مجله دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران (پیاورد سلامت) دوره ۲ شماره ۳ پاییز ۱۳۸۷، ۲۵-۱۶

Downloaded from payavard.tums.ac.ir at 8:05 IRST on Saturday March 17th 2018

ارزیابی جهش JAK2V617F در نئوپلاسم های میلوپرولیفراتیو کلاسیک غیر CML به روش ARMS-PCR

دکتر فاطمه نادعلی[۱]، شیرین فردوسی[۲]، بهرام چاردولی[۳]، دکتر غلام رضا توگه [٤]، دکتر ناهید عین الهی[۵]، دکتر سید اسداله موسوی[۶]، دکتر کامران علی مقدم[۷]، دکتر اردشیر قوام زاده[۸]، دکتر سید حمید اله غفاری[۹]*

چکیده

زمینه و هدف: *نئوپلاسم های میلوپرولیفراتیو (MPNs) یک گروه هتروژن از بیماریهایی هستند که در آنها یک اختلال کلونال اولیه در سطح سلول بنیادی خونساز منجر به افزایش تولید در یک یا چند رده سلول خونی می شود. اخیرا جهش اکتسابی JAK2 V617F در تعداد زیادی از این بیماران شناسایی شده است. این جهش ناشی از تغییر G به T در نوکلئوتید ۱۸۴۹ در اگزون ۱۲ از ژن JAK2 واقع بر روی کروموزوم ۹ است که منجر به جایگزینی اسیدآمینه فنیل آلانین به جای والین در موقعیت ۶۱۷ از پروتئین JAK2 می گردد .مطالعه حاضر به منظور تعیین این جهش انجام شد.*

روش بررسی *: مطالعه انجام شده از نوع تجربی بود. در این مطالعه جهشJAK2 V617F با روش نمونه گیری تصادفی ساده، در ۵۸ بیمار با تشخیص جدید یا در حال درمان مبتلا به بدخیمی های میلوپرولیفراتیو با روش سیستم تکثیر متزلزل جهش ها (ARMS-PCR) مورد ارزیابی قرار گرفت. روش ARMS-PCR یک تست سریع و آسان است. به علاوه، امکان افتراق ما بین افراد هموزیگوت و هتروزیگوت دارای جهشJAK2 V617F را فراهم می سازد. برای تایید نتایج، سه نمونه از بیماران مورد sequencing قرار گرفتند.*

نتیجه گیری :جهش در ۸۶/۶ درصد (۲۶/۳۰) بیماران پلی سیتمی ورا، ۴۶/۶ درصد (۷/۱۵) بیماران ترومبوسیتمی اولیه، و ۶۱/۵ درصد (۸/۱۳) بیماران میلوفیبروز اولیه شناسایی شد. بیماران جهش مثبت پلی سیتمی ورا، میزان گلبولهای سفید بالاتری داشتند(p=0.03). به علاوه ۱۶ بیمار از ۲۶ بیمار پلی سیتمی ورا JAK2 مثبت، زن بودند. در سایر گروهها تفاوت قابل توجهی یافت نشد. وجود جهش توسط روش sequencing مورد تایید قرارگرفت.

نتایج *: میزان جهش ژن JAK2 در گروه مطالعه، قابل مقایسه با نتایج گزارش شده قبلی هست. بنابراین روش ARMS-PCR می تواند به عنوان یک تست تشخیص افتراقی در بیماران مشکوک به نئوپلاسم های میلوپرولیفراتیو BCR-ABL منفی (MPNs) استفاده شود.*

واژه های کلیدی: *جهش JAK2، نئوپلاسم های میلوپرولیفراتیو، سیستم تکثیر متزلزل جهش ها*

* نویسنده مسئول :
دکتر سید حمید اله غفاری ؛
مرکز تحقیقات خون، انکولوژی و پیوند مغز استخوان دانشگاه علوم پزشکی تهران

Email :shgaffari 2000@yahoo.com

– دریافت مقاله : مرداد ۸۷ – پذیرش مقاله : مهر ۸۷

مقدمه

نئوپلاسم های میلوپرولیفراتیو (MPNs) یک گروه هتروژن از بیماریهایی هستند که در آنها یک اختلال کلونال اولیه در سطح سلول بنیادی خونساز منجر به افزایش تولید در یک یا چند رده سلول خونی می شود (۲-۱). William Domeshek در سال ۱۹۵۱، تشابهات فنوتیپی در بین لوسمی میلوئید

[۱] استادیار گروه پاتولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان
[۲] کارشناس ارشد هماتولوژی و بانک خون، دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران
[۳] کارشناس ارشد مرکز تحقیقات خون، انکولوژی و پیوند مغز استخوان دانشگاه علوم پزشکی تهران
[۴] استادیار مرکز تحقیقات خون، انکولوژی و پیوند مغز استخوان دانشگاه علوم پزشکی تهران
[۵] استادیار گروه علوم آزمایشگاهی دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران
[۶] استادیار مرکز تحقیقات خون، انکولوژی و پیوند مغز استخوان دانشگاه علوم پزشکی تهران
[۷] دانشیار مرکز تحقیقات خون، انکولوژی و پیوند مغز استخوان دانشگاه علوم پزشکی تهران
[۸] استاد مرکز تحقیقات خون، انکولوژی و پیوند مغز استخوان دانشگاه علوم پزشکی تهران
[۹] دانشیار مرکز تحقیقات خون، انکولوژی و پیوند مغز استخوان دانشگاه علوم پزشکی تهران

Downloaded from payavard.tums.ac.ir at 8:05 IRST on Saturday March 17th 2018

مزمن(CML)، پلی سیتمی ورا (PV) ، ترومبوسیتمی اولیه (ET)، و میلوفیبروز اولیه (PMF) را مشخص و آنها را تحت عنوان بیماریهای میلوپرولیفراتیو مزمن (MPD) طبقه بندی نمود.

درسال ۱۹۶۰، در CML یک شاخص سیتوژنتیک خاص (Bcr-Abl) به صورت کروموزوم فیلادلفیا t (9 ; 22) مشخص و یک طبقه بندی جدید بر اساس این شاخص ملکولی ایجاد شد و به این ترتیب MPD کلاسیک به صورت $BCR\text{-}ABL^{+}$ یعنی CML و BCR-ABL یعنی PV، ET و PMF طبقه بندی شد (۳). در طبقه بندی جدیدی که سازمان جهانی بهداشت در سال ۲۰۰۸ برای بیماریهای میلوپرولیفراتیو مزمن گزارش نموده است واژه «نئوپلاسم» به جای «بیماری» به کار رفته و«نئوپلاسم های میلوپرولیفراتیو» جایگزین «بیماریهای میلوپرولیفراتیو مزمن» شده است (۴).

در اوایل ۱۹۷۴، مشخص شد که یک زیر جمعیت از پیش سازهای اریتروئیدی در PV می توانند در in vitro در غیاب اریتروپویتین رشد کنند و این تست برای تشخیص ابتدایی PV از اشکال ثانویه اریتروسیتوز مورد استفاده قرار گرفت. با وجود این تشکیل کلونی اریتروئید آندوژن (EEC) خاص PV نیست و در تعدادی از بیماران ET، PMF ، و CML و در بیماران مبتلا به بیماریهای ترومبوتیک همچون سندرم Budd chiari نیز دیده می شود. از طرفی وجود اریتروسیتوز یکی از تظاهرات شایع در ابتدای پلی سیتمی ورا هست و باید آن را از انواع دیگر اریتروسیتوز افتراق داد (۱). در سال ۲۰۰۵ ارتباط مابین بیماریهای PV، ET و PMF از طریق شناسایی یک موتاسیون اکتسابی تیروزین کیناز JAK2 بیشتر مشخص شد (۳). Janus Kinase 2 (JAK2) یک تیروزین کیناز سیتوپلاسمی است که یک دومین تیروزین کیناز فعال JAK homology 1 (JH2)، یک دومین سودوکیناز غیر فعال از نظر کاتالیتیک JAK homology 2 (JH2) ، یک دومین SRC homology 2 (SH2) و یک دومین همولوژی N–ترمینال FERM (4-point-1 ,Erzin ,Radixin ,Moesin) دارد که محل اتصال به رسپتورهای سایتوکاین تیپ ۱ است (۵-۴). این جهش از طریق تغییر G به T در نوکلئوتید ۱۸۴۹ در اگزون ۱۲ از ژن JAK2 واقع بر روی کروموزوم ۹ مشخص می شود که منجر به جایگزینی اسیدآمینه فنیل آلانین به جای والین در موقعیت ۶۱۷ از پروتئین JAK2 می گردد (۱۰-۶). پروتئین های خانواده JAK2، واسطه اثرات سایتوکاین های هماتوپویتیک همچون ترومبوپویتین (TPO)، اریتروپویتین(EPO)، و فاکتور محرک کلونی گرانولوسیت (G-CSF) از طریق فسفریلاسیون عوامل سیتوپلاسمیک همچون STAT(signal transducers and activators of transcription) هستند و بروز جهش منجر به فعالسازی مداوم JAK2 در غیاب سایتوکاین می شود. بنابراین جهش JAK2 V617F یک فاکتور مستعد کننده برای پیشرفت MPN محسوب می گردد (۱۱). از اینرو کشف این جهش در تشخیص، پیش آگهی و پیش بینی پاسخ درمان مفید است (۱۲). Kralovics گزارش کرد که بیماران دارای جهش JAK2 V617F یک بیماری طولانی تر همراه با درصد بالاتری از عوارض بیماری (میلوفیبروز، ترومبوز و خونریزی) دارند (۹). به دلیل اینکه جهش در یک نسبت کمی از جمعیت گرانولوسیتی وجود دارد یک روش حساس برای تشخیص آن مورد نیاز است (۱۳). تا کنون چندین تکنیک برای شناسایی این جهش بکار برده شده است،

از جمله: Genomic DNA-PCR-Sequencing ، RT-PCR ، ARMS-PCR ، Allele –Specific PCR، PCR-Restriction Analysis و Red-Time PCR(۱۴).

در مطالعه حاضر با استفاده از روش ARMS-PCR

Downloaded from payavard.tums.ac.ir at 8:05 IRST on Saturday March 17th 2018

میزان شـیوع جهـش JAK2 V617F در بیمـاران PV، ET و PMF مورد ارزیابی قرار گرفته است.

مواد و روشها

پس از اخذ رضایت، نمونه های خون محیطی ۵۸ بیمار با تشخیص جدید یا در حال درمان مبتلا به بدخیمی های میلوپرولیفراتیو و ۵۰ نمونه کنترل طبیعی 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 پرونده پزشکی آنها استخراج شد. بیماران شامل ۳۰ بیمار پلی سیتمی ورا، ۱۳ بیمار میلوفیبروز اولیه و ۱۵ بیمار ترومبوسیتمی اولیه بودند. ۲۹ بیمار (۵۰٪) مونث و ۲۹ بیمار (۵۰٪) مذکر بودند. میانگین سنی کل بیماران ۵۳ سال با حداقل سنی ۱۸ سال و حداکثر ۷۶ سال بود.

استخراج DNA :

از هر فرد مبتلا مقدار ۵ میلی لیتر خون وریدی در لوله های حاوی ضد انعقاد EDTA گرفته شد و DNA توسط روش پروتئیناز K از خون تام استخراج شد. برای این منظور به طور خلاصه خون بیمار سانتریفوژ شده و به رسوب سلولی جهت لیز نمودن سلولها، آب مقطر اضافه شد. سپس به سلولها بافرتـریس یک مـولار و SDS ده درصـد و پروتئیناز K (۲۰ میلی گرم در میلی لیتر) اضافه نموده و پس از انکوباسیون شبانه ، کلرید سدیم ۶ مولار به محلول سلولی اضافه شد و پس از سانتریفوژ نمودن، اتانول ۷۰ درصد اضافه شد. پس از سانتریفوژ نهایی به رسوب DNA آب مقطر اضافه کرده و جذب نوری در طول ۲۶۰ نانومتر اندازه گیری شد. با استفاده از جذب نوری ۲۶۰:۲۸۰ OD و به دست آوردن عدد بالای ۱/۷ از خلوص DNA اطمینان حاصل شد.

آزمایش واکنش زنجیره ای پلیمراز با سیستم تکثیر متزلزل جهش ها (ARMS-PCR) :

این روش امکان شناسایی تغییر یک باز منفرد را تحت شرایط PCR ایده ال، فراهم می سازد. این روش مناسب برای تشخیص جابه جایی باز منفرد G→T در موتاسیون JAK2 است. تکنیک ARMS-PCR از ۴ پرایمر استفاده می کند: یک پرایمر Forward (FO) Outer، 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 ۰/۵µl و غلظت Rmt برابر با ۱ µl بود. محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۳ درصد الکتروفورز شده و سپس توسط اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شده و از نظر وجود یا عدم وجود جهش مورد بررسی قرار گرفتند. پرایمرهای FO و RO از ژن JAK2 یک باند ۴۶۳ bp می دهند. پرایمرهای Fwt و RO یک آلل wild-typeرا تکثیر و باعث تولید یک باند ۲۲۹ bp می شوند و پرایمرهای F0 و Rmt یک باند ۲۷۹ bp از آلل موتانت ایجاد می کنند (جدول ۱).

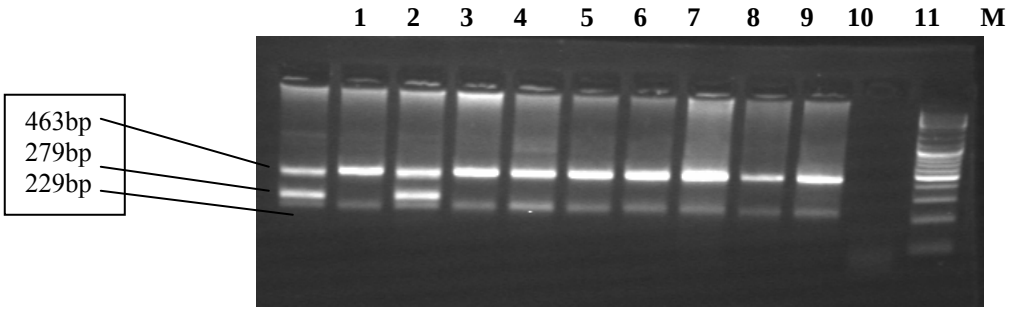
Downloaded from payavard.tums.ac.ir at 8:05 IRST on Saturday March 17th 2018

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'

Chen و همکارانش حساسیت این تست را در تشخیص جهش JAK2 ۰/۰۵ تا ۰/۱ درصد گزارش کرده اند (۱۵).

این روش افتراق ما بین افراد هموزیگوت و هتروزیگوت جهش مثبت را ممکن می سازد و یک نقش کلیدی در تشخیص وجود و یا عدم وجود جهش در بیماران MPN به عنوان یک تست غربالگری قابل اعتماد دارد (۱۶). دماهای مورد استفاده جهت تکثیر ژن JAK2 در جدول ۲ آمده است. جهت تایید وجود جهش و صحت روش کار تعدادی از نمونه های مثبت تعیین توالی شدند (شکل۱) .



شکل ۱: ARMS-PCR جهت غربالگری جهش JAK2 V617F

شکل(۱):ARMS-PCR جهت غربالگری جهش JAK2V617F. ستون ۱ کنترل مثبت و ستون ۳ یک بیمار JAK2 مثبت را نشان می دهد. ستونهای ۲،۴،۵،۶،۷،۸، بیماران JAK2 منفی و ستونهای ۹ و ۱۰ کنترل سالم، ستون ۱۱ کنترل منفی و ستونM سایز مارکر را نشان می دهد.

جدول۲ : دماهای مورد استفاده در واکنش زنجیره ای 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
توسعه نهایی	۱۰ دقیقه	۷۲

Downloaded from payavard.tums.ac.ir at 8:05 IRST on Saturday March 17th 2018

نتایج

در مطالعه حاضر ۵۸ بیمار مبتلا به بدخیمی های میلوپرولیفراتیو، مراجعه کننده به مرکز تحقیقات خون، انکولوژی و پیوند مغز استخوان بیمارستان شریعتی و بیمارستان امام خمینی از نظر بیان ژن JAK2 V617F با استفاده از روش ARMS-PCR مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج آزمایشها از قبیل CBC و سیتوژنتیک، تشخیص های مورفولوژیک، زمان تشخیص اولیه و غیره از پرونده پزشکی بیماران استخراج شد. داده های بیماران وارد SPSS 16 شد و مورد تجزیه و تحلیل آماری به روش Mann-Whitney Test قرار گرفت. به علاوه ۵۰ نمونه سالم نیز به عنوان کنترل بررسی شدند که از نظر وجود جهش منفی بودند.

از ۳۰ بیمار پلی سیتمی ورا ۲۶ نفر دارای جهش بودند (۸۶٪). به علاوه جهش در ۸ بیمار از ۱۳ بیمار میلوفیبروز ایدیوپاتیک (۶۱٪) و ۷ بیمار از ۱۵ بیمار ترومبوسیتمی اولیه (۴۶٪) یافت شد. ۱۸ مورد از ۲۹ بیمار مرد (۱۰ بیمار PV، ۳ بیمار ET و ۵ بیمار PMF) و ۲۳ مورد از ۲۹ بیمار زن (۱۶ بیمار PV، ۴ بیمار ET و ۳ بیمار PMF) دارای جهش بودند (جدول ۳).

جدول ۳ : درصد فراوانی جهش JAK2 V617F در بیماران مبتلا به نئوپلاسم های میلوپرولیفراتیو و به تفکیک نوع بیماری

نوع بیماری	جهش مثبت	جهش منفی
پلی سیتمی ورا	٪۸۶ (۲۶/۳۰)	٪۱۴ (۴/۳۰)
میلوفیبروز اولیه	٪۶۱ (۸/۱۳)	٪۳۹ (۵/۱۳)
ترومبوسیتمی اولیه	٪۴۶ (۷/۱۵)	٪۵۴ (۸/۱۵)
مجموع بیماران	(۴۱/۵۸)	(۱۷/۵۸)
مرد به زن	۱۸/ ۲۳	۶/۱۱

در بیماران پلی سیتمی ورا از ۳۰ بیمار مورد مطالعه ۲۶ بیمار (۸۶٪) 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 ($p=0.03$). اما در سایر داده ها تفاوت مهمی مشاهده نشد. از آنجا که پرونده بیشتر بیماران فاقد اطلاعات سیتوژنتیک بود امکان بررسی ارتباط شیوع جهش با ناهنجاریهای سیتوژنتیک مقدور نشد. از ۲۶ بیمار تنها ۲ بیمار دارای جهش هموزیگوت و بقیه دارای جهش هتروزیگوت بودند. بنابراین از آنجا که تعداد بیماران هموزیگوت کم بود آنالیز آماری جداگانه برای این گروه انجام داده نشد (جدول۴).

Downloaded from payavard.tums.ac.ir at 8:05 IRST on Saturday March 17th 2018

جدول ۴: وضعیت جهش JAK2 در بیماران پلی سیتمی ورا

	جهش مثبت	جهش منفی	P
تعداد بیماران	۲۶	۴	
مرد به زن	۱۶/۱۰	۰/۴	
میانگین سنی	۵۴	۵۱	
شمارش گلبولهای سفید ($۱۰^{۳}$ بر لیتر)			
میانگین ± انحراف معیار	۲۲/۲۶ ± ۳۷/۶	۵/۹۵ ± ۱/۴۳	۰/۰۳
هموگلوبین(گرم بر لیتر)			
میانگین ± انحراف معیار	۱۶/۹۸ ± ۱/۸۰۵	۱۸/۳ ± ۱/۱۵۱	۰/۱
هماتوکریت(٪)			
میانگین ± انحراف معیار	۵۱/۶۳ ± ۷/۹۳	۵۲/۳۲ ± ۴/۱۰۱	۰/ ۷
اسپلنومگالی			
طبیعی به غیر طبیعی	۹/۱۷	۳/۱	

در بیماران میلوفیبروز اولیه (جدول ۵) و نیز ترومبوسیتمی اولیه (جدول۶) تفاوت مهمی ما بین بیماران JAK2 V617F مثبت و منفی مشاهده نگشت.

جدول ۵: وضعیت جهش JAK2 در بیماران میلوفیبروز اولیه

	جهش مثبت	جهش منفی	P
تعداد بیماران	۸	۵	
مرد به زن	۵/۳	۳/۲	
میانگین سنی	۵۷	۵۱	
شمارش گلبولهای سفید ($۱۰^{۳}$ بر لیتر)			
میانگین ± انحراف معیار	۱۲/۴ ± ۶/۹۹	۵/۹۲ ± ۲/۰۵	۰/۱
هموگلوبین(گرم بر لیتر)			
میانگین ± انحراف معیار	۹/۸۷ ± ۳/۲۸	۷/۲۰ ± ۲/۱۴	۰/۳
هماتوکریت (٪)			
میانگین ± انحراف معیار	۲۹/۳۸ ± ۸/۲۳	۲۹/۲۴ ± ۷/۴۷	۰/۶
اسپلنومگالی			
طبیعی به غیر طبیعی	۱/۷	۱/۵	

Downloaded from payavard.tums.ac.ir at 8:05 IRST on Saturday March 17th 2018

جدول ۶: وضعیت جهش JAK2 در بیماران ترومبوسیتمی اولیه

	جهش مثبت	جهش منفی	P
تعداد بیماران	۷	۸	
مرد به زن	۳/۴	۵/۳	
میانگین سنی	۵۰	۵۴	
شمارش گلبولهای سفید ($۱۰^{۳}$ بر لیتر)			
میانگین ± انحراف معیار	۸/۷۵ ± ۲/۲۵	۶/۸۸ ± ۴/۹۴	۰/۰۷
هموگلوبین(گرم بر لیتر)			
میانگین ± انحراف معیار	۱۳/۶۰ ± ۲/۴۹	۱۳/۶۰ ± ۱/۱۶	۰/۵
هماتوکریت(٪)			
میانگین ± انحراف معیار	۳۷/۹۲ ± ۸/۴۸	۴۰/۱۶ ± ۲/۴۵	۰/۶
اسپلنومگالی			
طبیعی به غیر طبیعی	۵/۲	۷/۱	

بحث

تشخیص بیماران MPN منفی از نظر BCR-ABL، بر پایه معیارهای آزمایشگاهی و کلینیکال است که با پیشرفت تستهای جدیدتر متحمل تغییرات اساسی شده است. کشف اخیر جهشJAK2 V617F فرصتی برای اصلاح معیارهای تشخیصی موجود و طبقه بندی بیماری فراهم نموده است. مطالعه حاضر شیوع بالای جهش JAK2 V617F را در بیماران PV ، ET و PMF تایید می کند. باید توجه داشت که تعداد کمی از موارد PV، جهش را ندارند که نیازمند معیارهای دیگری برای تشخیص قطعی PV است. با وجود این، شناسایی این جهش، امکان افتراق ما بین بیماران با یک MPN حقیقی و آنهایی که یک اریتروسیتوز یا ترومبوسیتوز ثانویه را دارند به وجود آورده است.

در مطالعه حاضر میزان شیوع جهشJAK2 V617F در ۵۸ بیمار مبتلا به نئوپلاسم های میلوپرولیفراتیو مراجعه کننده به بخش خون و انکولوژی بیمارستان شریعتی و امام خمینی با روش ARMS-PCR مورد بررسی قرار گرفت. در مطالعه مشابهی که توسط Jones و همکارانش (۱۶) با روش ARMS-PCR در سال ۲۰۰۵ انجام گرفت، میزان شیوع جهش در بیماران پلی سیتمی ورا ۸۱ درصد (۵۸/۷۲)، در ترومبوسیتمی اولیه ۴۱ درصد (۲۴/۵۹) و در میلوفیبروز اولیه ۴۳ درصد (۱۵/۳۵) گزارش شده است.

در این مطالعه میزان شیوع جهش در بیماران PV، ۸۶ درصد به دست آمد که قابل مقایسه با یافته های James (۸۶ درصد) (۷) ، Jelinek (۸۶ درصد) (۱۸) و Jones (۸۱ درصد) (۱۶) است. بالاترین میزان شیوع توسط گروه Lippert (۹۷ درصد) با روش allele-specific quantitative reaction (qPCR) polymerase chain (۱۹) و کمترین ۶۵ درصد توسط

Downloaded from payavard.tums.ac.ir at 8:05 IRST on Saturday March 17th 2018

گروه Kralovics (۹) با روش microsatellite mapping و DNA sequencing به دست آمده است. در مطالعه Speletas و همکارانش (۱۴) بیماران جهش مثبت پلی سیتمی ورا، سطوح بالاتر گلبولهای سفید را نشان دادند (p=0.02). به علاوه در این گروه از بیماران شیوع اسپلنومگالی بالاتر بود. در این مطالعه نیز میزان گلبولهای سفید بالاتر (p=0.03) و شیوع بالای اسپلنومگالی (۱۷ مورد از ۲۶ بیمار جهش مثبت) به دست آمد. در مطالعه Levine و همکارانش (۸) ارتباط مهمی ما بین حضور آلل موتانت و جنس مونث در بیماران PV (۸۳ درصد زنان در مقابل ۶۴ درصد مردان) ثابت شده است. در این مطالعه نیز از ۲۶ بیمار جهش مثبت پلی سیتمی ورا، ۱۶ بیمار (۶۱/۵ درصد) زن بودند. در مطالعه Levine دلیلی برای این ارتباط بیان نشده و می توان چنین نتیجه ای را به نمونه های 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 تخمین های قبلی (۸،۲۲،۱۶) از شیوع جهش در این اختلال است که البته در مقایسه با مطالعه Jones (۱۶) شیوع بالاتری به دست آمده است. شیوع نسبتاً بالای گزارش شده در اینجا ممکن است انعکاسی از تعداد بیماران مطالعه شده باشد.

Campbell گزارش کرد (۲۲) که بیماران میلوفیبروز اولیه JAK2 مثبت، شمارش گلبول سفید و نوتروفیل بالاتری از بیماران جهش منفی دارند. اما اندازه طحال، شمارش پلاکت و سطوح هموگلوبین تفاوت مهمی ما بین دو گروه نشان نمی دهد. نتایج به دست آمده در این مطالعه هیچ تفاوت مهمی ما بین دو گروه جهش مثبت و منفی حتی در میزان WBC نشان نداد. بالاترین میزان شیوع گزارش شده در بیماران PMF مربوط به مطالعه Jelink (۱۸) با روش pyrosequencing با شیوع ۹۵ درصد است که از ۱۹ بیمار، ۱۸ مورد جهش را نشان دادند و کمترین میزان مربوط به مطالعه Levine (۸) با شیوع ۳۵ درصد است که از ۴۶ بیمار، ۱۶ مورد مثبت بودند. در اینجا نیز ارتباط ما بین جهش و سن بالاتر در تشخیص یافت شد. این ارتباط ما بین سن و جهش JAK2 بیانگر تاثیر سن بر روی ناپایداری ژنتیکی است.

در بیماران ترومبوسیتمی اولیه نیز شیوع ۴۶ درصد به دست آمد. در مطالعه Campbell و همکارانش(۱۷) بر روی ۸۰۶ بیمار مبتلا به ET، ۴۱۴ نفر (۵۳/۴ درصد) مثبت و ۳۶۲ نفر (۴۶/۶درصد) منفی بودند. این گروه گزارش کرد که بیماران JAK2 مثبت افزایش قابل توجه هموگلوبین (p<0.0001)، شمارش نوتروفیل (p<0.0001)، اریتروپوئز و گرانولوپوئز مغز استخوان، ترومبوز رگی بیشتر و یک نسبت بالاتر از تغییر شکل پلی سیتمیک نسبت به افراد بدون جهش دارند. در مطالعه حاضر آنالیز داده های بیماران ET هیچ تفاوت معنی داری در میزان RBC، WBC، HCT،PLT و Hb نشان نداد. در توجیه این مساله می توان این طور بیان کرد که در مقایسه با مطالعات Campbell تعداد نمونه های مورد بررسی بسیار کمتر (۱۵ نمونه) است.

به علاوه در این مطالعه نتایج با sequencing مورد بررسی قرار گرفت و جهش با این روش تایید شد که مشابه با یافته های Baxter (۶)، Levin (۸) ، Kralovics (۹)، zhao (۱۰)، و J ones (۱۶) است.

نتیجه گیری

تشخیص جهش JAK2 V617F اهمیت کلینیکال و تشخیصی زیادی دارد. روشن است که شیوع بالای این جهش در بیماران PV می تواند در افزایش تشخیص پلی سیتمی ورا از اریتروسیتوز ثانویه کمک کننده باشد. شناسایی این جهش می تواند نیاز برای بررسی های بیشتر همچون توده گلبول قرمز (Red Cell Mass) و بیوپسی مغز استخوان را کاهش دهد.

Downloaded from payavard.tums.ac.ir at 8:05 IRST on Saturday March 17th 2018

به علاوه، در بیماران دارای ترومبوسیتوز، استفاده از آنالیز JAK2 V617F ممکن است در تشخیص بیماران با یک اختلال سلول بنیادی کمک کننده باشد. کشف imatinib توسط دکتر Brian Draker برای درمان CML بر پایه شناسایی تیروزین کیناز bcr-abl بود که تقریباً دو دهه اخیر اتفاق افتاد. این امید وجود دارد که کشف جهش JAK2 منجر به پیشرفت مهارکننده های دارویی خاص مشابه، با توانایی درمان PV، ET و PMF شود. اگر چه سوالاتی وجود دارد که نیازمند ارزیابی دقیق است. اول اینکه آیا تولید دارویی با داشتن فعالیت ترجیحی بر علیه ژن موتانت به جای wild-type JAK2 ممکن است و اینکه مسمومیت هماتولوژیکال مهمی ایجاد نکند؟

تشکر و قدردانی

این مطالعه حاصل یک طرح تحقیقاتی مصوب مرکز تحقیقات هماتولوژی- انکولوژی و پیوند مغز استخوان دانشگاه علوم پزشکی تهران است که از مسئولین و کلیه کارشناسان آن تشکر و قدردانی می شود.

منابع

1- Vainchenker W, Constantinescu SN. A unique activating mutation in JAK2 (V617F) is at the origin of polycythemia vera and allows a new classification of myeloproliferative diseases. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2005:195-200.

2- McLornan D, Percy M, McMullin MF. JAK2 V617F: A single mutation in the myeloproliferative group of disorders. Ulster Med J. 2006 May; 75(2): 112–119.

3- Tefferi A, Gilliland G. Oncogenes in myeloproliferative disorders . Cell Cycle.2007 March; 6(5):550-558.

4.Tefferi A, Vardiman JW. Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: the 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms. Leukemia. 2008 Jan; 22(1):14-22.

5- 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 Dec; 8(6):1327–38.

6- 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 Mar 19-25; 365(9464):1054-61.

7- 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 Apr 28; 434(7037): 1144-8.

8- 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 Apr; 7(4): 387-97.

9- 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 Apr, 352(17):1779-1790.

Downloaded from payavard.tums.ac.ir at 8:05 IRST on Saturday March 17th 2018

10- 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 Jun; 280(24):22788–22792.

11- 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 Jun; 20(6): 1055-1060.

12- Chen Q, Lu P, Jones AV, Cross NC, Silver RT, Wang YL. Amplification refractory mutation system , a highly sensitive and simple polymerase chain reaction assay, for the detection of JAK2V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders. J Mol Diagn. 2007 Apr; 9(2): 272-6.

13- Levine RL, Wernig G. Role of JAK-STAT signaling in the pathogenesis of myeloproliferative disorders. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2006: 233-239.

14- Speletas M, Katodritou E, Daiou C, Mandala E, Papadakis E, Kioumi A, et al. Correlations of JAK2-V617F mutation with clinical and laboratory findings in patients with myeloproliferative disorders. Leuk Res. 2007 Aug; 31(8):1053-62.

15. Chen Q, Lu P, Jones AV, Cross NC, Silver RT, Wang YL. Amplification refractory mutation system, a highly sensitive and simple polymerase chain reaction assay, for the detection of JAK2V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders. J Mol Diagn. 2007 Apr; 9(2): 272-6.

16- Jones AV, Kreil S, Zoi K, Waghorn K, Curtis C, Zhang L, et al. Widespread occurrence of the JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders. Blood. 2005 Sep 15;106(6):2162-8.

17- 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 Dec 3;366(9501):1945-53.

18- 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 Nov 15; 106(10):3370-3.

19- Lippert E, Boissinot M, Kralovics R, Girodon F, Dobo I, Praloran V, et al. The JAK2-V617F mutation is frequently present at diagnosis in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. Blood. 2006 Sep; 108(6): 1865–1867.

20- 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 May; 8(2): 170-177.

21- 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 Jul; 8(3): 299-304.

22- 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 Mar 1;107(5):2098-100.