablo.5).

Tablo.4: MPN'de 2008 WHO Sınıflaması

Myeloproliferatif Neoplazmlar
Kronik Myelogenik Lösemi Kronik Nötrofilik Lösemi Kronik Eozinofilik Lösemi Primer Myelofibrozis Polistemia Vera Esansiyel Trombositemi Mastositozis Sınıflandırılmayan MPN
MDS/MPN
Kronik Myelomonositik Lösemi Atipik Kronik Myeloid Lösemi Juvenil Myelomonositik Lösemi Sınıflandırılmayan Diğer MPN

Tablo .5: 2008 WHO sınıflamasına göre retikülin fibrozis değerlendirme skalası

Grade	Görünüm
0	Saçılmış lineer retikülin, normal kemik iliği
1	Özellikle perivasküler alanlarda, çok sayıda çapraz liflerle birlikte, retikülin ağında bozulma
2	Yoğun çaprazlaşma ile birlikte retikülinde diffüz ve yoğun bir artış .Nadiren fokal kollajen bantları ve/veya fokal osteosklerozis
3	Yoğun çaprazlaşma ile birlikte retikülinde diffüz ve yoğun bir artış, kaba kollajen bantlar , sıklıkla osteosklerozis

Kronik MPN insidansının her sene 100.000’de 6-9 olduğu tahmin edilmektedir. Vakalar çoğunlukla 40-60 yaş arasındadır. 20 yaş altında nadiren izlenir.

Bu hastalıklarda, tirozin kinaz genlerinde artan sayıda izlenen mutasyonlar, hastalığın patogenezinde önemli rol oynamaktadır. Bunlardan en önemlisi 1984 yılında tanımlanan 9 ve 22. kromozomlarda translokasyon sonucu oluşan BCR-ABL füzyon genidir (Philadelphia Kromozomu) (23,24). Buna bağlı olarak, 4 “klasik” MPN tipi kendi aralarında BCR-ABL(+) olanlar (KML) ve BCR-ABL (-) olanlar (PV, ET ve PMF) olarak sınıflanmıştır. (25,26) BCR-ABL(-) klasik MPN hastalarının çoğunda aktif bir JAK2 mutasyonu (JAK2V617F) bulunmuş (26-30) Oysa ki diğer myeloid hastalıklarda bu mutasyon çok nadirdir ya da yoktur. MPN’de görülebilecek diğer mutasyonlar arasında PV’de JAK2 exon 12 mutasyonu (26,31), ET ve PMF’de MPLW515L/K mutasyonu (26,32,33), CEL’de F1P1L1-PDGFR mutasyonu (26,34), SM’de KITD816V ve diğer KIT mutasyonları (26,35) veya JMML’de RAS, PTPN11 veya NF1 gibi Ras yolu mutasyonları (26,36-38) sayılabilir. Bahsi geçen gen mutasyonları, tirozin kinaz proteinlerinde üretim artışına neden olur ve sonuçta belli bir hücre serisinde proliferasyon meydana gelir (23).

2.7-Myelodisplastik Sendromlar

Myelodisplastik sendromlar (MDS), progessif sitopeni ile beraber, bir veya daha fazla kemik iliği serisinde displastik değişiklikler sonucu gelişen, ineffectif hematopoesis ile karakterize bir grup klonal hematopoetik hastalıktır. MDS primer bir hastalık olarak görülebilmekle birlikte toksik maruziyet ve ya tedavi sonrası (t-MDS) da izlenebilir (4,17). Primer ve t-MDS arasında klinik ve labaratuvar bazı farklılıklar mevcuttur(2).

Primer MDS daha çok ileri yaştaki insanlarda izlenir. Tanı esnasında hastaların ortalama yaşı 70'dir. Hastaların %92'si 50 yaşın üzerindedir (39,40). Çocuk ya da adolosanlarda MDS nadirdir. 14 yaşın altındaki hastalarda tüm hematopoetik neoplazmların %5'inden azını oluşturur (39,41). Erkeklerde daha sık görülür. Siyah veya Asyalılardan ziyade beyaz ırkta daha sık görülür (2,42). Sıklıkla kemik iliği yetmezliğine ilerler ve ya myeloid tip akut lösemiye dönüşür. Akut lösemiye dönüşme oranı, MDS'nin alt tipine bağlı olarak % 10-60 arasında değişir. Kural olarak, displazinin derecesi ve blast hücrelerinin yüzdesi, hastalığın agresifliği ile koreledir. Hematopoetik elemanlarda izlenen displastik değişiklikler MDS'ye özgü değildir, ayrıca birçok inflamatuvar durumlar, HIV enfeksiyonu, endokrin disfonksiyon, otoimmün hastalıklar gibi birçok reaktif durumda da izlenebilir (4).

MDS'nin klinik bulgularını oluşturan değişik sitopenilerdir. Hemoraji, enfeksiyonlara yatkınlık ve ya anemi semptomları izlenebilir. Bazı hastalarda hematomegali, splenomegali görülebilir (2).

MDS tanısı koymak, klinik ve labaratuvar bulguların yanı sıra, periferik kan ve kemik iliği aspiratının da morfolojik değerlendirilmesini gerektirmektedir (4).

MDS,1982 yılında French-American-British (FAB) sistemine göre 5 major kategoriye ayrıldı. Bu sınıflandırma temel olarak, periferik kan ve kemik iliğindeki blast hücrelerinin yüzdesi, kemik iliğinde ringed sideroblastların varlığı, periferik kanda monositlerin mutlak sayısı kriter alınarak yapıldı (2,4,43,44)(Tablo.6).

Tablo 6: MDS'de French–American–British (FAB) sınıflaması

Refrakter Anemi (RA)

Refrakter Anemi, Ringed Sideroblastlı (RARS)

Refrakter Anemi, Artmış Blastlı (RAEB)

Refrakter Anemi, Transformasyon Gösteren Blast Artışlı (RAEB-T)

Kronik Myelomonositik Lösemi (CMML)

Bu altgruplar farklı AML'ye ilerleme oranlarına ve surveye sahiptirler. Refrakter anemi ve ringed sideroblastlı refrakter anemi çok daha uzun surveye ve düşük AML'ye ilerleme insidansına sahiptirler. Bu nedenle bu alt tiplere "düşük grade MDS" denebilir (4) . Düşük gradeli MDS vakalarında, 5 yıl içersinde AML'ye ilerleme riski %20 'den düşük izlenirken, RAEB hastalarında, bu oran %50 'lere kadar çıkmaktadır (39).

FAB sınıflamasının yetersiz kaldığı durumları göz önünde bulunduran bilim adamları 2001 yılında bünyesinde toplanmışlar ve yeni bir sınıflama sistemi oluşturmuşlar (2,4,17). 2008 yılında ise bu sınıflama sistemi yeniden düzenlenmiş (45,46) (Tablo. 7).

FAB ve WHO sınıflaması arasındaki en önemli fark, AML tanısı için daha önceden gerekli olan % 30 blast sayısı barajının % 20'ye indirilmesidir. Buna ilaveten daha önceden sınıflamada yer alan RAEB-T (Artmış Transformasyonlu Blastla Seyreden Refrakter Anemi) kategorisi iptal edilmiş, Kronik Myelomonositik Lösemi (CMML) kategorisi MDS sınıflamasında çıkartılıp, yeni bir grup olan MDS/MPN sınıflamasına dahil edilmiştir (2,4,47,48).

Tablo.7: MDS' de 2008 WHO Sınıflaması

Tek Seride Displazi Gösteren Refrakter Sitopeni (RCUD)

Refrakter Anemi (RA)
Refrakter Nötropeni (RN)
Refrakter Trombositopeni (RT)

Ringed Sideroblastlı Refrakter Anemi (RARS)

Multiseride Displazi Gösteren Refrakter Sitopeni (RCMD)

Artmış Blastla Seyreden Refrakter Anemi 1 (RAEB-1)

Artmış Blastla Seyreden Refrakter Anemi 2 (RAEB-2)

Sınıflandırılmayan MDS (MDS-U)

5q Sendromu

FAB sınıflaması tamamen periferik kan veya ilik aspiratından hazırlanan boyalı yaymalarda sitolojik detayların değerlendirilmesine bağlıydı. Daha kapsamlı ve yeni bir yaklaşım sunan WHO sisteminde ise kemik iliği biopsisi, sitogenetik ve moleküler genetik çalışmalar ile entegre bir tanısal metod izlenmiştir (4).

MDS'de Periferik Kan Bulguları

MDS hastalarındaki en önemli bulgu sitopenilerdir. Hastalarda hemen her zaman anemi izlenir. Anemi sıklıkla makrositiktir. Bir kısım MDS vakasında, özellikle sideroblastik anemi vakalarında, kırmızı hücreler dimorfik bir görünümde olabilirler. Makrositler ve hipokromik, mikrositik eritrositler birarada olabilirler (4). Demir boyası ile tanınabilen Pappenheimer cisimcikleri izlenebilirler (2). Nadiren göz yaşı şekilli ya da çekirdekli kırmızı kan hücreleri izlenebilir (4).

Nötropeni, özellikle RAEB'da sıklıkla izlenen bir bulgudur (2). Nötrofillerde nükleer hipolobülasyon ve sitoplazmik hipogranülerite görülebilir. Agranüler nötrofiller MDS için oldukça spesifiktir (2,49). Anormal bilobüle nükleusa sahip hücrelerde bazen iki nükleusu birbirine bağlayan çizgi halinde bir nükleoplazma bulunur. Bu görünüme "pseudo Pelger-Huét" görünümü denir. Bu da MDS'de periferik kanda izlenebilen bir bulgudur (4). Bu akkiz anomali MDS için hayli karakteristik ve hatta patognomoniktir (2,49). Hipersegmentasyon ve pseudo Chediak Higashi granülleri izlenebilen bulgular arasındadır (4).

Genel olarak eozinofil ve bazofil sayıları azalmıştır fakat nadiren artmış olabilir. Nükleer şekil bozukluğu veya anormal stoplazmik granülasyon gibi displastik bulgular izlenebilir. Bazen monositozis mevcut olabilir. Buna artmış stoplazmik bazofili veya anormal şekilli nükleus gibi sitolojik anomaliler de eşlik edebilir. RAEB başta olmak üzere bütün MDS tiplerinde, periferik kanda blastlar izlenebilir (2). Auer cisimcikleri çok nadiren izlenebilir (4). Diğer granülosit prekürsörleri periferik kanda oldukça nadiren izlenir.

Platelet sayısı genellikle ya normal ya da azalmıştır. Çok nadiren artmış olabilir. Hipogranülasyon, agranülasyon (gri plateletler) ve dev plateletler gibi displastik bulgular izlenebilir. MDS hastalarında otoimmün trombositopeni insidansı artmış olarak izlenir (2,50).

MDS'de Kemik İliği Sitolojisi

MDS vakalarının çoğunluğunda kemik iliği hipersellülerdir fakat normosellüler veya hiposellüler (%10) de olabilir (2,39). Hiposellülerite daha çok t-MDS veya benzer maruziyeti sonrası gelişen MDS'de izlenir.

Tipik olarak eritroid elemanlarda hiperplazi görülür. Bilobüle, multilobüle eritroid prekürsörleri veya irregüler nükleer kontürlü hücreler gibi displastik değişiklikler gösteren immatür hücrelerin oranında artış izlenir. Siderotik granüller ve Howell-Jolly cisimcikleri (apoptotik nükleer parçalar) sitoplazmada izlenebilir (4).

Eritropoiesis, normoblastik veya megaloblastik olabilir. Binüklearite veya multinüklearite, internükleer köprüler, nükleer lobülasyon, nukleusun düzensizliği veya parçalanması, gigantizm, artmış piknozis ve bazofilik noktalanma izlenebilen bulgular arasındadır .

Myeloid seride izlenen bulgular periferik kanda görülenlere benzer. Granülositopoesis genellikle artmıştır. Granülosit prekürsörleri de artmış izlenebilir. Premyelosit basamağından itibaren granülasyon defekti izlenebilir. Nükleer granülasyon defektleri mevcut olabilir (2). Agresif vakalarda, myeloblastlar artmış oranda izlenebilir (4).

Megakaryosit sayısı genellikle normal ve ya artmıştır. Nadiren azalmış olabilir. Daha çok küçük boyutta displastik megakaryositler, MDS hastalarında sıklıkla gözlenir. MDS için en spesifik özelliklerden bir tanesi "mikromegakaryositler"dir (2,49). Bu mikromegakaryositlerin en önemli özelliği, hücre çapının küçük olması ve yoğun, hiperkromatik stoplazma içerisinde izlenen bir tek hiperkromatik, non-lobüle veya hipolobüle nukleustur. Megakaryositler ayrıca normal boyutta fakat geniş, non – lobüle nukleusa sahip olabilirler. Bu anomali MDS için daha az spesifiktir. Oysaki akkiz 5q- kromozomal anomalisi için karakteristik bir bulgudur (2,51)

Görülebilen diğer megakaryositik anomaliler: bizar nükleer şekiller ve multipl bölünmüş nukleus varlığıdır. Megakaryosit stoplazmasında granülasyon kaybı da ayrıca MDS'de görülebilen hayli spesifik bir bulgudur (2,52)

Lenfosit, eozinofil ve nadiren monosit sayılarında da artış gözlenebilir.

MDS'de Kemik İliği Histolojisi

Vakaların büyük çoğunluğunda ilik hipersellülerdir. Fakat az sayıda vakada hiposellüler görünüm mevcuttur (2,39,53,54). Normal kemik iliğinde, granülopoetik

prekürsörler temel olarak paratrabeküler bölgede, eritroid prekürsörleri ve megakaryositler daha santralde yerleşirler. MDS'de bu topografik organizasyon bozulur. Farklı hücre serilerinin öncülleri kemik iliğinin tüm bölgelerine dağılmış durumdur (4).

Kemik iliği biopsisinde izlenebilen bütün değişikliklerin arasında prognostik olarak öneme sahip bir bulgu ise anormal lokalizasyonda bulunan immatür myeloid pregenitör hücrelerdir (ALIP). Bunların, normal olan paratrabeküler lokalizasyonun aksine santral alanlara yerleşmesi MDS için karakteristik bir bulgudur (4). Vakanın ALIP olarak kabul edilebilmesi için her bir kesitte en az 5 adet myeloid prekürsör içeren en az 3 agregat veya küme izlenmelidir (4,55). ALIP temel olarak aggressif MDS alt tiplerinde bulunur. Kötü prognoz ve AML'ye transformasyon için artmış insidans ile ilişkilidir (2,56).

CD34, progenitör ve erken prekürsör ilik hücrelerinde eksprese edilen bir antijendir ve ALIP'in varlığını göstermede çok yardımcıdır. CD34 (+) hücrelerin oranında artış görülmesi ve bu pozitif hücrelerin agregat oluşturmaya yönelik eğilimi, MDS vakalarında subtip bakılmaksızın akut lösemik transformasyon ve kötü prognoz için bir prediktif göstergedir (4,57,58). MDS'de bulunan CD34 (+) hücrelerin çoğunluğu morfolojik olarak blasta benzer. Bununla birlikte pozitif hücrelerin bir kısmı promyelosit benzeri sitolojik özellikler gösterirler. Bunlar premyelositten ziyade blast olarak değerlendirilmelidir.

MDS'de ayrıca megakaryositlerde de aberan CD34 ekspresyonu rapor edilmiştir (4,59). Normal durumlarda, CD34 (+) fenotip sadece küçük bir grup megakaryositte bulunur. Bunlar morfolojik olarak immatür blast olarak tanınabilirler. Bu bize, MDS'de izlenen CD34 (+) megakaryositlerin, morfolojik atipi ve anormal fenotipik differansiasyona ilaveten fonksiyonel olarak zayıf neoplastik megakaryositler olduğunu gösterir. Bununla birlikte CD34(+) megakaryositler, diğer tip neoplastik hastalıklarda ve reaktif durumlarda da izlenir (4).

Histolojik kesitlerde, displazi en açık olarak eritroid prekürsörlerde ve megakaryositlerde izlenir. Eritroid adacıklarda düzensizlik izlenir. Eritroid prekürsörler multinükleer olabilir veya multinükleer tomucuklanma, fragmentasyon, megaloblastik değişiklikler veya stoplazmik vakuolizasyon gösterebilir. Megakaryositik displazi vakaların büyük çoğunluğunda mevcuttur. Genellikle megakaryosit sayısı artmıştır. Kümelenme sıklıkla izlenir. Tipik olarak, sıklıkla hiperkromatik olan, hipolobüle nükleusları vardır. Mikromegakaryositler izlenebilir. Bazı hastalarda hiper-

multinükleer megakaryositler görülebilir. Artmış emperipolesis de izlenebilen bulgular arasındadır (2,60)

Immunohistokimyasal olarak vWF (faktör VIII), CD42b veya CD61, mikromegakaryositlerin varlığını doğrulamada ve fibrozisle seyreden MDS'yi, akut megakaryoblastik lösemi ve artmış megakaryoblast sayısı ile seyreden lösemik durumlardan ayırmada kullanılabılır (4). İneffektif hematopoesisin göstergesi olarak artmış olan apoptotik eritroid ve granülositik prekürsörler sıklıkla izlenebilir (2,57).

MDS vakalarını neredeyse yarısında retikülin fibrozis izlenmiş (2,54,61) Retikülin fibrozisin varlığı, megakaryosit sayısı ve atipi ile korele bulunmuş (2,61) Retikülin fibrozis, sitogenetik anomaliler ve kötü prognoz ile korele bulunmuş. Ödem, sinuzoidlerde ektazi, plazma hücre sayısında ve lenfoid folikül sayısında artma gibi diğer non-spesifik reaksiyonlar sıklıkla izlenir. Özellikle transfüzyon alan hastalarda, hemosiderin yüklü makrofajlar sık görülen bir bulgudur. Özellikle parafin bloklardan yapılan kesitlerde, immatür eritroid prekürsörlerin oluşturduğu grupları, ALIP oluşturan immatür granülositik seri hücrelerinden ayırmak çok zor olabilir. Bu durumda immunohistokimya faydalı olabilir.

MDS 'de İmmunohistokimyanın Yeri

MDS vakalarında İHK'nın değeri kısaca şöyledir:

- 1- Anormal topografiyi daha net olarak ortaya çıkarabilir. ALIP'lerin veya paratrabeküler bölgedeki eritroid hücrelerin veya megakaryositlerin varlığı daha net şekilde seçilebilir.
- 2- ALIP'i oluşturan myeloid prekürsörleri, megaloblastik eritroblastlardan ayırmak için Myeloperoksidaz (MPO), CD68, CD163, anti-nötrofil elastaz kullanılabılır. MPO zemindeki matür myeloid prekürsörleri güçlü olarak boyar. Anti-Glikoporin veya anti-Hemoglobin ise erken eritroid hücreleri belirlemek amacıyla kullanılır (4).
- 3- Anormal büyük eritroid adalar ve bu adalar içerisindeki değişik matürasyondaki hücreler vurgulanmış olur.
- 4- Mikromegakaryositler, CD42b ve CD61 yardımıyla kolaylıkla tanınabilir. Megakaryosit kümeleri veya displazi değerlendirilebilir.
- 5- CD34 antikoru ile tanısal ve prognostik bilgi edinilebilir. % 5'den fazla CD34 (+) hücre izlenmesi MDS'li hastaları, MDS'li olmayanlardan ayırmada bir

parametre olarak kullanılabilir (2,58). CD34 (+) hücrelerin oranı lösemik transformasyon için bir parametre olarak kabul edilebilir (2,62). Ayrıca CD34 , fibrozis ile seyreden MDS'de, blast hücrelerini tanımak için oldukça yardımcıdır.

6- Hiposellüler MDS ve Aplastik Anemi ayırımında yardımcıdır.

IHK çalışmaları özellikle üç MDS alt tipinde önem arz etmektedir: Fibrozis ile seyreden MDS (MDS-f), terapi ilişkili MDS(t-MDS) ve hiposellüler MDS (MDS-h). Bu vakalarda incelenmeye uygun yeterli kemik iliği materyali elde edilmesi zor olabilir. Retikülin fibrozis veya kemik iliğinde yağlı değişiklik varlığı tanı için zorluk yaratmaktadır. Fibrozisin yanı sıra diğer sık görülebilecek bulgular arasında; ödem, artmış mikrodamarlanma, artmış plazmositozis, mast hücresi ve makrofaj sayısında artış ve artmış sellüler debri ve hemosiderin, lenfositosis ve lenfoid foliküller gelir (4).

MDS'de Flow Sitometrik Değerlendirme

Kronik anemisi veya sitopenisi olan hastalarda akut lösemi, kemik iliğini tutan lenfoma ve diğer neoplastik durumları dışlamak için flow sitometriden faydalınabilir. MDS şüphesi olan bir hastada, flow sitometriye sıklıkla akut blastik transformasyonu (AML) dışlamak için başvurulur. Şüpheli populasyon histogramlardaki karakteristik kümelenmesiyle tanınabilir. En son çalışmalarda (4,63) kök hücre/ myeloid hücre differansiyasyon evresindeki prekürsör hücrelerde ekspresyon gösteren belirteçler olan CD34 ve CD117 ile, aggressif MDS subtiplerinde double pozitiflik izlendiği gösterilmiş. Tecrübelerle göre, CD13 ve CD33 (+) myeloid hücrelerde MPO ekspresyonunun azalması, MDS'de sık görülen bir bulgudur. Bu bulgu MDS'de , lösemik blastların MPO ile zayıf boyanan veya boyanmayan az differansiye myeloid hücreler olduğu iddiasını destekler.

Flow sitometri ayrıca yüksek riskli MDS vakalarında "multidrug resistans geni" (MDR-1) p170 ekspresyonunu göstermek amacıyla kullanılabilir. p170, CD34 (+) blast sayısında artış ve anormal karyotip ile ilişkili bulunmuştur. Yine de MDS hastalarında MDR ekspresyonunun prognostik değeri halen tartışmalıdır (4,64).

Yüksek grade MDS vakalarında CD34 ve CD117 (+) prekürsör hücre sayısında artış izlenir. Ayrıca bu immatür hücreler CD38 de pozitifdir. Genel olarak blast hücre oranı ve CD34 eksprese eden hücrelerin oranı arasında bir korelasyon

vardır. Blast hücrelerinin hangi seriye ait olduğunu belirlemek için immunfenotip kullanılabilir.

MDS'de Sitogenetik Analizler

MDS, hematopoetik kök hücrelerde defektif matürasyon ve ileri derecede kontrolsüz proliferasyonla karakterize klonal bir anomalidir (65) .

Sitogenetik analizler MDS değerlendirmesinde en faydalı çalışmalardır (4,66,67). Morfolojik bulguların değerlendirilmesi subjektif olmasına karşın, sitogenetik, vakaların objektif değerlendirilmesini sağlar. Karakteristik klonal karyotip anomalileri veya kompleks sitogenetik anomaliler, tanıyı net olarak koydururlar.

Knudson'un "çift vuruş" modeli, MDS gelişimi için patogenesis basamaklarının temelini oluşturur. Herediter kanserlerin gelişiminde tek bir alleldeki kayıp veya inaktivasyon çok nadiren malign klonun gelişimi ile sonuçlanır. Çoğu zaman, eş allelin de kaybı veya ek değişimler, klonal hücrelerin gelişimi için gereklidir (65,68). Bu değişimler, hücre-siklus ilişkili genlerin, transkripsiyon faktörlerinin ve tümör supresör genlerinin ekspresyonunu etkileyebilir. Özellikle, AML'ye yavaş progresyonuyla erken evre MDS, başlangıç ve hastalık progresyonunda, sellüler ve moleküler hasarların yığılmasıyla multistep lökomogenesis için prototip olabilir. MDS'de mutasyona uğrayan genler arasında; nRAS, Tp53, Bcl-2, CDKN2B bulunur(4).

P53 geninde fonksiyon kaybı, hematolojik maligniteye transformasyonda major bir role sahiptir. Vakaların bir kısmında Tp53 geninde, 17p kromozom bandında anomali izlenir. Tecrübeler göstermiştir ki, p53 overekspresyonu neredeyse her zaman kompleks karyotip ve kötü prognozla ilişkilidir. Bu yüzden MDS vakalarında ,parafin kesitlerde p53 analizi önemli bir tanı yoludur.

MDS'de, genetik materyalde kayıp veya çoğalmadan, yapısal değişikliklere kadar çok geniş bir yelpazeye yayılmış anomaliler izlenir. Bununla birlikte konvansiyonel sitogenetik ile MDS vakalarının sadece %50'sinde böyle aberasyonlar yakalanabilir.

MDS ile ilişkilendirilen sitogenetik anomaliler heterojendir. En karakteristik anomaliler monosomiler, delesyonlar ve dengelenmemiş translokasyonlardır. İzlenen anomaliler sıklıkla: Monozomi 5, monozomi 7, trizomi 8, del(5q), del(7q) ve del(20q)'dur (2).

Anomalinin tipinin de ayrıca prognostik önemi vardır. Örneğin izole del(5q) anomalisinde iyi prognoz beklenirken, kompleks karyotipler ve 17p-‘de kötü prognoz beklenir.

2.8 MDS’nin Subtipleri

□□ Tek Seride Displazi ile Seyreden Refrakter Sitopeni

Tek seride displazi ile seyreden refrakter sitopeni (RCUD), tüm MDS vakalarının % 10-20’sini oluşturur. Hastalar genellikle, orta veya ileri yaştadır. Prognoz görece iyidir. Survey ortalama olarak 5 yıldan uzundur ve AML’ye transformasyon oranı düşüktür (2,69). Refrakter Anemi (RA) en sık görülen RCUD formudur fakat az sayıda hastada refrakter nötropeni veya refrakter trombositopeni izlenebilir (2). Refrakter Anemi (RA) ve Ringed sideroblastlı refrakter anemi (RARS)’de kemik iliği aspiratında değişken diseritropoetik değişiklikler ve eritroid hiperplazi izlenir (4). Kemik iliğinde blast sayısı % 5’den az, periferik kanda ise,% 1’den azdır (4,17). Demir boyama ile genellikle artmış miktarda demir izlenir. RARS’da eritroblastların %15 veya daha fazlası ringed sideroblastlardır (Nukleusun en az 1/3’ünün çevresinde, halka şeklinde, prusya mavisi ile boyanmış demir içeren 10 veya daha fazla hücre).

Belirgin displazi yokluğunda, ringed sideroblastlar ve/veya yeterli klinik ve labaratuvar bilgisi ve sitogenetik analizlerle RA tanısı konabilir.

Klonal sitogenetik anomalilerin yokluğunda, pesistan anemi yapacak diğer nedenlerin dışlanması, refrakter anemi tanısı koymak için yeterli olacaktır. Granülositik veya megakaryositik displazi bulguları göstermeyen RA hastaları, RAEB ve AML’ye progresyon göstermezler. Aksine, multiseri displazi ile seyreden vakalar ve/veya artmış oranda blast içeren vakalar daha agresif MDS subtipleri olarak sınıflandırılırlar. RA ve RARS, en sık görülen ve en iyi prognozlu MDS tipleridir. Ortalama survey 66-72 aydır ve akut lösemiye progresyon oranı % 10’dan azdır (4).

□□□ Multiseri Displazi ile Seyreden Refrakter Sitopeni

Multiseri displazi ile seyreden refrakter sitopeni (RCMD), tüm MDS vakalarının % 30’unu oluşturur. Hastalar sıklıkla ileri yaşıdır. Ortalama hayatta kalım 30 aydır, AML’ye transformasyon oranı yaklaşık % 10’dur (2,70).

Bir MDS vakasını RCMD olarak isimlendirmek için iki veya daha fazla myeloid hücre serisinde, hücrelerin % 10 veya daha fazlasında displastik değişiklikler izlenmesi gerekir. Eğer ringed sideroblastlar %15 veya daha fazla ise, vaka ringed sideroblastlı RCMD olarak isimlendirilmelidir (RCMD-RS) (4).

Artmış Blastla Seyreden Refrakter Anemi

Multiseri displazi ve sitopenilere ek olarak, kemik iliğinde veya periferik kanda artmış sayıda myeloblast içeren MDS tipleridir. Blast sayısı % 15-19 arasında değişir. Kanda ise %1-5 arasında değişir (4,17,71).

Tüm MDS vakalarının yaklaşık % 40'ını oluştururlar (2,72). Hastalar sıklıkla orta -ileri yaştadır. Tanı sıklıkla anemi semptomlarının gelişmesi, çürük, kanama veya enfeksiyon gelişmesi sonucu konur. Bazı hastalarda splenomegali gelişir .

Blast hücre sayısına ve Auer rodların varlığı veya yokluğuna göre RAEB-1 ve RAEB-2 olarak ikiye ayrılır (2). Tip1 'de kemik iliği blast sayısı % 10'dan azdır. Tip2'de blast sayısı % 10-19 arasında değişir. % 10'dan daha az blast içeren ancak Auer rod'lar içeren vakalar da ikinci kategoriye girer. Blast yüzdesi %20'den az olan ve Auer rodlar içeren vakaların önemi ise tam olarak net değildir. Bazı kaynaklar tarafından Auer rodların olduğu RAEB vakalarının RAEB-2 olarak sınıflandırılması tavsiye edilir. Kemik iliğinde ringed sideroblastların varlığı sınıflamayı etkilemez.

RAEB hastalarının AML'ye progresyon şansı >% 25'dir. Ortalama hayatta kalım RAEB-1 için 18 ayken, RAEB-2 için 10 aydır (4,17,73).

Transformasyonlu Artmış Blast ile Seyreden Refrakter Anemi

FAB sınıflamasına göre RAEB-T tanısı kemik iliğinde %20 veya daha fazla (fakat % 30'dan az) blast ya da periferik kanda % 5 veya daha fazla blast varlığına dayanır. Kemik iliği ve periferik kandaki blastlarında Auer rodlar izlenen hastalar, FAB sınıflamasına göre RAEB-T olarak sınıflanırlar. Şu an geçerli olan WHO sınıflamasına göre Auer Rod içeren MDS vakaları, RAEB-2 kategorisinde değerlendirilir. Daha önceden RAEB-T olarak sınıflanan (kemik iliğinde > %20 blast hücresi varlığına dayanır) hastaların büyük çoğunluğu, bugün artık WHO sınıflamasına göre AML olarak gruplandırılmaktadırlar. Periferik kanda > %5 blast ve kemik iliğinde < % 20 blast içeren vakalar bugün RAEB-2 grubu içerisinde

değerlendirilmektedir. RAEB-T grubu olarak sınıflanan vakalarda % 60 oranında AML'ye progresyon izlenir. Ortalama hayatta kalım 5 aydır (4).

† İzole del (5q) İçeren MDS (5q Sendromu)

5q sendromu, primer olarak yaşlı kadınlarda izlenen bir MDS formudur. Kadın/erkek oranı 2/1 olarak seyreder. MDS'nin klinik ve morfolojik olarak ayrı bir subtipidir. Periferik kanda izlenen temel bulgular; ılımlı makrositik anemi, hafif nötropeni ve normal veya nadiren artmış platelet sayısıdır (4,74,75) Kemik iliğinde ise sadece orta derece diseritropoesis, disgranülopoez yokluğu ve artmış sayıda hipolobüle ve monolobüle megakaryositler mevcuttur (4). Kromozom 5'in uzun kolunda izole delesyon izlenir (2).

5q sendromlu hastalar görece iyi bir prognoza sahiptirler. AML'ye dönüşüm için düşük riske sahiptir. Enfeksiyon ve hemorajik komplikasyon insidansı düşüktür. Bununla birlikte artmış blast (%5-19) ve ringed sideroblasta (vakaların %10'unda) sahip ve multiseri displazi veya 5q' ya ilaveten başka sitogenetik anomalilerle seyreden vakalar daha agresif gidişata sahiptir. Genel olarak iyi bir prognoza sahip olmasına karşın, nadir vakalarda Akut Megakaryoblastik Lösemi veya diğer AML tiplerine transformasyon gözlenebilir (4).

† 17p Anomalisi ile Seyreden MDS

17p anomalisi ile seyreden MDS tipi WHO sınıflamasına dahil edilmemiştir. Primer veya terapi ilişkili MDS olarak ortaya çıkabilir. P53 mutasyonu ile birliktelik gösterebilir.

Çok sayıda pseudo-Pelger-hücresi, displastik monolobüle nötrofiller ve vakuole stoplazmalı nötrofiller gibi morfolojik özellikler izlenebilirler (4,76).

VII. Fibrozisle Giden MDS

MDS-f, pansitopeni ve minimal ya da organomali yokluğuyla presente olan ve kemik iliğinde retikülin fibrillerde belirgin artış ile karakterize bir MDS varyantıdır (4,57,77). Kemik iliğinde belirgin dismegakaryopoesis ile giden 'trilineage' displazi izlenir. Çoğu vakalarda artmış sayıda blast izlenir. Myelofibrozisten dolayı blastlar aspirattan ziyade kemik iliği biopsisinde daha iyi izlenir. MDS-f tanısı koyabilmek için gümüş boyalı retikülin fibrozisin en az +2 olduğu sistem önerilmiş (4,78).

MDS-f, primer MDS vakalarının % 10-15'ini ve terapi ilişkili MDS'lerin > % 50'sini oluşturur. MDS-f'de CD34 ekspresyonunun artması sıklıkla gözlenir (4,79). Megakaryositlerle reaktif antikorlar, MDS-f vakalarında, fibrozissiz MDS veya normal kemik iliğine oranla artmış bir ekspresyon gösterirler (4,57). Özellikle megakaryositler, belirgin derecede pleomorfizm gösterirler. Küçük, cüce form yanı sıra büyük anormal megakaryositler de izlenebilir.

MDS-f'in ayırıcı tanısına myelofibrozisli panmyelozis (APMF) girer. APMF önceleri 'akut myelofibrozis' olarak sınıflandırılıyordu. APMF, ani ortaya çıkan ateş ve kemik ağrısı ile MDS-f'ten ayrı bir entitedir. APMF'de, kemik iliğinde çok sayıda cüce megakaryositler ve artmış sayıda blast ve şiddetli trilineage displazi ile birlikte, belirgin fibrozis (>+3) izlenir.

Daha az akut presentasyonla giden vakalar hariç RAEB-2-f vakaları APMF'den ayrılamayabilir ve aynı hastalık tablosunu oluşturabilir (4,80). Ayırıcı tanıda ayrıca 'akut megakaryositik lösemi' (morfolojik olarak multiseri displazi ile giden APMF ve AML ile çakışır) düşünülmelidir. 'Kronik idiopatik myelofibrozis' genellikle, karakteristik morfolojik özellikleri (intravasküler hematopoesis, dev megakaryositler) ve belirgin splenomegali gibi klinik bulguları ile kolaylıkla ayrılır.

✚ Terapi ilişkili MDS

Terapi ilişkili MDS (t-MDS), MDS'nin ayrı bir tipi olarak ele alınması gereken, genellikle klinik olarak çok agresif bir hastalıktır (4,81,82). MDS-t'nin iki ana tipi tanımlanmıştır. İlk klasik tip, karakteristik olarak -7(del)q ve /veya -5(del)q ile presente olup, genellikle alkileyici ajan kullanımını takiben 7 veya daha fazla sene sonra ortaya çıkar (4,79,83). İkinci form görece daha erken, topoizomera II'yi hedefleyen (örn. podophyllotoksinler, etoposid, teniposid, doksorubisin) ajan kullanımından 2-3 sene sonra, 21q22'de translokasyonlar veya daha az sıklıkla t(8,21), t(3,21), t(8,16), t(15,17) veya t(9,22) gibi 'denova' lösemiler için tipik olan translokasyonlarla presente olabilir (4,84). Bu hastaların birçoğu daha önceki displastik faz olmaksızın direkt olarak AML'ye progrese olurlar.

✚ Hipoplastik MDS

Hipoplastik MDS (h-MDS), MDS vakalarının yaklaşık %15'ini oluşturur. Kadınlarda daha sıklıkla izlenir. Hiposellüler iliklerin t-MDS vakalarında da izlenebilmesinden ötürü, önceki genotoksik maruziyet veya terapi dışlanmalıdır.

h-MDS genellikle sitopeni ile seyreder. Tanı koyabilmek için kemik iliği biopsisi gereklidir. Hipoplastik ilikli MDS en sık olarak FAB sınıflamasına göre RA'lı hastalarda izlenir. Hiposellüler ilikte > %20 myeloblast varlığı, hiposellüler MDS yerine daha çok hiposellüler AML'yi düşündürür. Displastik özellikler daha az sıklıkla izlenir ve normal/hiposellüler MDS ile karşılaştırıldığında daha düşük gradededirler.

RA'lı çoğu h-MDS vakası sadece orta derece diseritropoesis gösterirler. Bu hastalarda, aspirasyonda artmış oranda blast izlenmemesi veya kemik iliği biopsisinde ALIP izlenmemesinden dolayı, aplastik anemiden ayırımı problemli olabilir. Yapısal olarak disorganize bir ilikte kolaylıkla tanınabilen megakaryositlerin ve retikülün fibrozisin varlığı, aplastik anemiden ziyade MDS lehinedir. Immunohistokimya, hipoplastik MDS'yi akkiz aplastik anemiden ayırmada işe yarayabilir. MDS'de, diğerine oranla daha fazla CD34 ekspresyonu gözlenir (4,85). Kemik iliği sellüleritesi MDS için önemli bir prognostik faktör olarak görülmektedir çünkü hiposellüler MDS'li hastalar da, normo/hiposellüler ilikli MDS vakalarına benzer prognoza sahiptirler (4,86). Aplastik anemiden ayırım önemlidir çünkü h-MDS, akut lösemiye progresyon için daha yüksek risk taşır (4,87).

2.9- MDS Patogenezinde Apoptozisin Önemi

MDS, ineffectif, displastik hematopoesis ve lösemik transformasyon için yüksek risk taşıyan heterojen bir grup klonal kök hücre hastalığıdır (88,89). Normal veya hipersellüler kemik iliğine sahip olmasına karşın, çoğu hasta periferik kanda sitopenilerle ilerler. Bu paradoks, hematopoietik progenitörlerde izlenen artmış apoptozis ile açıklanır (88,90). Programlı hücre ölümü (PCD) esasen kemik iliği mikroçevresi tarafından, büyüme faktörlerinin relatif olarak azalması veya stromal immunregulator hücrelerin, defektli ve hatalı klonları ortadan kaldırması yönünde çalışması yolu ile tetiklenir.

Apoptozis, intrinsik hücre intihar mekanizmasının yönettiği düzenli bir hücre ölümüdür. Hedef hücrelerin yok edilmesiyle, embriogenesis, gelişim, immunité ve doku homeostazında döngüsel bir rol oynar. Hasarlı hücrelerin yok edilmesiyle, tümör denetimi sağlanmış olur. Apoptozisi, radyasyon ve kemoterapi gibi (88,91,92) DNA hasarlayıcı ajanlar veya Tümör Nekroz Faktör-a (TNF-a) veya Fas/Fas Ligand sinyali

ileti sistemi (88,93,94) gibi inhibitör sitokinlerin salınması pozitif olarak indükleyebilir. PCD ayrıca, hematopoetik büyüme faktörleri ve interlökinler tarafından üretilen yaşamsal sinyallerin görece azlığında artabilir (88,95).

Kemik iliği stroması, adezyon molekülleriyle direkt kontakt, transmembran sitokinleri veya integrinleri vasıtasıyla hematopoesisi düzenler (88,96). MDS'li hastada hem hematopoetik progenitörlerde hem de stromal hücrelerde artmış apoptozis izlenir (88,97). Uzun süreli kemik iliği kültür sistemleri ile yapılan çalışmalarda MDS stromasında hem büyümenin defektif olduğu hem de normal CD34 (+) hücre proliferasyon ve differansiasyonunu destekleme kapasitesinin azaldığı gösterilmiş (88,98,99).

2.10-MDS'de Anjiogenesinin Önemi

Anjiogenesis, solid tümörlerin büyüme ve progresyonu için ön koşuldur. Buna ilaveten myeloid hastalıkların gelişim ve progresyonunda da önemli rol oynayabileceği görüşü ortaya atılmış ve bazı araştırmacılar yaptıkları çalışmalarda, lösemi vakalarında, birim alan başına düşen damar sayısının, normal kontrollere oranla artmış olduğunu gözlemlemişler (100,101). Bu damarlanma artışının kemoterapi sonrası azalmadığı gözlemlenmiştir. Akut myeloid lösemi hastalarında, lösemik hücrelerin parakrin bir büyüme faktörü gibi çalışarak, vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) eksprese ederek, neovaskülarizasyonun gelişmesine öncülük ettiği bulunmuş (100,102).

Myeloid hastalıklarda izlenen mikrodamar patternlerini inceleyen araştırmacılar MDS'de ağırlıklı olarak izlenen damarların irregüler ve dallanan şekilli, lümeni net olarak izlenebilen, geniş damarlar olduklarını, myeloproliferatif hastalıklarda izlenen damarların daha çok sinüzoid benzeri damarlar olduklarını, AML'de ise net seçilemeyen lümene sahip küçük damarların baskın olarak izlendiğini gözlemlemişler (100,101). Yüksek grade MDS vakalarında, düşük gradedekilere göre daha yüksek MVD oranlarının görülmesi, anjiogenesis ile lösemik transformasyon riski arasındaki korelasyonu göstermektedir (100). MDS ve AML'deki blast hücrelerinde çok daha sınırlı ve az miktarlarda VEGF ekspresyonu izlenmiştir (103,104). Ayrıca MDS ve AML hastalarında klinik olarak anlamlı miktarlarda VEGF seviyesine raslanmadığı tespit edilmiştir. Bu verilerle megakaryositlerin, MDS ilişkili anjiogenesisde çok önemli bir rol oynadığı söylenebilir. Neoanjiogenesinin hematolojik neoplastik hastalıkların gelişiminde önemli katkısı vardır çünkü endotelial hücrelerin kök hücre faktörü ve Flt-

3 ligandı, VEGF ile stimule olmuş endotelial hücrelerin ise granülosit-makrofaj koloni stimulating factor (GM-CSF) ürettiği bilinmektedir (100,102,105,106). Bu sitokinler hematopoetik progenitörler ve muhtemel neoplastik blastlar için büyüme faktörü gibi etki gösterirler.

2.11 -Wnt Sinyal İletim Sistemi ve B-katenin

Wnt/beta-katenin yolu, gen ekspresyonu, büyüme, proliferasyon, migrasyon ve adezyon gibi değişik hücre biyolojisi olaylarında önemli rol oynayan bir sinyal iletim yoludur. Kemik, deri ve intestinal epitel gibi birçok dokunun embriojenik gelişim ve rejenerasyon aşamalarında görev alır. Ayrıca hematopoetik kök hücrelerinin kendini tamir ve proliferasyonunda rol oynar. Wnt/b-katenin sinyal yolunun hematopoetik hücrelerde, yaşamsal fonksiyonların devamı, proliferasyon ve differansiyasyon gibi birçok önemli görevde rol aldığı gösterilmiştir (106-112). Bu nedenle meydana gelebilecek bir aberan sinyal hematopoesisi etkileyebilir (106). Wnt/b-kateninin disregulasyonu, tümörigenesise, özellikle de kolon, prostat, endometrial, ovarian ca ile melanom, hepatoblastom, hepatosellüler ca, medullablastom ve pilomatriksoma gelişimi ile ilişkilendirilmiştir (107,113-117).

Wnt'ler molekül ağırlığı 39-46 kDA (350-400 aa) arasında değişen 19 proteinden oluşan bir ailedir. Yapıları ve fonksiyonları 20 yılı aşkın süredir araştırılmaktadır. Wnt'ler glikoprotein yapıdadırlar. Frizzled (Fzd) ve LDL reseptör ilişkili protein (LRP) ailesine ait hücre yüzey reseptörlerine bağlanarak sinyal yolunu aktive ederler (108,118).

Beta-katenin ise intersellüler adezyon bağlantılarında rol alan bir proteindir. Bunun haricinde, wnt sinyal yolu da dahil olmak üzere birçok önemli intrasellüler sinyal yolunda rol oynar (108). Mutasyona uğradığında ya da overeksprese edildiğinde onkojen gibi çalışır (106,108,112). Nukleusta, b-katenin, Human T cell factor (TCF) ve Lymphoid Enhancer Factor (LEF) gibi transkripsiyon faktörlerini bağlar (106). Gen ekspresyonunda meydana gelen değişikliklerle, b-katenin, hücre proliferasyonunu arttırabilir veya hücre apoptozisini inhibe edebilir.

Wnt ailesi proteinleri, b-katenin bağımlı gen ekspresyonu, proliferasyon stimülasyonu, adezyon gibi bazı biyolojik olayların sinyal yollarını aktive eder (106,111). Klasik Wnt yolu b-katenin yokluğunda da aktive olabilir. Hematopoetik kök hücreler ve hematopoetik orijinli matür hücrelerin b-katenin yokluğunda Wnt klasik

yolunu aktive ettiği gösterilmiştir. B-kateninden bağımsız olarak Wnt tarafından aktive edilmiş yollar bildirilmiştir. Bunlar intrasellüler Ca seviyesini arttırarak hücre davranışını kontrol ederler. Bazı Wnt ailesi üyeleri sadece klasik ya da non-klasik yolu aktive etmek için design edilmiştir, bazıları ise her ikisini (106).

Human b-katenin 92 kDa ağırlığında, kromozom 3'ün kısa kolunda lokalize CTNNB1 geninin bir ürünüdür (108). Beta-katenin, kadherinlerle ilişkilidir ve kadherini, aktin sitokeletine bağlar (a-katenin ile), adeziv bağlantıları oluşturur, bu yüzden hücre adezyon ve migrasyonunda önemlidir (106).

B-katenin, Wnt yolunun ve nükleer sinyal iletim yolunun kavşağında lokalizedir. Wnt sinyali kesildiği zaman, b-katenin; Kazein kinaz 1, adenomatöz polipozis coli (APC) proteini, aksin ve glikojen sentaz kinaz-3b'dan oluşan bir indirgeme kompleksi tarafından, N terminal ucundaki serin ve trionin aa'lerinin fosforillenmesi suretiyle indirgenir ve stoplazmada engellenir. Herhangi bir stimülasyon olmadığı zaman b-kateninin stoplazmik seviyesi düşer, hücre membranındaki kadherinlerle bağlantısı azalır. Kadherinler, b-kateninle iletişime geçebilmek için APC ile yarışır, bu birleşim sonucu b-katenin indirgenmekten kurtulmuş olur (119,120).

Klasik Wnt sinyal yolu ile ilişkiye giren çok sayıda faktör vardır. Bunlar ekstrasellüler ve intrasellüler kompartımda aktivatör ve inhibitör olarak çalışır. Wnt hücre yüzeyinde Fzd ailesi reseptörlerine bağlanır. İnsanda şimdiye kadar 10 adet Fzd reseptörü tanımlanmıştır. Wnt Fzd'ye bağlandıktan sonra, bir sinyal kompleksi oluşturur. Bu kompleksin bir komponenti Dishevelled (Dsh veya Dsv)'dir. Aksinin indirgenmesini sağlar. Aksin, b-katenin indirgeme kompleksinin bir parçasıdır. Bu nedenle aksinin yokluğu b-katenini koruyucu yönde işgörür. Dsh aktivasyonu GSK-3b inhibisyonuna yol açar. GSK-3b ayrıca lityum tuzları ile de inhibe olur.

LRP 5 ve LRP 6 Wnt yolunun koreseptörleridir. Dsh gibi bu reseptörlerin aktivasyonu da aksin destabilizasyonuna yol açar. Dickkopf gibi bazı intra ve ekstrasellüler proteinler, Fzd ilişkili proteinler (sFRP) ve Wnt inhibitör faktör (WIF-1) sekrete ederler. Bu yolla bu koreseptörlerin bağlanması ve aktivasyonunu düzenler. Dickkopf Wnt'lerin LRP 5 ve 6 reseptörlerine bağlanmasını engeller. sFRP'ler 5 adet glikoprotein reseptörü içeren bir gruptur. Direkt olarak Wnt'lere bağlanır ve bunların LRP ve Fzd ile ilişkiye girmesine engel olur. Bununla birlikte sFRP'ler düşük konsantrasyonda Wnt taşıyıcısı olarak görev yaparak, aktivitesini desteklerler. WIF-1, Wnt'leri bağlar (Wnt-1 ve Wnt-8) ve sinyal üretimini inhibe eder. İndirgenmekten

kurtulan ve stoplazmada korunan b-katenin sonuçta nukleusa transloke olur. Nükleer b-katenin, TCF ve LEF ailesi üyeleri ile iletişime geçer. Bu iletişim hedef genlerin transkripsiyonunu aktive eder. Wnt stimülasyonunun olmadığı durumlarda TCF, Groucho, CREB-binding protein, karboksi-terminal binding protein ve pontin 52 ile bir kompleks oluşturur ve baskılayıcı rol üstlenir. Chibby proteini b-katenin ile TCF/LEF bağlanmasını inhibe ederek inhibitör olarak etki eder. Nükleer androjen reseptörleri veya vitaminler (A ve D), b-katenin için TCF/LEF ile yarışır. B-katenin ayrıca Wnt/Fzd sinyalinin bağımsız olarak fibroblast büyüme faktörü, hepatosit büyüme faktörü ve ürokinaz plazminojen aktivatörü ile aktive olabilir. Alternatif yollarda Wnt'ler b-kateninden bağımsız olarak düzenlenir. Wnt/Ca yolunda, wnt stimülasyonu intrasellüler Ca seviyesini artırır. G proteini aktive olur. GMP seviyesi azalır ve Protein kinaz C aktive olur. Bu yolun gastrülasyonun düzenlenmesinde ve hücre adezyonunda önemi vardır. Son yayınlara göre hematopoesisin düzenlenmesinde de rolü vardır. Klasik Wnt yolunu inhibe edici yönde çalışır.

Hematopoesiste Wnt/b-kateninin Etkisi

HSC'ler blastik cell forming unit'e (CFU-blast), oradan da Common Lymphocyte Progenitor (CLP) ve Common Myeloid Progenitor'e (CMP) differansiye olur. Buradan da eritrosit, granülosit, trombosit ve monosit serileri oluşur.

Wnt/b-katenin yolunun tüm hematopoetik hücrelerin gelişiminde rol alan yeni bir grup hematopoetik faktör olarak işgördüğü gösterilmiş (109-112). Wnt'lerin overekspresyonu, CD 34 (+) hücrelerin proliferasyonunun artmasına neden olur (121). Wnt'lerin HSC'nin self-renewal süreci için zorunlu oldukları gösterilmiştir (109,110,112). Wnt'ler hematopoetik büyüme faktörü gibi işgörürler. Ayrıca bu etkinin kök hücre faktörü (KHF) ve interleukin-3 (IL-3) gibi iyi bilinen hematopoetik büyüme faktörlerinininkinden daha önemli olduğu gösterilmiştir.

Hematopoetik sistemde Wnt/b-katenin yolundaki mutasyonlar, non-neoplastik hastalıklar (immün yetmezlik sendromları) kadar neoplastik (lösemi) hastalıklara da yol açar. Wnt'lerin artmış stimülasyonu myeloid ve lenfoid seri neoplazmlarına yol açar (110,112). Eritrositer ve lenfositler seride differansiasyon blokajı gözlenir. B-katenin aktivasyonu multipotent HSC'in ekspansiyonunu tetikler ve transformasyona yol açar. Wnt ve ilişkili proteinlerin mutasyonu birçok hematolojik hastalıkta saptanmıştır. Wnt'nin tümörigenesisdeki rolüne bir kanıt olarak: Wnt 5a 'da meydana gelen bir mutasyon myeloid lösemi ve B-cell lenfoma gelişimine yol açmaktadır (122).

Wnt 16 mutasyonu ise ALL'ye yol açmaktadır (123). Wnt mutasyonunun tümör hücrelerinde invazyon yeteneğini artırıcı etkisi vardır. TCF1 mutasyonları veya Wnt'nin Fzd'ye bağlanmasında meydana gelen blok, timositlerin proliferasyon ve differansiasyonuna neden olur. Gau ve ark. B-katenin stabilizasyonunun timositlerin maturasyonunda defekte yol açtığını ve transformasyona yönlendirdiğini göstermişler. Bununla birlikte c-Myc ekspresyonunun artması final transformasyona yol açar. LEF -1 mutasyonları pro-B lenfositlerin apoptozisini artırır. T lenfositlere etki etmez. TCF1 ve LEF1 genlerindeki anormallikler her iki lenfoid seriye de etki eder. Bazı neoplazmlarda, Wnt ilişkili genlerin düzeyine bakılarak ayırım yapmak mümkün olabilir. Örneğin, LEF1 ekspresyonu KLL'de, B-cell non-Hodgkin lenfomaya göre daha yüksektir (106).

2.12. Hematopoiesis ve CD34

CD34, glikofosfoprotein yapıda bir hücre yüzey antijenidir (124). Karakteristik olarak kök hücrelerde eksprese edilir (124,125). CD34 temel olarak tüm multipotent (CFU-Blast, pre-CFU, CFU-Mix) ve çoğu bipotent ve unipotent myeloid koloni-forming hücreler (BFU-E, CFU-Meg, CFU-GM) ve erken B lenfosit pregenitörlerinde eksprese edilir (126-135). Normal kemik iliğinde hücrelerin yaklaşık %1-2'si CD34 ekspresyonu gösterir (126). CD34 ekspresyonu maturasyon arttıkça azalır, en son progenitör hücrelerde (CFU-E,CFU-G,CFU-M) zayıf pozitiflik veya negatiflik izlenir. Daha matür ilik ve kan hücrelerinde CD34 ekspresyonu saptanmaz (127,136,137).

Yapılan birçok çalışmada, dikkate değer orandaki AML vakasında, lösemik blastların CD34 yüzey antijeni eksprese ettiği görülmüş (126,138). Akut lösemideki 'matürasyon aresti' kavramına bağlı olarak, CD34 pozitifliğinin, lösemik blastların 'immatür' biyolojik karakterini gösterdiği söylenmiştir. Yüksek oranlardaki CD34 ekspresyonu, primitif kök hücrelerin akut lösemik transformasyonunu yansıtır. Ayrıca CD34 pozitifliği, AML'de, düşük komplet remisyon oranları ve kötü prognoz ile ilişkili bir klinikopatolojik antitedir (126). MDS vakalarında CD34 ekspresyon oranı, ilik blast ve ALIP sayısı ile belirgin derecede koreledir . MDS vakalarında, artan grade ile birlikte CD34(+) blast sayısında artış beklenir. En sık olarak RAEB ve RAEB-T vakalarında yüksek oranda CD34 eksprese eden hücre izlenir (139). Yapılan bazı çalışmalarda MDS vakalarının yaklaşık %50'sinde CD34(+) hücrelerin, GM-CSF, G-CSF veya IL-3 gibi seri spesifik koloni-stimule edici faktörlerin uyarılarına cevap vermediği bildirilmiş (140). CD34 ekspresyonu, azalmış koloni sayısı ve artmış blast

kümeleri ile ilişkili bulunmuş. Bu durum, differansiyasyon kapasitesinden yoksun, daha immatür hücrelerin büyüme patternini ortaya koymaktadır (127,139).

2.13. Hematopesis ve CD 117 (C-KIT)

C-kit protoonkogeni, kök hücre faktörü ligandı olan bir tirozin kinaz reseptörünü kodlar (141,142-144). Bu reseptör, kök hücre faktörüne (KHF) bağlanınca, tirozin kinazın aktivasyonu ve çok sayıda intrasellüler hedefin fosforillenmesiyle, sinyal transdüksiyon kaskadı aktive edilmiş olur.

C-kit eksprese eden non-hematopoetik dokular arasında; meme epitelial hücreleri, paratroid ve dermal ter bezleri, melanositler, santral sinir sistemi, (özellikle serebellum, hipokampus ve spinal kanalın dorsal kısmı), plasenta, testisin interstitial hücreleri ve overler sayılabilir (145,146). Küçük hücreli akciğer kanseri, meme kanseri veya melanom gibi bu dokulardan gelişen neoplastik serilerde de ekspresyon izlenmiştir (147-152). C117'nin normal kemik iliği hücrelerinin yaklaşık %2-5'inde eksprese edildiği gösterilmiştir (153,154). CD34(+) kemik iliği progenitör hücrelerinde, CD117 ile %60-70'lere kadar ko-ekspresyon izlenebilir (155-157). CD34(+)/CD117(+) hücreler klojenik hücrelerin büyük çoğunluğunu oluşturur (157). Hematolojik gelişimin erken evrelerindeki progenitör hücrelerde CD117 ekspresyonu en yüksek değerdeyken, matürasyon ilerledikçe ekspresyon yoğunluğunda azalma izlenir.

Normal hematopoesisdeki ekspresyon patternine uyumlu olarak, en yüksek CD117 ekspresyonu erken myeloid neoplazilerde izlenir. AML ve MDS, MPN gibi konal kök hücre hastalıklarında, normal kontrolleriyle karşılaştırıldığında artmış CD117 ekspresyonu beklenir (153,158-160). En yüksek CD117 ekspresyonları, artmış blast oranlarıyla ilişkili olarak ileri evre MDS ve MPN vakalarında izlenir. AML vakalarının yaklaşık %50'sinde CD117 eksprese edilir (124,155). Malign lenfomalarda, CD117 ekspresyonu CD30(+) anaplastik büyük hücreli lenfomalar ve Hodgkin lenfomada (158) izlenirken, Burkitt Lenfoma (161) ve diğer yüksek grade lenfomalar veya matür lenfoid neoplazilerde CD117 ekspresyonu beklenmez. Normal plazma hücrelerinde CD117 ekspresyonu izlenmezken, Multipl Myelom 'un malign hücrelerinde ekspresyon izlenir.

CD117'nin myeloid differansiasyon için yüksek sensivite gösterdiği ancak megakaryositik ve eritroid progenitörlerde ekspresyonun genelde olmadığı belirlenmiş (141). Yapılan birçok çalışmada CD117'nin AML ve diğer myeloid

neoplazmların çoğunluğunda eksprese edildiği ve özellikle akut lösemilerde myeloid kompartmanı göstermede güvenilir bir marker olduğu belirtilmiş (141,162).

3- MATERYAL VE METOD

Çalışmamızda, 2007-2010 yılları arasında Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji anabilim dalı arşivimizde yer alan 30 Myelodisplastik Sendrom, 29 Myeloproliferatif Neoplazm ve 30 adet herhangi bir sitolojik atipi içermeyen, normal kemik iliği kontrolleriyle beraber, toplam 89 kemik iliği materyali ve kemik iliği yaymaları 2008 WHO kriterlerine göre yeniden değerlendirildi (46). Subtip ve gradelerine bakılmaksızın MDS ve MPN tanısı alabilen vakalar çalışma için uygun kabul edildi.

Bölümümüze gelen kemik iliği materyalleri 3-4 saat formol tespitinden sonra 12 saat dekalsifiye edilip rutin takibe alınmış materyallerdir. Kemik iliği yaymaları giemsa ile boyandı. İmmunhistokimyasal çalışma için her bir parafin bloktan 3'er adet kesit alınarak, bunlar beta-katenin, CD34 ve CD117 immunboyaları ile çalışıldı.

3.1- İmmunhistokimyasal çalışma

Olguların parafin bloklarından 4mm kalınlığında kesitler, poly-L-Lysinli lamlara alındı. Lamlar 56 derecelik etüvde bir gece bekletildi. Deparafinizasyon işlemi için 2 x 10 dakika boyunca ksilen ve 2 x 10 dakika % 96'lık alkol solüsyonlarında bekletildi. Daha sonra distile suyla yıkama yapıldı. Antijen retrieval amacıyla, plastik taşıyıcıya konulan kesitler CD34 için Ph 6 sitrat buffer solüsyonu, CD117 için EDTA solüsyonu eklenerek, 4 defa 5'er dakikalık sürelerle toplam 20 dakika mikrodalga fırında (800 watt) kademeli bir şekilde şoklandı. Beta- katenin boyanacak kesitler ise EDTA solüsyonu içersine konarak Pressure Cooker cihazı ile 125 derece sıcaklığa kadar retriye edildi. Kesitler oda sıcaklığında 20 dk. soğutuldu. Kesitler distile suda 10 dk. bekletildi. Dokuların etrafı hidrofobik kalemle çizildi. 10 dk. endojenöz peroksidaz içersinde bekletildi. PBS solüsyonunda 2 x 5 dk. bekletildi. 20 dk. protein blok solüsyonu (Ultra V blok) içersinde bekletildi. PBS solüsyonunda 2 x 5 dk. bekletildi.

Hazırlanan kesitler primer antikor olarak Beta-katenin (NCL-B-CAT, Leica) , CD34 (NCL-L EUD, Leica) ve CD117 (CME,296,AK,BK,CK,Biocare) ile inkübe edildi. Beta-katenin için 135 dk, CD34 için 40 dk. ve CD117 için 75 dk. inkübasyon süreleri uygulandı. PBS solüsyonunda 2 x 5 dk. bekletildi. Ardından kesitler Broad Spectrum Second Antibody içerisinde 20 dk. bekletildi. PBS solüsyonunda 2 x 5 dk. bekletildi. Kesitler daha sonra HRP Streptavidin ile 20 dk. muamele edildi. PBS solüsyonunda 2x 5 dk. bekletildi. AEC (3-Amino-9-Etilkarbazol) solüsyonunda 10 dk. bekletildikten sonra distile su ile yıkama yapıldı. Mayer's Hematoksilen ile 2dk. nükleer zıt boyama yapıldı. Daha sonra oda sıcaklığında kurutulan camlar, Aqueous mounting kapama maddesi ile kapatıldı.

Beta-katenin için pozitif kontrol olarak tonsil, CD34 için daha önceden tanı almış angiosarkom ve CD117 için Gastrointestinal stromal tümör vakası kullanıldı.

3.2- Değerlendirme

Olgular Nikon Eclipse 80i (Japan) ışık mikroskopunda değerlendirildi. Fotoğraflar Nikon Coolpix 5000 dijital fotoğraf makinesi (Japan) ile çekildi. Olgularımıza ait resimler Resim 1-8'de gösterilmektedir.

Her bir vakaya ait, boyalı üçer cam, değerlendirildi. Skorlamalar, her bir vakada 100'lük büyütmede en az 100 hücre izlendikten sonra, aşağıda verilen ölçütlere göre yapıldı:

1- Olguların immun boyalarla boyanma sıklığı aşağıdaki skorlamaya göre yapıldı:

- 0 : Kemik iliğinde boyanma izlenmemiştir ya da <%5 boyanma izlenmiştir
- 1 : Kemik iliğinde % 5-%30 arasında boyanma izlenmiştir
- 2: Kemik iliğinde % 31- % 60 arasında boyanma izlenmiştir.
- 3: Kemik iliğinde >% 61 boyanma izlenmiştir.

Çalışmamızda %5'in altında boyanma gösteren vakalar 'negatif' olarak değerlendirildi.

2- Olguların immun boyalarla boyanma yoğunluğu aşağıdaki skorlamaya göre yapıldı:

- 0 : Boyanma izlenmedi
- 1 (+) : Hafif/minimal boyanma izlendi
- 2 (+): Orta derece boyanma izlendi
- 3 (+): Güçlü boyanma izlendi

3- Olguların immun boyalar ile boyanma patternleri aşağıdaki skorlamaya göre yapılmıştır:

- 0 : Boyanma izlenmedi
- 1 : Membranöz boyanma izlendi
- 2: Stoplazmik boyanma izlendi
- 3: Membranöz/stoplazmik boyanma izlendi
- 4: Nükleer boyanma izlendi

3.3-İstatiksel değerlendirme

İstatiksel değerlendirmeler istatistik paket programı Epi Info versiyon 2000 (CDC Atalanta) ile yapıldı. Gruplar arası frekansların karşılaştırılmasında (çapraz tablolarda) Ki-kare testi kullanıldı. Ortalamaların karşılaştırılmasında ANOVA kullanıldı. ANOVA işlemi sonrası (Post Hoc) ikili karşılaştırmalarda Tukey HSD kullanıldı. Her bir hastalık grubunda farklı boyalar için boya alma yüzdelerinin karşılaştırılmasında Kruskal Wallis varyans analizi kullanıldı. Kruskal Wallis'e göre anlamlı çıkan analiz sonuçları için ikili karşılaştırmalar yapıldı. Bunun için de t testi kullanıldı. p değerinin 0,05'ten küçük olduğu durumlarda gruplar arası farkın istatistiksel anlamlı olduğu kabul edildi.

Beklenen frekansların 5'in altında olduğu durumlarda Fisher's Exact Test'i kullanıldı.

4- BULGULAR

Çalışmamızda 30'u MDS, 29'u MPN tanılı ve 30'u kontrol grubu olmak üzere toplam 89 adet hasta değerlendirilmiştir. Değerlendirilen hastaların, toplamda 42'si erkek (%47,2), 47'si kadın (%52,8) 'dır. Cinsiyete göre hastalık grupları dağılımının yapılan istatistiksel değerlendirmesinde anlamlı bir fark izlenmedi ($p= 0.810$) (Tablo.8).

Tablo.8: Hastalık gruplarına göre cinsiyet dağılımı tablosu

	Kontrol		MDS		MPN		Toplam	
Erkek	13	% 43,3	14	% 46,7	15	% 51,7	42	% 47,2
Kadın	17	% 56,7	16	% 53,3	14	% 48,3	47	%52,8
Toplam	30	% 100	30	% 100	29	% 100	89	% 100

MDS hastalarının yaşları 21 ile 79 arasında değişmekte olup, ortalaması 58,53 olarak hesaplandı. MPN hastalarının yaşları 18 ile 79 arasında değişmekte olup, ortalaması 57,24 olarak hesaplandı. Kontrol grubunun yaşları ise 20 ile 82 arasında değişmekte olup, ortalaması 47,33 olarak hesaplandı. Yaşa göre hastalık gruplarının dağılımının istatistiksel değerlendirmesinde anlamlı bir fark olduğu izlendi ($p=0.03$). Yaş dağılımına göre MDS ve MPN gruplarının istatistiksel olarak karşılaştırılmasında anlamlı bir fark izlenmedi ($p = 0.95$). Yaş dağılımına göre kontrol grubunun MPN hastaları ile karşılaştırılmasında anlamlı farklılık bulunmazken ($p=0.08$), kontrol grubunun MDS hastaları ile karşılaştırılmasında anlamlı bir fark olduğu görülmüştür ($p= 0.04$). Sonuç olarak MDS hastalarının, normal kemik iliğine sahip hastalara göre belirgin olarak daha ileri yaş ortalamasına sahip olduğu söylenebilir.

MDS hastalarının kemik iliği sellülaritesi % 35 ile % 95 arasında değişmekte olup, ortalaması % 70,16 olarak hesaplandı. MPN hastalarının sellülaritesi % 50 ile %

98 arasında değişmekte olup, ortalaması % 80,44 olarak hesaplandı. Kontrol grubunun sellülaritesi % 25 ile % 75 arasında değişmekte olup, ortalaması % 48,66 olarak hesaplandı. Kemik iliği sellülaritesine göre hastalık gruplarının dağılımının değerlendirmesinde anlamlı bir fark olduğu izlendi ($p < 0.001$). Sellülarite dağılımı açısından kontrol grubunun hem MDS hem de MPN hastaları ile ayrı ayrı karşılaştırılmasında, istatistiksel olarak anlamlı farklar olduğu görüldü ($p < 0.001$, $p < 0.001$). Sellülarite dağılımı açısından MDS grubunun hem MPN hem de kontrol grubu ile ayrı ayrı karşılaştırılmasında anlamlı istatistiksel farklar olduğu görüldü ($p = 0.02$, $p < 0.001$). Sellülarite dağılımı açısından MPN grubunun da hem MDS hem de kontrol grubu ile karşılaştırılmasında istatistiksel olarak anlamlı farklar olduğu görüldü ($p = 0.02$, $p < 0.001$). Sonuç olarak kemik iliği sellülaritesi açısından her üç grubun da birbirinden anlamlı derecede farklı olduğu izlendi. En yüksek sellülarite % 80,44 ile MPN hastalarında izlenirken, bunu % 70,16 ile MDS ve % 48,66 ile kontrol gruplarının takip ettiği izlendi (Tablo.9).

Tablo.9: Her üç hastalık grubundaki hastaların ortalama kemik iliği sellülariteleri

Sellularite	Hasta sayısı	Ortalama
kontrol	30	48,6667
MDS	30	70,1667
MPN	29	80,4483
Total	89	66,2697

MDS, MPN ve kontrol gruplarının hiçbirinde CD34 ile, % 31 ve üzeri boyanma sıklığı izlenmedi (Tablo.10). CD34 boyanma sıklığına göre grupların dağılımının değerlendirmesinde anlamlı fark bulundu ($p < 0.001$). Yapılan ikili karşılaştırmalar sonucunda MDS ve MPN grupları arasında CD34 boyanma sıklığı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmazken ($p = 0.24$), kontrol grubu ile MDS ve MPN vakalarının ayrı ayrı karşılaştırılmasında CD34 boyanma sıklığı açısından istatistiksel olarak anlamlı farklar bulundu ($p < 0.001$). Sonuç olarak MDS ve MPN vakalarının her ikisinde de, kemik iliği kontrollerine göre CD34 ile belirgin derecede yüksek sıklıkta boyanma izlenmiştir. Kontrol vakalarının büyük çoğunluğunda (%83.3) %5'in altında boyanma sıklığı izlenirken, MDS vakalarının % 70'inde, MPN vakalarının ise % 58.6'sında % 5 ve üzerinde boyanma izlenmiştir.

Tablo.10: Hastalık gruplarının CD34 boyanma sıklığına göre dağılımı

CD34 Boyanma sıklığı	Kontrol		MDS		MPN		Toplam	
<% 5	25	%83,3	9	% 30	12	%41,4	46	%51,7
% 5-30	5	%16,7	21	% 70	17	%58,6	43	%48,3
>%31	0	% 0	0	% 0	0	% 0	0	% 0
Toplam	30	% 100	30	%100	29	%100	89	% 100

MDS, MPN ve kontrol gruplarındaki vakaların hepsinde CD34 ile boyanma izlenmiştir. CD34 ile boyanma yoğunluğu açısından MDS, MPN ve kontrol grupları arasında kayda değer bir farklılık izlenmemiştir ($p=0.06$). Sonuç olarak, MDS, MPN ve normal kemik iliği örneklerinin, CD34 ile boyanma yoğunluğu açısından anlamlı bir farklılık göstermedikleri izlenmiştir (Tablo 11).

Tablo.11: Hastalık gruplarına göre CD34 ile boyanma yoğunluğu dağılımı

CD34 Boyanma yoğunluğu	Kontrol		MDS		MPN		Toplam	
1 (+)	5	%16,7	4	%13,3	0	%0	9	%10,1
2 (+)	15	%50	10	%33,3	10	%34,5	35	%39,3
3(+)	10	%33,3	16	%53,3	19	%65,5	45	%50,6
Toplam	30	% 100	30	%100	29	%100	89	% 100

MDS, MPN ve kontrol gruplarından hepsinde CD34 ile boyanma izlenmiştir. Hiçbir vakada tek başına membranöz boyanma izlenmemiştir (Tablo.12). Vakaların hiçbirinde nükleer boyanma izlenmemiştir. CD34 ile boyanma patterni açısından gruplar arasında anlamlı bir farklılık izlenmiştir ($p= 0.01$). Yapılan ikili karşılaştırmalarda MPN ve kontrol grupları arasında, CD34 ile boyanma patternleri açısından kayda değer bir fark izlenmezken ($p=1.00$), MDS grubunun hem MPN hem de kontrol grubu ile ayrı ayrı karşılaştırmasında anlamlı farklar izlenmiştir ($p=0.02$, $p=0.0.2$). MDS ve MPN grupları arasında CD34 boyanma patternleri açısından yapılan karşılaştırmada Fisher's Exact Test'in sonuçları kullanılmıştır.

Tablo.12: CD34 ile boyanma patterni açısından hastalık gruplarının dağılımı

CD34 Boyanma Patterni	Kontrol		MDS		MPN		Toplam	
Stoplazmik	29	%96,7	23	%76,7	28	%96,6	80	%89,9
Membranöz/stoplazmik	1	% 3,3	7	%23,3	1	%3,4	9	%10,1
Toplam	30	% 100	30	%100	29	%100	89	% 100

Sonuç olarak CD34 ile boyanma patterni açısından MDS vakalarının diğer iki gruptan belirgin derecede farklılık gösterdiği izlendi. Özellikle membranöz/ stoplazmik boyanma paterninin, MDS vakalarında diğer iki gruba göre belirgin derecede yüksek olduğu dikkat çekti.

CD117 ile boyanma sıklığı açısından MDS, MPN ve kontrol grupları arasında anlamlı fark izlenmiştir ($p<0.001$). İkili karşılaştırmalarda MDS ve MPN vakaları arasında CD117 ile boyanma sıklığı açısından anlamlı bir fark izlenmezken ($p=0.94$), kontrol grubu ile MDS ve MPN grupları arasında ayrı ayrı yapılan karşılaştırmalarda anlamlı farklar izlenmiştir ($p<0.001$, $p<0.001$). Sonuç olarak kontrol grubunun CD117 ile boyanma sıklığı açısından MDS ve MPN vakalarından belirgin derecede farklılık gösterdiği izlendi. Kontrol grubunun büyük çoğunluğunda (%90) CD117 ile % 5'in altında boyanma izlenirken, MDS vakalarının % 73.3'ünde, MPN vakalarının ise % 82.7'sinde, % 5 ve üzerinde boyanma izlenmiştir (Tablo.13).

Tablo.13: CD117 ile boyanma sıklığına göre hastalık gruplarının dağılımı

CD117 Boyanma sıklığı	Kontrol		MDS		MPN		Toplam	
<% 5	27	%90	8	%26,7	5	%17,2	40	%44,9
% 5-30	3	%10	18	%60	24	%82,8	45	%50,6
>%31	0	%0	4	%13,3	0	%0	4	%4,5
Toplam	30	%100	30	%100	29	%100	89	% 100

CD117 ile boyanma yoğunluğu açısından MDS, MPN ve kontrol grupları arasında anlamlı bir fark izlenmiştir ($p=0.01$). Yapılan ikili karşılaştırmalarda, CD117 ile boyanma yoğunluğu açısından MDS-MPN ($p=0.27$) ve MDS-kontrol ($p=0.15$) grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmazken, MPN ve kontrol grupları arasında anlamlı bir fark bulunmuştur ($p<0.001$). CD117 ile 1 (+) boyanan vakaların % 57.8'i kontrol grubuna aitken, 3(+) boyanan vakaların sadece % 17.2'si kontrol grubuna aittir. MPN vakalarının % 96.5'inde 2(+) ve üzerinde boyanma yoğunluğu izlenmiştir (Tablo.14).

Tablo.14: CD117 ile boyanma yoğunluğuna göre hastalık gruplarının dağılımı

CD117 boyanma yoğunluğu	Kontrol	MDS	MPN	Toplam
-------------------------	---------	-----	-----	--------

1 (+)	11	%36,7	7	%23,3	1	%3,4	19	%21,3
2 (+)	14	%46,7	12	%40	15	%51,7	41	%46,1
3(+)	5	%16,7	11	%36,7	13	%44,8	29	%32,6
Toplam	30	% 100	30	%100	29	%100	89	% 100

CD117 ile boyanan hiçbir vakada tek başına membranöz veya nükleer boyanma izlenmemiştir (Tablo.15). CD117 boyanma patterni açısından MDS, MPN ve kontrol vakaları arasında ki-kare testi ile istatistiksel olarak anlamlı bir fark izlenmemiştir ($p=0.90$). Tüm vakaların % 84.3'ünde stoplazmik boyanma izlenirken, %15.7'sinde membranöz/stoplazmik boyanma izlenmiştir.

Tablo.15: CD117 ile boyanma patternine göre hastalık gruplarının dağılımı

CD117 Boyanma Patterni	Kontrol		MDS		MPN		Toplam	
Stoplazmik	25	%83,3	26	%86,7	24	%82,8	75	%84,3
Membranöz/stoplazmik	5	%16,6	4	%13,3	5	%17,2	14	%15,7
Toplam	30	% 100	30	%100	29	%100	89	% 100

B-katenin boyanma sıklığı açısından MDS, MPN ve kontrol grupları arasında anlamlı bir fark izlenmiştir ($p< 0.001$). Yapılan ikili karşılaştırmalarda, b-katenin ile boyanma sıklığı açısından MDS ve MPN vakaları arasında anlamlı bir fark bulunmazken ($p=0.14$), kontrol grubu ile MDS ve MPN gruplarının ayrı ayrı karşılaştırmalarında istatistiksel olarak anlamlı farklar bulunmuştur ($p< 0.001$, $p<0.001$) (Tablo.16).

Tablo.16: B-katenin ile boyanma sıklığı açısından Hastalık Gruplarının Dağılımı

B-katenin Boyanma sıklığı	Kontrol		MDS		MPN		Toplam	
<% 5	30	%100	10	%33,3	17	%58,6	57	%64,0
% 5-30	0	%0	20	%66,6	12	%41,4	32	%35,9
Toplam	30	%100	30	%100	29	%100	89	% 100

MDS, MPN ve kontrol gruplarında, b-katenin boyanma yoğunluğu açısından, anlamlı bir fark izlenmedi ($p=0.32$). Tüm vakaların % 86.5' inde b-katenin ile 1 (+) boyanma izlenirken, %13.4 'ünde 2 (+) boyanma izlendi (Tablo.17).

Tablo.17: B-katenin ile boyanma yoğunluğu dağılımı

B-katenin Boyanma yoğunluğu	Kontrol		MDS		MPN		Toplam	
1 (+)	24	%80	28	%93,3	25	%86,2	77	%86,5
2 (+)	6	%20	2	%6,7	4	%13,7	12	%13,4
Toplam	30	% 100	30	%100	29	%100	89	% 100

MDS, MPN ve kontrol gruplarının b-katenin ile boyanma patternlerini değerlendirmede, vakaların frekansları arasında çok büyük fark bulunduğundan, sağlıklı bir istatistiksel değerlendirme yapılamamıştır. Tüm vakaların % 96.6'sında sitoplazmik boyanma izlenmiştir (Tablo.18).

Tablo.18: B-katenin ile Boyanma Patterni Açısından Hastalık Gruplarının Dağılımı

B-katenin Boyanma Patterni	Kontrol		MDS		MPN		Toplam	
Stoplazmik	29	%96,7	28	%93,3	29	%100	86	%96,6
Membranöz/stoplazmik	1	%3,3	2	%6,6	0	%0	3	%3,3
Toplam	30	% 100	30	%100	29	%100	89	% 100

Sadece MDS grubu içersinde, CD34, CD117 ve b-katenin boyalarının, boyanma sıklıklarına göre karşılaştırmasında anlamlı bir fark bulundu ($p<0.001$). Bu yüzden T-testi ile boyaların ikili karşılaştırmalarını yaptık (Tablo 19).

Tablo.19: MDS Vakalarında Her Üç Markerin Boyanma Sıklıklarının Karşılaştırılması

Boyalar	Karşılaştırıldıkları Boyalar	Anlamlılık Değeri
CD34	CD117	P=0.04
	B-Katenin	P<0.001
CD117	CD34	P=0.04
	B-Katenin	P=0.04
B-katenin	CD34	P<0.001
	CD117	P=0.04

Tüm boyaları kendi arasında ikişer ikişer karşılaştırdığımızda MDS'de, her üç boyanın da boyanma

sıklıklarına göre aralarındaki farkın anlamlı olduğunu bulduk. Daha önceki mevcut istatistiksel bilgilerimize dayanarak en yüksek boyanma sıklığının CD34'de görüldüğü ve bunu sırayla CD117 ve b-kateninin takip ettiği sonucuna vardık. Sadece MPN grubu içerisinde, CD34, CD117 ve B-katenin boyalarının, boyanma sıklıklarına göre karşılaştırmasını yaptığımızda, istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulduk ($p<0.001$) (Tablo 20). Bundan sonra T-testi ile boyaların ikili karşılaştırmalarını yaptık.

Tablo.20: MPN Vakalarında Her Üç Boyanın Boyanma Sıklıkları Açısından Karşılaştırılması

MPN Vakaları	CD34	CD117	P=0.01
		B-Katenin	P=0.08
	CD117	CD34	P=0.01
		B-Katenin	P<0.001
	B-katenin	CD34	P=0.08
		CD117	P<0.001

Tüm boyaları kendi aralarında ikişer ikişer karşılaştırdığımızda, MPN vakalarında CD117'nin boyanma sıklığının, diğer iki markera göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğunu bulduk. Sadece kontrol grubu içerisinde, CD34, CD117 ve b- katenin boyalarının boyanma sıklıklarına göre karşılaştırmasını yaptığımızda, Kruskal Wallis varyans analizi testine göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulduk ($P= 0.01$) (Tablo 21).

Tablo.21: Kontrol Grubunda Her Üç Boyanın Boyanma Sıklıkları Açısından Karşılaştırılması

Kontrol Vakaları	CD34	CD117	P=0.07
		B-Katenin	P=0.03

	CD117	CD34	P=0.07
		B-Katenin	P<0.001
	B-katenin	CD34	P=0.03
		CD117	P<0.001

Tüm boyaları kendi arasında ikişer ikişer karşılaştırdığımızda, kontrol grubunda b-katenin boyanma sıklığının diğer iki belirtece göre istatistiksel olarak anlamlı oranda düşük olduğunu bulduk. MDS vakalarında, CD34, CD117 ve b-katenin boyalarının ekspresyon oranları arasındaki korelasyonlarda; CD34 ile CD117 arasında güçlü bir korelasyon (0.50- 0.75), CD34 ile b-katenin arasında zayıf bir korelasyon (0.25-0.50), CD117 ile b-katenin arasında güçlü bir korelasyon (0.50-0.75) bulduk (Tablo .22).

Tablo.22: MDS Vakalarında Her Üç Boyanın Ekspresyon Oranları Arasındaki Korelasyon

	CD34	CD117	B-Katenin
CD34	1	0.516	0.356
CD117	0.516	1	0.695
B-Katenin	0.356	0.695	1

MPN vakalarında, CD34, CD117 ve b-katenin boyalarının ekspresyon oranları arasındaki korelasyonlarda; CD34 ile CD117 arasında güçlü bir korelasyon (0.50-0.75), CD34 ile b-katenin arasında zayıf derecede bir korelasyon (0.25-0.50) ve CD117 ile b-katenin arasında güçlü bir korelasyon (0.50-0.75) bulduk (Tablo.23).

Tablo.23: MPN Vakalarında Her Üç Boyanın Ekspresyon Oranları Arasındaki Korelasyon

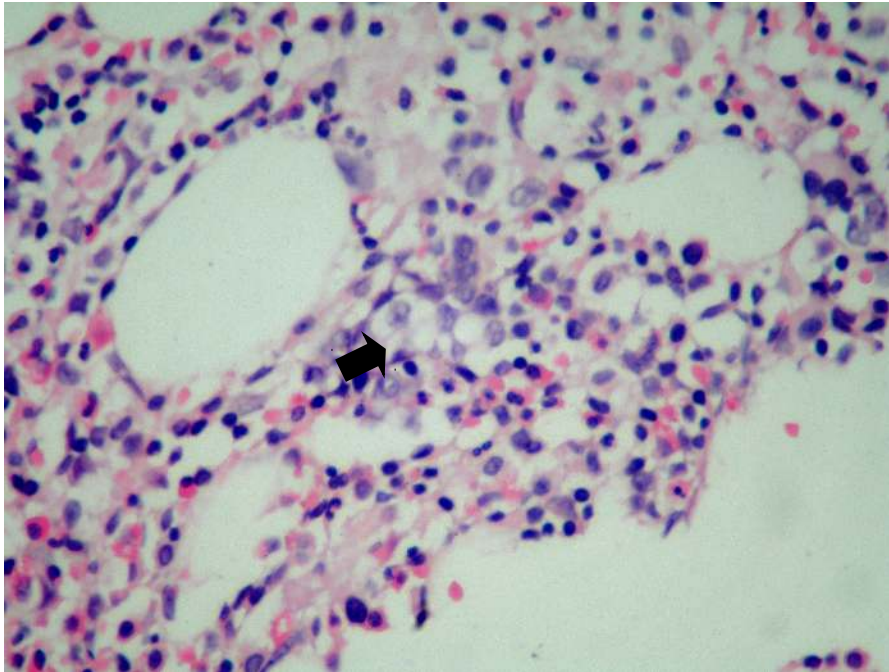
	CD34	CD117	B-Katenin
CD34	1	0.607	0.303
CD117	0.607	1	0.594
B-Katenin	0.303	0.594	1

Kontrol grubunda, CD34, CD117 ve b-katenin boyalarının ekspresyon oranları arasındaki korelasyonlarda; CD34 ile CD117 arasında zayıf bir korelasyon (0.25- 0.50), CD34 ile b-katenin arasında minimal korelasyon (< 0.25), CD117 ile b-katenin arasında güçlü bir korelasyon (0.50-0.75) bulduk (Tablo 24).

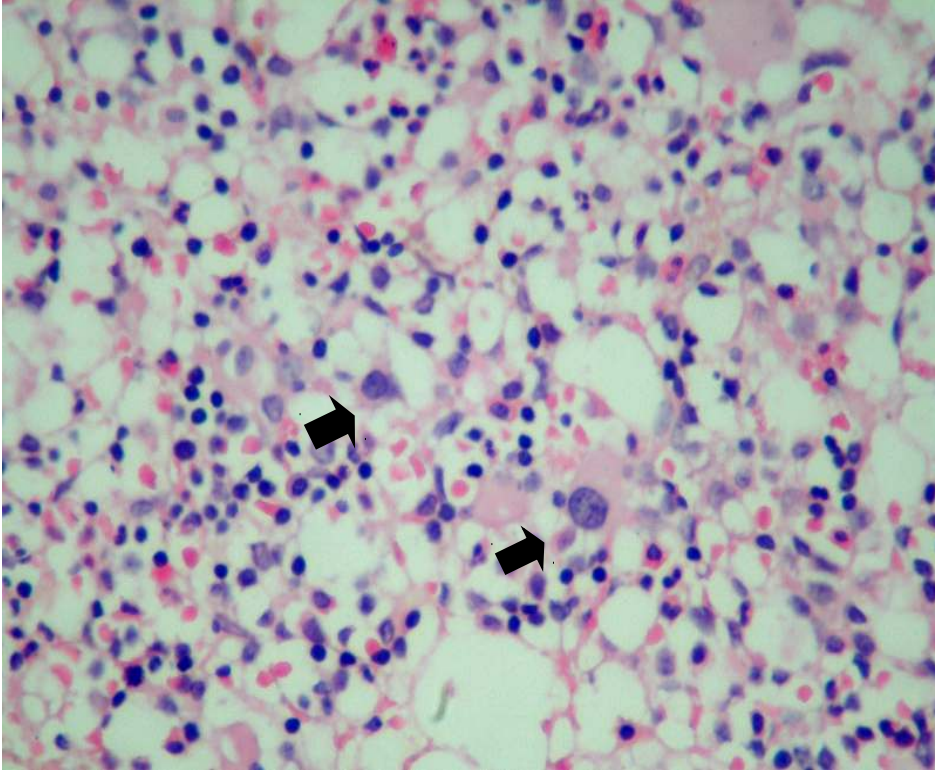
Tablo.24: Kontrol Vakalarında Her Üç Boyanın Ekspresyon Oranları Arasındaki Koralesyon

	CD34	CD117	B-Katenin
CD34	1	0.303	0.234
CD117	0.303	1	0.511
B-Katenin	0.234	0.511	1

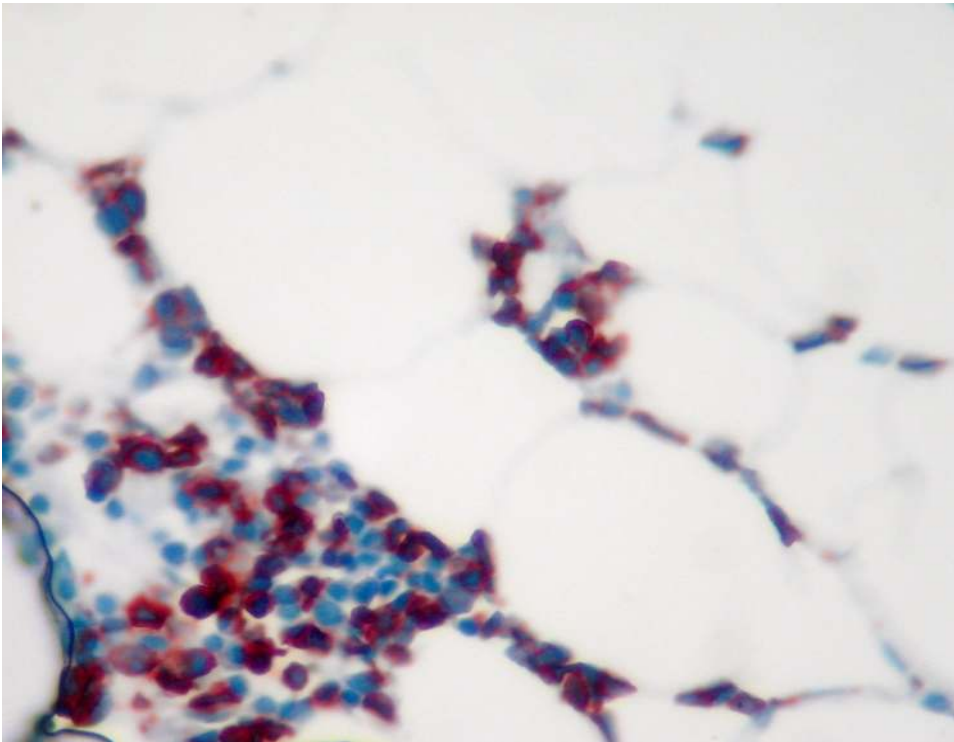
5-OLGULARIMIZA AİT RESİMLER



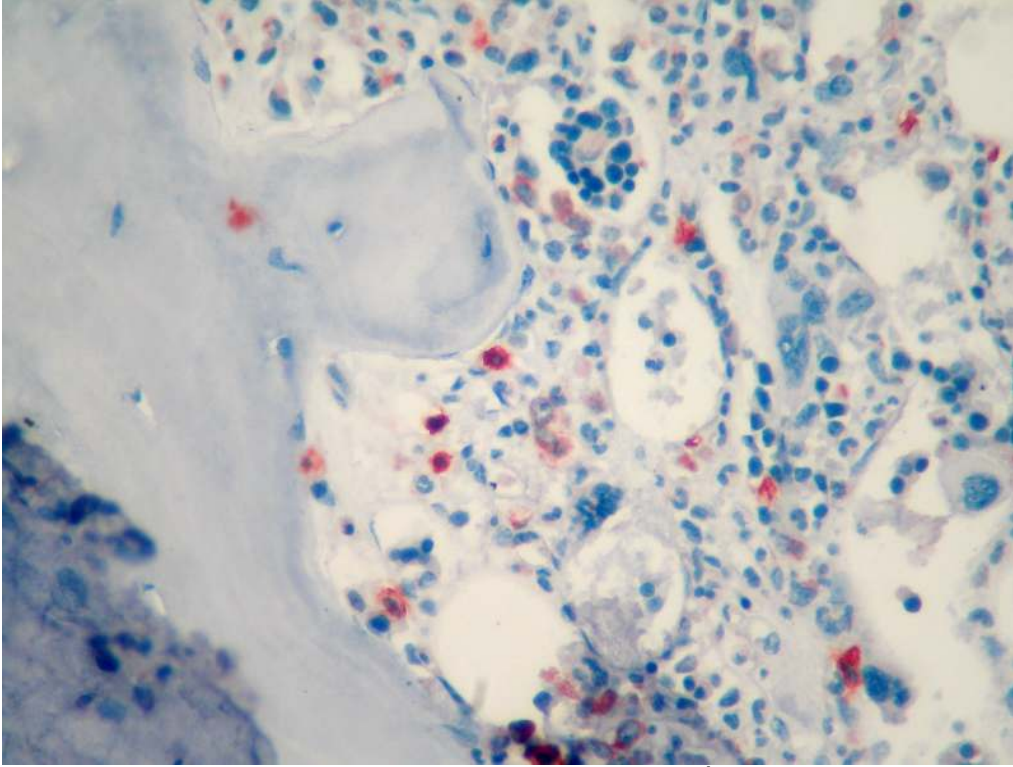
Resim.1. MDS'de ALIP (H&E, X400)



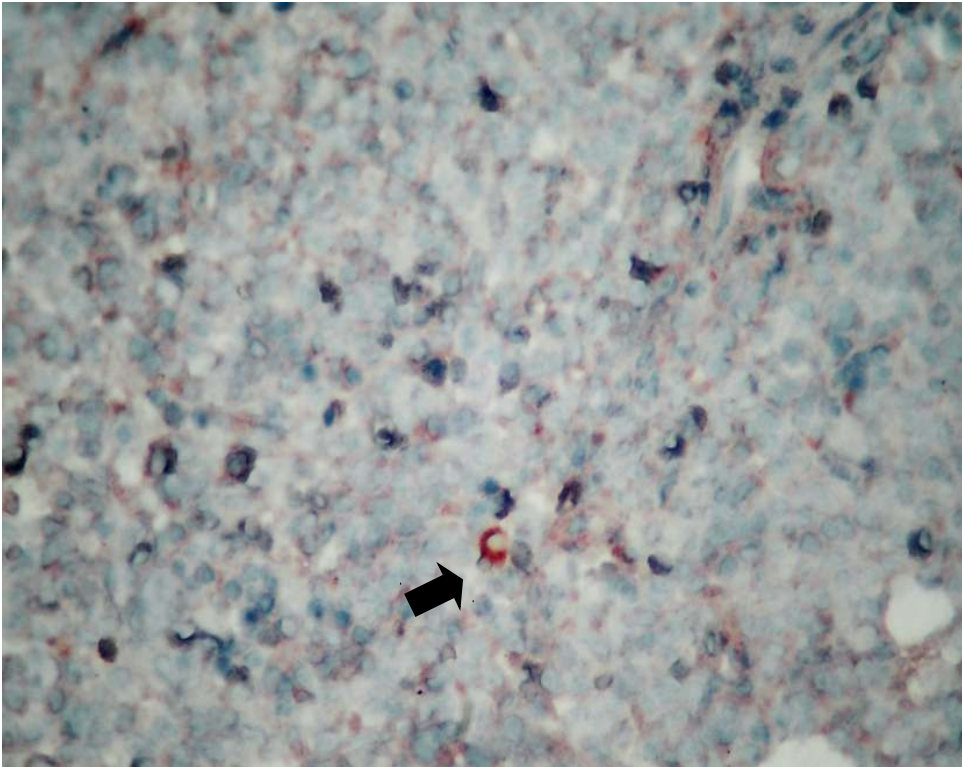
Resim.2. MDS'de hipolobüle,mikromegakaryositler (H&E, X 400)



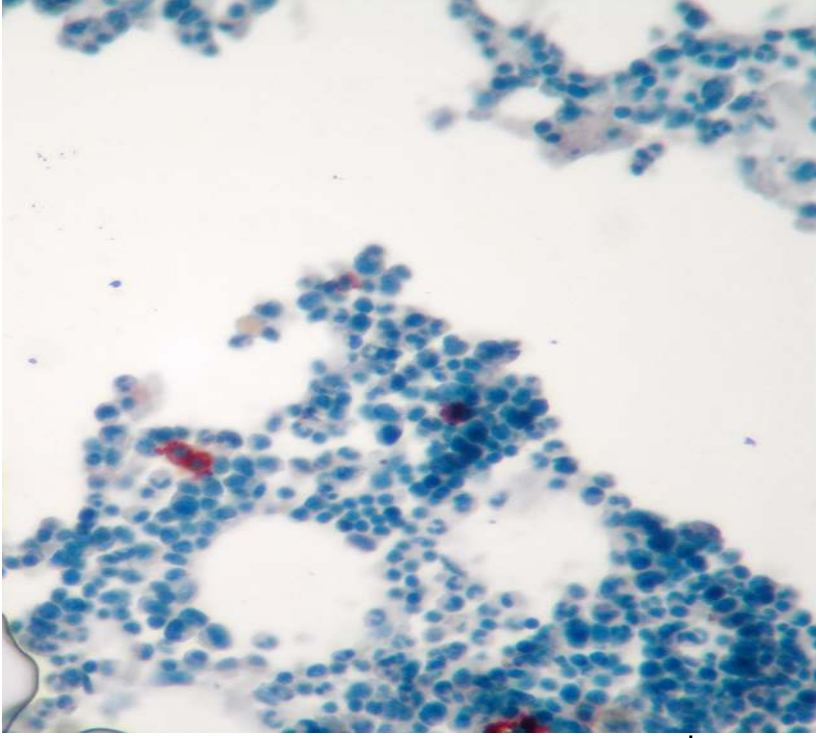
Resim.3. MDS'de stoplazmik CD34 boyanması (immunperoksidaz, X400)



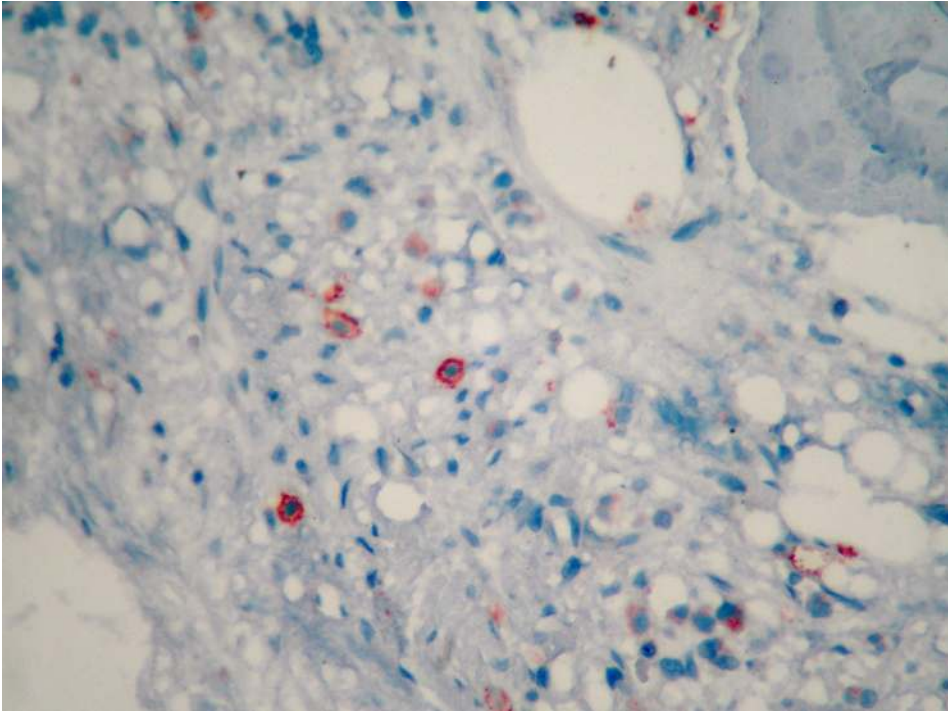
Resim.4. MDS'de stoplazmik CD117 boyanması (immunperoksidaz, X200)



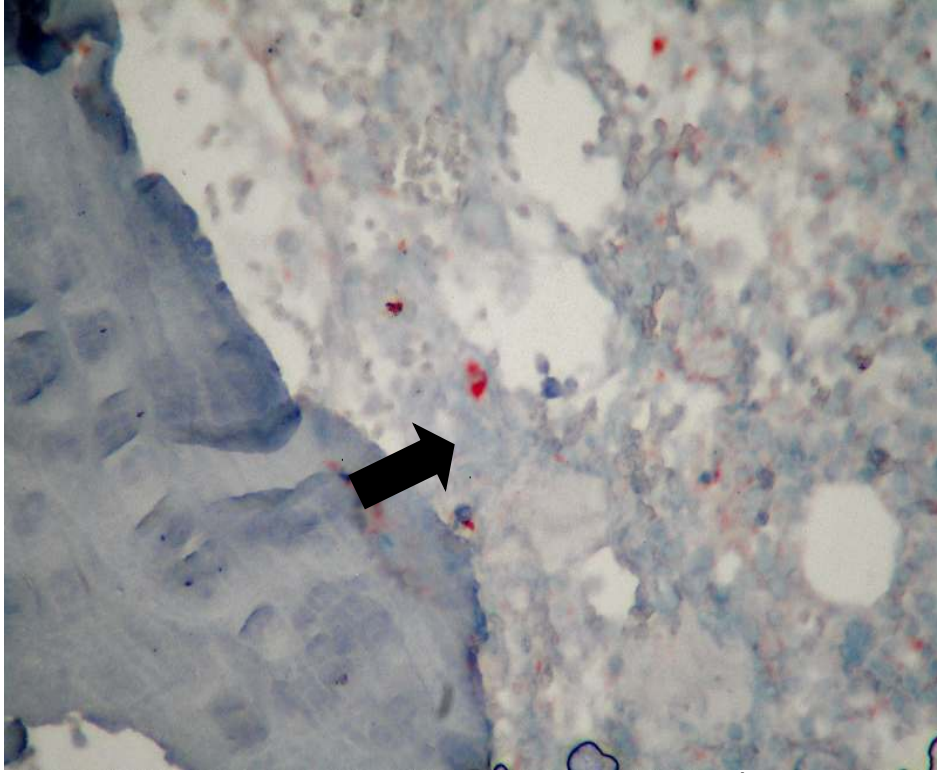
Resim.5. MDS'de stoplazmik b-katenin boyanması (immunperoksidaz, X400)



Resim.6. MPN'de stoplazmik CD34 boyanması (İmmunperoksidaz,X 400)



Resim.7. MPN'de memb/stoplazmik CD117 boyanması (İmmunperoksidaz, X400)



Resim.8. MPN'de stoplazmik b-katenin boyanması (İmmunperoksidaz,X 400)

6-TARTIŞMA

İlk olarak 1951 yılında Dameshak tarafından tanımlanan Myeloproliferatif Neoplazmlar (MPN), kemik iliğinde en az bir seride neoplastik proliferasyonla karakterize olan, pluripotent hematopoetik kök hücrelerin klonal bir grup hastalığıdır. Klonal genişlemenin sonucunda, hematopoetik serilerde ileri derecede proliferasyon ve anormal hematopoesis izlenir. Akut lösemilerin aksine MPN'de hücrelerin matürasyonu tamdır ve hastalığın doğal gidişatı kroniktir (23).

En son WHO sınıflamasında (2008), altgrupları yeniden yapılandırılan Myelodisplastik Sendromlar (MDS) ise, ineffectif ve displastik hematopoesis ile seyreden, akut lösemiye progresyon için yüksek risk taşıyan bir grup klonal kök hücre hastalığıdır (88). MDS zaman içerisinde FAB ve WHO sınıflamaları ile subtiplere ayrılmıştır. Bu ayırmada en önemli prognostik değer, kan ve kemik iliğindeki artmış blast sayısıdır (126).

Blast sayısını belirlemek, birçok klonal hematopoetik hastalıkta tanı ve subtiplleme açısından önemlidir. Örneğin 2008 WHO kriterlerine göre AML tanısı için asgari blast oranı % 20 olarak belirlenmiştir.

MDS ve MPN klonal kök hücre hastalıklarıdır (163). Kök hücrelerin fonksiyonlarını ve eksprese ettikleri yüzey moleküllerini tanımak, normal hematopoesisi olduğu kadar malign hematolojik hastalıkları da anlamak için gereklidir. Kök hücrelerin karakteristik olarak eksprese ettikleri yüzey antijenleri uzun yıllardan beri birçok çalışmaya konu olmuştur. Çeşitli yöntemlerle bu antijenlerin etkinlikleri karşılaştırılmıştır.

Üzerinde en fazla durulan yüzey antijenlerinden biri CD34 'tür. CD34'ün karakteristik olarak kök hücrelerde eksprese edildiği gösterilmiştir (124,125). CD34 ekspresyonu, azalmış koloni sayısı, artmış ALIP sayısı ve blast kümeleri ile ilişkili bulunmuştur. Bu durum, differansiasyon kapasitesinden yoksun, daha immatür hücrelerin büyüme patternini göstermektedir (127,139).

Eldeki tüm bulgular göstermiştir ki MDS'de CD 34 ekspresyonu, erken hematopoetik kök hücre seviyesinde, erken intramedüller programlı hücre ölümü ve ineffectif hematopoesis ile ilişkilidir. Özellikle RAEB ve RAEB-t vakalarında CD34 ekspresyonunun belirgin artış gösterdiği izlenmiştir (139). Pellegrini ve ark. çalışmasında, MDS vakalarının % 45.4'ünde, progenitör hücrelerin yanı sıra % 10 ve daha fazla megakaryositte, CD34 ekspresyonu gözlemlemişlerdir (59). Bu durum bize CD34'ün seri spesifik bir özellik göstermediğini kanıtlamaktadır. Bazı yayınlarda, normal kemik iliği biopsilerinde % 1-2 kadar, bazı yayınlarda ise %2-5 arası CD34 ekspresyonunun olağan olarak izlenebileceği belirtilmiştir (126,153). Yapılan çok sayıda çalışmada ayrıca CD13, CD38, CD117, CD15, CD45, CD33 ve MPO gibi birçok yüzey antijeni de progenitör hücrelerin işaretlenmesi amacıyla denenmiştir (124,127,153). Bunlar içersinde CD117'nin diğerlerine göre daha güvenilir ve üstün olduğu gösterilmiştir (141). Muroi ve ark. CD117'nin, myeloblastları tanımda en güvenilir marker olduğunu belirtmişlerdir (164).

Kök hücre faktörünün bağlandığı transmembran, tirozin kinaz reseptörünü kodlayan c-kit protoonkogeninin birçok hematolojik hastalıkta eksprese edildiği gösterilmiştir (124,141,153). Birçok non-hematopoetik dokuda ve tüm kemik iliği serilerinde eksprese edilebilmesine rağmen özellikle myeloid seriye yüksek spesivite gösterdiği kanıtlanmıştır (141,153). Bunun aksine megakaryositik ve eritroid tutulumla ilerleyen hematolojik hastalıklarda ekspresyonun çok daha az, hatta hiç olmadığı gösterilmiştir (153).

Wells ve ark. çalışmalarında AML vakalarının % 87'sinde ve myeloid blast krizindeki MPN vakalarının %80'inde, CD117 ekspresyonu gözlemlemişler (141).

Di Noto ve ark. AML vakalarının % 62'sinde, myeloid blast krizindeki KML hastalarının % 64.7'sinde ve RAEB-t vakalarının ise % 92.8'inde CD117 pozitifliği bulmuşlar. Joseph F. ve ark. çalışmalarında AML vakalarının ve diğer myeloid hastalıkların çoğunda (>%90) CD117 ekspresyonuna rastlamışlardır. Aynı çalışmada, ayrıca B-hücre seri ALL vakalarında CD117'nin negatif olduğunu ve bu nedenle ALL ve AML ayrımında CD117'nin çok faydalı bir marker olduğunu belirtmişler. MDS vakalarının % 91.6'sında, %10 ve daha fazla blastta, CD117 ekspresyonu izlemişler (141).

Başka birçok çalışmada, CD34 ve CD117 antijenlerinin ko-ekspresyonları gösterilmiştir. Pirruccello ve ark. çalışmasında RARS hastalarının % 50'sinde, RCMLD hastalarının % 68'inde ve RAEB hastalarının ise % 100'ünde CD34 ve CD117 ko-ekspresyonu bulmuşlar (165). Bu durum elbetteki myeloblast artışı ile MDS grade'inin yakın korelasyonuyla alakalıdır. Bu çalışmada ayrıca myeloblast fenotipik anomali sayısı ile IPSS skorunun iyi derecede korelasyon gösterdiği belirtilmiştir. Arroya ve ark. (174), Del Canizo ve ark.(173) ve Ogata ve ark (172) yaptıkları çalışmalarda, MDS hastalarında myeloblastlarda artmış CD15 ve CD34 ko-ekspresyonu ve CD34(+) myeloblast sayısında artış izlemişler. Kussick ve ark. (175) 124 adet MDS vakası ile yaptıkları çalışmada, % 50 ve daha fazla vakada, myeloblastlarda anormal HLA-DR, CD13, CD33,CD38 ve CD117 ekspresyonları bulmuşlar. Pirruccello ve ark. çalışmasında çoğunlukla myeloblastlarda CD45 yoğunluğunda azalma ve CD13, CD34 ve CD117 yoğunluklarında artış izlemişler (165).

B-katenin ise, Wnt sinyal sisteminin bir komponenti olan stoplazmik bir proteindir. Wnt/b-katenin kaskadının, embriolojik gelişim esnasında ve intestinal kript, kıl folikülü ve hematopoetik hücreler gibi farklı dokularda, kök hücre gelişiminde rol oynadığı gösterilmiştir. Bu yolun disregülasyonu, tümörigenesis ile, özellikle de kolon, prostat, endometrial ve ovarian ca ile, melanom, hepatoblastom hepatosellüler ca, medulloblastom ve pilomatricoma gibi neoplazmlarla ilişkili olduğu gösterilmiştir.

Normal hematopoiesis ve lenfopoiesisin sağlıklı devamı, matür granülosit, eritrosit ve lenfositlerin oluşum mekanizmalarının işleminde Wnt/b-katenin sinyal sisteminin önemi çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir. Wnt/b-katenin yolunda meydana gelebilecek mutasyonlar veya Wnt kaskadının artmış stimülasyonu, myeloid, lenfoid ve eritroid seri differansiasyonunda ve gelişiminde blokaja neden

olabilir. Wnt'nin tümörigenezisdeki rolüne bir kanıt olarak, Wnt 5a 'da meydana gelen bir mutasyonun, myeloid lösemi ve B-cell lenfoma gelişimi ile sonuçlandığı gösterilmiştir. Wnt 16'daki mutasyonların akut lenfoblastik lösemiye yol açtığı gösterilmiştir. Wnt 11 mutasyonunun ise tümör hücrelerinin invazivliğini artırıcı etkisi olduğu bulunmuştur .

Lenfoid neoplazmlarda, Wnt yolunun, proliferasyon, migrasyon ve invazyon gibi çok sayıda fonksiyonda önemli rol oynadığı belirtilmiştir. Diarra ve ark çalışmasında, akut myeloid lösemi vakalarında, b-katenin gen ekspresyonunun arttığını bulmuşlar (176). Diğer hematopoetik hastalıklarda b-katenin varlığı gösterilmesine karşın, MDS ve MPN'de bu yönde literatürde pek çalışma bulunmamaktadır. Monica P. ve ark. çalışmasında özellikle PV ve ET vakalarında , megakaryositlerde yüksek b-katenin ekspresyonu bulmuşlar (107). Jinglan Xu ve ark., AML ve MDS vakalarında yaptıkları bir çalışmada ise immunhistokimyasal olarak, b-kateninin C ve N terminallerini işaretleyen iki ayrı peptid antikör kullanmışlar. C terminali işaretli b-katenin, stoplazmadaki b-katenini temsil ederken, N terminal işaretli b-katenin ise non-fosforile yani stoplazmada indirgenmekten kurtulan ve nukleusa taşınan b-katenini temsil eder. Yani nukleer b-katenin boyanması, b-kateninin indirgenmediğini, varolduğunu ve nukleusa taşınarak aktive olduğunu gösterir. Anti-N terminal non-fosforile b-kateninin, AML ve MDS vakalarında, myeloblast ve eritroblastlarda nukleer boyanma gösterdiği izlenmiştir (108). Nukleer b-katenin boyanmasının hem AML hem de MDS vakaları için kötü prognoz göstergesi olduğu belirtilmiştir. Bu çalışma MDS hastalarında b-kateninin ilk defa gösterilmesi açısından önem taşımaktadır. Ysebaert ve ark. çalışmasında, b-katenin ekspresyonunun CD34 ekspresyonu ile korele olduğunu göstermişler (171).

MDS ve MPN genel olarak ileri yaşlarda görülen hastalıklardır. MPN hastalarının çoğunlukla tanı konulma yaşı 40-60 yaş arasındadır. 20 yaş altında nadiren izlenir (4). Çalışmamızda MPN tanılı hastaların yaşları 18-79 arasında değişkenlik gösteriyordu ve ortalaması 57,24 idi. 1 adet MPN hastası 18 yaşında idi. MDS hastalarının ise genel olarak tanı esnasında yaş ortalaması 70'dir. Hastaların % 92'si 50 yaşın üzerindedir (68,69). Bizim çalışmamızda ise MDS hastalarının ortalama yaşı 58,5 bulunmuştur. Çalışmamızdaki hastalardan sadece %63.3'ünün yaşı 50 yaşın üzerindedir. Bu değerler literatürdeki değerlerin altındadır. Yapılan istatistiksel analiz sonucunda yaşa göre hastalık gruplarının

dağılımı arasında anlamlı bir fark bulunmuştur ($p=0.03$). Kontrol grubu ile MPN ve MDS gruplarının ayrı ayrı ikişerli karşılaştırmasında yaş dağılımı açısından arada anlamlı bir fark bulunmuştur. Kontrol grubunun yaş ortalaması 47.3 iken, MDS ve MPN gruplarının sırasıyla 58.5 ve 57.2 olarak bulunmuştur. Bu veriler genel olarak MPN ve MDS'lerin ileri yaş hastalıkları oldukları bilgisini destekler niteliktedir.

Kemik iliği sellülaritesi açısından her üç çalışma grubunda birbirinden anlamlı derecede farklı olduğu izlendi. En yüksek sellülarite %80.44 ile MPN hastalarında izlenirken, bunu % 70.16 ile MDS ve %48.66 ile kontrol gruplarının takip ettiği izlendi. Kontrol grubu genel olarak normosellüler görünümde biopsilerden oluşmaktaydı. MDS ve MPN ise temelde kemik iliğinde hipersellülarite ile karakterli hastalıklardır. Aralarında anlamlı bir fark çıkması beklenen bir sonuçtur. Bu yüzden elde edilen sonuçlar literatür verileri ile uyumludur (2,4).

Vakaların CD34 ile boyanma sıklığını değerlendirdiğimizde, kontrol vakalarına göre MDS ve MPN vakalarında anlamlı derecede yüksek sıklıkta boyanma izlenmiştir. Kontrol vakalarının büyük çoğunluğunda (%83.3), % 5'in altında boyanma sıklığı izlenirken, MDS vakalarının %70'inde ve MPN vakalarının ise % 58.6'sında, % 5 ve üzerinde boyanma izlenmiştir. Yoo Hong Min ve ark. çalışmasında RA vakalarının % 23'ü, RAEB vakalarının %33'ü, RAEB-t vakalarının % 62'si ve KMML vakalarının %63'ünde eşik değerin üzerinde CD34 pozitifliği izlemişler. Yani toplamda MDS vakalarının %41.3'ünde eşik değerin üzerinde boyanma izlenmiştir (126). Bu değerler bizim çalışmamızdaki değerlerin altındadır. Pirruccello ve arkadaşlarının çalışmasında ise RARS vakalarının %13'ünde, RCMLD vakalarının % 38'inde ve RAEB vakalarının % 58'inde, toplamda ise tüm MDS vakalarının % 39.4'ünde eşik değerin üzerinde boyanma izlenmiştir. Aynı çalışmada RARS vakalarının % 50'sinde RCMLD vakalarının %38'inde ve RAEB vakalarının % 75 'inde, toplamda vakaların % 57.2'sinde CD117 ile boyanma izlenmiştir (165). Çalışmamızdaki vakaların CD117 ile boyanma sıklığı değerlendirmesinde, yine CD34 boyanma oranlarına benzer şekilde MDS ve MPN gruplarının boyanma oranlarının kontrol vakalarından anlamlı oranda farklı oldukları izlendi. Kontrol vakalarının %90'ında, %5'in altında CD117 boyanması izlenirken, MPN vakalarının % 82.8'inde, MDS vakalarının ise % 60'ında . % 5 ve üzerinde boyanma izlenmiştir.

Bizim çalışmamızdaki bu değerler, literatürdeki değerlerden farklıdır. Burada dikkat edilmesi gereken, MDS vakalarında grade, blast artışı ile beraber CD34 ve CD117 boyanma oranlarındaki artıştır. Her iki markerın da kemik iliğinde progenitör hücrelerde boyandığı bilindiğinden, blast artışı ile bu markerlarda ekspresyon oranlarının artışı sürpriz değildir. Yoo Hong Min ve arkadaşlarının çalışmasında da CD34 boyanma oranı, kemik iliği blast sayısı ile korele olarak izlenmiştir (126). Yine Pirruccello ve ark. çalışmasında da benzer şekilde CD34 ve CD117 boyanma oranları ile myeloblast sayısı arasında direkt bir ilişki tespit edilmiştir (165). Bizim çalışmamızdaki boyanma oranlarının literatürdeki değerlerin üzerinde çıkmasının nedeni, çalışmamızdaki vakaların büyük çoğunluğunun artmış blast sayısı ile seyreden yüksek grade MDS vakalarından oluşmuş olabileceğidir. Ancak çalışmamızda MDS subtiplemesi yapmadığımızdan, bu konuda daha ileri değerlendirme yapamıyoruz.

MPN ve MDS arasında CD34 ve CD117 boyama oranları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark izlenmemiştir. Fakat dikkat edilecek bir başka husus, MDS hastalarında CD34 (+) boyanan vaka oranı %70 ve CD117 (+) boyanan vaka oranı %73.3 iken, MPN vakalarında CD34 (+) boyanma oranı % 58.6 ve CD117 boyanma oranı % 82.8'dir. Her ne kadar istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık izlenmese de, MPN vakalarında CD34'den ziyade CD117 ile boyanma eğilimi dikkat çekicidir. CD117 genel olarak myeloid spesivite gösteren bir marker olduğu için, özellikle myeloid serilerde proliferasyonla karakterli MPN vakalarında CD117'nin daha yüksek oranlarda boyanması beklenen bir sonuçtur.

MDS, MPN ve kontrol grupları arasında, CD34 ile boyanma yoğunlukları açısından kayda değer bir farklılık izlenmemiştir. Toplamda 89 hastanın 80'inde (%89.8), 2 (+) ve üzerinde boyanma izlenmiştir. MPN hastalarının tamamı 2(+) ve üzerinde boyanma göstermişlerdir.

CD34'ün aksine, CD117 ile, çalışma grupları arasında boyanma yoğunluğu açısından anlamlı bir fark izlenmiştir ($p=0.01$). İkili karşılaştırma testleri sonucunda MPN vakalarında kontrol grubuna göre anlamlı oranda fazla boyanma yoğunluğu bulunmuştur ($p<0.001$). Kontrol grubunun %63.3'ü 2(+) ve üzerinde boyanma gösterirken, MPN vakalarının % 96.5'i 2(+) ve üzerinde boyanma göstermişlerdir. 1(+) boyanan hastaların sadece % 3.4'ü MPN vakası iken, 3 (+) boyanan hastalarda bu oran % 44.8'e çıkmaktadır.

Genel olarak CD117 ekspresyonu erken evredeki hematopoetik progenitörlerde çok daha fazla olup, matürasyon ilerledikçe ekspresyon yoğunluğunda azalma izlenir. Fakat buna rağmen en primitif hematopoetik progenitörlerde, granülosit/makrofaj seri progenitörlerine oranla daha zayıf c-kit ekspresyonu izlenebilir (153). Bu bilginin ışığında MPN'de CD117 ekspresyon yoğunluğunun anlamlı olarak artışını, myeloid proliferasyonla karakterize MPN vakalarında, granülosit /makrofaj seri progenitörlerinin, diğer progenitörlerden bariz derecede daha fazla artışı ile açıklamak mümkündür.

Çalışmamızdaki vakaların büyük çoğunluğu (%89.9) CD34 ile stoplazmik boyanma gösterirken, vakaların % 10.1'i membranöz/stoplazmik boyanma göstermiştir. Yalnızca membranöz veya nükleer boyanma gösteren vaka yoktur. CD34 boyanma patternleri açısından her üç grup arasında anlamlı bir fark izlenmiştir ($p=0.01$). Stoplazmik boyanma her üç gruptaki vakaların çoğunluğunda izlenmiştir. Yapılan ikili karşılaştırmalarda MDS vakalarında diğer iki grup vakalara göre membranöz/stoplazmik boyanma patterninde anlamlı oranda bir yükseklik izlenmiştir. Tüm vakalar içerisinde membranöz/stoplazmik boyanan vakaların % 77.7'si MDS grubuna ait vakalardır. Kontrol ve MPN grubunda ise sadece 1'er adet hastada membranöz/stoplazmik boyanma izlenmiştir.

CD117 ile boyanma patterni açısından vakaları incelediğimizde her üç grup arasında boyanma patternleri açısından anlamlı bir fark izlenmemiştir. CD117 ile boyanma patterni açısından farklı dokularda, literatürde farklı bildirimler bulunmaktadır. Örneğin Mouriaux ve ark. çalışmasında, CD117 pozitif boyanan vakaların % 75'inde membranöz boyanma izlenmiştir (166). Butner ve ark., 96 adet vaka ile yaptıkları çalışmada , pozitif boyanan vakaların hepsinde CD117 ile membranöz belirginlik gösteren stoplazmik boyanma izlenmiştir.

MDS, MPN ve kontrol grubu vakalarının, b-katenin ile boyanma sıklıklarının karşılaştırmasında, MDS ve MPN gruplarının her ikisinde de kontrol grubuyla aralarında boyanma sıklığı açısından anlamlı farklar bulunmuştur. Kontrol grubunda vakaların tamamında % 5'in altında boyanma izlenirken, MDS vakalarının % 66.7'sinde, MPN vakalarının ise % 41.4'ünde, % 5 ve üzerinde boyanma izlenmiştir. Monica P. ve ark. çalışmasında, 52 adet MPN vakasını megakaryositik ve eritroid/myeloid seride b-katenin ile ayrı ayrı boyanma sıklıkları açısından karşılaştırmışlar. Buna göre 52 adet MPN vakasının % 46.1 'inde megakaryositer seri hücrelerinde, % 5'in altında boyama, % 17.3'ünde % 5-30

arası boyanma izlenmiştir. 6 adet kontrol vakasının hepsinde % 5'in altında boyanma izlenmiştir. 52 adet vakanın % 57.6'sında % 5'in altında boyanma izlenirken, % 26.9'unda % 5-30 arası boyanma izlenmiştir. 6 adet kontrol vakasının 6'sında da % 5'in altında boyanma izlenmiştir (107). Bizim çalışmamızda MPN hastalarında % 5'in altında boyanma oranı literatürdeki bu çalışmaya göre daha düşük iken, % 5-30 arası boyanma oranları çok daha yüksek bulunmuştur. Özetle, çalışmamızdaki MPN vakaları, b-katenin ile daha yüksek oranlarda boyanmıştır. Kontrol vakaları, literatürdeki çalışmanın sonuçları ile uyumlu olarak tamamen % 5'in altında boyanmıştır. İki çalışma arasındaki boyanma oranları arasındaki fark, gerek vakaların özelliklerinden gerekse teknik nedenlerden kaynaklanıyor olabilir. Monica P. ve ark çalışması haricinde MPN vakalarında b-katenin boyanması üzerine yapılmış pek çok çalışma yoktur. Bu çalışmada megakaryositer ve eritroid/myelositer seri hücrelerinde boyanma oranları ayrı ayrı değerlendirilmiştir. Bu nedenle bizim çalışmamızdaki oranlarla karşılaştırmak doğru bir yaklaşım olmayabilir. Literatürdeki bu eksiklik nedeniyle, bu konuda sağlıklı sonuçlar elde edememekteyiz. Çalışmamızdaki MDS ve MPN vakalarının genel olarak kontrol vakalarından daha yüksek oranda b-katenin ile boyanma eğilimi, her iki hastalıkta da hematopoetik serilerde ve progenitör hücrelerde proliferasyonun ve bu proliferasyonda Wnt sinyal sisteminin rol aldığı kanıtı olarak sayılabilir.

B-katenin ile boyanma yoğunluğu açısından her üç grup arasında anlamlı bir fark izlenmedi. Vakaların genel olarak % 86.5'inde 1(+) boyanma izlenirken, % 13.4'ünde 2(+) boyanma izlendi. Hiçbir vakada 3(+) boyanma izlenmedi. Monica P. ve ark. çalışmasında, megakaryositlerde b-katenin boyanmasının stoplazmik, eritroid/myeloid serilerde ise perinükleer/stoplazmik olduğu izlenmiş (107). Bazı eski çalışmalarda, b-kateninin non-hematolojik neoplazmlarda hem stoplazmik hem de nükleer lokalizasyonlarda eksprese edildiği bulunmuş (167,168). Soliter fibröz tümörlerde, araştırmacılar vakaların % 33'ünde b-katenin ile nükleer boyanma bulurken, geri kalanında membranöz veya stoplazmik patternde boyanma izlemişler (169). Kutanoz lenfomalarla yapılan bir çalışmada, tüm vakalarda b-kateninle stoplazmik bir boyanma izlenmiş (170). Bizim çalışmamızda da bu verilerle uyumlu olarak vakaların % 96.6'sında stoplazmik boyanma izlenmiştir. Vakaların hiçbirinde nükleer boyanma izlenmemiştir.

B-katenin, intersellüler adezyon bağlantılarında rol alan bir proteindir. Kadherinler yoluyla hücre yüzey membranının iç kısmına bağlıdır. B-katenin stoplazmada bulunan bir indirgeme kompleksi vasıtasıyla indirgenir. Wnt sinyali uygun şekilde geldiğinde ya da indirgenme kompleksi elemanlarında meydana gelebilecek herhangi bir hasarda, b-katenin indirgenmeyerek nükleusa taşınır. Yani nükleer b-katenin varlığı, b-katenin aktivasyonunun net bir göstergesidir. Jinglan Xu ve ark çalışması, MDS’de b-katenin boyanmasını gösteren ilk ve tek çalışmadır. Bu çalışmada AML ve MDS vakalarında, b-katenin ile nükleer boyanma sıklığı araştırılmıştır (108). Tüm vakaların % 40.9’unda nükleer boyanma izlenmiştir. Normal eritroblastlarda stoplazmik boyanma izlenmiştir. MDS vakalarında eritroid ve endotelial hücrelerde stoplazmik b-katenin boyanması izlenirken, myeloblast ve eritroblastlarda nükleer b-katenin boyanması izlenmiştir. Normal eritroblastlarda da stoplazmik b-katenin boyanmasının izlenmesi, her stoplazmik boyanmanın illa ki b-katenin aktivasyonu anlamına gelmediğini ve b-kateninin normal olarak da hücre membranının iç yüzünde adezyon molekülü olarak var olduğunu hatırlamamız gerektiği anlamına gelmektedir. Nükleer b-katenin boyanması, özellikle RAEB-t vakalarında izlenmiştir. Nükleer b-katenin boyanması direkt olarak b-katenin aktivasyonunun bir kanıtı olduğu için bu sonuçlar MDS’de, Wnt/b-katenin sinyal sisteminin önemini ve blast sayısı artışıyla, b-katenin aktivasyonunun direkt olarak ilişkili olduğunu göstermektedir.

Çalışmamızda tek olarak MDS vakalarını ele aldığımızda, CD34’ün boyanma sıklığı açısından CD117 ve b-katenine üstün olduğu dikkat çekmektedir. Bunda CD34’ün hemtopoetik progenitör hücrelerde ve blastlarda yüksek oranda boyanma eğiliminin payı büyüktür. Her ne kadar artmış blast sayısını belirlemede birçok farklı immunmarker denense de, CD34 halen bu açıdan en güvenilir marker gibi görünmektedir. Bu durumun aksine, çalışmamızdaki MPN vakalarında ise, CD117 boyanma oranları diğer iki markera göre anlamlı ölçüde yüksek bulunmuştur. Daha önce de birçok kez anlatıldığı gibi, CD117 daha çok myeloid spesivite gösteren ve primitif hematopoetik progenitörlerden ziyade granülosit/myeloid progenitör hücrelerde daha yüksek oranlarda eksprese edilen bir markerdir. Bu yüzden özellikle myeloid seride proliferasyonla giden MPN vakalarında yüksek oranlarda boyanması beklenen bir sonuçtur. İlginç olarak çalışmamızdaki kontrol grubu vakalarında b- katenin boyanma oranlar, diğer iki

gruba göre yüksek bulunmuştur. B-katenin normal durumlarda da, hücre iç membranında bulunabilen bir adezyon proteindir. Yani herhangi bir patoloji olmayan durumlarda da stoplazmada bulunabilir. Bu bilgileri destekler şekilde Jinglan Xu. ve ark. çalışmasında, normal kemik iliği vakalarında, hücrelerin membran ve stoplazmasında ekspresyon izlemiştir (107). Öte yandan CD34 ve CD117 antijenleri daha çok blast ve progenitör hücrelerin neoplastik proliferasyonlarında kendilerini gösterir.

Son olarak her bir gruptaki vakalarda eksprese edilen markerlar arasındaki korelasyonları inceledik. Buna göre MDS vakalarında CD34 ve CD117 arasında iyi derecede bir korelasyon, CD117 ile b-katenin arasında iyi derecede bir korelasyon ve CD34 ile b-katenin arasında zayıf derecede bir korelasyon bulduk. MPN vakalarında da buna benzer şekilde CD34 ile CD117 arasında ve CD117 ile b-katenin arasında iyi derecede korelasyon ve CD34 ile b-katenin arasında zayıf derecede bir korelasyon bulduk. Ysebaert ve ark yaptıkları çalışmada b-katenin ekspresyonu ve CD34 ekspresyonu arasında bir korelasyon olduğunu belirtmişler (171). Bizim çalışmamızdaki bu bulgular da bu bilgiyi destekler niteliktedir ancak bulduğumuz korelasyon zayıf derecededir.

Kontrol grubunda CD34 ve CD117 arasında zayıf bir korelasyon bulunurken, CD34 ve b-katenin arasındaki korelasyon minimaldir. CD117 ile b-katenin arasındaki korelasyon iyi derece olarak izlenmiştir.

Çalışmamızda elde ettiğimiz bütün sonuçlar bize MDS’de blast sayısını ve grade’i belirlemede halen CD34’ün en etkin marker olduğunu ancak CD117’nin bunun yanında destekleyici, özellikle de myeloid seri progenitörlerini tespitite önemli bir yardımcı olabileceğini göstermektedir. MPN’de CD117 ekspresyonu, CD34’e göre anlamlı derecede üstündür. Özellikle myeloid proliferasyonla giden MPN vakalarında faydası şüphesizdir. Ayrıca MDS ve MPN arasında kararsız kalınan durumlarda CD34 ve CD117 ‘nin birlikte çalışılması, doğru tanı için çok yol gösterici olacaktır. Hematopoetik hastalıklarda yeni kullanım alanı bulan B-katenin ise AML vakalarında izlenen yüksek performansı, MDS ve MPN vakalarında gösterememektedir. Bu konuda yapılan çok az sayıda çalışma, Wnt/b-kateninin MDS ve MPN gibi hastalıklardaki rolüne ilişkin soruları tam cevaplayamamaktadır. Bu yöndeki kapsamlı çalışmaların artırılmasıyla gelecekte b-kateninin, hematolojik neoplazmların tanı ve tedavisindeki önemi aydınlığa kavuşacaktır.

7-SONUÇLAR

- MDS hastalarının yaş ortalamasının, kontrol grubu hastalarının yaş ortalamasından istatistiksel olarak anlamlı derecede fazla olduğu izlendi ($p=0.04$).
- MDS ve MPN hastalarının, kemik iliği sellüleritelerinin kontrol grubu kemik iliği sellüleritelerinden anlamlı derecede yüksek olduğu izlendi ($p=0.02$, $p<0,001$).
- Hastalık grupları arasında cinsiyet dağılımı açısından anlamlı bir fark izlenmedi ($p=0.810$).
- MDS ve MPN vakalarının her ikisinde de kemik iliği kontrollerine göre, CD34 ile anlamlı derecede yüksek oranda boyanma izlenmiştir ($p<0.001$, $p<0.001$).
- MDS, MPN ve kontrol grupları arasında CD34 ile boyanma yoğunlukları açısından anlamlı bir fark izlenmemiştir ($p=0.06$).
- MDS vakalarında, CD34 ile membranöz/ stoplazmik boyanma patterni, diğer iki gruptaki vakalara göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p=0.02$, $p=0.02$).

- Kontrol grubunun CD117 ile, MDS ve MPN gruplarına göre anlamlı oranda düşük sıklıkta boyanma gösterdiği izlendi ($p<0.001, p<0.001$).
- CD117 ile MPN grubunun, kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek boyanma yoğunluğu gösterdiği izlendi ($p<0.001$).
- CD117 ile boyanma patterni açısından gruplar arasında anlamlı bir fark izlenmemiştir ($p=0.9$).
- Kontrol grubunun, b-katenin ile, MDS ve MPN vakalarından, anlamlı derecede düşük oranda boyanma gösterdiği izlendi ($p<0.001, p<0.001$).
- B-katenin ile boyanma yoğunluğu açısından gruplar arasında anlamlı bir fark izlenmedi ($p=0.32$).
- MDS vakalarında CD34'ün boyanma oranı diğer iki markera göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p=0.04, p<0.001$).
- MPN vakalarında CD117'nin boyanma oranı, diğer iki markera göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p=0.01, p<0.001$).
- Kontrol grubunda b-katenin boyanma oranı, diğer iki markera göre zayıf bulunmuştur ($p=0.03, p<0.001$).
- MDS vakalarında, CD34 ve CD117 arasında boyanma oranları açısından güçlü bir korelasyon saptandı.
- MDS vakalarında, CD117 ile b-katenin arasında boyanma oranları güçlü bir korelasyon saptandı.
- MDS vakalarında, CD34 ile b-katenin arasında boyanma oranları açısından zayıf bir korelasyon saptandı.
- MPN vakalarında, CD34 ile CD117 arasında boyanma oranları açısından güçlü bir korelasyon saptandı.
- MPN vakalarında, CD34 ile b-katenin arasında boyanma oranları açısından zayıf bir korelasyon saptandı.
- MPN vakalarında, CD117 ile b-katenin arasında, boyanma oranları açısından güçlü bir korelasyon saptandı.
- Kontrol grubunda, CD34 ile CD117 arasında, boyanma oranları açısından zayıf bir korelasyon saptandı.

- Kontrol grubunda, CD34 ile b-katenin arasında, boyanma oranları açısından zayıf bir korelasyon saptandı.
- Kontrol grubunda, CD117 ile b-katenin arasında, boyanma oranları açısından güçlü bir korelasyon saptandı.

8-ÖZET

Myelodisplastik Sendrom (MDS) ve Myeloproliferatif Neoplazmlar (MPN) klonal hematopoetik kök hücre hastalıklarıdır. Çalışmamızda Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı arşivinden 2007-2010 yıllarında elde edilen 30 MDS, 29 MPN ve kontrol grubu olarak 30 kemik iliği biopsi materyali kullanılmıştır. Tüm parafin kesitler immunhistokimyasal olarak anti-beta-katenin, anti-CD34 ve anti-CD117 antikorları ile çalışılmıştır.

MDS ve MPN vakalarının her ikisinde de kemik iliği kontrollerine göre, CD34 ile anlamlı derecede yüksek oranda boyanma izlenmiştir ($p<0.001, p<0.001$). MDS, MPN ve kontrol grupları arasında CD34 ile boyanma yoğunlukları açısından anlamlı bir fark izlenmemiştir ($p=0.06$). Kontrol grubunun CD117 ile, MDS ve MPN gruplarına göre anlamlı oranda düşük sıklıkta boyanma gösterdiği izlendi ($p<0.001, p<0.001$). CD117 ile boyanma patterni açısından gruplar arasında anlamlı bir fark izlenmemiştir ($p=0.9$). Kontrol grubunun, b-katenin ile, MDS ve MPN

vakalarından, anlamlı derecede düşük oranda boyanma gösterdiği izlendi ($p<0.001, p<0.001$). B-katenin ile boyanma yoğunluğu açısından gruplar arasında anlamlı bir fark izlenmedi ($p=0.32$).

Çalışma sonucunda elde edilen verilere göre CD34 halen, MDS ve MPN gibi hastalıklarda blast artışını göstermede en güvenilir markerdir. CD117 ise özellikle myeloid blast ve progenitörlere yüksek spesivite göstermesi açısından, CD34 ile birlikte kullanılabilecek önemli bir markerdir. B-katenin ise diğer neoplazilerde gösterdiği başarıyı, MDS ve MPN vakalarında gösterememektedir. Bu konuda yapılacak daha kapsamlı çalışmalar, bu konuya ışık tutacaktır.

Anahtar kelimeler: MDS, MPN, CD34, CD117, Beta katenin

9- SUMMARY

Myelodysplastic Sendrome and Myeloproliferative Neoplasia are both clonal hematopoietic stem cell diseases. In the present study, 30 MDS, 29 MPN and 30 histologically normal bone marrow biopsies obtained from the archive of Dicle University Pathology Department between the years 2007-2010 were used. All the parafin slides were stained immunohistologically with CD34, CD117 and b-catenin.

In both MDS and MPN cases, staining percentage with CD34 was significantly higher when compared with the control cases ($p<0.001, p<0.001$). No significant difference was seen in staining density between all the groups ($p=0.06$). Control group showed significantly lower staining percentage with CD117 and b-catenin when compared with MDS and MPN cases ($p<0.001, p<0.001$). Staining pattern with CD117 did not show a significant difference between all groups ($p=0.09$). Among

three groups there was no significant difference in staining density with b-catenin ($p=0.32$).

In conclusion, CD34 is still the most reliable immunomarker to show blasts and progenitor cells in the diseases like MDS and MPN. CD117 shows higher sensitivity particularly for myeloid blasts and progenitors, so it would be so useful when used together with CD34. B-catenin could not show the same success that performed in other hematologic diseases. More studies are needed for investigating the role of b-catenin in MDS and MPN.

Key words: MDS, MPN, CD34, CD117 and B-catenin

10- KAYNAKLAR

- 1-K. Allampallam,V. Shetty, S. Mundle,D. Dutt,H. Kravitz,P. L. Reddy,S. Alvi, N. Galili,G. S. Saberwal. Biological Significance of Proliferation ,Apoptosis,Cytokines and Monocyte/Macrophage Cells in Bone Marrow Biopsies of 145 Patients With Myelodysplastic Syndrome. Int J Haematol , 2002,75: 289-297.
- 2-B.J.Brain, D.M.Clark and B.S.Wilkins. "Bone Marrow Pathology".Wiley-Blackwell Publication, 2010
- 3-Stacey Mills. Histology for Pathologist. Lippincot Williams&Wilkins. USA, 2007
- 4-A.Orazi, D.P.O'Malley and Daniel A.Arber. "Illustrated Pathology of the Bone Marrow".Chambridge University Pres, 2006
- 5-Lemischka IR. Clonal, in vivo behavior of the totipotent hematopoietic stem cell. Semin Immunol. 1991;3:349-55.
- 6-Friedenstein AJ. Stromal mechanisms of bone marrow cloning in vitro an retransplantation in vivo. In: Thienfelder S, ed. Immunology of bone marrow transplantation. Berlin: Springer Verlag,1980 p. 19-28.

- 7-Dexter TM, Moore MAS. In vitro duplication and "cure" of haemopoietic defects in genetically anaemic mice. *Nature* 1977;269:412-14
- 8-Yoder MC, Papaioannou VE, Breitfeld PP, Williams DA. Murine endoderm and mesoderm-derived cell lines support in vitro growth and differentiation of hematopoietic cells. *Blood* 1994; 83:2436-43
- 9-Julien Y, Bertranda and David Travera. Hematopoietic cell development in the zebrafish embryo. *Current Opinion in Hematology* 2009, 16:243–248
- 10-Thierry Jaffredo^a, Wade Nottingham^b, Kate Liddiard^b, Karine Bollerota^a, Claire Pouget^a, and Marella de Bruijn^b. From hemangioblast to hematopoietic stem cell: An endothelial connection? *Experimental Hematology*, 2005,33,1029–1040
- 11-Dantschakoff V. Über das erste Auftreten der Blutelemente beim Hühnerembryo. *Folia Haematol.* 1907;4:159–166.
- 12-Maximow A. Untersuchungen über Blut und Bindegewebe: 1. Die frühesten Entwicklungsstadien der Blut- und Bindegewebszellen beim Säugetierembryo, bis zum Anfang der Blutbildung in der Leber. *Arch Mikr Anat Entwicklungsgesch.* 1909;73:444–561.
- 13-Ciau-Uitz A, Walmsley M, Patient R. Distinct origins of adult and embryonic blood in *Xenopus*. *Cell.* 2000;102:787–796.
- 14-Charles Durand, Elaine Dzierzak. Embryonic beginnings of adult hematopoietic stem cells. *haematologica/the hematology journal* | 2005; 90,1.
- 15-Palis J, Yoder MC. Yolk-sac hematopoiesis: the first blood cells of mouse and man. *Exp Hematol.* 2001;29:927–936
- 16- Murray PDF. The development "in vitro" of blood of the early chick embryo. *Proc R Soc London.* 1932;11:497–521.
- 17-Jaffe, E. S., Harris, N. L., Stein, H., & Vardiman, J. W., eds. *World Health Organization Classification of Tumours: Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. Lyon: IARC Press. 2001.
- 18-George, T. I. & Arber, D. A. Pathology of the myeloproliferative diseases. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, 2003. 17, 1101–27.
- 19-Anastasi, J. & Vardiman, J. W. Chronic myelogenous leukemia and the myeloproliferative disorders. In *Neoplastic Hematopathology*, ed. D. M. Knowles, 2nd edn. Baltimore: Williams & Wilkins, 2000. pp. 1745–60.
- 20-Harris, N. L., Jaffe, E. S., Diebold, J., et al. The World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting, Airlie House, Virginia, November, 1997. *Annals of Oncology*, 1999. 10, 1419–32.
- 21- F. Delhommeau^{a, b}, D. F. Pisani^a, C. James^{a, c}, N. Casadevall^{a, b}, S. Constantinescu^d and W. Vainchenker^a. Oncogenic mechanisms in myeloproliferative disorders. *Cell. Mol. Life Sci.* 63, 2006, 2939–2953
- 22-Thiele J, Kvasnicka HM, Tefferi A, Barosi G and Orazi A. Primary Myelofibrosis. In: Swedlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J and Vardiman JW. *World Health*

- Organization Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissue, 4th edn. IARC Pres, Lyon, 2008. pp. 44-50
- 23-Andrzej Hellmann. Myeloproliferative Syndromes: diagnosis and therapeutic options. ,Pol Arch Med Wewn 2008;118: 756-760
 - 24-Groffen J, Stephenson JR, Heisterkamp N, et al. Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region bcr on chromosome 22. Cell 1984; 36: 93-96
 - 25-Tefferi A, Gilliland DG. Classification of myeloproliferative disorders: From Dameshek towards a semi-molecular system. Best Pract Res Clin Haematol 2006;19:361–364.
 - 26-Richard T. Silver, Ayalew Tefferi. Myeloproliferative Disorders, Biology and Management. Informa Healthcare USA, 2008
 - 27- Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. Lancet 2005;365:1054–1061.
 - 28-Levine RL, Wadleigh M, Cools J, et al. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. Cancer Cell 2005;7:387–397.
 - 29- Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, et al. A gain of function mutation in Jak2 is frequently found in patients with myeloproliferative disorders. N Engl J Med 2005;352:1779–1790.
 - 30-James C, Ugo V, Le Couedic JP, et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. Nature 2005;434:1144–1148
 - 31-Scott LM, Tong W, Levine R, et al. JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis. N Engl J Med 2007;356:459–468.
 - 32-Pikman Y, Lee BH, Mercher T, et al. MPLW515 L is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia. PLoS Med 2006;3:e270.
 - 33-Pardanani AD, Levine RL, Lasho T, et al. MPL515 mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: A study of 1182 patients. Blood 2006;108:3472–3476.
 - 34-Cools J, DeAngelo DJ, Gotlib J, et al. A tyrosine kinase created by fusion of the PDGFRA and FIP1L1 genes as a therapeutic target of imatinib in idiopathic hypereosinophilic syndrome. N Engl J Med 2003;348:1201–1214.
 - 35-Nagata H, Worobec AS, Oh CK, et al. Identification of a point mutation in the catalytic domain of the protooncogene c-kit in peripheral blood mononuclear cells of patients who have mastocytosis with an associated hematologic disorder. Proc Natl Acad Sci USA 1995;92:10560–10564.
 - 36-Loh ML, Vattikuti S, Schubert S, et al. Mutations in PTPN11 implicate the SHP-2 phosphatase in leukemogenesis. Blood 2004;103:2325–2331.
 - 37-Shannon KM, O'Connell P, Martin GA, et al. Loss of the normal NF1 allele from the bone marrow of children with type 1 neurofibromatosis and malignant myeloid disorders. N Engl J Med 1994;330:597–601.
 - 38-Lauchle JO, Braun BS, Loh ML, et al. Inherited predispositions and hyperactive Ras in myeloid leukemogenesis. Pediatr Blood Cancer 2006;46:579–585.
 - 39-U Germing, C Aul, C M Niemeyer, R Haas, J M Bennet. Epidemiology, classification and prognosis of adults and children with myelodysplastic syndromes. Ann Haematol, 2008, 87: 691- 699

- 40-Kündgen A, Strupp C, Aivado M, Hildebrandt B, Haas R, Gattermann N, Germing U. Myelodysplastic syndromes under the age of 50 years. *J Clin Oncol*, 2006, 24:5358–5365
- 41-Hasle H, Niemeyer CM, Chessells JM, Baumann I, Bennett JM, Kerndrup G, Head DR A pediatric approach to the WHO classification of myelodysplastic and myeloproliferative diseases. *Leukemia* , 2003, 17:277–282
- 42-Rollison DE, Howlader N, Smith MT, Stom SS, Merrit WD, Riesla et al. Epidemiology of Myelodysplastic Syndromes and Chronic Myeloproliferative Disorders, *Blood*, 2008. 112,45-52
- 43-Bennett, J. M., Catovsky, D., Daniel, M. T., et al. Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. *British Journal of Haematology*, 1982. 51, 189–99.
- 44-Bennet JM Catovsky D, Daniel MJ, Flandin G, Galton DAG, Gralnick HR and Sultan C. Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. *Ann Intern Med*. 1985, 103,626-629
- 45-Bruning RD, Orazi A, Germing U, Le Beau MM, Porwit A, Baumann I, Vardiman JW and Hellstrom-Linberg E. Myelodysplastic Syndromes/neoplasms, overview. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J and Vardiman JW, *World Health Organization Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. IARC Press, Lyon , 2008. pp 88-93
- 46-Baumann I, Niemeyer CM, Bennet JM and Shannon K Childhood Myelodysplastic Syndrome. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J and Vardiman JW, *World Health Organization Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. IARC Press, Lyon , 2008, pp 105-107
- 47-Estey, E., Thall, P., Beran, M., Kantarjian, H., Pierce, S., & Keating, M. Effect of diagnosis (refractory anemia with excess blasts, refractory anemia with excess blasts in transformation, or acute myeloid leukemia [AML]) on outcome of AML-type chemotherapy. *Blood*, 1997. 90, 2969–77.
- 48-Arber, D. A., Stein, A. S., Carter, N. H., Ikle, D., Forman, S. J., & Slovak, M. L. Prognostic impact of acute myeloid leukemia classification: importance of detection of recurring cytogenetic abnormalities and multilineage dysplasia on 5- year survival. *American Journal of Clinical Pathology*, 2003 , 119, 672–80
- 49-Kuriyama K, Tomonaga M, Matsuo T, Ginnai I ve Ichimaru M Diagnostic significance of detecting pseudoPelger-Huët anomalies and micromegakaryocytes in myelodysplastic syndrome. *Br J Haematol*, 1986, 63;665-669
- 50-Fernandez-Lago C and Romero E. Myelodysplastic Syndromes associated with immune thrombocytopenia. *Br J Haematol*, 1998. 102, 342-345
- 51-Thiede T, Enquist L and Billstrom R Application of megakaryocytic morphology in diagnosing 5q-Syndrome. *Eur J Haematol*, 1988, 41;434-437
- 52-Wong KF and Chan JKC Are 'dysplastic' and hypogranular megakaryocytes specific markers for myelodysplastic syndrome? *Br J Haematol*, 1991, 77, 509-514
- 53-Yoshida Y, Oguma S, Uchijino H and Maekawa T. Refractory Myelodysplastic Syndromes with hypocellular bone marrow. *J Clin Pathol*, 1988, 41, 763-767

- 54-Rios A,Canizo C,Sanz MA,Vallespi T,Sanz G,Torrabadella M et al. Bone marrow biopsy in myelodysplastic syndromes: morphological characteristics and contribution to the study of prognostic factors. *Br J Haematol*,1990 75, 26-33
- 55-De Wolf-Peeters, C., Stessens, R., Desmet, V., Tricot, G., & Verwilghen, R. L. The histological characterization of ALIP in the myelodysplastic syndromes. *Pathology Research and Practice*, 1986. 181, 402–7.
- 56-Tricot G, de Wolf Peeters C,Hendrickx B and Verwilghen RL. Bone marrow histology in myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol*, 1984, 56, 423-430
- 57-Lambertenghi-Deliliers, G., Annaloro, C., Soligo, D., & Oriani, A. The diagnostic and prognostic value of bone marrow immunostaining in myelodysplastic syndromes. *Leukemia and Lymphoma*, 1998. 28, 231–9.
- 58-Baur, A. S.,Meuge-Moraw, C., Schmidt, P. M., Parlier, V., Jotterand, M., & Delacretaz, F. CD34/QBEND10 immunostaining in bone marrow biopsies: an additional parameter for the diagnosis and classification of myelodysplastic syndromes. *European Journal of Haematology*, 2000. 64, 71–9.
- 59-Pellegrini, W., Facchetti, F.,Marocolo, D., Pelizzari, A. M., Capucci, A., & Rossi, G. Expression of CD34 by megakaryocytes in myelodysplastic syndromes. *Haematologica*, 2000. 85, 1117– 18.
- 60-Mangi MH and Mufti GJ Primary myelodysplastic Syndromes: diagnostic and prognostic significance of immunohistochemical study on bone marrow trephines. *Histopathology*, 1992, 17, 69-74
- 61-Maschek H,Georgii A, Kaloutsi V,Werner M, Bandekar K,Kressel M-G et al. Myelofibrosis in primary myelodysplastic syndromes: a retrospective study of 352 patients. *Eur J Haematol*, 1992, 48,208- 214
- 62-Soligo, D. A., Oriani, A., Annaloro, C., et al. CD34 immunohistochemistry of bone marrow biopsies: prognostic significance in primary myelodysplastic syndromes. *American Journal of Hematology*, 1994. 46, 9–17.
- 63-Colovai, A. I., Wang, S., & Orazi, A. Flow cytometric analysis of myelodysplastic syndromes. *Modern Pathology*, 2002. 15, 236A.
- 64-Poulain, S., Lepelley,P.,Preudhomme,C., et al. Expression of the multidrug resistance-associated protein in myelodysplastic syndromes. *British Journal of Haematology*, 2000.110, 591–8.
- 65-Florian Nolte &Wolf-K. Hofmann. Myelodysplastic syndromes: molecular pathogenesis and genomic changes. *Ann Hematol* ,2008, 87:777–795
- 66-MIC Report Recommendations for a morphologic, immunologic, and cytogenetic (MIC) working classification of the primary and therapy-related myelodysplastic disorders: report of the workshop held in Scottsdale, Arizona, USA, on February 23–25, 1987. Third MIC Cooperative Study Group. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 1998. 32, 1–10.
- 67-Pfeilstocker, M., Reisner, R., Nosslinger, T., et al. Cross validations of prognostic scores in myelodysplastic syndromes on 386 patients from a single institution confirm importance of cytogenetics. *British Journal of Haematology*, 1999. 106, 455–63.
- 68-Knudson AG ,Hereditary cancer: two hits revisited. *J Cancer Res Clin Oncol*, 1996 , 122:135–140

- 69-Brunning RD, Hasserjian RP, Porwit A, Bennet JM, Thiele J and Hellstrom-Lindberg E. Refrakter Cytopenia with unilineage dysplasia. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J and Vardiman JW (eds) World Health Organization Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, IARC Press, Lyon, 2008,, pp. 94-95
- 70-Brunning RD, Bennet JM, Matuszewski J, Orazi A, Vardiman JW and Thiele J. Refrakter Cytopenia with multilineage dysplasia, In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J and Vardiman JW (eds) World Health Organization Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, IARC Press, Lyon, 2008, pp. 98-99.
- 71-Greenberg, P., Cox, C., LeBeau, M., et al. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood*, 1997. 89, 2079–88.
- 72-Orazi A, Brunning RD, Hasserjian RP, Germing U and Thiele J. Refrakter Cytopenia with excess of blasts. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J and Vardiman JW (eds) World Health Organization Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, IARC Press, Lyon, 2008, pp. 100-101.
- 73-Germing, U., Gattermann, N., Strupp, C., Aivado, M., & Aul, C. Validation of the WHO proposals for a new classification of primary myelodysplastic syndromes: a retrospective analysis of 1600 patients. *Leukemia Research*, 2000. 24, 983–92.
- 74-Boultonwood, J., Lewis, S., & Wainscoat, J. S. The 5q- syndrome. *Blood*, 1994. 15, 3253–60.
- 75-Lewis, S., Oscier, D., Boultonwood, J., et al. Hematological features of patients with myelodysplastic syndromes associated with a chromosome 5q deletion. *American Journal of Hematology*, 1995. 49, 194–200.
- 76-Sugimoto, K., Hirano, N., Toyoshima, H., et al. Mutations of the p53 gene in myelodysplastic syndrome (MDS) and MDS derived leukemia. *Blood*, 1993. 81, 3022–6.
- 77-Pagliuca, A., Layton, D. M., Manoharan, A., Gordon, S., Green, P. J., & Mufti, G. J. Myelofibrosis in primary myelodysplastic syndromes: a clinico-morphological study of 10 cases. *British Journal of Haematology*, 1989. 71, 499–504.
- 78-Manoharan, A., Horsley, R., & Pitney, W. R. The reticulin content of bone marrow in acute leukaemia in adults. *British Journal of Haematology*, 1979. 43, 185–90.
- 79-Orazi, A., Cattoretti, G., Soligo, D., Luksch, R., & Lambertenghi-Delellis, G. Therapy-related myelodysplastic syndromes: FAB classification, bone marrow histology, and immunohistology in the prognostic assessment. *Leukemia*, 1993. 7, 838–47.
- 80-Orazi, A., O'Malley, D. P., Jiang, J., et al. Acute panmyelosis with myelofibrosis: an entity distinct from acute megakaryoblastic leukemia. *Modern Pathology*, 2005. 18, 603–14.
- 81-Ellis, M., Ravid, M., & Lishner, M. A comparative analysis of alkylating agent and epipodophyllotoxin-related leukemias. *Leukemia and Lymphoma*, 1993. 11, 9–13.
- 82-Pedersen-Bjergaard, J., Philip, P., Larsen, S.O., et al. Therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia: cytogenetic characteristics of 115 consecutive cases and risk in seven cohorts of patients treated intensively for malignant diseases in the Copenhagen series. *Leukemia*, 1993, 7, 1975–86.

- 83-Michels, S. D., McKenna, R. W., Arthur, D.C., & Brunning, R. D. Therapy-related acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome: a clinical and morphologic study of 65 cases. *Blood*, 1985. 65, 1364–72.
- 84-Quesnel, B., Kantarjian, H., Bjergaard, J. P., et al. Therapy related acute myeloid leukemia with t(8;21), inv(16),and t(8;16):a report on 25 cases and review of the literature. *Journal of Clinical Oncology*, 1993. 11, 2370–9.
- 85-Orazi, A., Albitar, M., Heerema, N. A., Haskins, S., & Neiman, R. S. Hypoplastic myelodysplastic syndromes can be distinguished from acquired aplastic anemia by CD34 and PCNA immunostaining of bone marrow biopsy specimens. *American Journal of Clinical Pathology*, 1997.107, 268–74
- 86-Goyal, R., Qawi, H., Ali, I., et al. Biologic characteristics of patients with hypocellular myelodysplastic syndromes. *Leukemia Research*, 1999. 23, 357–64.
- 87-Barrett, J., Sauntharajah, Y.,&Molldrem, J. Myelodysplastic syndrome and aplastic anemia: distinct entities or diseases linked by a common pathophysiology? *Seminars in Hematology*, 2000. 37, 15–29.
- 88-Jane E. Parker, Ghulam J. Mufti. The Role of Apoptosis in the Pathogenesis of the Myelodysplastic Syndromes. *Int J Hematol*. 2001;73:416-428.
- 89-Mufti GJ, Galton DA. Myelodysplastic syndromes: natural history and features of prognostic importance. *Clin Haematol*. 1986;15: 953-971.
- 90-Yoshida Y. Hypothesis: apoptosis may be the mechanism responsible for the premature intramedullary cell death in the myelodysplastic syndrome. *Leukemia*. 1993;7:144-146.
- 91-Martin SJ, Cotter TG. Ultraviolet B irradiation of human leukemia HL-60 cells in vitro induces apoptosis. *Int J Radiat Biol*. 1991;59: 1001-1016.
- 92-Hickman JA. Apoptosis induced by anticancer drugs. *Cancer Metast Rev*. 1992;11:121-139
- 93-Laster SM, Wood JG, Gooding LR. Tumor necrosis factor can induce both apoptic and necrotic forms of cell lysis. *J Immunol*. 1988;141:2629-2634.
- 94- Suda T, Takahashi T, Golstein P, Nagata S. Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell*. 1993;75:1169-1178.
- 95-Williams GT, Smith CA, Spooner E, Dexter TM, Taylor DR. Haemopoietic colony stimulating factors promote cell survival by suppressing apoptosis. *Nature*. 1990;343:76-79.
- 96-Clark BR, Gallagher JT, Dexter TM. Cell adhesion in the stromal regulation of haemopoiesis. *Baillieres Clin Haem*. 1992;5:619-652.
- 97-Raza A, Gezer S, Mundle S, et al. Apoptosis in bone marrow biopsy samples involving stromal and hematopoietic cells in 50 patients with myelodysplastic syndromes. *Blood*. 1995;86:268-2676
- 98-Silverman LR, Zinzar S, Holland JF. Biological consequences of stromal abnormalities in the myelodysplastic syndrome (MDS): its influence on the hematopoietic dysregulation [abstract]. *Leuk Res*. 1997;21:S20.
- 99-Aizawa S, Nakano M, Iwase O, et al. Bone marrow stroma from refractory anemia of myelodysplastic syndrome is defective in its ability to support normal CD34-positive cell proliferation and differentiation in vitro. *Leuk Res*. 1999;23:239-246.

- 100-G Pruneri, F Bertolini, D Soligo, N Carboni, A Cortelezzi, PF Ferrucci, R Buffa, G Lambertenghi-Delilieri and F Pezzella. Angiogenesis in myelodysplastic syndromes. *British J Cancer*,1999, 81: 1398-1401
- 101-Perez-Atayde AR, Sallan SE, Tedrow U, Connors S, Allred E and Folkman J Spectrum of tumor angiogenesis in the bone marrow of children with acute lymphoblastic leukemia. *Am J Pathol*,1997, 150: 815–821
- 102-Fiedler W, Graeven U, Ergun S, Verago S, Kilic N, Stockschrader M and Hossfeld DK Vascular endothelial growth factor, a possible paracrine factor in human acute myeloid leukemia. *Blood*,1997, 89: 1870–1875
- 103-Mohle R, Green D, Moore MA, Nachman RL and Rafii S Constitutive production and thrombin-induced release of vascular endothelial growth factor by human megakaryocytes and platelets. *Proc Natl Acad Sci USA*,1997, 94: 663–668
- 104-Weidner N, Semple JP, Welch WR and Folkman J .Tumor angiogenesis and metastasis -correlation with invasive breast carcinoma. *N Engl J Med*. 1991, 324:1–8
- 105-Solanilla A, Grosset C, Lemercier C, Dupouy M, Mahon FX, Schweitzer K, Reiffers J, Weksler B and Ripoche J Expression of Flt3-ligand by the endothelial cell. Regulation by IL-1a, glucocorticoids, IFN-a, MIP-1a and TGFb. Key role in the proliferation of primitive hematopoietic progenitors. *Blood* ,1998, 92: 580
- 106-Miroslawa W and Marcin M. Role of Wnt/b-catenin network in regulating hematopoiesis. *Arch. Immunol.Ther.Exp*.2008, 56, 257-266
- 107-Monica P. Jauregui MDa, Steven R. Sanchez MDa, April A. Ewton MDa, Lawrence Rice MDb, Sherrie L. Perkins MD, PhDd, Cherie H. Dunphy MDc, Chung-Che Chang MD, The role of b-catenin in chronic myeloproliferative disorders. *Human Pathology*. 2008,39, 1454–1458
- 108-Jinglan Xu, Momoko Suzuki, Yousuke Niwa, Junji Hiraga, Tetsuro Nagasaka, Masafumi Ito, Shigeo Nakamura, Akihiro Tomita, Akihiro Abe, Hitoshi Kiyoi, Tomohiro Kinoshita and Tomoki Naoe. Clinical significance of nuclear non-phosphorylated beta-catenin in acute myeloid leukaemia and myelodysplastic syndrome. *British Journal of Haematology*,2008, 140, 394–401
- 109-Qing Yu, William J. Quinn III, Theresa Salay, Jenni E. Crowley, Michael P. Cancro, and Jyoti Misra Sen. Role of β -Catenin in B Cell Development and Function. *J Immunol*. 2008 ,September 15; 181: 3777–3783.
- 110-Frank J. T. Staal and Jyoti M. Sen. The canonical Wnt signaling pathway plays an important role in lymphopoiesis and hematopoiesis. *Eur J Immunol*. 2008 July ; 38: 1788–1794.
- 111-Xizhi Guo, Kinglun Kingston Mak, Makoto M. Taketo, Yingzi Yang. The Wnt/b-Catenin Pathway Interacts Differentially with PTHrP Signaling to Control Chondrocyte Hypertrophy and Final Maturation.2009, PLoS ONE 4: 6067.
- 112-Monica Cobas,Anne Wilson,Bettina Ernst,Stéphane J.C. Mancini,H. Robson MacDonald,Rolf Kemler,and Freddy Radtke. Beta-Catenin Is Dispensable for Hematopoiesis and Lymphopoiesis. *J. Exp. Med*. Volume 199, Number 2, January 19, 2004, 221–229
- 113-Morin PJ. Beta-catenin signaling and cancer. *BioEssays* 1999;21: 1021-30.

- 114-Korinek V, Barker N, Morin PJ, et al. Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC-/-colon carcinoma. *Science* 1997;275:1784-7.
- 115-Rubinfeld B, Robbins P, El-Gamil M, Albert I, Porfiri E, Polakis P. Stabilization of beta-catenin by genetic defects in melanoma cell lines. *Science* 1997;275:1790-2.
- 116-Rask K, Nilsson A, Brannstrom M, et al. Wnt-signalling pathway in ovarian epithelial tumours: increased expression of beta-catenin and GSK3beta. *Br J Cancer* 2003;89:1298-304.
- 117-NH Le1, P Franken1 and R Fodde*,1. Tumour-stroma interactions in colorectal cancer: converging on b-catenin activation and cancer stemness. *British Journal of Cancer* ,2008, 98, 1886 – 1893
- 118-Giles, R.H., van Es, J.H. & Clevers, H. Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2003, 1653, 1–24.
- 119-Moon R. T., Kohn A. D., De Ferrari F. and Kayakas A. Wnt and β -catenin signaling: diseases and therapies. *Nature*, 2004: 5, 689–699.
- 120-Nelsson W. J. and Nusse R. Convergence of Wnt, β -catenin, and cadherin pathways. *Science*, (2004): 303, 1483–1487.
- 121-Reya T., O'Riordan M., Okamura R., Devaney E., Willert K., Nusse R. and Grosschedl, Rsignaling regulates B lymphocyte proliferation through a LEF-1 dependent mechanism. *Immunity*, 2000: 13, 15–24.
- 122-Liang H., Chen Q., Coles A.H., Anderson S.J., Pihan G., Bradley A. Bradley A., Gerstein R., Jurecic R. and Jones S. N. Wnt5 inhibits B cell proliferation and functions as a tumor suppressor in hematopoietic tissue. *Cancer Cell*, 2003: 4, 349–360.
- 123-Casagrande G., Te Kronnie G. and Basso G.: The effects of siRNA-mediated inhibition of E2A-PBX1 on EB-1 and Wnt16b expression in the 697 pre-B leukemia cell line. *Haematologica*, 2006, 91, 765–771.
- 124 -D Haase, M Feuring-Buske, C Scha"fer, C Schoch, C Troff, B Gahn, W Hiddemann and B Wo"rmannCytogenetic analysis of CD34+ subpopulations in AML and MDS characterized by the expression of CD38 and CD117. *Leukemia* ,1997, 11, 674–679
- 125-Civin CI, Strauss LC, Brovall C, Fackler MJ, Schwartz JF, Shaper JH. Antigenetic analysis of hematopoiesis: III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells. *J Immunol* 1984; 133: 157–165.
- 126-Yoo Hong Min,Seung Tae Lee,Dong Won Min,Tai Seung Kim,Chan Hee Lee,Byung Kwon Lee,Jee Sook Hahn and Yun Woong Ko. CD34 Immunohistochemical Staining of Bone Marrow Biopsies in Myelodysplastic Syndromes. *Yonsei Med.J. Vol:36,No:1*, 1995
- 127-By K. Sawada, N. Sato, A. Notoya, T. Tarumi, S. Hirayama, H. Takano, K. Koizumi, T. Yasukouchi, M. Yamaguchi, and T. Koike. Proliferation and Differentiation of Myelodysplastic CD34' Cells: Phenotypic Subpopulations of Marrow CD34' Cells *American Society of Hematology*. 1995 ,85: 194-202
- 128-Holyoake TL,Alcorn MJ: CD 34 + haematopoietic cells: biology and clinical applications. *Blood Rev.* 1994,8:113-124,

- 129-Strauss LC, Rowley SD, La Russa VF, Sharkis SJ, Stuart RK, Civin CI: Antigenic analysis of hematopoiesis. V. Characterization of My-10 antigen expression by normal lymphohematopoietic progenitor cells. *Exp Hematol.* 1986,14:878,
- 130-Civin CI, Banquerigo ML, Strauss LC, Loken MR: Antigenic analysis of hematopoiesis. VI. Flow cytometric characterization of My-10-positive progenitor cells in normal human bone marrow. *Exp Hematol* 1987,15:10
- 131-Loken MR, Shah VO, Dattilio KL, Civin CI: Flow cytometric analysis of human bone marrow. 11. Normal B lymphocyte development. *Blood* 1987, 70:1316
- 132-Ryan D, Kossover S, Mitchell S, Frantz C, Hennessy L, Cohen H: Subpopulations of common acute lymphoblastic leukemia antigen-positive lymphoid cells in normal bone marrow identified by hematopoietic differentiation antigens. *Blood* 1986,68:417
- 133-Leary AG, Ogawa M, Strauss LC, Civin CI: Single cell origin of multilineage colonies in culture: Evidence that differentiation of multipotent progenitors and restriction of proliferative potential of monopotent progenitors are stochastic process. *J Clin Invest.*1984. 74:2193
- 134-Schmitt C, Eaves CJ, Lansdorp PM: Expression of CD34 on human B cell precursors. *Clin Exp Immunol.*1991. 85:168
- 135-Tindle RW, Nichols RAB, Chan LC, Campana D, Bimie G: A novel monoclonal antibody BL3C5 recognizes myeloblasts and non B, non T lymphoblasts in acute leukemias and CGL blast crisis and reacts with immature cells in normal bone marrow. *Leuk Res* 1984, 9:1
- 136-Civin CI: Human monomyeloid cell membrane antigens. *Exp Hematol.*1990, 18:461
- 137-Terstappen LW, Huang S, Safford M, Lansdorp PM, Loken MR: Sequential generations of hematopoietic colonies derived from single nonlineage-committed CD34⁺CD38⁻ progenitor cells. *Blood* 1991, 77:1218
- 138-Vaughan WP, Civin CI, Weisenburger DD, Karp JE, Graham ML, Sanger WG, Grierson HL, Joshi SS, Burke P: Acute leukemia expressing the normal human hematopoietic stem cell membrane glycoprotein CD34. *Leukemia* 1988,2:661-664
- 139-Guyotat DG, Campos L, Thomas X, Vila L, Shi ZH, Charrin C, Gentilhomme O, Fiere D: Myelodysplastic syndromes: a study of surface markers and in vitro growth patterns. *Am J Hematol.*1990, 34:26-31
- 140-Sawada K, Sato N, Tarumi T, Saka N, Koizumi K, Sakurama S, Ieko M, Yasukouchi T, Koyanagawa Y, Yamaguchi M, Ohmoto A, Kohno M, Koike T: Proliferation and differentiation of myelodysplastic CD34(+) cells in serum-free medium: response to individual colony-stimulating factors. *Brit J Haematol.* 1993, 83:349-358
- 141-Josep F. Nomdedéu, Roser Mateu, Albert Altes, Andreu Llorente, Carme Rio, Camino Estivill, Olga López, Josep Ubeda, Enriqueta Rubiol. Enhanced myeloid specificity of CD 117 compared with CD13 and CD33. *Leukemia Research* 23, 1999, 341–347
- 142-Hirota S, Isozaki K, Moriyama Y, Hashimoto K, Nishida T, Ishiguro S, et al. Gain-of-function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors. *Science* 1998;279:577.
- 143- Doi H, Inaba M, Yamamoto Y, Taketani S, Mori SI, Sugihara A, et al. Pluripotent hemopoietic stem cells are c-kit⁺ cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:2513–7.

- 144-Akashi K, Weissman IL. The c-kit_ maturation pathway in mouse thymic T-cell development: lineages and selection. *Immunity* 1996;5:147–61.
- 145-Nagata H, Worobec AS, Oh CH, Chowdhury BA, Tannenbaum S, Suzuki Y, Metcalfe DD. Identification of a point mutation in the catalytic domain of the protooncogene c-kit in peripheral blood mononuclear cells of patients who have mastocytosis with an associated hematologic disorder. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:10560.
- 146-Bennet JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DAG, Gralnick HR, Sultan C. Proposals for the calssification of the myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol* 1982;51:189.
- 147-Bennet JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DAG, Gralnick HR, Sultan C. Proposed revised criteria for the acute myeloid leukemias: a report of the French–American–British Cooperative Group. *Ann Intern Med* 1985;103:626.
- 148-Groeneveld K, te Marvelde JG, van den Beemd MWM, Hooijkaas H, van Dongen JJM. Flow cytometric detection of intracellular antigens for immunophenotyping of normal and malignant leukocytes. *Leukemia* 1996;10:1383.
- 149-Lanza F, Latorraca A, Moretti S, Castagnari B, Ferrari L, Castoldi G. Comparative analysis of different permeabilization methods for the flow cytometry measurement of cytoplasmic myeloperoxidase and lysozyme in normal and leukemic cells. *Cytometry* 1997;30:134.
- 150-Lacombe F, Durrieu F, Briaux A, Dumain P, Belloc F, Bascans E, et al. Flow cytometry CD45 gating for immunophenotyping of acute myeloid leukemia. *Leukemia* 1997;11:1878.
- 151-Bene MC, Castoldi G, Knapp W, Ludwig WD, Matutes E, Orfao A, van't Veer MB. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. *Leukemia* 1995;9:1783.
- 152-Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucl Acids Res* 1988;16:1215.
- 153-Christian Sperling, Stefan Schwartz, Thomas Bucher ,E ckhard Thiel,Wolf-Dieter Ludwig, Expression Of The Stem Cell Factor Receptor C-Kit (CD117) In Acute Leukemias, *Haematologica* 1997; 82:617-621
- 154-Ashman LK, Cambareri AC, To LB, Levinsky RJ, Juttner CA. Expression of the YB5.B8 antigen (c-kit proto-oncogene product) in normal human bone marrow. *Blood* 1991; 78:30-7.
- 155-Strobl H, Takimoto M, Majdic O, Hicker P, Knapp W. Antigenicanalysis of human haematopoietic progenitor cells expressing thegrowth factor receptor c-kit. *Br J Haematol* 1992; 82: 287–294.
- 156-Simmons PJ, Aylett GW, Niutta S, To LB, Juttner CA, Ashman LK. C-kit is expressed by primitive human hematopoietic cells that give rise to colony-forming cells in stroma-dependent or cytokine-supplemented culture. *Exp Hematol* 1994; 22:157-65.
- 157-deCastro CM, Denning SM, Langdon S, et al. The c-kit proto-oncogene receptor is expressed on a subset of human CD3-CD4-CD8- (triple-negative) thymocytes. *Exp Hematol* .1994; 22:1025-33.
- 158-Pinto A, Gloghini A, Gatei V, Aldinucci D, Zagonel V, Carbone A. Expression of the c-kit receptor in human lymphomas is restricted to Hodgkin's disease and CD30 anaplastic large cell lymphomas. *Blood*. 1994;83:785.

- 159-Smith FO, Broudy VC, Zsebo KM, Lampkin BC, Buckley CV, Buckley JD, et al. Cell surface expression of c-kit receptors by childhood acute myeloid leukemia blasts is not of prognostic value: a report from the childrens cancer group. *Blood* 1994;84:847.
- 160-Sincock PM, Ashman LK. Expression of c-kit and functional drug efflux are correlated in de novo acute myeloid leukemia. *Leukemia* 1997;11:1850
- 161-Tomeczkowski J, Beilken A, Frick D, et al. Absence of c-kit receptor and absent proliferative response to stem cell factor in childhood Burkitt's lymphoma cells. *Blood* 1995; 86:1469-80
- 162-Doi H, Inaba M, Yamamoto Y, Taketani S, Mori SI, Sugihara A, et al. Pluripotent hemopoietic stem cells are c-kit Blow. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:2513-7.
- 163-Büyükbayram H., Polistemia Vera'nın Histopatolojik Özellikleri. *Türkiye Klinikleri J Hem Onc-Special Topics* ,2009;2(3):33-6
- 164-Muroi K, Amemiya Y, Miura Y. Specificity of CD117 expression in the diagnosis of acute myeloid leukemia. *Leukemia* 1996;10:1048.
- 165-Samuel J. Pirruccello, MD, Ken H. Young, MD and Patricia Aoun, MD, Myeloblast Phenotypic Changes in Myelodysplasia ,CD34 and CD117 Expression Abnormalities Are Common. *Am J Clin Pathol* 2006;125:884-894
- 166-Moriaux F.,Kherrouche Z.,Maurage CA,Demailli FX. Expression of the c-kit receptor in choroidal melanomas. *Melanoma Res.* 2003 Apr;13(2):161-6.
- 167-Haydon RC, Deyrup A, Ishikawa A, et al. Cytoplasmic and/or nuclear accumulation of the beta-catenin protein is a frequent event in human osteosarcoma. *Int J Cancer* 2002;102:338-42.
- 168-Sugimachi K, Taguchi K, Aishima S, et al. Altered expression of beta catenin without genetic mutation in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Mod Pathol* 2001;14:900-5.
- 169-Rakheja D, Molberg KH, Roberts CA, Jaiswal VR. Immunohistochemical expression of beta-catenin in solitary fibrous tumors. *Arch Pathol Lab Med* 2005;129:776-9.
- 170- Bellei B, Pacchiarotti A, Perez M, Faraggiana T. Frequent beta-catenin expression without exon 3 mutation in cutaneous lymphomas. *Mod Pathol* 2004;17:1275-81
- 171- Ysebaert, L., Chicanne, G., Demur, C., Toni, F.D., Houdellier, N.P., Ruidavets, J.B., Mas, V.M.D., Huguet, F.R., Laurent, G., Payrastre, B., Manenti, S. & Sultan, C.R. Expression of beta-catenin by acute myeloid leukemia cells predicts enhanced clonogenic capacities and poor prognosis. *Leukemia*, 2006, 20, 1211-1216.
- 172-Ogata K, Nakamura K, Yokose N, et al. Clinical significance of phenotypic features of blasts in patients with myelodysplastic syndrome. *Blood*. 2002;100:3887-3896.
- 173-Del Canizo MC, Fernandez ME, Lopez A, et al. Immunophenotypic analysis of myelodysplastic syndromes. *Haematologica*. 2003;88:402-407.
- 174-Arroyo JL, Fernandez ME, Hernandez JM, et al. Impact of immunophenotype on prognosis of patients with myelodysplastic syndromes: its value in patients without karyotypic abnormalities. *Hematol J*. 2004;5:227-233.
- 175-Kussick SJ, Fromm JR, Rossini A, et al. Four-color flow cytometry shows strong concordance with bone marrow morphology and cytogenetics in the evaluation for myelodysplasia. *Am J Clin Pathol*. 2005;124:170-181

- 176- Diarra D., Stolina M., Polzer K., Zwerina J., Ominsky M. S., Dwyer D., Korb A., Smolen J. S. and Scheinecker C. Dickkopf-1 is a master regulator of joint remodeling. *Nat. Med.*, 2007: 13, 156–163.