مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال بیست و هشتم/ شماره ۱۰۵/ اردیبهشت ۱۳۸۹
مقاله پژوهشی
تاریخ دریافت: ۸۸/۱/۳۰ تاریخ پذیرش: ۸۸/۱۰/۴

بررسی میزان شیوع جهش JAK2 V617F و ارتباط این جهش با یافته‌های آزمایشگاهی و بالینی در بیماران مبتلا به نئوپلاسم‌های میلوپرولیفراتیو مزمن

دکتر فاطمه نادعلی[۱]، شیرین فردوسی[۲]، دکتر ناهید عین الهی[۳]، دکتر اسداله موسوی[۴]، بهرام چهاردولی[۵]، دکتر غلام رضا توگه[۴]، دکتر کامران علی مقدم[۴]، دکتر اردشیر قوام زاده[۶]، دکتر حمید اله غفاری[۷]

خلاصه

مقدمه: در سال ۲۰۰۵، چندین گروه شیوع بالایی از جهش V617F (G→T) را در ژن تیروزین کیناز JAK2 در نئوپلاسم‌های میلوپرولیفراتیو مزمن (MPNs) شناسایی کردند. در مطالعه‌ی حاضر میزان شیوع این جهش و ارتباط آن با یافته‌های آزمایشگاهی و بالینی در بیماران مبتلا به این نئوپلاسم‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت.

روش‌ها: جهش JAK2 V617F با روش سیستم تکثیر متزلزل جهش‌ها (ARMS-PCR) در ۹۲ بیمار با تشخیص جدید یا در حال درمان مبتلا به نئوپلاسم‌های میلوپرولیفراتیو مزمن (MPNs) از طریق نمونه گیری تصادفی ساده مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: جهش در ۸۶/۶ درصد (۲۶/۳۰) بیماران پلی‌سیتمی ورا، ۴۶/۶ درصد (۷/۱۵) بیماران ترومبوسیتمی اولیه، ۶۱/۵ درصد (۸/۱۳) بیماران میلوفیبروز اولیه و ۱۴ درصد (۴/۳۴) بیماران لوسمی میلوئید مزمن شناسایی شد. بیماران جهش مثبت پلی‌سیتمی ورا، میزان گلبول‌های سفید بالاتری داشتند (P = ۰/۰۳). به علاوه، از ۲۶ بیمار پلی‌سیتمی ورا JAK2 مثبت، ۱۶ بیمار زن بودند و ۱۷ بیمار اسپلنومگالی داشتند. یک بیمار پلی‌سیتمی ورا به طور هم‌زمان دارای جهش JAK2 و ناهنجاری کروموزومی فیلادلفیا بود. در سایر گروه‌ها تفاوت قابل توجهی یافت نشد. وجود جهش توسط روش Sequencing مورد تأیید قرارگرفت.

نتیجه‌گیری: این یافته‌ها بیان می‌کند که تشخیص جهش JAK2 V617F نه تنها دارای اهمیت تشخیصی است بلکه در درمان بیماری‌های نئوپلاسم‌های میلوپرولیفراتیو مزمن (MPNs) از طریق داروهای مهار کننده‌ی مسیر JAK/STAT نقش دارد.

واژگان کلیدی: جهش JAK2، نئوپلاسم‌های میلوپرولیفراتیو، سیستم تکثیر متزلزل جهش‌ها.

مقدمه

تولید سلول‌های خونی از طریق تعدادی از سایتوکاین‌ها و فاکتورهای رشد پروتئینی تنظیم می‌شود. این مولکول‌ها به رسپتورهای سطح سلولی متصل می‌شوند و رسپتورها با تیروزین کینازهای خانواده‌ی Janus Kinase (JAK) و عوامل نسخه برداری به نام ارسال کنندگان پیام و فعال کنندگان رونویسی (STAT) مرتبطند. خانواده‌ی JAK دارای چهار عضو JAK1، JAK2، JAK3 و تیروزین کیناز 2 می‌باشد (۱). هر JAK، یک دومین تیروزین کیناز فعال به نام JAK homology 1 (JH1)، یک دومین سودوکیناز غیر فعال از نظر کاتالیتیک به نام

[۱] دانشیار، گروه پاتولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.
[۲] کارشناس ارشد هماتولوژی و بانک خون، دانشکده‌ی پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.
[۳] استادیار، گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده‌ی پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.
[۴] استادیار مرکز تحقیقات خون، انکولوژی و پیوند مغز استخوان، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.
[۵] کارشناس ارشد هماتولوژی و بانک خون، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.
[۶] استاد، مرکز تحقیقات خون، انکولوژی و پیوند مغز استخوان، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.
[۷] دانشیار، مرکز تحقیقات خون، انکولوژی و پیوند مغز استخوان، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر حمید اله غفاری ، دانشیار، مرکز تحقیقات خون، انکولوژی و پیوند مغز استخوان، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.
E-mail: shgaffari2000@yahoo.com

Archive of SID
www.SID.ir

2 JAK homology (JH2)، یک دومین به نام 2 SRC homology (SH2) و یک دومین همولوژی N–ترمینال FERM (4-point-1, Erzin, Radixin, Moesin) دارد که محل اتصال به پذیرنده‌های سایتوکاین تیپ ۱ است (۲). توالی رویدادهایی که در مسیر ارسال پیام JAK/STAT به وقوع می‌پیوندند به این صورت است که تجمع پذیرنده‌های تحت القای سایتوکاین، منجر به فسفریله شدن زنجیره‌های پذیرنده توسط JAK می‌گردد. سپس پروتئین‌های STAT توسط کینازهای JAK فسفریله می‌شوند. دومین SH2 یک پروتئین STAT می‌تواند به بنیان‌های تیروزین فسفریله شده سایر پروتئین‌های STAT متصل شود. در نتیجه، دو پروتئین STAT به هم متصل و از پذیرنده جدا می‌شوند. دیمرهای STAT به هسته مهاجرت می‌کنند و در آن جا به توالی‌های DNA در نواحی پروموتر ژن‌های پاسخگو به سایتوکاین متصل می‌شوند و رونویسی از ژن را فعال می‌کنند. مکانیسم‌های متعدد تنظیم منفی مسیرهای JAK/STAT شناسایی شده‌اند. پروتئین‌هایی به نام سرکوب کنندگان ارسال پیام سایتوکاین (SOCS) خانواده‌ای از مهارکنندگان مسیر STAT هستند. پروتئین‌های SOCS فعالیت‌های سایتوکاین‌ها را توسط پایان دادن به فسفریلاسیون در ناحیه سیتوپلاسمی رسپتور سایتوکاین یا خاتمه دادن و جلوگیری از فعالیت کینازی JAK مهار می‌کنند. شناسایی جهش JAK2 V617F در نئوپلاسم‌های میلوپرولیفراتیو مزمن (MPNs) در سال ۲۰۰۵ باعث افزایش درک ما از پاتوژنز نئوپلاسم‌های میلوپرولیفراتیو مزمن (MPNs) شده است. این جهش از طریق تغییر G به T در نوکلئوتید ۱۸۴۹ در اگزون ۱۲ از ژن JAK2 واقع بر روی کروموزوم ۹ مشخص می‌شود که منجر به جایگزینی اسید آمینه‌ی فنیل آلانین به جای والین در موقعیت ۶۱۷ از پروتئین JAK2 می‌گردد (۷–۳).

چهار گروه به طور جداگانه و در عرض یک سال با استفاده از تکنیک‌های متفاوت، وجود یک جهش در تیروزین کیناز JAK2 را با یک توافق نزدیک در درصد جهش، شناسایی و گزارش کردند (۹–۸، ۵–۳). موتاسون JAK2 در نزدیک به ۹۰–۷۵ درصد بیماران پلی‌سیتمی ورا (PV) و در ۵۰–۳۰ درصد بیماران ET و Progressive massive fibrosis (PMF) شرح داده شده است (۱۰) که این تشخیص با استفاده از تعدادی تکنیک نظیر Allele-specific PCR، Pyrosequencing و Direct sequencing به دست آمده است. جهش در برخی بدخیمی‌های میلوئید دیگر، گرچه با شیوع کمتر، همچون a Chronic myeloproliferative disorder (aCML)، لوسمی میلومونوسیتیک مزمن (CMML)، لوسمی میلوئید حاد (AML)، سندرم‌های میلودیسپلاستیک (MDS)، لوسمی میلومونوسیتیک جوانان (JMML) و لوسمی نوتروفیلی مزمن (CNL) گزارش شده است (۱۳–۱۱). جهش در بیماران با اختلالات لنفوپرولیفراتیو نظیر لوسمی لنفوبلاستیک حاد و همین طور در کنترل‌های طبیعی وجود ندارد. بنابراین نشان دهنده‌ی آن است که V617F یک جهش اکتسابی سلول‌های بنیادی میلوئید است (۱۶–۱۴). در مطالعه‌ی حاضر با استفاده از روش ARMS-PCR میزان شیوع جهش JAK2 V617F در بیماران PV، ET، PMF و CML مورد ارزیابی قرار گرفت و ارتباط این جهش با یافته‌های آزمایشگاهی بیماران بررسی شد.

روش‌ها

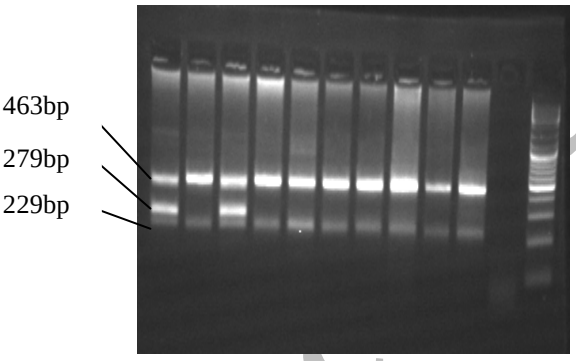
پس از اخذ رضایت، نمونه‌های خون محیطی ۹۲ بیمار با تشخیص جدید یا در حال درمان مبتلا به بدخیمی‌های میلوپرولیفراتیو و ۵۰ نمونه‌ی شاهد طبیعی

Archive of SID
www.SID.ir

مراجعه کننده به بخش خون و انکولوژی بیمارستان شریعتی و امام خمینی با روش ARMS-PCR مورد بررسی قرار گرفت. اطلاعات بالینی و آزمایشگاهی بیماران از پرونده‌ی پزشکی آن‌ها استخراج شد. بیماران شامل ۳۰ بیمار پلی‌سیتمی ورا، ۱۳ بیمار میلوفیبروز اولیه، ۱۵ بیمار ترومبوسیتمی اولیه و ۳۴ بیمار CML بودند. میانگین سنی کل بیماران ۴۸ سال، با حداقل سن ۱۶ و حداکثر ۷۶ سال بود. از ۹۲ بیمار مورد مطالعه، ۵۲ بیمار مرد (۱۴ بیمار PV، ۸ بیمار ET، ۷ بیمار PMF و ۲۳ بیمار CML) و ۴۰ بیمار زن (۱۶ بیمار PV، ۷ بیمار ET، ۶ بیمار PMF و ۱۱ بیمار CML) بودند.

از هر فرد مبتلا، مقدار ۵ میلی‌لیتر خون وریدی در لوله‌های حاوی ضد انعقاد EDTA گرفته شد و DNA توسط روش پروتئیناز K از خون تام استخراج شد. برای ارزیابی جهش JAK2 V617F از تکنیک ARMS-PCR استفاده شد. در این تکنیک از ۴ پرایمر استفاده می‌شود: یک پرایمر Forward Outer (FO)، یک پرایمر Reverse Outer (RO)، یک پرایمر Forward wild-type specific (Fwt) و یک پرایمر Reverse mutant-specific (Rmt).

واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر و در ۴۰ چرخه انجام شد. برای هر واکنش، مقدار DNA ژنومیک، ۲۵ نانوگرم و غلظت نهایی پرایمرهای FO، RO و Fwt هر سه ۰/۵ µl و غلظت Rmt برابر با ۱ µl بود. محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۳ درصد الکتروفورز و سپس توسط اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شد و از نظر وجود یا عدم وجود جهش مورد بررسی قرار گرفت. پرایمرهای FO و RO از ژن JAK2 یک باند ۴۶۳ bp می‌دهند. پرایمرهای Fwt و RO یک آلل wild-type را تکثیر می‌کنند و باعث تولید یک باند ۲۲۹ bp می‌شوند؛ همچنین پرایمرهای F0 و RMT یک باند ۲۷۹ bp از آلل موتانت ایجاد می‌کنند (جدول ۱). Chen و همکاران حساسیت این تست را در تشخیص جهش JAK2 برابر ۰/۰۵ تا ۰/۱ درصد گزارش کرده‌اند (۱۷). این روش، افتراق ما بین افراد هموزیگوت و هتروزیگوت جهش مثبت را ممکن می‌سازد و یک نقش کلیدی در تشخیص وجود و یا عدم وجود جهش در بیماران MPN به عنوان یک تست غربال‌گری قابل اعتماد دارد (۱۸). دماهای مورد استفاده جهت تکثیر ژن JAK2 در جدول ۲ آمده است. جهت تأیید وجود جهش و صحت روش کار، تعدادی از نمونه‌های مثبت تعیین توالی شدند (شکل ۱).



شکل ۱. ARMS-PCR جهت غربال‌گری جهش JAK2 V617F

ستون ۱، کنترل مثبت و ستون ۳، یک بیمار JAK2 مثبت را نشان می‌دهد. ستون‌های ۲، ۴، ۵، ۶، ۷ و ۸، بیماران JAK2 منفی و ستون‌های ۹ و ۱۰، شاهد سالم، ستون ۱۱، کنترل منفی و ستون M، سایز مارکر را نشان می‌دهد.

یافته‌ها

در مطالعه‌ی حاضر، ۹۲ بیمار مبتلا به بدخیمی‌های میلوپرولیفراتیو، مراجعه کننده به مرکز تحقیقات خون، انکولوژی و پیوند مغز استخوان بیمارستان شریعتی و بیمارستان امام خمینی از نظر بیان ژن **JAK2 V617F**

Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۱. پرایمرهای استفاده شده جهت شناسایی جهش JAK2

Forward Outer (FO): 5'- TCC TCA GAA CGT TGA TGG CAG-3'
Reverse Outer (RO): 5'- ATT GCT TTC CTT TTT CAC AAG AT-3'
Forward wild-type specific (FWT): 5'- GCA TTT GGT TTT AAA TTA TGG AGT ATA TG -3'
Reverse mutant-specific (RMT): 5'- GTT TTA CTT ACT CTC GTC TCC ACA AAA-3'

جدول ۲. دماهای مورد استفاده در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز جهت شناسایی جهش JAK2 V617F

مراحل	زمان	دما (°C)
واسرشته سازی اولیه	۶ دقیقه	۹۴
واسرشته سازی	۴۰ ثانیه	۹۴
اتصال	۴۵ ثانیه	۵۶
توسعه	۴۵ ثانیه	۷۲
توسعه‌ی نهایی	۱۰ دقیقه	۷۲

با استفاده از روش ARMS-PCR مورد بررسی قرار گرفت. نتایج آزمایش‌هایی نظیر CBC و سیتوژنتیک، تشخیص‌های مورفولوژیک، زمان تشخیص اولیه و ... از پرونده پزشکی بیماران استخراج شد. داده‌ها به نرم‌افزار $SPSS_{16}$ (version 16, SPSS Inc., Chicago. IL) وارد شد و به روش Mann-Whitney مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت.

به علاوه، ۵۰ نمونه‌ی سالم نیز به عنوان شاهد بررسی شدند که از نظر وجود جهش منفی بودند. در بیماران پلی‌سیتمی ورا، از ۳۰ بیمار مورد مطالعه ۲۶ بیمار (۸۶ درصد) جهش مثبت بودند که این بیماران، میانگین سنی بالاتری داشتند. از ۲۶ بیمار جهش مثبت، ۱۶ بیمار زن بودند و ۱۷ بیمار اسپلنومگالی داشتند. به علاوه بیماران جهش مثبت، میزان گلبول‌های سفید بالاتری نسبت به بیماران جهش منفی داشتند ($P = ۰/۰۳$). اما در سایر داده‌ها تفاوت مهمی مشاهده نشد. از آن جا که پرونده‌ی بیشتر بیماران فاقد اطلاعات سیتوژنتیک بود، امکان بررسی ارتباط شیوع جهش با ناهنجاری‌های سیتوژنتیک مقدور نشد. از ۲۶ بیمار، تنها ۲ نفر دارای جهش هموزیگوت و بقیه دارای جهش هتروزیگوت بودند. بنابراین از آن جا که تعداد بیماران هموزیگوت کم بود، آنالیز آماری جداگانه برای این گروه انجام نشد. در بیماران میلوفیبروز اولیه، ترومبوسیتمی اولیه و نیز لوسمی میلوئید مزمن (جدول ۳) تفاوت مهمی بین بیماران JAK2 V617F مثبت و منفی مشاهده نشد. از کل بیماران، ۴۷ درصد دارای اسپلنومگالی و ۵۳ درصد فاقد اسپلنومگالی بودند.

گزارش یک مورد از حضور هم‌زمان جهش JAK2 V617F و کروموزوم فیلادلفیا: یک بیمار شناسایی شده به عنوان بیمار پلی‌سیتمی ورا با جهش JAK2 مثبت دارای ناهنجاری کروموزومی فیلادلفیا بود و تا کنون تنها یک بیمار به صورت گزارش مورد در سال ۲۰۰۸ گزارش شده است (۱۹). داده‌های مربوط به این بیمار مرد ۶۴ ساله در زیر آورده شده است. به علاوه، در بررسی مغز استخوان نیز در زمان تشخیص، سلولاریته ۹۵ درصد گزارش شده بود. بیمار RBC برابر ۸/۱۸ میلین، WBC برابر ۱۳۲۰۰، پلاکت برابر ۱۱۸۶۰۰۰۰، هموگلوبین برابر ۱۶/۶ و هماتوکریت برابر ۴۰/۲ داشت.

Archive of SID
www.SID.ir

شناسایی جهش JAK2 V617F در چهار بیمار CML. از ۳۴ بیمار مورد مطالعه، ۴ بیمار (۱۴ درصد) جهش نشان دادند که در این جا نیز بیماران JAK2 مثبت، میانگین سنی بالاتری داشتند. در سایر موارد تفاوت قابل توجهی یافت نشد (جدول ۴). از این تعداد (سه مرد و یک زن)، سه بیمار فیلادلفیا مثبت و یک نفر منفی و New case بود. با توجه به این که این جهش در بین بیماران CML بسیار به ندرت گزارش شده است، داده‌های مربوط به این ۴ بیمار در یک فهرست جداگانه ذکر می‌شود. شناسایی این بیماران به عنوان CML، بر اساس پرونده‌ی پزشکی بیمار و یافته‌های آزمایشگاهی موجود انجام گرفته است.

جدول ۳. وضعیت جهش JAK2 در بیماران مورد مطالعه

	پلی‌سیتمی ورا			میلوفیبروز اولیه			ترومبوسیتمی اولیه			لوسمی میلوئید مزمن		
	جهش مثبت	جهش منفی	P value	جهش مثبت	جهش منفی	P value	جهش مثبت	جهش منفی	P value	جهش مثبت	جهش منفی	P value
تعداد بیماران	۲۶	۴		۸	۵		۷	۸		۴	۳۰	
مرد به زن	۱۰/۱۶	۴/۰		۵/۳	۲/۳		۳/۴	۵/۳		۳/۱	۲۰/۱۰	
میانگین سنی	۵۴	۵۱		۵۷	۵۱		۵۰	۵۴		۵۲	۳۴	
شمارش گلبول‌های	۳۷/۶ ± ۲۲/۲۶	۱/۴۳ ± ۵/۹۵	۰/۰۳	۶/۹۹ ± ۱۲/۴	۲/۰۵ ± ۵/۹۲	۰/۱	۲/۲۵ ± ۸/۷۵	۴/۹۴ ± ۶/۸۸	۰/۰۷	۸۴/۰۴ ± ۱۸۸/۳	۱۷۲/۱ ±	۰/۷
هموگلوبین (گرم بر لیتر)	۱/۸۰۵ ± ۱۶/۹۸	۱/۱۵۱ ± ۱۸/۳	۰/۱	۳/۲۸ ± ۹/۸۷	۲/۱۴ ± ۷/۲۰	۰/۳	۲/۴۹ ± ۱۳/۶۰	۱/۱۶ ± ۱۳/۶۰	۰/۵	۲/۴۱ ± ۱۲/۳۹	۱/۶۳ ± ۱۱/۷۴	۰/۲
هماتوکریت (٪)	۷/۹۳ ± ۵۱/۶۳	۴/۱۰۱ ±	۰/۷	۸/۲۳ ± ۲۹/۳۸	۷/۴۷ ± ۲۹/۲۴	۰/۶	۸/۴۸ ± ۳۷/۹۲	۲/۴۵ ± ۴۰/۱۶	۰/۶	۶/۴۶ ± ۳۶/۲۳	۸/۰۱ ± ۴۲/۰۶	۰/۱
اسپلنومگالی طبیعی به غیر	۹/۱۷	۳/۱		۱/۵	۱/۷		۷/۱	۵/۲		۱/۱۴	۱/۴	

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۴. یافته‌های آزمایشگاهی مربوط به بیماران CML دارای جهش JAK2 V617F

ردیف	سن	WBC×10^9/l	RBC×10^{12}/l	PLT×10^9/l	Ph+/Ph-	اسپلنومگالی
۱	۵۸	۱۳۷	۵/۶	۷۸	Ph+	+
۲	۴۱	۷۵	۴/۷۶	۲۳۰	Ph+	+
۳	۵۵	۱۳/۵	۵/۳۱	۳۶۹	Ph+	+
۴	۵۲	۸۰	۵	۲۹۸	Ph-	-

Ph: Philadelphia

بحث

در مطالعه‌ی حاضر، میزان شیوع جهش JAK2 V617F در ۹۲ بیمار مبتلا به نئوپلاسم‌های میلوپرولیفراتیو مراجعه کننده به بخش خون و انکولوژی بیمارستان شریعتی و امام خمینی با روش ARMS-PCR مورد بررسی قرار گرفت. در مطالعه‌ی مشابهی که توسط Jones و همکاران به نقل از Sawyers (۱۸) با روش ARMS-PCR انجام گرفت، میزان شیوع جهش در بیماران پلی‌سیتمی ورا ۸۱ درصد (۵۸/۷۲)، در ترومبوسیتمی اولیه ۴۱ درصد (۲۴/۵۹) و در میلوفیبروز اولیه ۴۳ درصد (۱۵/۳۵) گزارش شد.

در این مطالعه، میزان شیوع جهش در بیماران PV، ۸۶ درصد به دست آمد که قابل مقایسه با یافته‌های James و همکاران (۸۶ درصد) (۹)، Jelinek و همکاران (۸۶ درصد) (۲۰) و Jones و همکاران به نقل از Sawyers (۸۱ درصد) (۱۸) است. بالاترین میزان شیوع توسط گروه Lippert به نقل از Pearson و همکاران (۹۷ درصد) با روش Allele-specific quantitative polymerase reaction chain (qPCR) (۲۱) و کمترین میزان شیوع توسط گروه Kralovics و همکاران (۶) با روش Microsatellite mapping و DNA sequencing (۶۵ درصد) به دست آمده است.

در مطالعه‌ی Speletas و همکاران (۲۲) بیماران جهش مثبت پلی‌سیتمی ورا سطوح بالاتر گلبول‌های سفید را نشان دادند (P = ۰/۰۲). به علاوه، در این گروه از بیماران شیوع اسپلنومگالی بالاتر بود. در این مطالعه نیز میزان گلبول‌های سفید بالاتر (P = ۰/۰۳) و شیوع بالای اسپلنومگالی (۱۷ مورد از ۲۶ بیمار جهش مثبت) به دست آمد. در مطالعه‌ی Levine و همکاران (۳) ارتباط مهمی بین حضور آلل موتانت و جنس مؤنث در بیماران PV (۸۳ درصد زنان در مقابل ۶۴ درصد مردان) ثابت شده است. در این مطالعه نیز از ۲۶ بیمار جهش مثبت پلی‌سیتمی ورا، ۱۶ بیمار (۶۱/۵ درصد) زن بودند. در مطالعه‌ی Levine و همکاران (۳) دلیلی برای این ارتباط بیان نشده است و می‌توان چنین نتیجه‌ای را به نمونه‌های وارد شده در مطالعه ربط داد.

از طرفی در این مطالعه جهش در بیش از نیمی از موارد میلوفیبروز اولیه (با شیوع ۶۱ درصد) شناسایی شد که مطابق با تخمین‌های قبلی (۲۳، ۱۸، ۵) از شیوع جهش در این اختلال است؛ البته در مقایسه با مطالعه‌ی Jones و همکاران به نقل از Sawyers (۱۸) شیوع بالاتری به دست آمده است. شیوع به نسبت بالای گزارش شده در این جا ممکن است انعکاسی از تعداد بیماران مطالعه شده باشد. Campbell و همکاران (۲۴) گزارش کردند که بیماران میلوفیبروز

Archive of SID
www.SID.ir

اولیه‌ی JAK2 مثبت، شمارش گلبول سفید و نوتروفیل بالاتری از بیماران جهش منفی دارند؛ اما اندازه‌ی طحال، شمارش پلاکت و سطوح هموگلوبین تفاوت مهمی بین دو گروه نشان نداد. نتایج به دست آمده در این مطالعه نیز هیچ تفاوت مهمی بین دو گروه جهش مثبت و منفی، حتی در میزان WBC، نشان نداد. بالاترین میزان شیوع جهش گزارش شده در بیماران PMF مربوط به مطالعه‌ی Jelink و همکاران (۲۰) با روش Pyrosequencing با شیوع ۹۵ درصد است که از ۱۹ بیمار، ۱۸ مورد جهش را نشان دادند؛ کمترین میزان شیوع جهش نیز مربوط به مطالعه‌ی Levine و همکاران (۳) با شیوع ۳۵ درصد است که از ۴۶ بیمار، ۱۶ مورد مثبت بودند. در این جا نیز ارتباط ین جهش و سن بالاتر در تشخیص یافت شد. این ارتباط بین سن و جهش JAK2 بیانگر تأثیر سن بر روی ناپایداری ژنتیکی است.

در بیماران ترومبوسیتمی اولیه نیز شیوع جهش ۴۶ درصد به دست آمد. در مطالعه‌ی Campbell و همکاران (۲۵) بر روی ۸۰۶ بیمار مبتلا به ET، ۴۱۴ نفر (۵۳/۴ درصد) جهش مثبت و ۳۶۲ نفر (۴۶/۶ درصد) جهش منفی بودند. این گروه گزارش کرد که بیماران JAK2 مثبت افزایش قابل توجه هموگلوبین ($P < ۰/۰۰۰۱$) و شمارش نوتروفیل ($P < ۰/۰۰۰۱$) نسبت به افراد بدون جهش دارند. در مطالعه‌ی حاضر، آنالیز داده‌های بیماران ET هیچ تفاوت معنی‌داری در میزان RBC، WBC، پلاکت، هماتوکریت و هموگلوبین نشان نداد. در توجیه این مسأله می‌توان این طور بیان کرد که در مقایسه با مطالعات Campbell و همکاران، تعداد نمونه‌های مورد بررسی بسیار کمتر (۱۵ نمونه) است.

در مطالعه‌ی حاضر، از ۳۴ بیمار مبتلا به CML، ۴ بیمار (۱۴ درصد) دارای جهش بودند. باید اشاره کرد که Jones و همکاران به نقل از Sawyers (۱۸) در هیچ بیمار CML ($n = ۱۷$) جهش یافت نکردند که البته در مقاله‌ی منتشر شده بیان می‌کنند که تعداد نمونه‌های آنالیز شده کم بوده است و نمی‌توان حضور جهش را در یک زیر گروه کوچک از بیماران رد کرد. این احتمال وجود دارد که تفاوت‌های تکنیکی مرتبط با حساسیت تشخیص، عامل اختلاف در نسبت‌های منتشر شده از موارد مثبت در بین زیرگروه‌های MPN باشد. به علاوه می‌توان به مستدل بودن معیارهای مورد استفاده جهت تشخیص بیماران نیز اشاره نمود. مواردی از حضور هم‌زمان جهش JAK2 و کروموزوم فیلادلفیا در بیماران تحت درمان با Imatinib گزارش شده است (۲۷-۲۶). در بررسی پرونده‌ی پزشکی بیماران مشخص شد، از ۳ بیماری که جهش‌های JAK2 و t(9;22) را به طور هم‌زمان دارند، سه بیمار تحت درمان با هیدروکسی اوره بوده‌اند که در ادامه، درمان دو نفر به Imatinib تغییر کرده است. در مورد یک بیمار دیگر نیز داده‌های پزشکی بیمار در دسترس نبود. بنابراین در این جا نیز تغییر فنوتیپی مشابه با یافته‌های گروه‌های قبلی یافت شد.

Kramer و همکاران در سال ۲۰۰۷ در یک مقاله‌ی گزارش مورد حضور هم‌زمان جهش JAK2 V617F و فیوژن BCR-ABL را در یک بیمار مرد ۵۰ ساله‌ی مبتلا به CML، که دچار فیبروز مغز استخوان در طی درمان با Imatinib شده بود، شرح دادند (۲۶). در یک مقاله گزارش مورد دیگر نیز Hussein و همکاران نیز مورد مشابهی را گزارش کردند (۲۷). در این مورد، یک بیمار مرد ۵۵ ساله با ویژگی‌های مشخص CML و وجود ژن

Archive of SID
www.SID.ir

فیوژن BCR-ABL، تحت درمان با Imatinib قرار گرفت و در مدت ۱۱ ماه، BCR-ABL غیر قابل تشخیص شد؛ اما ۱۱، ۱۴ و ۲۳ ماه پس از تشخیص و شروع درمان، بیوپسی مغز استخوان افزایش مگاکاریوسیت‌ها را نشان داد. در حالی که هیستومورفولوژی، مقاومت یا عود کلون CML فیلادلفیا مثبت را پیشنهاد می‌کرد، در مغز استخوان هیچ گونه فیوژن BCR-ABL قابل تشخیص نبود. در نتیجه، آنالیز جهش JAK2 با روش Pyrosequencing انجام گرفت که نشان دهنده‌ی وجود ۵ درصد آلل موتانت در بیوپسی اولیه و افزایش آن به ۱۵ و ۲۳ درصد به ترتیب پس از گذشت ۱۴ و ۲۳ ماه بود (۲۷). هر چند در مطالعات Jelinek و همکاران (۱۱)، Bock و همکاران (۲۸) و Horn وهمکاران (۲۹) هیچگونه جهشی در بیماران CML فیلادلفیا مثبت گزارش نشده است؛ البته در مطالعه‌ی Jelinek و همکاران، از ۱۶ بیمار CML فیلادلفیا منفی سه مورد جهش مثبت بودند که شیوع ۱۹ درصد را نشان می‌دهد (۱۱).

در یکی از بیمارانی که به عنوان بیمار پلی‌سیتمی ورا تشخیص داده شده بود (RBC: ۸/۱۸، Hb: ۱۶/۶، HCT: ۴۰/۲)، کروموزوم فیلادلفیا مثبت بود. مواردی از تغییر پلی‌سیتمی ورا به لوسمی میلوئید مزمن توسط Haq (۳۰) و Mirza (۳۱) گزارش شده است. به علاوه Cambier و همکاران (۱۹) در یک مقاله‌ی گزارش مورد در سال ۲۰۰۸، در یک بیمار وجود دو اختلال میلوپرولیفراتیو مجزا (پلی‌سیتمی ورا JAK2 V617F مثبت و لوسمی میلوئید مزمن فیلادلفیا مثبت) را شناسایی کردند. Haq و همکاران در سال ۱۹۹۰ در یک مقاله‌ی گزارش مورد، تغییر پلی‌سیتمی ورا به لوسمی میلوئید مزمن فیلادلفیا مثبت را در یک بیمار گزارش کردند که نشان می‌داد اشعه درمانی و عوامل آلکیله کننده ممکن است در تغییر شکل به CML نقش داشته باشد (۳۰). Mirza و همکاران نیز در سال ۲۰۰۷ دو بیمار زن ۸۲ و ۷۳ ساله‌ی مبتلا به پلی‌سیتمی ورا که در آن‌ها بیماری به سمت لوسمی میلوئید مزمن پیشرفت کرده بود را شرح دادند. هر دو بیمار در زمان تشخیص پلی‌سیتمی ورا، فیوژن BCR-ABL نداشتند. بررسی نمونه‌های خون و مغز استخوان، حضور موتاسیون JAK2 V617F و فیوژن BCR-ABL را نشان داد (۳۱). Cambier و همکاران در سال ۲۰۰۸ در یک بیمار وجود دو اختلال میلوپرولیفراتیو مجزا (پلی‌سیتمی ورا JAK2 V617F مثبت و لوسمی میلوئید مزمن فیلادلفیا مثبت) را شناسایی کردند (۱۹).

نتیجه‌گیری

بلوکه کردن فعالیت مداوم سیگنالینگ ایجاد شده به وسیله‌ی این جهش در بیماران MPN، یک گزینه‌ی درمانی مناسب است. ما پیشنهاد می‌کنیم که همه‌ی موارد MPN مشکوک برای حضور این جهش، جهت کمک به طبقه‌بندی بیماری و ایجاد یک مارکر برای اهداف درمانی غربال‌گری شوند

تشکر و قدردانی

این مطالعه حاصل یک طرح تحقیقاتی مصوب مرکز تحقیقات هماتولوژی، انکولوژی و پیوند مغز استخوان دانشگاه علوم پزشکی تهران می‌باشد که از مسؤولین آن مرکز و کلیه‌ی کارشناسان تشکر و قدردانی می‌شود.

Archive of SID
www.SID.ir

References

1. Wilks AF. Two putative protein-tyrosine kinases identified by application of the polymerase chain reaction. Proc Natl Acad Sci USA 1989; 86(5): 1603-7.
2. Huang LJ, Constantinescu SN, Lodish HF. The N-terminal domain of Janus kinase 2 is required for Golgi processing and cell surface expression of erythropoietin receptor. Mol Cell 2001; 8(6): 1327-38.
3. Levine RL, Wadleigh M, Cools J, Ebert BL, Wernig G, Huntly BJ, et al. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. Cancer Cell 2005; 7(4): 387-97.
4. 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 2005; 352(17): 1779-90.
5. Zhao R, Xing S, Li Z, Fu X, Li Q, Krantz SB, et al. Identification of an acquired JAK2 mutation in polycythemia vera. J Biol Chem 2005; 280(24): 22788-92.
6. Kralovics R, Teo SS, Buser AS, Brutsche M, Tiedt R, Tichelli A, et al. Altered gene expression in myeloproliferative disorders correlates with activation of signaling by the V617F mutation of Jak2. Blood 2005; 106(10): 3374-6.
7. Vannucchi AM, Pancrazzi A, Bogani C, Antonioli E, Guglielmelli P. A quantitative assay for JAK2(V617F) mutation in myeloproliferative disorders by ARMS-PCR and capillary electrophoresis. Leukemia 2006; 20(6): 1055-60.
8. Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, East C, Fourouclas N, Swanton S, et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. Lancet 2005; 365(9464): 1054-61.
9. James C, Ugo V, Le Couedic JP, Staerk J, Delhommeau F, Lacout C, et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. Nature 2005; 434(7037): 1144-8.
10. Langabeer SE, Ni AF, Conneally E, Lawler M. Incidence and significance of the JAK2 V617F mutation in patients with chronic myeloproliferative disorders. Ir J Med Sci 2007; 176(2): 105-9.
11. Barnes DJ, Melo JV. Cytogenetic and molecular genetic aspects of chronic myeloid leukaemia. Acta Haematol 2002; 108(4): 180-202.
12. Tono C, Xu G, Toki T, Takahashi Y, Sasaki S, Terui K, et al. JAK2 Val617Phe activating tyrosine kinase mutation in juvenile myelomonocytic leukemia. Leukemia 2005; 19(10): 1843-4.
13. Levine RL, Loriaux M, Huntly BJ, Loh ML, Beran M, Stoffregen E, et al. The JAK2V617F activating mutation occurs in chronic myelomonocytic leukemia and acute myeloid leukemia, but not in acute lymphoblastic leukemia or chronic lymphocytic leukemia. Blood 2005; 106(10): 3377-9.
14. Melzner I, Weniger MA, Menz CK, Moller P. Absence of the JAK2 V617F activating mutation in classical Hodgkin lymphoma and primary mediastinal B-cell lymphoma. Leukemia 2006; 20(1): 157-8.
15. Lee JW, Soung YH, Kim SY, Nam SW, Park WS, Lee JY, et al. JAK2 V617F mutation is uncommon in non-Hodgkin lymphomas. Leuk Lymphoma 2006; 47(2): 313-4.
16. Sulong S, Case M, Minto L, Wilkins B, Hall A, Irving J. The V617F mutation in Jak2 is not found in childhood acute lymphoblastic leukaemia. Br J Haematol 2005; 130(6): 964-5.
17. Goldman J. Chronic myeloid leukemia-past, present, and future. Semin Hematol 2003; 40(1): 1-3.
18. Sawyers CL. Chronic myeloid leukemia. N Engl J Med 1999; 340(17): 1330-40.
19. Cambier N, Renneville A, Cazaentre T, Soenen V, Cossement C, Giraudier S, et al. JAK2 V617F-positive polycythemia vera and Philadelphia chromosome-positive chronic myeloid leukemia: one patient with two distinct myeloproliferative disorders. Leukemia 2008; 22(7): 1454-5.
20. Jelinek J, Oki Y, Gharibyan V, Bueso-Ramos C, Prchal JT, Verstovsek S, et al. JAK2 mutation 1849G>T is rare in acute leukemias but can be found in CMML, Philadelphia chromosome-negative CML, and megakaryocytic leukemia. Blood 2005; 106(10): 3370-3.
21. Pearson TC, Wetherley-Mein G. The course and complications of idiopathic erythrocytosis. Clin Lab Haematol 1979; 1(3): 189-96.
22. Cervantes F. Modern management of myelofibrosis. Br J Haematol 2005; 128(5): 583-92.
23. Berk PD, Goldberg JD, Donovan PB, Fruchtman SM, Berlin NI, Wasserman LR. Therapeutic recommendations in polycythemia vera based on Polycythemia Vera Study Group protocols. Semin Hematol 1986; 23(2): 132-43.
24. Campbell PJ, Griesshammer M, Dohner K, Dohner H, Kusec R, Hasselbalch HC, et al. V617F mutation in JAK2 is associated with poorer survival in idiopathic myelofibrosis. Blood 2006; 107(5): 2098-100.
25. Campbell PJ, Scott LM, Buck G, Wheatley K, East CL, Marsden JT, et al. Definition of subtypes of essential thrombocythaemia and relation to polycythaemia vera based on JAK2 V617F mutation status: a prospective study. Lancet 2005; 366(9501): 1945-53.

Archive of SID

www.SID.ir

26. Kramer A, Reiter A, Kruth J, Erben P, Hochhaus A, Muller M, et al. JAK2-V617F mutation in a patient with Philadelphia-chromosome-positive chronic myeloid leukaemia. Lancet Oncol 2007; 8(7): 658-60.

27. Hussein K, Bock O, Seegers A, Flasshove M, Henneke F, Buesche G, et al. Myelofibrosis evolving during imatinib treatment of a chronic myeloproliferative disease with coexisting BCR-ABL translocation and JAK2V617F mutation. Blood 2007; 109(9): 4106-7.

28. Bock O, Busche G, Koop C, Schroter S, Buhr T, Kreipe H. Detection of the single hotspot mutation in the JH2 pseudokinase domain of Janus kinase 2 in bone marrow trephine biopsies derived from chronic myeloproliferative disorders. J Mol Diagn 2006; 8(2): 170-7.

29. Horn T, Kremer M, Dechow T, Pfeifer WM, Geist B, Perker M, et al. Detection of the activating JAK2 V617F mutation in paraffin-embedded trephine bone marrow biopsies of patients with chronic myeloproliferative diseases. J Mol Diagn 2006; 8(3): 299-304.

30. Haq AU. Transformation of polycythemia vera to Ph-positive chronic myelogenous leukemia. Am J Hematol 1990; 35(2): 110-3.

31. Mirza I, Frantz C, Clarke G, Voth AJ, Turner R. Transformation of polycythemia vera to chronic myelogenous leukemia. Arch Pathol Lab Med 2007; 131(11): 1719-24.

Archive of SID

www.SID.ir

Journal of Isfahan Medical School **Original Article**

May 2010, Vol 28, No 105 Received: 19.4.2009 Accepted: 25.12.2009

Evaluation of JAK2 V617F Mutation and Correlations of This Mutation with Clinical and Laboratory Findings in Patients with Myeloproliferative Neoplasms

Fatemeh Nadali PhD[1], Shirin Ferdowsi MSc[2], Nahid Einollahi PhD[3], Seyed Asadollah Mousavi MD[4], Bahram Chahardouli MSc[5], Golamreza Togheh MD[4], Kamran Alimoghaddam MD[4], Ardeshir Ghavamzadeh MD[6], Seyed Hamidollah Ghaffari PhD[7]

Abstract

Background: In 2005, multiple groups identified a high frequency of the V617F (G→T) mutation in the tyrosine kinase gene JAK2 in myeloproliferative neoplasms. In this study, we evaluated prevalence of JAK2 mutation and it's clinical and laboratory correlates in patients with myeloproliferative neoplasms (MPNs).

Methods: The JAK2 mutation was investigated with ARMS-PCR in 92 patients with myeloproliferative neoplasms by simple randomized sampling.

Findings: The JAK2 V617F mutation was detected in 86.6% (26/30) of patients with polycythemia vera, 46.6% (7/15) of patients with essential thrombocythemia, 61.5% (8/13) of patients with idiopathic myelofibrosis, and 14% (4/34) of patients with chronic myeloid leukemia. Polycythemia vera patients carrying the mutation displayed a higher levels of WBC (P = 0.03); 61.5% (16/26) of these patients were female and 17 patients had splenomegaly. One patient had simultaneously JAK2 V617F mutation and Philadelphia chromosome. The differences in other groups were not significant. The mutation was confirmed by sequencing.

Conclusion: These correlations imply that detection of this mutation will not only have a diagnostic value, but also a role in treatment given the development of STAT/JAK pathway inhibiting drugs.

Keywords: JAK2 V617F mutation, myeloproliferative neoplasms, ARMS-PCR.

Archive of SID

[1] Associate Professor, Department of Pathology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.
[2] MSc, School of Allied Health Sciences, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[3] Assistant Professor, School of Allied Health Sciences, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[4] Assistant Professor, Department of Hematology-Oncology and BMT Research Center, Shariati Hospital, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[5] MSc, School of Medicine, University of Tarbiat Modares, Tehran, Iran
[6] Professor, Department of Hematology-Oncology and BMT Research Center, Shariati Hospital, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[7] Associate Professor, Department of Hematology-Oncology, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
Corresponding Author: Seyed Hamidollah Ghaffari PhD, E-mail: shgaffari2000@yahoo.com

www.SID.ir