

T.C.
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
PATOLOJİ ANABİLİM DALI

ESANSİYEL TROMBOSİTOZ ve POLİSİTEMİA VERA HASTALIKLARINDA
KEMİK İLİĞİ BİYOPSİLERİNDE Wnt YOLAK PROTEİNLERİNİN (Wnt-
1/ β -katenin/E-kaderin) DEĞERLENDİRİLMESİ

Dr. HATİCE KÜÇÜK
UZMANLIK TEZİ

Trabzon-2011

T.C.
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
PATOLOJİ ANABİLİM DALI

ESANSİYEL TROMBOSİTOZ ve POLİSİTEMİA VERA HASTALIKLARINDA
KEMİK İLİĞİ BİYOPSİLERİNDE Wnt YOLAK PROTEİNLERİNİN (Wnt-
1/ β -katenin/E-kaderin) DEĞERLENDİRİLMESİ

Dr. Hatice KÜÇÜK

UZMANLIK TEZİ

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Ümit ÇOBANOĞLU

Trabzon-2011

TEŞEKKÜR

Asistanlık eğitimim boyunca tüm tecrübe ve bilgilerinden yararlanmamı sağlayan başta değerli hocam Prof.Dr.Yavuz ÖZORAN olmak üzere tüm hocalarıma , ayrıca benden ilgi ve desteklerini esirgemeyen ve bu tezin hazırlanmasında değerli katkı ve önerilerinden dolayı Doç.Dr.Ümit ÇOBANOĞLU'na sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca birlikte çalıştđđım tüm asistan,teknisyen,sekreter ve diğer görevli arkadaşlara da teşekkürü borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	I
İÇİNDEKİLER.....	II
ŞEKİLLER LİSTESİ	IV
TABLolar LİSTESİ	V
RESİMLER LİSTESİ	VI
KISALTMALAR.....	VII
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1 .HEMATOPOEZ	3
2.2. ERİTROPOEZ	4
2.3. MYELOPOEZ	5
2.4. MEGAKARYOPOEZ.....	5
2.5. HEMAPOETİK KÖK HÜCRELER VE PROGENİTÖR HÜCRELER	6
2.6. İLİK SELÜLARİTESİ.....	6
2.7. KEMİK İLİĞİ STROMASI	7
2.8. POLİSTEMİA VERA	7
2.8.1. Tanım	7
2.8.2. Epidemiyoloji.....	8
2.8.3. Etiyoloji	8
2.8.4. Klinik özellikler	9
2.8.5. Morfoloji	9
2.8.6. Prognoz	10
2.9. ESANSİYEL TROMBOSİTEMİ	10
2.9.1. Tanım	10
2.9.2. Epidemiyoloji.....	11

2.9.3. Etiyoloji:	11
2.9.4. Klinik özellikler	11
2.9.5. Morfoloji	11
2.9.6. Prognoz	12
2.10. KEMİK İLİĞİ SİNYAL YOLAKLARI VE JAK2 MUTASYONU	12
2.10.1. JAK2 V617F Mutasyonu	12
2.10.2. Wnt Sinyal Yolağı.....	13
3. MATERYAL METOD	17
4. BULGULAR.....	19
5. TARTIŞMA.....	27
6. SONUÇLAR.....	30
7. ÖZET	31
8. SUMMARY	32
9. KAYNAKLAR	33

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1: JAK2 sinyal yolağı	13
Şekil 2: Wnt - β -katenin standart yolağı	14
Şekil 3: Wnt - β -katenin- E-kaderin yolağı	16

TABLolar LİSTESİ

Tablo:1 ET, PV ve kontrol grubu olgularının immünhistokimya sonuçları.....	19
Tablo:2 PV olgularının Wnt ile boyanma sonuçları	19
Tablo:3 PV olgularının E-kaderin ile boyanma sonuçları	20
Tablo:4 PV olgularının β -katenin ile boyanma sonuçları.....	20
Tablo:5 ET olgularının Wnt ile boyanma sonuçları	20
Tablo:6 ET olgularının E-kaderin ile boyanma sonuçları	20
Tablo:7 ET olgularının β -katenin ile boyanma sonuçları.....	21
Tablo:8 Kontrol olgularının Wnt ile boyanma sonuçları.....	21
Tablo:9 Kontrol olgularının E-kaderin ile boyanma sonuçları.....	21
Tablo:10 Kontrol olgularının β -katenin ile boyanma sonuçları	21
Tablo:11 ET, PV ve kontrol grubu olgularının Wnt-1 ile boyanma sonuçları.....	22
Tablo:12 ET, PV ve kontrol grubu E-kaderin ile boyanma sonuçları	22
Tablo:13 PV olgularının eritroid seride Wnt-1, E-kaderin ve β -katenin ile boyanma sonuçları.....	23
Tablo:14 ET olgularının megakaryositik seride Wnt-1, E-kaderin ve β -katenin ile boyanma sonuçları	23

RESİMLER LİSTESİ

Resim 1. PV olgusunda megakaryopoez ile birlikte hiperselüler görünüm (HE X100)	24
Resim 2. ET olgusunda hiperlobüle görünümde, belirgin artış gösteren megakaryositler ve hiperselüler kemik iliği (HE X100)	24
Resim3. Kontrol grubu normoselüler kemik iliği (H.E X100).....	25
Resim 4. PV olgusunda megakaryositlerde stoplazmik Wnt-1 pozitifliği (İHKX200).....	25
Resim 5. ET olgusunda Wnt-1 ile megakaryositlerde stoplazmik pozitiflik (İHKX200)	26
Resim 6. ET olgusunda eritroid seride E-kaderin ile membranöz pozitif boyanma (İHKX200).....	26

KISALTMALAR

JAK2-kinaz	Janus kinaz
PV	Polisitemia vera
ET	Esansiyel trombositoz
MPN	Myeloproliferatif neoplazi
KML	Kronik myeloid lösemi
KNL	Kronik nötrofilik lösemi
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
İHK	İmmünohistokimya
KIMF	Kronik idiyopatik myelofibrozis
CFU-S	Koloni oluşturan birim

1. GİRİŞ VE AMAÇ

2008 Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) sınıflamasına göre myeloproliferatif neoplazmlar (MPN) 7 gruba ayrılmaktadır (1).

1-Kronik myeloid lösemi (KML)(BCR-ABL-1 pozitif)

2-Kronik nötrofilik lösemi (KNL)

3-Polisitemia vera (PV)

4-Esansiyel trombositoz (ET)

5-Kronik eozinofilik lösemi (KEL)

6-Mastositozis

7-Sınıflandırılmayan myeloproliferatif neoplaziler

MPN, bir veya birden fazla myeloid kökenli hematopoetik kök hücrenin (granülosit, eritrosit, mast hücresi) proliferasyonundaki bozuklukla karakterizedir. Sıklıkla erişkinlerde 5 ve 7. dekad arasında görülür. PV, kemik iliğinde eritroid seride daha belirgin olmak üzere myeloid ve megakaryositik serilerde artış, venöz ve arteriyel trombozların eşlik ettiği klonal myeloproliferatif bir hastalıktır. Çoğu olgu sporadik olup nadiren bazı ailelerde kalıtsal geçiş bildirilmiştir. ET, multipotent kök hücreden kaynaklanan kronik myeloproliferatif bir bozukluktur. Trombosit sayısında belirgin artış vardır. Megakaryositlerde devamlı proliferasyona bağlı dolaşımdaki trombositlerin sayısı artar. Hastalık tipik olarak kemik iliğinde megakaryosit hiperplazisi ve splenomegali ile karakterizedir. MPN patogenezinde özellikle PV ve ET tablosunda Janus kinaz 2 (JAK2) geninde gelişen JAK2 V617F somatik mutasyonu bildirilmiştir. JAK2 mutasyonuna ek olarak trombopoetin reseptör gen mutasyonu MPN tanısında önemlidir (2).

Hematopoetik kök hücreler kendiliğinden yenilenir ve bu süreçte mikroçevre etkileşimi önemlidir. Kendiliğinden yenilenme, dış çevresel uyaranlarla aktive olur ve farklanma için intrinsek faktörlerle koordinasyon içindedir. MPN'lerin köken aldığı hematopoetik kök hücrenin gelişmesinde de (proliferasyon ve farklanma) çeşitli yollar mevcuttur. Bu yollar içinde Wnt sinyal yolağı , ScF/c –kit sinyal yolağı, Notch sinyal

yolağı, HOX sinyal yolağı ve EPO sinyal yolağı yer almaktadır. Wnt sinyal yolağında Wnt-1/ β -katenin/E-kaderin proteinleri bulunmaktadır (1,2). Çalışmamızda hematopoetik kök hücre kökenli PV ve ET tablolarında Wnt sinyal yolağında normal kemik iliği dokusuna kıyasla değişiklik olup olmadığı ve patogenezdaki olası rolünün araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 .HEMATOPOEZ

Kanın şekilli elemanlarının oluştuğu bir süreçtir. Prekürsör hücre kümeleri veya adaları sinüzoidler aracılığı ile kan dolaşımına girer. Periferik kandaki normal hücre popülasyonu kemik iliğindeki hematopoetik dokular tarafından sağlanır. Kemik iliğinde eritrosit, granülosit, trombositler yanı sıra kökeni mezenkim olan fibroblastlar, osteoblastlar, mast hücreleri ve osteoklastlar da yer alır (3).

Doğumda ilik mesafesini hematopoetik hücreler oluşturur. Doğum ile birlikte iskelet sistemindeki bütün ilik mesafesi hematopoetik aktivite gösterir. Tüm hematopoetik hücreler hemen, hemen bir yaşına kadar terminal falankslarda yağ hücreleri tarafından değiştirilir. İlik dört yıldan sonra kemik iliği boşluklarında hematopoetik hücreler arasında artan sayıda görülür. Hematopoetik hücreler on-on dört yaşlar arasında uzun kemiklerin orta şaft kısmında yağ hücreleri ile yer değiştirir. Daha sonra nonhematopoetik sarı ilik kemik dokusunda proksimal ve distal bölgeye yayılır. Proksimal yayılım distal yayılımdan daha yavaş olur. Uzun kemiklerde yaklaşık yirmibeş yaşına kadar kırmızı ilik mevcuttur (humerus ve femurun proksimal çeyreğinde hematopoetik ilik bulunur). Yetişkinlerde hematopoezin diğer yapım yerleri sırasıyla kafatası, kaburga, klavikula, skapula, sternum, vertebra ve pelvistir. İhtiyaca göre hematopoez uzun kemiklerin şaft kısmında dahi yapılır. Hematopoetik hücrelerin ömürleri sınırlı olduğu için sürekli olarak olgun kan hücrelerine dönüştürülmeleri gerekir. Mikrosürkülasyondaki değişikliklere bağlı olarak ilik mesafesindeki yağ oranındaki miktarda artış veya azalışa göre kırmızı ilikte bir genişleme olur. Bazı durumlarda hematopoeze karaciğer, dalak ve lenf nodları destek olan organ ve dokulardır. Normal kemik iliği hücre popülasyonundaki çoğalma Ki67 ve PCNA antikörlerinin kullanımı ile tesbit edilir. Öncü hücrelerin kendi kendine yenilenmesi yoluyla, pluripotent kök hücrelerin bölünmesiyle eritropoez, granülopoez, monosit, lenfopoez ve megakaryositler oluşur (4).

Kemik iliği lenfopoez ve plazma hücre matürasyonunu destekler. Kök ve progenitor hücreler morfolojik tekniklerle (histokimya ve immünohistokimya) tanınmazlar ve biyopsi kesitlerinde görülmezler.

Kemik iliği iki komponent içerir:

1. Parankim: Prekürsör ve tüm matürasyon evrelerindeki kırmızı hücreler, beyaz hücreler ve megakaryositleri içerir.
2. Stroma: Yağ hücreleri, histiositler, fibroblastlar ve kan damarları (5-8).

2.2. ERİTROPOEZ

Eritropoez gelişmekte olan embriyoda gestasyonun 12-19. günlerinde yolk kesesinde kırmızı kan adacıkları şeklinde başlar. Bunlar ilk primitif hücrelerdir ve eritropoez gestasyonun 12.haftasına kadar sürer. Yolk kesesinde eritropoez intravasküler ve megaloblastik tip olarak ortaya çıkar. Yolk kesesinde hematopoezin erken döneminde megakaryositler ve granüler lökositler görülebilir. Gebeliğin yaklaşık 8.haftasında kan adacıklarında gerileme başlar. Çekirdekli kan hücreleri azalmaya başlar ve gebeliğin 12-15. haftaları arasında dolaşımdan kaybolur (9).

Karaciğer eritropoezin diğer bir yapım yeridir. Gestasyonun 6. haftasında karaciğer sinüzoidlerinde eritropoez görülmeye başlar, 6 aya kadar çekirdekli eritrositlerin %50'sinin yapımını karaciğer üstlenir. Eritroblastlar karaciğer parankiminde ekstravasküler alan içinde başlangıçta megaloblastik tipte oluşur ve daha sonra makronormoblastik hale dönüşür.

Fetal hepatik eritropoez ve hemoglobinler çekirdeksiz makrositik kırmızı hücrelerdir. Karaciğerde kırmızı kan yapımı 6.aydan sonra azalarak doğumdan sonra 1.haftaya kadar devam eder. 6. aydan sonra majör fetal hematopoez yeri kemik iliğidir. Gestasyonun 7. ayından sonra myeloid/eritroid oranı $\frac{1}{4}$ ' tür .

Eritroblastların inmatür ve matür çekirdekli formları küçük ve büyük adalar halinde bulunur. Bunlar yapılarında bulunan Hb ve glikoforin antikorlarına göre tanınırlar. Bu adaların çevresinde veya orta kısımda hemosiderin nükleer debri bulunan stoplazmik ömrü uzun olan makrofajlar bulunur. Makrofajların kırmızı hücre yapımında destekleyici rolü vardır. Myeloid/eritroid oranı yaklaşık 2/1 dir (9).

2.3. MYELOPOEZİS

Granülositik seriyi nötrofil, eozinofil, bazofil ve mast hücreleri oluşturur. Kemik iliği kesitlerinde myeloblast, promyelosit, metamyelosit, bant ve segmentli formları tanımlanabilir. Granülositik seri paratrabeküler ve periarterioler bölgeler de gelişim gösterir ancak prekürsörleri kemik iliğinin her yerinde dağılmış olarak bulunur.

Nötrofil ve eozinofilik granüller erken myelosit gelişim döneminde dahi tanınırlar. Olgun bazofiller seyrek olarak görülürler. Bunlar daha büyük ve daha koyu kırmızı boyanırlar. Normal şartlarda granülopoez çok etkilidir ve üretilen bütün hücreler hemen hemen dolaşıma katılırlar. Matür granülositler damar endotelindeki sinüzoidlere migrasyon gösterirler. Myeloid hücreler CD15, CD13, CD33 pozitifdir, ayrıca myeloperoksidaz ve CD34 eksprese ederler. Myeloperoksidaz ile premyelositik evrede azurofilik granüller gösterilebilir (10).

2.4. MEGAKARYOPOEZ

Bunlar normal kemik iliğindeki geniş hücrelerdir. 12-150 mikrometre arasında değişen boyutta ve değişen nükleer konfigürasyonda görülür.

3 aşamada tanımlanırlar:

1. Megakaryoblast:15-20 mikron, oval veya böbrek şeklinde nükleus ve bazofilik stoplazmalıdır.
2. Promgakaryosit :Stoplamaları az bazofilik, granülleri perinükleer bölgede bulunur.
3. Matür megakaryosit: Eozinofilik stoplazma ve değişen derecede granül içerir.

Nükleus kaba serebriform ve sıklıkla multilobüledir (11).

2.5. HEMAPOETİK KÖK HÜCRELER VE PROGENİTÖR HÜCRELER

Hematopoetik kök hücreler iki kategoride incelenir:

1. Erken prekürsör hücreler: Morfolojik olarak tanınamazlar, fonksiyonel testlerle tanınırlar.
2. Morfolojik olarak tanınabilen prekürsör hücreler,

Hematopoetik kök hücreler pluripotent ve multipotent kök hücreleri içerir. Bunlar; eritrositler, granülositler, monositler, trombositler, osteoklastlar, mast hücreleri ve lenfoid kök hücreleri içerir .

Yukarıda belirtilen multipotent kök hücreler ve lenfopotent kök hücreler erken progenitör hücreler olarak kabul edilir. Multipotent kök hücre letal dozda ışınlanmış farelere enjekte edildiğinde makroskopik olarak görünür koloniler dalakta oluşur. Bu nedenle kök hücreler koloni oluşturan birim olarak adlandırılır (CFU-S) (3).

Sağlıklı yetişkinlerde miyeloid kök hücreler uzun bir G0 veya G1 fazında istirahat halinde kalır. İhtiyaç halinde proliferasyon olurlar. Miyeloid kök hücreler farklı olgun hematopoetik progenitör kök hücrelerin çoğalmasını sağlarlar. Kök hücreler hematopoez yeteneğine sahip ilk hücrelerdir. Kendini yenileme ve multilineer farklılaşma potansiyeline sahiptir. Pluripotent kök hücreler kademeli olarak myeloid ve lenfoid hücrelerin öncüllerine sınırlı oranda dönüşür. Normal hematopoetik kök hücreler kendiliğinden yenilenme yoluyla oluşurlar ve mikro çevrelerinden etkilenirler. Eksternal uyarılarla aktive olurlar ve akıbetleri intrensek faktörlerle koordinelidir. Bunlar SCF, LIF, BMP/TGF-Beta, IL-3, IL-6, Flt3–ligand, TPO, Wnt proteinleri, Notch-ligand (Jagged1),Anjiopoetin-1, Ca yanıtı sıra HOXB4 protein, PGE2, ve retinoik asit gibi hematopoetik büyüme faktörlerini içerir. Kendini yenileme p18 ve p21 inhibitörleri, p53, PTEN ile olduğu kadar c-myc hücre düzenlemesiyle de oluşur (12).

2.6. İLİK SELÜLARİTESİ

Kemik iliği yağ dokusu ve hematopoetik doku olmak üzere iki ana bileşenden oluşur. Bu iki dokunun miktarı göreceli olarak değişir. Kemik iliği yağ dokusu ve hematopoetik doku miktarına göre 3 gruba ayrılır;

I-Normoselüler kemik iliği: Eşit oranda hematopoetik ve yağ hücresi içerir veya hematopoetik hücre biraz daha fazla olabilir.

II-Hiposelüler kemik iliği: Hematopoezde azalma, yağ hücrelerinde artış olur.

III-Hiperselüler kemik iliği: Yağ hücresinde azalma ,hematopoetik hücrelerde artış gözlenir.

İlerleyen yaşla birlikte trabeküler kemik miktarında ve hematopoezde bir azalma meydana gelirken subkortikal bölgede , özellikle yağ hücrelerinde bir artış olur. Buna bağlı olarak yaşlıların kemik iliğinde lenfosit, plazma ve mast hücrelerinde normal bir artış görülür (13).

2.7. KEMİK İLİĞİ STROMASI

Kemik iliğinde stroma hematopoez için gerekli olan çatıyı oluşturur. Retiküler hücreler, yağ hücreleri, fibroblastlar, fibriller, kan damarlarını ,sinüzoidleri içeren geniş bir çatıdan oluşur. İliak kemik biyopsisinde yağ hücreleri ilik hacminin yaklaşık üçte birini oluşturur. Retiküler hücreler makrofajlar, endosteal hücreler, fibroblastlar, osteoblastlar mezenkimal elementler, endotel ve adventisyal hücreler arasında yakın ilişki vardır. Örneğin myeloid büyüme faktörü osteoblastların paratrabeküler yerleşimine katkıda bulunur.

Geniş çekirdekli, geniş retiküler hücrelerin fibroblastlardan ayırımı zordur. Fibroblastlar kan damarı ve endostiumu oluşturan retiküler lifleri üretir. Proteinler stromal hücreler tarafından üretilen çeşitli komponentlerden oluşur. Bunlar kan elemanlarını düzenleyen adezyon molekül, kollajen, fibronektin, vitronektin, proteoglikan, büyüme faktörleri ve diğer faktörlerdir(3,14).

2.8. POLİSTEMİA VERA

2.8.1. Tanım

İlk kez 1892 yılında Vaquez tarafından tanımlanan klonal, kronik, progressif bir myeloproliferatif hastalık olarak tanımlanmıştır. Genellikle sinsi başlangıçlıdır. Eritrositlerde ve total kan volümünde mutlak artış ile karakterizedir.

Normal eritropoez mekanizmalarından bağımsız olarak artan, aşırı kırmızı kan hücresi ile karakterli bir hastalıktır. Hemen hemen tüm hastalarda sadece eritroid seri değil granülositik ve myeloid seride çoğalmaya neden olan JAK kinaze geninde JAK2 V617 F somatik mutasyonu saptanır. PV'li hastalarda çeşitli kromozomal bozukluklar tanımlanmıştır. Hastaların yaklaşık %20'sinde tanı anında sitogenetik anormallikler vardır. En sık kromozom 20'nin uzun kolunda delesyon görülür. Ayrıca trizomi 8 ve 9, del (13q) ve del (1p) de görülebilir (1).

PV 'nin 3 evresi tanımlanmıştır:

1. Prodromal polisitemik faz : Orta derecede eritrositozisle karakterlidir
2. Aşkar polisitemik faz : Belirgin şekilde artan kırmızı kan hücreleri ile karakterlidir
3. Post polisitemik myelofibrozis fazı : Sitopeni, anemi, inefektif eritropoez, kemik iliğinde fibrozis, ekstremiteler hematopoez ve hipersplenizm ile karakterlidir. PV düşük bir insidansla myelodisplastik sendrom, prelösemik faz veya akut lösemiye progresyon gösterir. Tüm vakalarda sekonder eritrositoz, kalıtsal polisitemi ve diğer myeloproliferatif neoplaziler ekarte edilmelidir (1).

2.8.2. Epidemiyoloji

PV'nin bildirilen yıllık insidansı ileri yaşla birlikte artar ve Avrupa ve Kuzey Amerika'da insidans 0.7-2.6/100000 arasında değişir. Çoğu raporda erkeklerde kadınlardan biraz daha sık olarak görüldüğü bildirilmiştir. K/E oranı 1-2:1 arasında değişir (15).

2.8.3. Etiyoloji

Altta yatan neden çoğu durumda bilinmemektedir. Bazı ailelerde genetik yatkınlık olduğu rapor edilmiştir. İyonize radyasyon ve mesleki olarak toksinlere maruz kalma bazı hastalarda rapor edilmiştir (16).

2.8.4. Klinik özellikler

Majör semptomlar artan kan kitlesinin neden olduğu hipertansiyon ve vasküler anormalliklerdir. Yaklaşık 20 hastada arteriyel tromboz, derin ven trombozu, myokardiyal iskemi ya da inme PV'nin ilk belirtisi olarak rapor edilmiştir (17).

2.8.5. Morfoloji:

Morfolojik bulgular hastaların kemik iliği biyopsi bulguları ile korelasyon gösterir. Ayrıca klinik ve laboratuvar bulguları ile yakın ilişkilidir. Hatta myeloproliferatif neoplazilerin alt tipleri ve sekonder polisitemiden ayıracak kadar özgül bulguları vardır. Hastalık iki aşamada meydana gelir:

1. Erken polisitemik faz ve aşikar polisitemi
2. Spent faz ve post polisitemik myelofibrozis

1. Erken polisitemik faz ve aşikar polisitemi: Prepolisitemik faz ve aşikar polisitemi evresinde kan ve kemik iliğinde eritroid, granülosit ve megakaryositlerde etkili proliferasyon vardır yani kemik iliğinde panmyelozis vardır. Panmyeloziste özellikle eritroid öncüleri ve megakaryositlerde artış gözlenir. Kırmızı kan hücreleri normokrom ve normositik özelliktedir. Kanama nedeniyle demir eksikliği olursa kırmızı kan hücreleri hipokrom mikrositer görünüm alırlar. Nötrofili ve nadiren bazofili olur. Nadiren aşikar polisitemik fazda inmatür granülositler olabilir fakat dolaşımda blastlar genellikle bulunmazlar. Myeloblast oranı artmaz. Erken faz polisitemide %15 vakada aşikar trombositoz olur ve esansiyel trombositozu taklit eder. Bu gibi durumlarda daha sonra aşikar polisitemik faz gelişir. Erken faz PV'de ilk sırada megakaryositik seride artış görülür ve fazla artan trombosit morfolojilerinde hiperlobulasyon gibi anormallikler olur. Panmyelozis erken polisitemik fazda aşikar polisitemik fazdan daha belirgindir. Erken PV ve ET klinikleri benzerdir ve ikisinin ayırımı panmyelozis ile olur. Zira ET'de olduğu gibi erken PV'de megakaryositoz olur. Megakaryositler gevşek küme oluşturma eğilimindedir yada kemik trabekülerine yakın yerleşirler. Bunlar genellikle farklı boyutta ve

ileri derecede pleomorfiktirler. Hastaların %80’de normal bir retikülin ağı bulunur geri kalanında retikülin ağında artış gözlenir. Bazen tanı sırasında hastalığın evresine bağlı olarak hafif fibrozis mevcuttur. %20 vakada kemik iliğinde lenfoid agregatlar görülür. Normal kemik iliği selülaritesi %35-100 arasında değişir (ortalama %80). Bu oran yaşa bağlı değişiklik gösterir. Bu vakalarda kemik iliği hiperselülerdir (1).

2. Spent faz ve post polisitemik myelofibrozis fazında eritropoezde progresif bir azalma görülür. Sonuç olarak kırmızı kan kitlesi önce normalleşir, sonra azalır ve dalak ekstramedüller hematopoeze bağlı olarak daha fazla büyür.periferik kanda lökoeritroblastik kırmızı kan tablosu ,göz yaşı hücreleri ve poikilositoz görülür. Hastalığın progresyonunda kemik iliğinde fibrozis gelişir. Terminal dönemde hücresellik değişkendir ancak spesmenlerde hiposelülarite sık görülür. Megakaryositler küme yapar, hiperkromazi ve pleomorfizm belirgindir. Eritropoez ve granülopoez miktarında azalma ve bazen bir miktar megakaryosit genişleyen ilik sinuzoidlerinde görülür. Osteosklerozis dahi gelişebilir. Olgunlaşmamış hücrelerin sayısında artış olur. Kemik iliği veya periferik kandan blast oranının %10’nun üzerinde olması myelodisplastik sendrom lehinedir (1,18-21).

2.8.6. Prognoz

İleri yaş ve diğer risk faktörlerine rağmen tedavi ile ortalama yaşam sürelerinin 10 yılın üzerinde olduğu rapor edilmiştir. Çoğu hasta ölümleri kanama veya trombozise bağlıdır,%20 kadar hasta myelodisplazi veya akut myeloid lösemiye yenik düşer (22).

2.9. ESANSİYEL TROMBOSİTEMİ

2.9.1. Tanım

Esansiyel trombositemi myeloproliferatif neoplazmlar içinde yer alır. Primer olarak megakaryositer seriyi ilgilendiren bir hastalık grubudur. Kanda trombositler 450000 üzerindedir. Kemik iliğinde megakaryositlerde artış mevcuttur. Klinikte tromboz ve/veya kanama epizotları görürülür. ET tanısı için bilinen bir biyolojik işaretleyici yoktur trombositoz yapan diğer nedenler, inflamatuvar ve infeksiyöz hastalıklar, diğer tip

hematolojik ve nonhematolojik hastalıklar ekarte edilmelidir. BCR-ABL1 füzyon geninin varlığı tanıyı dışlar. %40-50 vakada JAK kinaz geninde mutasyon vardır. Hastaların tedavilerinin tayini için önemlidir. Moleküler veya sitogenetik olarak bilinen spesifik bir anomali yoktur. %40-50 vakada JAK 2kinaz veya benzer fonksiyonel anomaliler vardır (1,23-24)

2.9.2. Epidemiyoloji

Gerçek insidansı bilinmemektedir. Ancak PV için yapılan çalışma gruplarında 0,6-2,5/100000 oranında saptanmıştır. Görülme yaşı 50-60 yaşdır. Ancak özellikle kadınlarda 2. pik 30 yaşında olur. Az sıklıkta çocuklarda görülür ancak herediter trombositozdan ayırt edilmelidir (25) .

2.9.3. Etiyoloji:

Etiyolojisi bilinmiyor.

2.9.4. Klinik özellikler

Hastaların yarısından fazlası asemptomatiktir. Rutin çalışmalarda periferik kandaki aşikar trombosit artışı ile tesadüfi fark edilirler. Kalan hastalar vasküler oklüzyon veya hemoraji ile fark edilirler. Hastalarda mikrovasküler oklüzyon, transiskemik atak, dijital iskemi, paraestezi ve gangren görülür. Majör arter ve venlerde belirgin oklüzyon olur (26).

2.9.5. Morfoloji:

Periferik kanda belirgin trombositoz görülür. Trombositlerde sıkça anizositoz, küçülme veya büyüme, dev trombosit oluşumu görülür. Lökosit sayısı genellikle normal olsada bazen orta derecede bir yükselme olabilir. Bazofili yok veya minimal derecede görülür. Kırmızı hücreler genellikle normositer, normokrom görünümlüdürler. Ancak kan kaybı gelişirse demir kaybına bağlı hipokrom mikrositer hal alırlar.

Çoğu vakada kemik iliği normoselüler veya hafif hiperselüler görünümlüdür. Kemik iliğinde geniş stoplazmalı, büyük boyutlu hiperlobüle megakaryositler mevcuttur. Megakaryositler kemik iliğ boyunca dağınık ama gevşek kümeler halinde bulunurlar. ET tanısı olan hastada primer myelofibrozisteki gibi son derece atipik megakaryositler varsa ET tanısı sorgulanmalıdır. ET de geniş hiperlobüle ve orta boyutlu monolobüle

megakaryositlerin varlığı 5q delesyonu ile ilişkilidir (27-29).

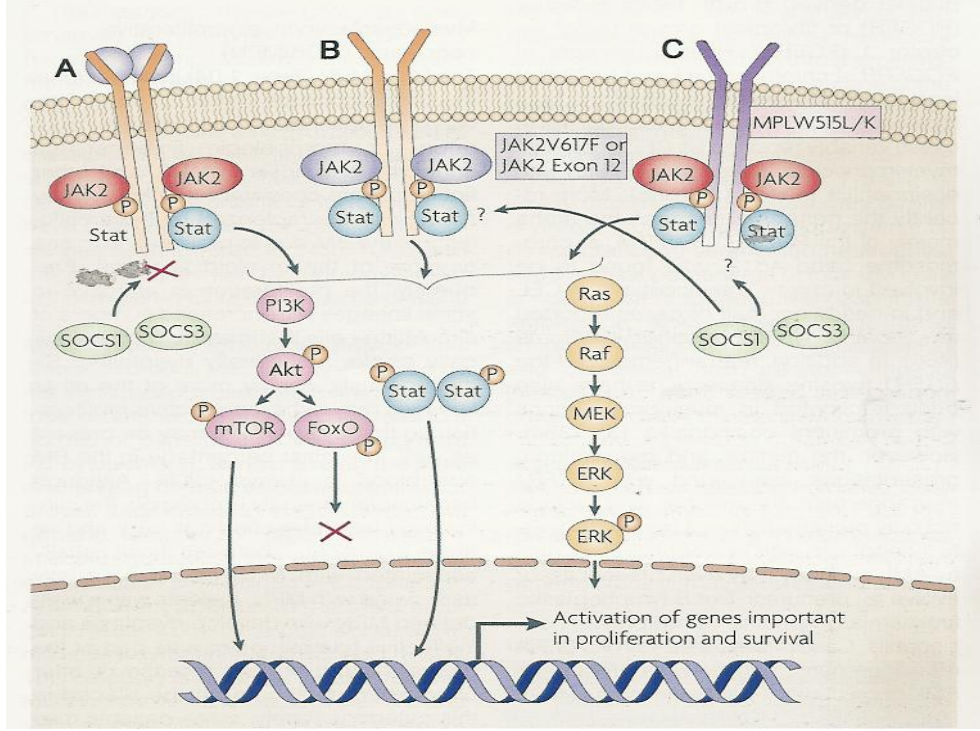
2.9.6. Prognoz

ET uzun semptomsuz dönem ile karakterize yavaş seyirli bir hastalıktır. Zaman zaman hayatı tehdit eden tromboembolik ve hemorajik ataklar olur .Her ne kadar bir süre sonra hastaların kemik iliğinde myeloid metaplazi, myelofibrozis gelişirse de bu mekanizma tam olarak bilinmemektedir. Sitotoksik tedaviye bağlı %5 hastada Akut myeloid lösemi veya Myelodisplastik sendrom transformasyonu görülür. Ortalama yaşam süresi 10-15 yıl olarak rapor edilmiştir. Pek çok hastada yaşam süresi normale yakındır (30).

2.10. KEMİK İLİĞİ SİNYAL YOLAKLARI VE JAK2 MUTASYONU

2.10.1. JAK2 V617F Mutasyonu

9.kromozomda bulunan Janus kinaz 2 (JAK2) geninde meydana gelen JAK2 V617F somatik mutasyonu, PV ve diğer myeloproliferatif hastalıklarda gösterilmiş olup nadiren myelodisplastik sendromlarda, akut myeloid lösemi, sistemik mastositoz ve hipereozinofilik sendromda da görülebilmektedir. JAK2 normal ve neoplastik hücrelerde bulunur ve eritropoetin gibi hematopoetik büyüme faktörleri tarafından uyarılan sinyal iletim sisteminde yer alan sitoplazmik tirozin kinazdır. Valin yerine fenialanin mutasyonunun (Val 617F) gelişmesi ile meydana gelir. JAK kinaz proteinler transfer alanında iki adet fosfat bulundurur. STAT transkripsiyon faktörleri dikkate alınarak JAK/STAT yolu olarak adlandırılırlar (Şekil 1) (31-32).



Şekil 1: JAK2 sinyal yolağı

2.10.2. Wnt Sinyal Yolağı

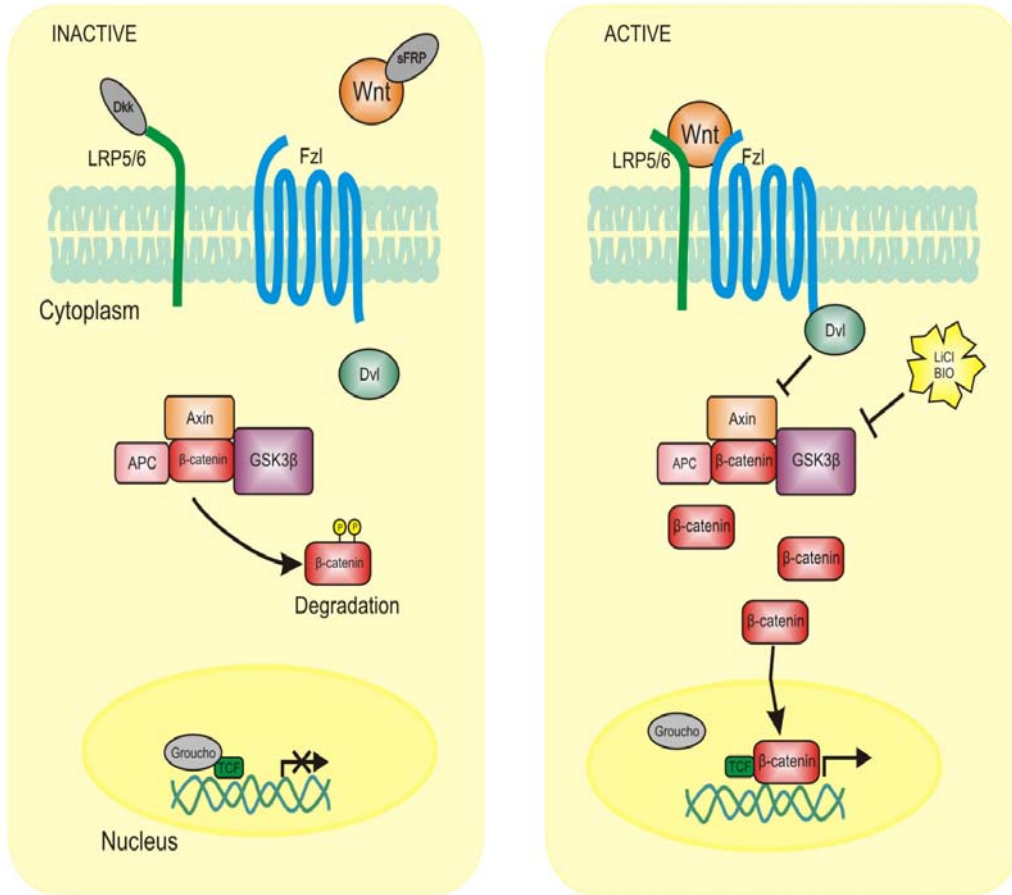
Wnt ailesi tarafından salgılanan glikoproteinler özellikle mezodermal kökenli hücrelerin kaderinin belirlenmesinde önemli yer alır. Wnt ailesi sekrete ettiği proteinleri bünyesinde barındırır. Son zamanlarda ortaya çıkan yeni bir reseptör ligand çifti olan Wnt ailesi tarafından salınan glikoproteinler Frizzled ailesi ve LDL- reseptör ilişkili transmembran proteinlerince bağlanırlar. Wnt proteinleri en az üç intraselüler sinyal yolağını tetikleyebilir:

1. Standart (canonical) β -katenin yolağı
2. Standart olmayan kalsiyum yolağı
3. c-Jun N-terminal kinaz yolağı

β -katenin, standart Wnt yolağının merkezi oyuncusudur. Wnt sinyal yokluğunda β -katenin yıkım kompleksi olarak adlandırılan protein kompleksi ubiquitasyonla ayrıştırma yapar. Reseptörüne bağlanan Wnt proteini β -kateninin ayrışmasına engel olur ve β -katenin stoplazmada birikir. Daha sonra β -katenin nükleusa iletilir ve transkripsiyon

faktörleri olan Lenfoid Enhancing Binding / T-cell transkription faktör ile β -katenin kompleksi oluşur. Bu kompleks oluşumu nükleusta hedef genlerde translokasyonun aktivasyonunu uyarırlar (Şekil 2). Wnt-1, Wnt-5a, Wnt-2b ve Wnt-10b insan fetal kemik stroma hücrelerinden klonlanmıştır (33).

Son zamanlarda yapılan in-vitro çalışmalarda Wnt üzerinden oluşan sinyalizasyonun hematopozin kaderini belirlediği gösterilmiştir. Wnt proteinleri omurgalı ve omurgasızların gelişim süreçlerini etkileyen büyük bir sinyal yolak ailesini oluştururlar. Wnt sinyal yolunun hematopoetik sistem üzerindeki etkileri kısmen biliniyor olmasına rağmen çeşitli organların gelişiminde önemli rolü vardır. Fetal hematopoz sırasında Wnt proteinleri özellikle Wnt 5a-Wnt-10b yolk salk ve karaciğerde eksprese edilir, embriyoda hematopoz her ikisinde de meydana gelir. Wnt 3A proteini hemapoetik kök hücrelerin kendini yenilemesinde önemlidir. Bu genler karsinogenez ve embriyogenez sırasında birçok hücre kaderinin belirlenmesinde önemli rol oynar (34).



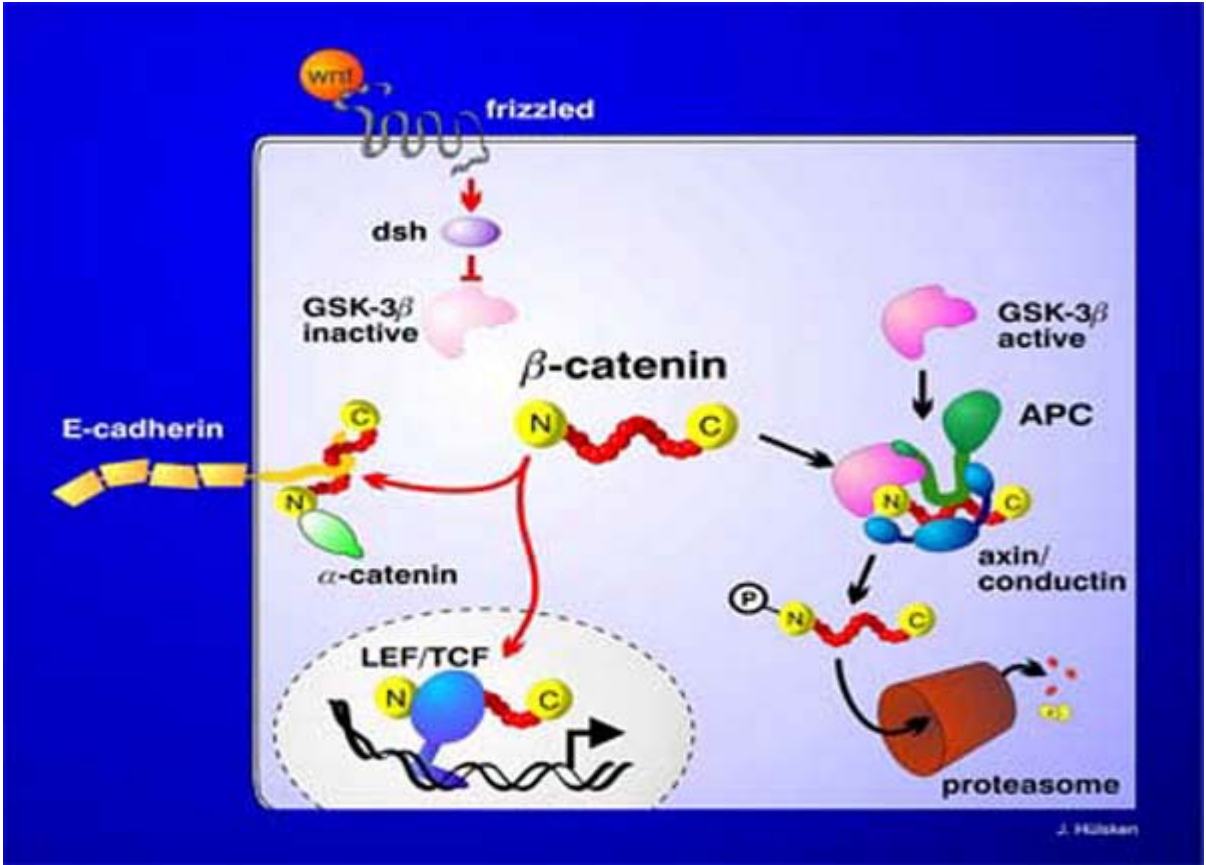
Şekil 2:Wnt - β -katenin standart yolağı

β -katenin Wnt sinyal yolağının bir bileşeni olan stoplazmik bir proteindir. Wnt uyarımı ile β -katenin çekirdekte TCF/LEF proteinleri ile etkileşime girip transkripsiyon aktivatörlerini etkileyerek hedef genlerde aktivasyona neden olur. İntestinal kriptomlar, saç follikülleri ve hematopoetik hücreler gibi farklı dokularda kök hücrelerin kendini yenilemesinde Wnt/ β -katenin yolağının önemli rolü olduğu bulunmuştur. Bu yolağın regülasyonunun bozulması kolon kanseri, melanom, prostat kanseri, hepatoselüler karsinom, endometriyal karsinom, medulloblastom, ve pilomatritksoma tümörögenезis ile ilişkilidir (35).

Epitelyal ve yumuşak doku neoplazmlarında β -kateninin rolü yaygındır. Bireyin yaşamı boyunca hematopoetik kök hücreler proliferasyon ve farklılaşma yolu ile yeniden yapılırlar. β -katenin bu iki etkiyi sahiptir.

E-kaderin Wnt sinyal yolağında yer alır. Hücrelerin birbirine yapışmasında kalsiyuma bağlı olarak görev yapan önemli bir adhezyon molekülüdür (Şekil 3). Epitel hücre yüzeylerinde bulunur. İntraselüler, intramembranöz ve ekstraselüler alanları mevcuttur. Önemli bir tümör süpresör genidir.

E-kaderin (ECAD) geni CDH1 16q22.1 de lokalizedir. ECAD gen kaybı hücresel adezyon kaybına, metastaz gelişimi ve yaşam süresinin kısalmasına neden olur. Bu yolaklardan farklı olarak kemik iliğinde ScF/c –kit sinyal yolağı, Notch sinyal yolağı, HOX sinyal yolağı ve EPO sinyal yolağı yer almaktadır (36-37).



Şekil 3: Wnt -β-katenin- E-kaderin yolağı (www.em2.molmed.uni-erlangen).

3. MATERYAL METOD

Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Bilim Dalı'nda PV ve ET tanısı ile kemik iliği biyopsisi yapılan 25 PV ve 25 ET olgusu yanı sıra 25 kontrol grubu olarak normoselüler kemik iliği biyopsisi çalışmaya dahil edilmiştir.

Olgulara ait parafin bloklar ve preparatlar patoloji arşivinden çıkarıldı. H&E boyalı preparatlar tekrar değerlendirilerek uygun parafin bloklar seçildi. Parafin bloklardan adezivli camlar üzerine immünohistokimyasal boyama yapmak üzere her bir parafin bloktan üçer adet 5 mikron kalınlığında kesit alındı (Leica RM 2155 Rotary). Her olguya ait parafin bloklardan Wnt-1 (Neomarkers. Rabbit poliklonal konsantre), E-kaderin (Neomarkers. Rabbit Monoklonal, kullanıma hazır) ve β -katenin (Neomarkers. Rabbit Monoklonal, kullanıma hazır) çalışmak üzere 3 kesit hazırlandı.

Daha sonraki aşamada deparafinizasyon ve antijen açığa çıkarma (CCL, standart) işlemi dahil tüm boyama basamakları Benchmark XT (Ventana Medicalsystem, Inc, Tuscon, AZ) otomatik immünohistokimya boyama cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. Antijenik boyama işlemi peroxidase-labeled Streptavidin-biotin kiti ve diaminobenzidan kromojen ile yapıldı. Zemin boyası için Mayer's Hematoksilin kullanıldı.

Pozitif kontrol grubu olarak; her üç immünohistokimyasal işaretleyici için meme invaziv duktal karsinom dokusu kullanıldı.

Boyanan preparatlar tek bir gözlemci tarafından değerlendirildi.

İmmünohistokimyasal değerlendirme:

İmmünohistokimyasal değerlendirmede her üç antikor için eritroid, myeloid ve megakaryositik seriye ait 2000 hücre ve bu hücreler içinde en az 20 megakaryosit olmak üzere değerlendirme yapıldı. İmmünohistokimyasal değerlendirmede her bir seri için %10'a kadar olan boyanma negatif, %10 ve üzerinde boyanma pozitif olarak kabul edildi.

İstatistiksel değerlendirme:

Vakaların tümü Wnt-1, Beta -katenin ve E-kaderin antikorları ile ekspresyon özellikleri açısından karşılaştırılarak istatistiksel analize tabi tutuldu. İstatistiksel analizler Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Halk Sağlığı Ana Bilim Dalı'nda yapıldı.

Niteliksel verilerin karşılaştırmasında ‘‘Ki-kare’’ testi kullanıldı. Sayımla elde edilen veriler % olarak ifade edildi.

4. BULGULAR:

Çalışmaya alınan toplam 75 olgunun 25 'i PV (Resim 1), 25 'i ET (Resim 2), 25 'i kontrol grubudur (Resim3). PV olgularının 12'si (%48) kadın, 13' ü (%52) erkek, ET olgularının 16'sı (%64) kadın, 9'u (%36) erkek, kontrol olgularının 15'i (%60) kadın, 10' u (%40) erkektir. PV olgularının yaş dağılımı 29-79 (ortalama 57,48), ET vakalarının yaş dağılımı 23-80 (ortalama 47,92), kontrol grubunun yaş dağılımı 25-72 (ortalama 47,44) olarak bulunmuştur.

İmmünohistokimyasal bulgular:

PV , ET, kontrol grubu olgularında Wnt-1, β -katenin ve E-kaderin ile elde edilen bulgular.Tablo 1'de yer almaktadır.

Tablo:1 ET, PV ve kontrol grubu olgularının serilere göre immünohistokimya sonuçları

Olgular	Wnt-1			E-kaderin			β -katenin		
	eritroid	myeloid	megakaryositer	eritroid					
PV n=25									
<%10	25	25	24	19	25	24	25	25	25
>%10	0	0	1	6	0	1	0	0	0
ET n=25									
<%10	25	25	19	13	25	25	25	25	25
>%10	0	0	6	12	0	0	0	0	0
Kontrol n=25									
<%10	25	25	23	24	25	25	25	25	25
>%10	0	0	2	1	0	0	0	0	0

Wnt ile PV olgularının 1 tanesinde megakaryositik seride boyanma gözlenmiştir. Myeloid ve eritroid seride pozitif sonuç saptanmamıştır. Sonuçlar Tablo 2'de belirtilmiştir.

Tablo:2 PV olgularının Wnt ile boyanma sonuçları

Olgu	Eritroid	Myeloid	Megakaryosit
PV	0(%0)	0(%0)	1(%4)

E-kaderin ile PV olgularının 6 tanesinde eritroid seride, 1 tanesinde megakaryositik seride pozitif sonuç elde edilmiştir. Myeloid seride pozitif sonuç saptanmamıştır. Sonuçlar Tablo 3'te verilmiştir.

Tablo:3 PV olgularının E-kaderin ile boyanma sonuçları

Olgu	Eritroid	Myeloid	Megakaryosit
PV	6(%24)	0(%0)	1(%4)

β -katenin ile PV olgularında pozitif sonuç elde edilmemiştir. Tablo 4'te verilmiştir.

Tablo:4 PV olgularının β -katenin ile boyanma sonuçları

Olgu	Eritroid	Myeloid	Megakaryosit
PV	0(%0)	0(%0)	0(%0)

Wnt ile ET olgularının 6 tanesinde megakaryositik seride pozitif sonuç elde edilmiştir (Resim5). Eritroid ve myeloid seride pozitif sonuç saptanmamıştır. Sonuçlar Tablo 5'te verilmiştir.

Tablo:5 ET olgularının Wnt ile boyanma sonuçları

Olgu	Eritroid	Myeloid	Megakaryosit
PV	0(%0)	0(%0)	6(%24)

E-kaderin ile ET olgularının 12 tanesinde eritroid seride (Resim 6) pozitif sonuç elde edilmiştir. Myeloid ve megakaryositik seride pozitif sonuç saptanmamıştır. Sonuçlar Tablo 6'da verilmiştir.

Tablo:6 ET olgularının E-kaderin ile boyanma sonuçları

Olgu	Eritroid	Myeloid	Megakaryosit
PV	12(%48)	0(%0)	0(%0)

β -katenin ile ET olgularında pozitif sonuç saptanmamıştır. Sonuçlar Tablo 7'de verilmiştir.

Tablo:7 ET olgularının β -katenin ile boyanma sonuçları

Olgu	Eritroid	Myeloid	Megakaryosit
PV	0(%0)	0(%0)	0(%0)

Wnt ile kontrol grubu olgularının 2 tanesinde megakaryositik seride pozitif sonuç elde edilmiştir. Eritroid ve myeloid seride pozitif sonuç saptanmamıştır. Sonuçlar Tablo 8'de verilmiştir.

Tablo:8 Kontrol olgularının Wnt ile boyanma sonuçları

Olgu	Eritroid	Myeloid	Megakaryosit
PV	0(%0)	0(%0)	2(%8)

E-kaderin ile kontrol grubu olgularının 1 tanesinde eritroid seride pozitif sonuç elde edilmiştir. Megakaryositik ve myeloid seride pozitif sonuç saptanmamıştır. Sonuçlar Tablo 9'da verilmiştir.

Tablo:9 Kontrol olgularının E-kaderin ile boyanma sonuçları

Olgu	Eritroid	Myeloid	Megakaryosit
PV	1(%4)	0(%0)	0(%0)

β -katenin ile kontrol grubu olgularında pozitif sonuç saptanmamıştır. Sonuçlar Tablo 10'da verilmiştir.

Tablo:10 Kontrol olgularının β -katenin ile boyanma sonuçları

Olgu	Eritroid	Myeloid	Megakaryosit
PV	0(%0)	0(%0)	0(%0)

Karşılaştırma sonuçları:

ET ,PV ve kontrol grubu olgularının β -katenin ile immünohistokimyasal ekspresyon sonuçlarının birbiri ile karşılaştırılmasında anlamlı sonuç elde edilmemiştir ($p<0,05$). Ancak ET, PV ve kontrol grubu Wnt-1 ile immünohistokimyasal ekspresyon sonuçlarının birbiri ile karşılaştırılmasında megakaryositik seride ET olgularında %24 oranında pozitif, PV olgularında %4 oranında pozitif, kontrol grubunda % 8 pozitif sonuç elde edilmiştir. ET olgularında megakaryositik seride Wnt-1 ekspresyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p<0,05$). (Tablo11)

Tablo:11 ET, PV ve kontrol grubu olgularının Wnt-1 ile boyanma sonuçları

Olgu	Eritroid	Myeloid	Megakaryosit
ET	0(%0)	0(%0)	6(%24)
PV	0(%0)	0(%0)	1(%4)
Kontrol	0(%0)	0(%0)	2(%8)

E-kaderin ile immünohistokimyasal ekspresyon sonuçlarının birbiri ile karşılaştırılmasında eritroid seride ET olgularında %48 oranında pozitif, PV olgularında %24 oranında pozitif, kontrol grubu olgularında % 4 pozitif sonuç elde edilmiştir. ET olgularında eritroid seride E-kaderin ekspresyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p<0,05$) (Tablo 12).

Tablo:12 ET, PV ve kontrol grubu E-kaderin ile boyanma sonuçları

Olgu	Eritroid	Myeloid	Megakaryosit
PV	6(%24)	0(%0)	0(%0)
ET	12(%48)	0(%0)	0(%0)
Kontrol	1(%4)	0(%0)	0(%0)

PV olgularında E-kaderin ile megakaryositer seride %4 oranında pozitif sonuç elde edilmiştir. Eritroid ve myeloid seride pozitif sonuç elde edilmemiştir. istatistiksel olarak

anlamli fark bulunmamıştır ($p>0,05$). PV, ET ve kontrol grubu olgularında B-katenin ile pozitif sonuç elde edilmediğinden istatistiksel değerlendirme yapılmamıştır. ET, PV ve kontrol grubu olgularının kendi içlerinde de eritroid ,myeloid ve megakaryositik serilerde Wnt-1, E-kaderin ve β -katenin ile boyanmaları arasında PV olgularında E-kaderin ile yalnız eritroid seride %24 oranında pozitif sonuç elde edilmiştir. İstatistiksel olarak anlamlı fark elde edilmiştir, ($p<0,05$), (Tablo 13). PV olgularında megakaryositer seride Wnt-1 ile %4, E-kaderin ile %4 oranında pozitif sonuç elde edilmemiştir. İstatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır ($p>0,05$).

Tablo:13 PV olgularının eritroid seride Wnt-1, E-kaderin ve β -katenin ile boyanma sonuçları

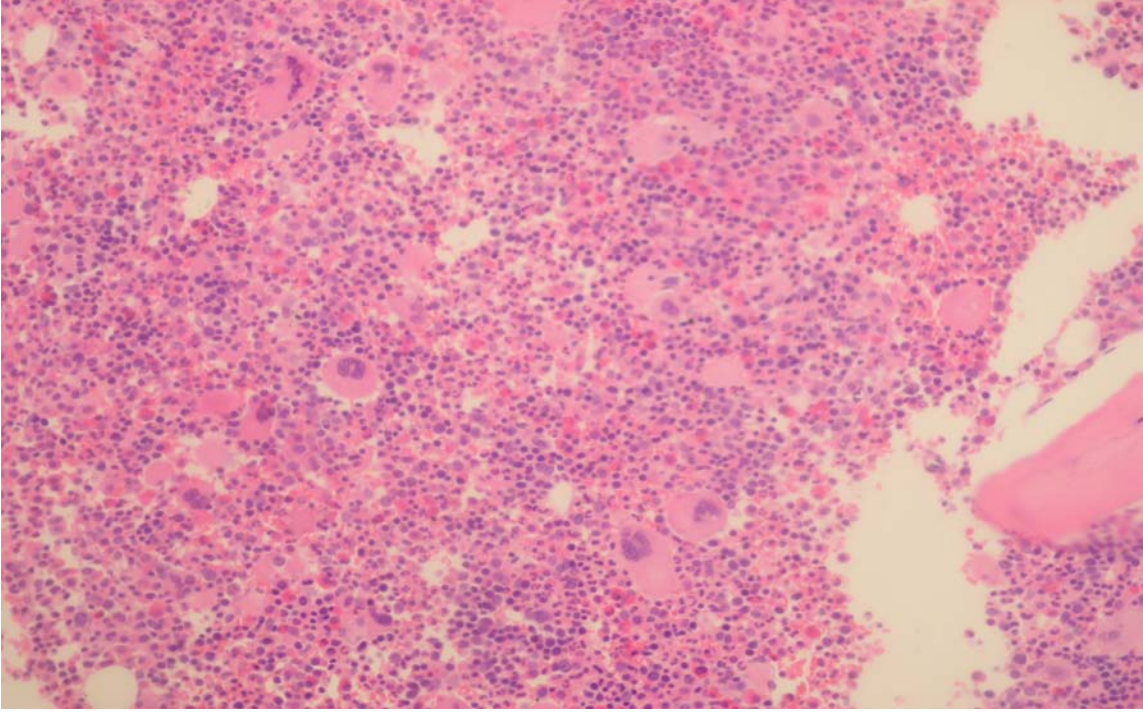
Seri	Wnt-1	E-kaderin	β -katenin
Eritroid	0(%0)	6 (%24)	0(%0)

ET olgularında Wnt-1 ile megakaryositik seride %24 oranında pozitif sonuç elde edilmiştir. İstatistiksel olarak anlamlı fark mevcuttur ($p<0,05$), (Tablo 14). ET olgularında E-kaderin ile %48 oranında pozitif sonuç elde edilmiştir. İstatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır. ($p>0,05$).

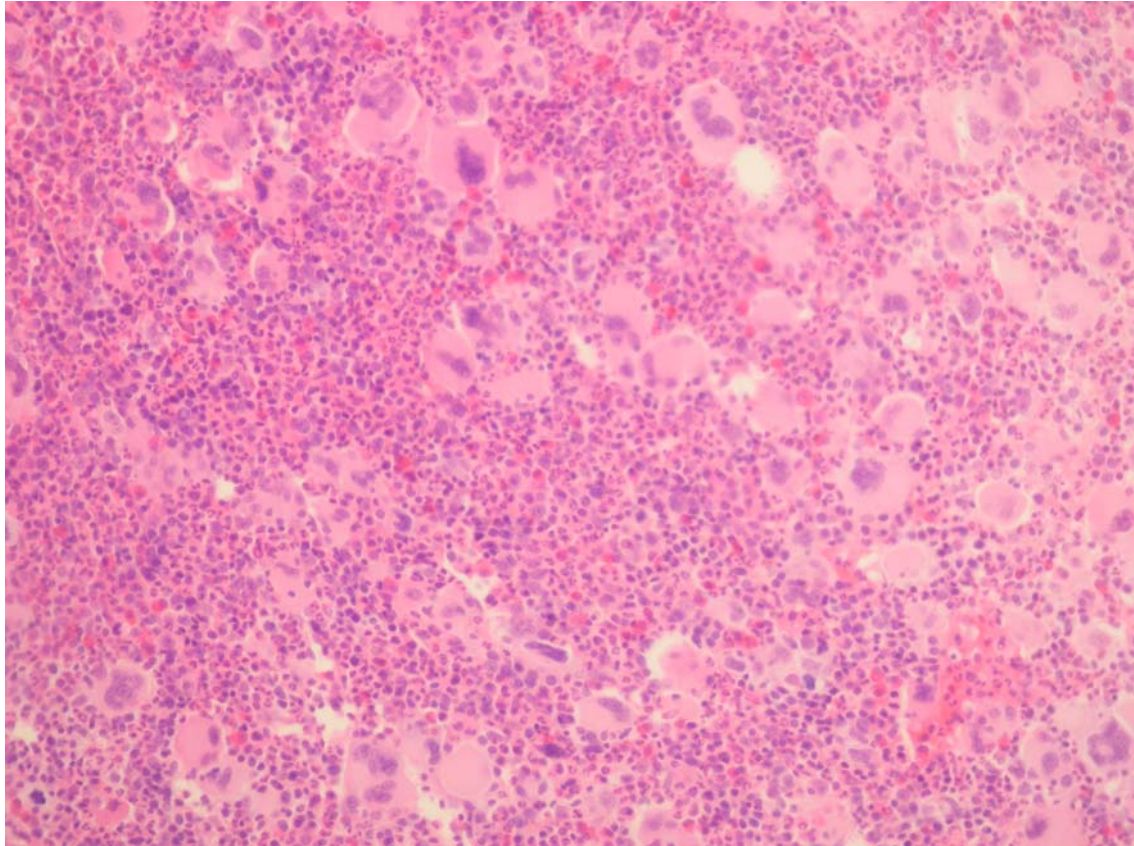
Tablo:14 ET olgularının megakaryositik seride Wnt-1, E-kaderin ve β -katenin ile boyanma sonuçları

Seri	Wnt-1	E-kaderin	β -katenin
Megakaryosit	6(%24)	0(%0)	0(%0)

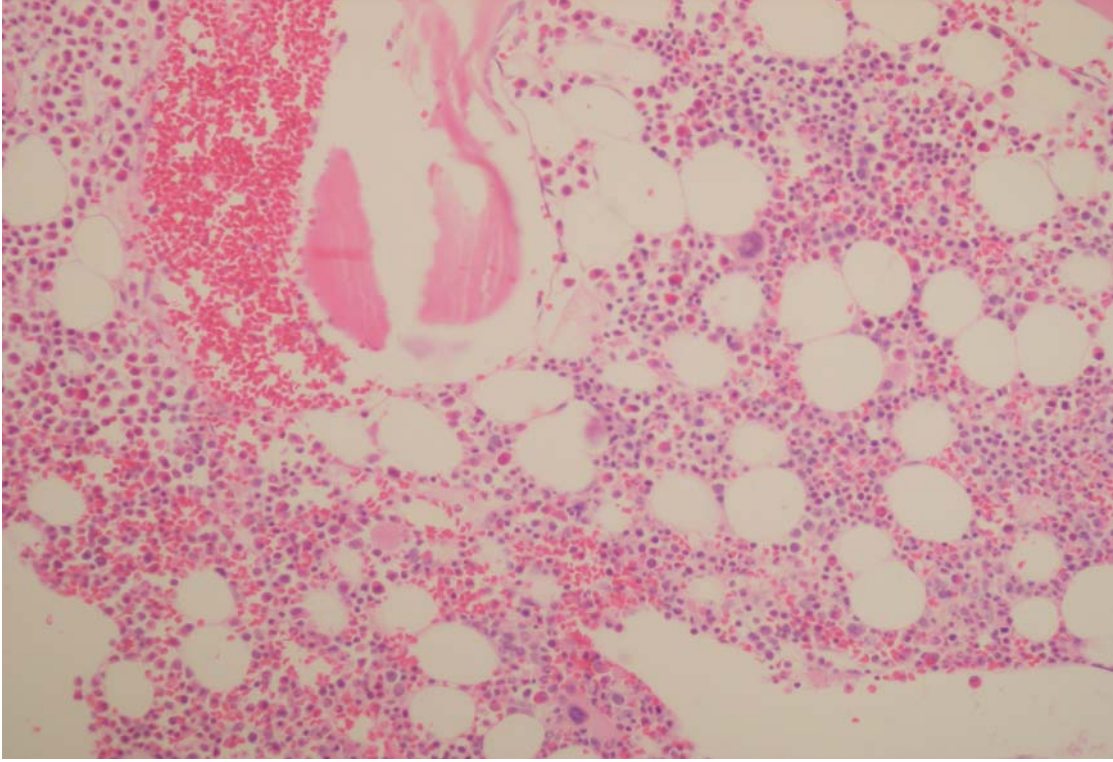
Kontrol grubu olgularında eritroid seride E-kaderin ile %4 oranında pozitif sonuç elde edilmiştir. İstatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır ($p>0,05$).



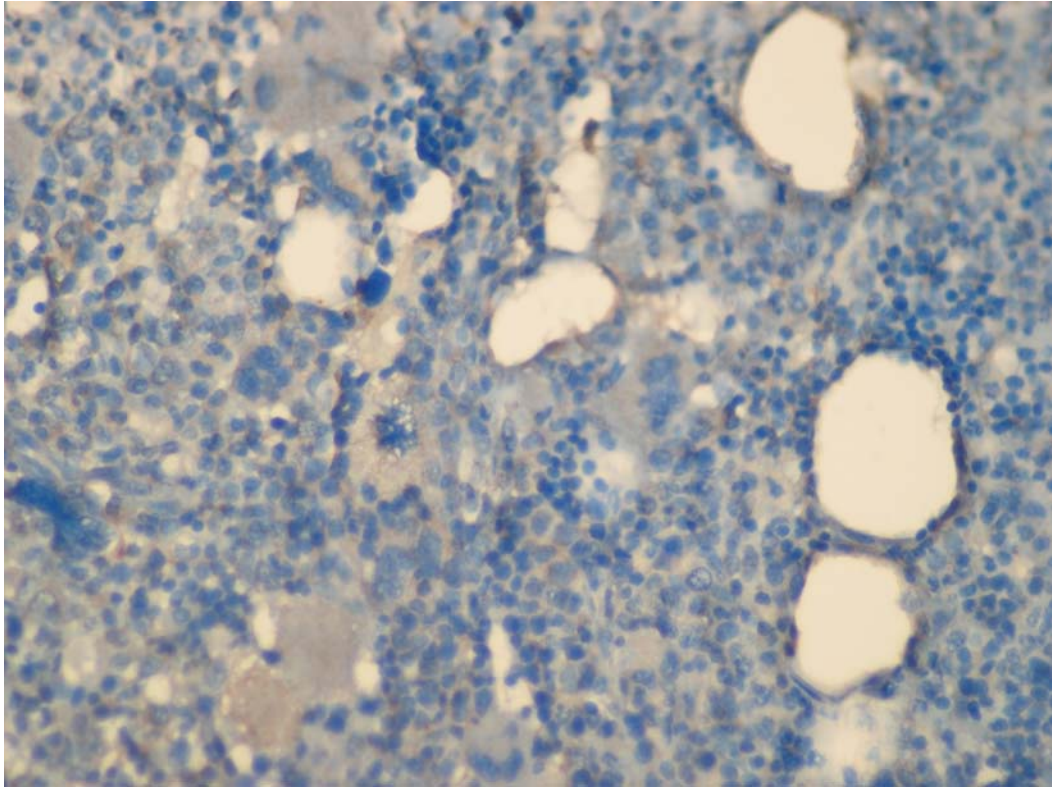
Resim 1. PV olgusunda megakaryopoez ile birlikte hiperselüler görünüm (HE X100)



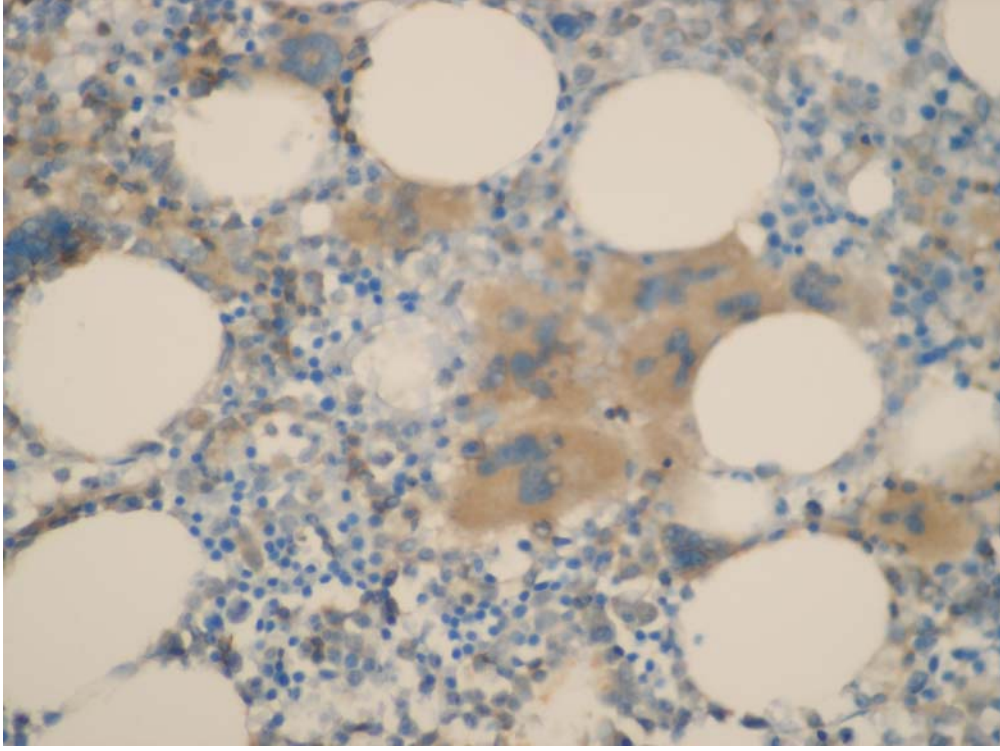
Resim 2. ET olgusunda hiperlobüle görünümde, belirgin artış gösteren megakaryositler ve hiperselüler kemik iliği (HE X100)



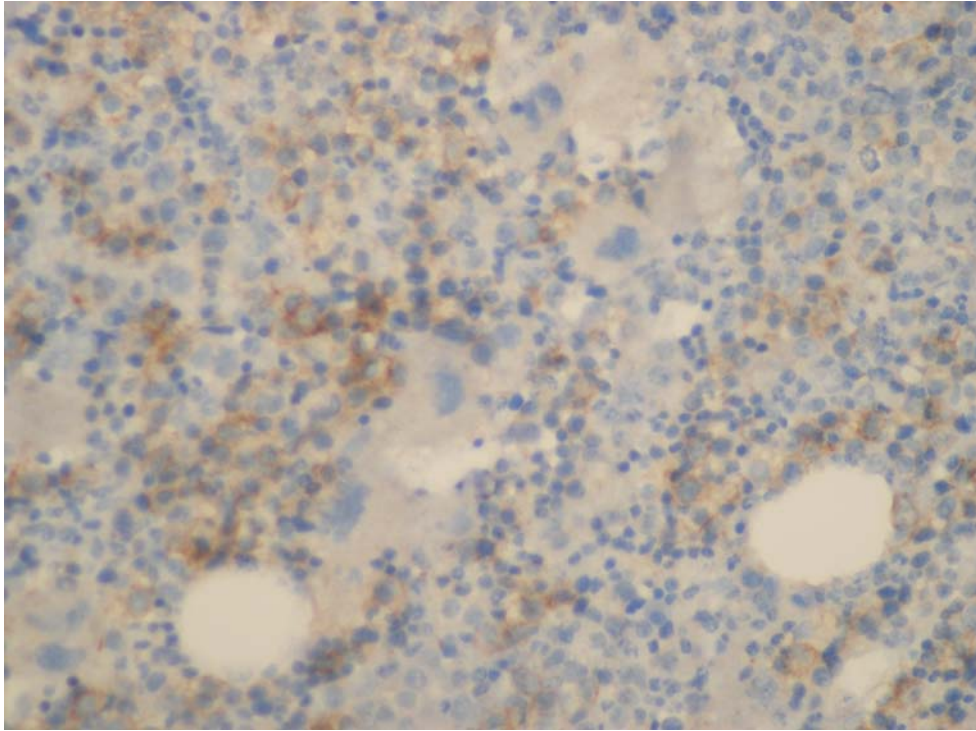
Resim3. Kontrol grubu normoselüler kemik iliği (H.E X100)



Resim 4. PV olgusunda megakaryositlerde stoplazmik Wnt-1 pozitifliği (IHKX200)



Resim 5. ET olgusunda Wnt-1 ile megakaryositlerde stoplazmik pozitiflik (İHKX200)



Resim 6. ET olgusunda eritroid seride E-kaderin ile membranöz pozitif boyanma(İHKX200)

5. TARTIŞMA

2008 Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) sınıflamasına göre myeloproliferatif neoplazmlar (MPN) 7 gruba ayrılmaktadır. PV ve ET bu sınıflama içinde yer alan 2 ayrı hastalık grubunu oluşturmaktadır. PV, normal eritropoez mekanizmalarından bağımsız olarak artan ,aşırı kırmızı kan hücresi ile karakterli bir hastalık olup kemik iliğinde her üç seri artışı dikkat çekmektedir. ET tablosunda trombositlerde artış ön planda olmakla birlikte kemik iliğinde megakaryosit artışı ön plandadır. Her iki hastalık grubunda JAK-2 mutasyonunun tanısız önem taşıdığı bilinmektedir. Ancak JAK-2 mutasyonu PV ve ET arasında ayırıcı tanıya gitmek için yardımcı değildir. Her iki hastalığın hematopoetik kök hücreden köken aldığı bilinmektedir (1).

Hematopoetik kök hücrenin yenilenmesi ve diferansiasyonu aşamalarında farklı yollar rol almaktadır. Bu yollar içinde Wnt, SF/c-kit, Notch, HOX, EPO-induced sinyal yollar yer almaktadır (2). **Wnt** sinyal yolunun hematopoetik sistem üzerindeki etkileri kısmen biliniyor olmasına rağmen literatürde myeloproliferatif neoplazilerde kemik iliğinde bu yolağın değerlendirilmesine yönelik fazla çalışma yapılmamıştır.

Wnt sinyal yolağının ET ve PV patogenezinde rolü ve bu iki hastalığın ayırıcı tanısında yardımcı olup olamayacağının araştırılması amacıyla yaptığımız bu çalışmada ET –ve PV olgularında kemik iliğinde **Wnt** sinyal yolağında rol alan **Wnt-1**, **β -katenin** ve **E-kaderinin** ekspresyonları incelenmiştir. Her üç seri (eritroid, myeloid, megakaryositik) dikkate alınarak yapılan değerlendirmede **Wnt-1** ile PV olgularında megakaryositik seride %4 oranında, ET olgularında %24 oranında, kontrol grubunda %8 oranında pozitif sonuç elde edilmiştir. Bu sonuçlar ile gruplar arasında değerlendirme yapıldığında ET olgularında megakaryositik seride anlamlı bir farklılık görülmüştür ve Wnt-1'in ET olgularında megakaryositopoezde rolü olduğu sonucuna varılmıştır. Literatürde myeloproliferatif neoplazilerde Wnt ekspresyonunun değerlendirildiği çalışma mevcut olmamakla birlikte Wnt yolağının hematopoez ve bazı non hematolojik tümör grubunda önemini vurgulayan çalışmalar mevcuttur. Carlene. ve ark., çalışmalarında **Wnt** proteinlerinin hematopoetik hücre üzerine etkilerini incelemişler ve kültür ortamında (civciv ve bıldırcın embriyosu) yaptıkları çalışmada uygun şartlar sağlandığında kemik iliğinde normal hematopoez (eritrosit, monosit, makrofaj ve trombosit) gerçekleştiğini saptamışlardır (38). Van Den Berg DJ. ve ark. yaptığı çalışmada hematopoezde **Wnt** gen

ailesinin rolünü araştırmışlar ve her **Wnt** reseptörünün farklı bir **Wnt** proteini ile bağlanarak etki oluşturduklarını rapor etmişlerdir (35). Toshiyuki Y. ve ark., yaptığı çalışmada ise **Wnt** proteinlerinin hedefinin stromal proteinler olduğu vurgulanmıştır. Ayrıca **Wnt** dışında sinyal düzenlenmesinde **β - kateninin** etkili olduğunu bildirmişlerdir (40). Hematoloji dışı olgu gruplarında yapılan çalışmalarda; **Wnt** yolak proteinlerinin memenin filloides tümörü patogenezinde yer aldığı, filloides tümörde stromal nükleer **β - katenin** akümülyasyonunda artışın olduğu, yolakların erken tümör gelişimi ve ilerleyişinde yer aldığı belirtilmiştir. Epitelyal membranöz ve stromal nükleer **β - katenin** ,epitelyal sitoplazmik **Wnt-1** ve epitelyal **E-kaderin** ekspresyonu artan tümör derecesi ile artan bir ekspresyon gösterdiğini ama belirgin farklılık göstermediği rapor edilmiştir (41). Maria J.L. ve ark. yaptığı çalışmada kolon tümörlerinde vitamin D reseptör kaybı **Wnt/ β -catenin** yolağında aşırı aktiviteye ve buna bağlı olarak tümörün büyüme ve malignitesinin hızlanmasında rolü olduğunu belirtmişlerdir (42).

β -katenin ile ET, PV ve kontrol grubu olgularında pozitif sonuç saptanmamıştır. Monica P. ve ark. yaptığı çalışmada myeloproliferatif neoplazi patogenezinde **β -katenin** rolünü araştırmışlardır. PV /ET olgularında kronik myeloid lösemi (KML)/ kronik idiyopatik myelofibrozis (KIMF) serilerine göre özellikle megakaryositlerde daha yüksek oranda stoplazmik pozitif sonuç rapor etmişlerdir. Normal kemik iliği kontrol grubunda **β - katenin** ile boyanma saptanmamışlardır. Bu boyanma farklarının megakaryositlerdeki morfolojik farklılıklardan kaynaklandığını belirtmişler ve KML 'de megakaryositlerin küçük ,dismorfik ve hipolobule iken KIMF, PV ve ET'de ise hiperlobule görünüm ile morfolojiye yansıdığını ifade etmişlerdir. Ek olarak **β -katenin** pozitifliğinin PV ve ET'yi reaktif süreçlerden ayırmak açısından da katkı sağlayabileceğini rapor etmişlerdir. Bu sonuca varırken ET ve PV olgularında megakaryositlerde **β -katenin** pozitif iken, kontrol grubunda negatif olması esas alınmıştır. PV ve ET serilerinde **β -katenin** ile megakaryositlerde stoplazmik kuvvetli boyanma olmasına rağmen nükleer boyanma gözlenmemiştir. Nükleer boyanmanın **β -katenin** ve dolayısıyla **Wnt** sinyal yolağının aktive olduğunu ortaya koyacak daha güvenilir bir bulgu olduğunu belirtmişlerdir (43). Serinsöz ve ark. yaptığı çalışmada, Philadelphia kromozomu (-) kronik myeloproliferatif hastalıklarda megakaryositlerde **β -katenin** stoplazmik orta/şiddetli boyanma gösterdiğini saptamışlardır (44). Çalışmamızda literatür verilerinin aksine PV, ET ve kontrol grubunda vakaların tamamında negatif sonuç elde edilmiştir. Bu farklılığa neden olacak sebepler

olarak çalışmamızda kullanılan primer antikör klonunun literatürde kullanılan klondan farklı olması ve kemik iliği dekalsifikasyonu için kullandığımız kimyasal ajanların antikör duyarlılığını azaltmış olabileceği düşünülmüştür. Ancak eksternal kontrol olarak kullandığımız meme kanseri dokusunda gözlenen pozitiflik dikkate alınırsa **β-katenin** ekspresyonunun gerçekten mevcut olmadığı sonucu da ortaya çıkabilmektedir. Ayrıca olgu sayılarının artırılması ve farklı antikör klonlarının kullanılması ile yapılacak çalışmalar bu konuda katkı sağlayıcı olacaktır.

Monica C. ve ark. **β-katenin** eksikliğin lenfopoez ve hematopozdaki rolünü araştırmak için yaptıkları çalışmada T ve B hücre gelişiminin normal olduğunu, bunun yanı sıra hematopozda **β-katenin** eksikliğin önemsiz olduğunu belirtmişler ancak Wnt sinyal yolağının hematopoetik sistemde tedavi ile ilişkili süreçlerde ele alınmasının gerekli olabileceği yorumuna yer vermişlerdir (45). Non-hematolojik vaka gruplarında yapılan çalışmalarda **β-katenin** ile nükleer ve/veya stoplazmik boyanmalar rapor edilmektedir. Rakheja D. ve ark. yaptığı çalışmada soliter fibröz tümörlerin %33'ü Beta-katenin ile nükleer boyanma ,kalanların ise stoplazmik boyanma gösterdiğini saptamışlar (46).Settakorn J. ve ark. 31 intrahepatik kolanjiokarsinomlu vakanın **β-katenin** ile çoğunun granüler stoplazmik, bir kısmının membranöz, bir kısmının ise nükleer boyanma gösterdiğini saptamışlardır (47). Myeloproliferatif hastalıklara yönelik çalışmalarda ise stoplazmik boyanma rapor edilmektedir (43,44).

Çalışmamızda PV olgularında **E-kaderin** ile megakaryositik seride %4, eritroid seride %24 oranında pozitif sonuç saptanmışken, myeloid seride boyanma saptanmamıştır. ET olgularında eritroid seride %48 oranında pozitiflik saptanırken, megakaryositik ve myeloid seride pozitiflik saptanmamıştır. Kontrol grubunda eritroid seride %4 oranında pozitif sonuç saptanırken megakaryositik ve myeloid seride pozitiflik saptanmamıştır. **Bu sonuçlar ile** gruplar arasında değerlendirme yapıldığında ET olgularında eritroid seride anlamlı bir farklılık görülmüştür ve E-kaderin'in ET olgularında eritropoezde rolü olduğu sonucuna varılmıştır. Literatürde myeloproliferatif neoplazilerde E-kaderin ile yapılan çalışma bulunmamakla birlikte lösemi vakalarını kapsayan çalışmalarda E-kaderin ekspresyonunda azalma ile lösemik hücrelerin büyüme ve transformasyonunda artış olduğu bildirilmektedir (48). Zhonghua X. ve ark. yaptığı çalışmada E-kaderinin lösemik hücrelerde kaybının β-kateninin hedef genlerde nükleer transkripsiyon ve translokasyon aktivasyonuna neden olduğunu göstermişlerdir (49).

6. SONUÇLAR

1. ET olgularında megakaryositik seride Wnt-1 ekspresyonunda anlamlı artış saptandı ve Wnt-1'in ET olgularında megakaryositopoezde rolü olabileceği sonucuna varılmıştır.
2. ET olgularında eritroid seride E-kaderin ekspresyonunda anlamlı artış saptandı ve E-kaderin'in ET olgularında eritropoez ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür.
3. Olgular kendi içlerinde her üç seri üzerinden değerlendirildiğinde PV olgularında E-kaderin ekspresyonunda artış eritroid seride ve ET olgularında megakaryositik seride Wnt-1 ekspresyonunda artış görüldü.
4. Literatürün tersine çalışmaya dahil edilen olgularda β -katenin ekspresyonu saptanmadı. Buna neden olarak primer antikor klonunun farklı olması ve kemik iliği dekalsifikasyonu için kullandığımız kimyasal ajanların antikor duyarlılığını azaltmış olabileceği düşünüldü.
5. Myeloproliferatif neoplazilerde Wnt sinyal yolağı sınırlı sayıda çalışma ile değerlendirilmiştir. Daha geniş vaka popülasyonu ile çalışmanın tekrarı ve Wnt yolağında yer alan diğer faktörlerin de araştırılması uygun olacaktır.

7. ÖZET

Polistemia Vera (PV) ve Esansiyel Trombositoz (ET), hematopoetik kök hücreden köken alan myeloproliferatif neoplazilerdir. Hematopoetik kök hücrenin yenilenmesi ve diferansiasyonu aşamalarında farklı yollar rol almaktadır. Bu yollardan bir tanesi Wnt sinyal yolağıdır. **Wnt** sinyal yolağının hematopoetik sistem üzerindeki etkileri kısmen biliniyor olmasına rağmen literatürde myeloproliferatif neoplazilerde kemik iliğinde bu yolağın değerlendirilmesine yönelik fazla çalışma yapılmamıştır. Çalışmamızda hematopoetik kök hücre kökenli PV ve ET tablosunda Wnt sinyal yolunda (Wnt-1, β -katenin, E-kaderin) normal kemik iliği dokusuna kıyasla değişiklik olup olmadığı ve patogenezdaki olası rolünün araştırılması amaçlanmıştır.

PV ve ET tanısı ile kemik iliği biyopsisi yapılan 25 PV ve 25 ET vakası yanı sıra 25 kontrol grubu olarak normoselüler kemik iliği biyopsisi çalışmaya dahil edilmiştir. Olgulara ait kemik iliği biyopsilerinde eritroid, myeloid ve megakaryositik seriye ait hücrelerde Wnt-1, β -katenin ve E-kaderin ekspresyonu immünohistokimyasal yöntemle değerlendirilmiştir. Her bir seri için %10 'a kadar olan boyanma negatif, %10 ve üzerinde boyanma pozitif olarak kabul edilmiştir. ET olgularında megakaryositik seride Wnt-1 ekspresyonunda ve eritroid seride E-kaderin ekspresyonunda anlamlı artış saptandı. Olgular kendi içlerinde her üç seri üzerinden değerlendirildiğinde PV olgularında E-kaderin ile eritroid seride E-kaderin ekspresyonunda artış ve ET olgularında megakaryositik seride Wnt-1 ekspresyonunda artış görüldü. Olgularda β -katenin ekspresyonu saptanmadı.

Sonuç olarak Wnt-1'in ET olgularında megakaryositopoezde ve E-kaderin'in ET olgularında eritropoez ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür. Ancak daha geniş myeloproliferatif neoplazi serileri ile çalışmanın tekrarı ve Wnt yolağında yer alan diğer faktörlerin değerlendirildiği başka çalışmalarında yapılması yararlı olacaktır.

8. SUMMARY

Polycythemia vera (PV) and essential thrombocytosis (ET) are myeloproliferative neoplasms that are derived from hematopoietic stem cells. Different pathways are involved in hematopoietic stem cell renewal and differentiation stages. The Wnt signaling pathway is one of these pathways. Although the effects of Wnt signaling pathway in the hematopoietic system is partially known, few studies have been performed for the evaluation of this pathway in bone marrow. In our study, Wnt signal pathway (Wnt-1, β -catenin, E-cadherin) is compared between hematopoietic stem cell-derived PV,ET, and normal bone marrow tissue to investigate a possible role in the pathogenesis

In this study, 25 PV, 25 ET cases and 25 normocellular bone marrow biopsy as control group were included. Wnt-1, β -catenin and E-cadherin expression was evaluated in the erythroid, myeloid cells and megakaryocytes by immunohistochemical method. Up to 10% of each series staining was considered negative, and over 10% of staining was considered positive.

Wnt-1 expression in megakaryocytes and E-cadherin expression in erythroid series of patients with ET was significantly increased. The cases themselves are evaluated over each of the three series of patients. Increased E-cadherin expression in the erythroid series was noted in cases with PV and increased Wnt-1 expression in megakaryocytes was noted in cases with ET. No β -catenin expression was detected in our cases.

In conclusion, these results indicate that Wnt-1 may be associated with megakaryopoiesis in ET and E-cadherin with erythropoiesis in patients with ET. However, studies with larger patient population and evaluating other factors in the Wnt pathway for myeloproliferative neoplasms would be appropriate.

9. KAYNAKLAR

1. Steve H, Swerdlow, Elias C, Nancy Lee H, Stefano P, Harald S, Jürgen T, James V. WHO Classification of tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues.;40-53, 2008.
2. Tsiftoglou AS, Bonovolias ID, Tsiftoglou SA. Multilevel targeting of hematopoietic stem cell self-renewal, differentiation and apoptosis for leukemia therapy pharmacology and Therapeutics. Jun;122:264-80, 2009.
3. Sunitha N W, Jeffrey MC: Blood Bone Marrow Pathology. First published. 2003; 24-63
4. Bloom W, Bartelmez GW: Hemopoiesis in young human embryos. American Journal of Anatomy. 67:21-44, 1940.
5. Gilmour JR : Normal haemopoiesis in intrauterine and neonatal life. Journal of Pathology and Bacteriology. 52:25-55, 1941.
6. Reuss-Borst MA, Bühring H J, Klein G, Müller CA et al: Adhesion molecules on CD34+ hematopoietic cells in normal human bone marrow and leukemia. Annals of Hematology .65: 169-174, 1992.
7. Duda ,SH, Laniado M, Schick F et al : Normal bone marrow in the sacrum of young adults; differences between the sexes seen on chemical –shift MR imaging. American Journal of Roentgenology. 164: 935-940, 1995.
8. Ahr A, Scharl A, Mülfer M, Gunter von M et al: Cross-reactive staining of normal bone-marrow cells by monoclonal antibody 2E11. International Journal of Cancer . 84 :502-505, 1999.
9. Thiele J, Meuter RB, Titus RB, Zankovich R, Fischer R: Article first published online, histoatology. 22: 429-35. 1993.

10. Kurrasey RH, Rutherford AV, Rick ME et al: Characterization of a monoclonal antibody, OVB1, which binds to a unique determinant in human ovarian carcinomas and myeloid cells. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry : Official Journal of the Histochemistry Society* . 37(1):57-67,1989.
11. Thile J, Wagner S, Dienemann D et al. Megacaryocyte precursors (promegacaryoblasts and Megacaryoblast) in the normal human bone marrow. An immunohistochemical and morphometric study on routinely processed trephine biopsies. *Analytical and Quantitative Cytology and Histology* .12(4):285-289,1990.
12. Wickramasinghe SN : Human bone marrow. Blackwell Scientific Publications, Oxford, .1-5 1975.
13. Babyn PS, Ranson M, McCarville ME: Normal bone marrow signal characteristics and fatty conversion. *Magnetic Resonance Imaging Clinics Of North America*. 6 (3) : 473-495,1998.
14. Schmitt-Gräff A, Skalli O, Gabbiani G: Alpha-smooth muscle actin is expressed in a subset of bone marrow stromal cells in normal and pathological conditions. *Virchows Archives B Cell pathology including molecular patholog.* 57(5) : 291-302, 1989.
15. 26-15- Tao M, Li B, Nayini J et al: SCF ,IL-beta, IL-Ira and GM-CSF in the bone marrow and serum of normal individuals and AML and CML patients. *Cytokine* 12(6): 699-707,2000.
16. Marchioli R, Finazzi G, Landolfi R, et al: Vascular and neoplastic risk in a large cohort of patients with polycythemia vera. *J Clin Oncol*. 23:2224-2232,2005.
17. Caldwell GG, Kelley DB, Heath CW, Jr., Zach M: Polycythemia vera among participants of a nuclear weapons test. *JAMA*. 252:662-664.1984.

18. Brière JB: Budd-Chiari syndrome and portal vein thrombosis associated with myeloproliferative disorders: diagnosis and management. *Semin Thromb Hemost.* 32:208-218,2006.
19. Jantunen R, Juvonen E, Ikkala E, et al: Development of erythrocytosis in the course of essential thrombocythemia. *Ann Hematol.* 78:219-222,1999.
20. Shih LY, Lee CT: Identification of Masked Polycythemia Vera From Patients With Idiopathic Marked Thrombocytosis by Endogenous Erythroid Colony Assay. *Blood.* 83:744–748,1994.
21. Ellis JT, Peterson P, Geller SA, Rappaport H : Studies of the bone marrow in polycythemia vera and the evolution of myelofibrosis and second hematologic malignancies. *Semin Hematol .* 23:144-155,1986.
22. Georgii A, Buesche G, Kreft A: The histopathology of chronic myeloproliferative diseases. *Baillière's Clin Haematol.* 11:721-749,1998.
23. Murphy S: Diagnostic criteria and prognosis in polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Semin Hematol.* 36:9-13,1999.
24. Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, Teo SS, et al: "A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders". *N Engl J Med* 352 (17): 1779–90,2005.
25. 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.* 7 (4): 387–97,2005.
26. Ding J, Komatsu H, Wakita A, et al: Familial essential thrombocythemia associated with dominant-positive activating mutation of the c-MPL gene, which encodes for the receptor for thrombopoietin. *Blood.* 103:4198-4200,2004.
27. Gisslinger H: Update on diagnosis and management of essential thrombocythemia. *Semin Thromb Hemost .* 32:430-436,2006.

28. Murphy S, Peterson P, Iland H, Laszlo J: Experience of the Polycythemia Vera Study Group with essential thrombocythemia: a final report on diagnostic criteria, survival, and leukemic transition by treatment. *Semin Hematol.* 34:29-39,1997.
29. Gianelli U, Vener C, Raviele PR, Moro A, Savi F, Annaloro C, Somalvico F, Radaelli F, Franco V, Delilieri GL : Essential thrombocythemia or chronic idiopathic myelofibrosis? A single-center study based on hematopoietic bone marrow histology. *Leuk Lymphoma .* 47:1774-1781,2006.
30. Thiele J, Kvasnicka HM : Clinicopathological criteria for differential diagnosis of thrombocythemias in various myeloproliferative disorders. *Semin Thromb Hemost.* 32:219–230,2006.
31. Radaelli F, Mazza R, Curioni E, et al: Acute megakaryocytic leukemia in essential thrombocythemia: an unusual evolution?. *Eur J Haematol .* 69:108-111,2002.
32. Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, Teo SS, Tiedt R, Passweg JR et al: "A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders.". *N Engl J Med.* 352 (17): 1779- 90,2005.
33. Dale T: Signal transduction by the Wnt family of ligands. *Biochemical Journal.* 329:209-215,1998.
34. Austin T, Solar G, Ziegler V, et al: A role for the Wnt gene family in hematopoiesis: expansion of multilineage progenitor cells. *Blood .* 89:3624-3631,1997.
35. Van Den Berg D, Sharma A, Bruno E, Hoffman : Role of members of the Wnt gene family in human hematopoiesis. *Blood .* 92:3189-3197,1997.
36. Brandon C, Eisenberg LM, Eisenberg ca: WNT signaling modulates the diversification of hematopoietic cells. *Blood.* 96:4132-4141, 2000.

37. Domen J, Weissman IL: Hematopoietic stem cells need two signals to prevent apoptosis: BCL-2 can provide one of these, Kit/c-Kit signaling the other. *J Exp Med.* 192:1707-18, 2000.
38. Gumbiner BM: Cell adhesion: The molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell* . 84:345-357, 1996.
39. Carlene B, Leonard M.E, Carol A.E: Wnt signaling modulates the diversification of hematopoietic cells; *Blood.* 15;96(13):4132-41 2000.
40. Yamane T, Kunisada T, Tsukamoto H, Yamazaki H, Niwa H, Takada S, Hayashi SI: Wnt signaling regulates hemopoiesis through stromal cells. *J Immunol.* 15;167(2):765-72 2001.
41. Karim RZ, Gerega SK, Yang YH, Horvath L, Spillane A, Carmalt H, Scolyer RA, Lee CS: Proteins from the Wnt pathway are involved in the pathogenesis and progression of mammary phyllodes tumours. *J Clin Pathol.* ;62(11):1016-20 2009.
42. Larriba MJ, Ordóñez-Morán P, Chicote I, Martín-Fernández G, Puig I, Muñoz A, Palmer HG: Vitamin D receptor deficiency enhances Wnt/ β -catenin signaling and tumor burden in colon cancer. *Plos One.*;6(8):e23524. 2011.
43. Jauregui MP, Sanchez SR, Ewton AA, Rice L, Perkins SL, Dunphy CH, Chang CC.: The role of beta-catenin in chronic myeloproliferative disorders. *Hum Pathol.* 39(10):1454-8 2008.
44. Serisöz E, Neusch M, Buesche G, Wasielewski R, Kreipe H, Bock O: Aberrant expression of β -catenin discriminates acute myeloid leukaemia from acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol.* 126:13-9, 2004.
45. Monica C, Anne W, Bettina E, Stéphane J.C. M,¹ H. Robson M, Rolf K, and Freddy R . Beta-catenin is dispensable for hematopoiesis and lymphopoiesis: *19;199(2):221-9.* 2004.

46. Raakheja D, Molberg KH, Roberts CA, Jaiswal VR: Immunohistochemical expression of beta-catenin in solitary fibrous tumors. *Arch Pathol Lab Med* ;129:776-9 2005.
47. Settakorn J, Kaewpila N, Burns GF, Leong AS: FAT, E-cadherin, beta-catenin, HER2/ neu, Ki 67 immuno-expression, and histological grade in intrahepatic cholangiocarcinoma. *J Clin Pathol*;58:1249-54 2005.
48. Rao Q, Wang JY, Meng J, Tang K, Wang Y, Wang M, Xing H, Tian Z, Wang J. Low-expression of E-cadherin in leukaemia cells causes loss of homophilic adhesion and promotes cell growth. *Cell Biol Int*.;35(9):945-51. 2011 Sep
49. Rao Q, Wang JY, Meng J, et al. Leukemia cell surface expression of E-cadherin and its correlation with membrane localization of beta-catenin. *Zhonghua X., Ye Xue Za Z.* ;29(9):592-4. 2008.