

## ارزیابی جهش JAK2 V617F در بیماران ایرانی مبتلا به نئوپلاسم‌های میلوپرولیفراتیو کلاسیک غیر CML

دکتر بهزاد پوپک<sup>۱</sup>، هاجر میرمنگره<sup>۲</sup>، دکتر علی اکبر پورفتح‌اله<sup>۳</sup>، دکتر رمضانعلی شریفیان<sup>۴</sup>، دکتر حمید رضوانی<sup>۵</sup>،  
دکتر فاضل الهی<sup>۶</sup>، دکتر منوچهر کیهانی<sup>۴</sup>، دکتر مجتبی قدیانی<sup>۵</sup>، دکتر سعید کاویانی<sup>۷</sup>، کبری فراهانی<sup>۸</sup>،  
ابوالفضل یوسفیان<sup>۹</sup>، محمدعلی جهانگیرپور<sup>۱۰</sup>، محمدعلی شمسیان<sup>۱۱</sup>

### چکیده

#### سابقه و هدف

جهش سوماتیک نقطه‌ای در ژن پروتئین تیروزین کیناز JAK2 (JAK2 V617F) باعث جابجایی G با T در اگزون ۱۲ ژن JAK2 می‌شود که منجر به فعالیت خودبخودی پروتئین JAK2 و انتقال پیام غیر وابسته به سیتوکاین می‌گردد و در نتیجه باعث تکثیر کلونال پیش‌سازهای خونساز در MPNs می‌شود. با توجه به این که تاکنون در ایران، هیچ گزارشی از جهش JAK2 V617F و اهمیت آن در تشخیص بیماران مبتلا به نئوپلاسم‌های میلوپرولیفراتیو ارائه نشده است، مطالعه حاضر به منظور تعیین این جهش انجام شد.

#### مواد و روش‌ها

مطالعه انجام شده از نوع تجربی بود. در این مطالعه جهش JAK2 با روش نمونه‌گیری تصادفی ساده، در ۱۰۰ بیمار با تشخیص جدید و یا در حال درمان مبتلا به بدخیمی‌های میلوپرولیفراتیو مورد ارزیابی قرار گرفت. گروه مورد مطالعه شامل بیماران مبتلا به پلی‌سیتمی ورا (۴۴ نفر)، بیماران مبتلا به میلو فیروز اولیه (۳۱ نفر) و بیماران مبتلا به ترومبوسیتمی اولیه (۲۵ نفر) بودند. برای تعیین جهش، ابتدا DNA ژنومیک از بافی کوت تهیه شده از خون محیطی استخراج شد و تعیین جهش به روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با آلل اختصاصی (Allele Specific PCR) انجام شد. برای تایید نتایج، واکنش هضم آنزیمی (RFLP) به وسیله آنزیم محدودالتر BsaXI صورت گرفت.

#### یافته‌ها

۷۲٪ (۸۳-۶۱) CI: ۹۵٪) بیماران مبتلا به نئوپلاسم‌های میلوئیدی مورد بررسی، دارای جهش بودند. با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با آلل اختصاصی و واکنش هضم آنزیمی، جهش JAK2 در ۸۹٪ (۱۰۰-۷۸) = ۹۵٪ CI: بیماران پلی‌سیتمی ورا، ۶۱٪ (۱۰۰-۲۲) CI: ۹۵٪) بیماران میلو فیروز اولیه و ۵۶٪ (۱۰۰-۱۲) = ۹۵٪ CI: بیماران ترومبوسیتمی اولیه وجود داشت.

#### نتیجه‌گیری

میزان جهش ژن JAK2 در گروه مطالعه، قابل مقایسه با نتایج گزارش شده قبلی می‌باشد. بنابراین می‌توان بر اساس معیارهای تشخیصی سازمان بهداشت جهانی از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با آلل اختصاصی برای شناسایی این جهش در بیماران ایرانی مشکوک به نئوپلاسم‌های میلوپرولیفراتیو Bcr-Abl منفی (MPNs) استفاده نمود.

**کلمات کلیدی:** جهش JAK2، پروتئین تیروزین کیناز، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، موتاسیون، نئوپلاسم‌ها

تاریخ دریافت: ۸۷/۳/۲۷

تاریخ پذیرش: ۸۷/۱۰/۲۴

- ۱- مؤلف مسؤول: PhD هماتولوژی و بانک خون - استادیار دانشگاه آزاد اسلامی واحد پزشکی تهران - صندوق پستی: ۱۹۳۹۵/۱۴۹۵
- ۲- کارشناس ارشد هماتولوژی و بانک خون - دانشگاه تربیت مدرس
- ۳- PhD ایمونولوژی - استاد دانشگاه تربیت مدرس
- ۴- فوق تخصص خون و انکولوژی - استاد دانشگاه علوم پزشکی تهران
- ۵- فوق تخصص خون و انکولوژی - استادیار دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
- ۶- فوق تخصص خون و انکولوژی - استادیار دانشگاه علوم پزشکی تهران
- ۷- PhD هماتولوژی و بانک خون - استادیار دانشگاه تربیت مدرس
- ۸- کارشناس علوم آزمایشگاهی - دانشگاه آزاد اسلامی واحد پزشکی تهران
- ۹- کارشناس ارشد خون شناسی و بانک خون - مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران
- ۱۰- کارشناس علوم آزمایشگاهی - آزمایشگاه پیوند
- ۱۱- کارشناس پرستاری - بیمارستان امام خمینی

**مقدمه**

در طبقه‌بندی جدیدی که سازمان جهانی بهداشت در سال ۲۰۰۸ برای بیماری‌های میلوپرولیفراتیو مزمن (CMPDs) گزارش نموده است، واژه «نئوپلاسم» به جای «بیماری» به کار رفته و «نئوپلاسم‌های میلوپرولیفراتیو» (MPNs) جایگزین بیماری‌های میلوپرولیفراتیو مزمن (CMPDs) شده است. در این طبقه‌بندی، نئوپلاسم‌های میلوپرولیفراتیو شامل لوسمی میلوژنوس مزمن (CML)، پلی‌سیتمی ورا (PV)، میلو فیروز اولیه (PMF)، لوسمی نوتروفیلی مزمن، لوسمی ائوزینوفیلی مزمن، سندرم هایپر ائوزینوفیلی، بیماری ماست سل و بدخیمی‌های طبقه‌بندی نشده وجود دارند (۱).

MPNs بدخیمی‌های کلونال خونی هستند که در اثر اختلال در سلول استم سل خونساز ایجاد می‌گردند. این اختلال باعث افزایش فعالیت خونسازی می‌شود و معمولاً با افزایش تولید سلول‌های خونی همراه است که عموماً یک رده به صورت غالب افزایش می‌یابد. هنوز پاتوژنز مولکولی این بدخیمی‌ها به طور کامل مشخص نشده است (۲، ۳).

در بررسی‌های انجام شده بر روی بیماران پلی‌سیتمی ورا، گزارش شده که سلول‌های پیش‌ساز اریتروئیدی در عدم حضور اریتروپوئیتین در محیط کشت، کلنی تشکیل می‌دهند. بعد از آن نیز محققان مشاهده نمودند که پیش‌سازهای اریتروئیدی و میلوئیدی در بیماران PV، ET و PMF، به تعدادی از فاکتورهای رشد خونی حساسیت بالایی را نشان می‌دهند (۴، ۳). با توجه به مشاهدات فوق به نظر می‌رسد ناهنجاری اولیه ناشی از اختلال در انتقال پیام توسط گیرنده‌های فاکتورهای رشد باشد (۵، ۶).

Janus Kinase 2 (JAK2) یک تیروزین کیناز سیترولاسمی است که نقش مهمی در انتقال پیام فاکتورهای رشد حاصل از چندین گیرنده خونساز از جمله اریتروپوئیتین، ترومبوپوئیتین، فاکتور رشد کلنی گرانولوسیتی (G-CSF) و فاکتور رشد کلنی گرانولوسیتی - مونوسیتی (GM-CSF) را به عهده دارد (۷، ۸). این تیروزین کیناز دارای یک دومین تیروزین کینازی فعال

JAK 1 JAK1homology (JH1) و یک دومین سودوکینازی غیر فعال (JH2) می‌باشد. در اثر موتاسیون در ژن JAK2، دومین JH2 خاصیت خود مهارکنندگی (Autoinhibitory) که از فسفریلاسیون گیرنده جلوگیری می‌کند را از دست داده و باعث فعال شدن خودبخودی این تیروزین کیناز می‌شود که این تغییر با نئوپلاسم‌های میلوپرولیفراتیو همراه خواهد بود (۸-۱۰). مشاهده شده است جهش در ژن JAK2 منجر به ازدیاد حساسیت به سیتوکاین و ایجاد اریتروسیتوز در مدل موشی می‌گردد (۱۱).

ژن JAK2 بر روی بازوی کوتاه کروموزوم شماره ۹ قرار داشته و شامل ۲۵ اگزون است که جهش مذکور در اگزون ۱۲ اتفاق می‌افتد. در اثر این جهش، نوکلئوتید گوانین در جایگاه نوکلئوتیدی شماره ۱۸۴۹ به تیمین تغییر یافته و در نتیجه اسید آمینه فنیل آلانین در جایگاه شماره ۶۱۷ جایگزین والین می‌شود و از این رو جهش حاصل را V617F می‌گویند (۱۲). در حال حاضر اعتقاد بر این است که تمامی نئوپلاسم‌های میلوپرولیفراتیو، حاصل تغییر در سلول بنیادی بوده و اختلاف فنوتیپی آن‌ها به تفاوت در انتقال پیام که ناشی از جهش‌های ایجاد شده در تیروزین کینازها یا مولکول‌های مرتبط است، مربوط می‌باشد (۱۳). ارتباط موتاسیون JAK2 V617F با نئوپلاسم‌های میلوپرولیفراتیو از جمله PV، ET و PMF اولین بار در سال ۲۰۰۵ توسط پنج گروه تحقیقاتی گزارش شد (۱۴-۱۸).

به دنبال این گزارش گروه‌های دیگر در کشورهای مختلف این جهش را در نئوپلاسم‌های میلوپرولیفراتیو و نئوپلاسم‌های خونی دیگر مورد ارزیابی قرار دادند. با توجه به عدم وجود گزارش در مورد فراوانی جهش ژن JAK2 در کشورمان، مطالعه حاضر بر روی بیماران ایرانی مبتلا به بدخیمی‌های میلوپرولیفراتیو انجام شد.

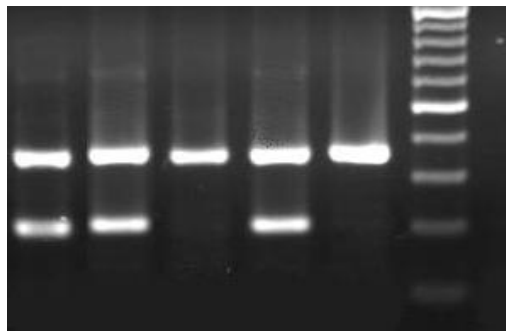
**مواد و روش‌ها**

مطالعه انجام شده از نوع تجربی بود. در این پژوهش با روش نمونه‌گیری تصادفی ساده، تعداد ۱۰۰ بیمار مبتلا به پلی‌سیتمی ورا، میلو فیروز اولیه و ترومبوسیتمی اولیه با تشخیص جدید و یا در حال درمان مراجعه کننده به بخش خون و انکولوژی بیمارستان امام خمینی و مطب برخی

شامل می‌شد (جدول ۱). آغازگرهای J1 و J3 محصول ۳۶۴ bp (آل‌های موتان و wild-type) و آغازگرهای J2 و J3 محصول ۲۰۳ bp را، زمانی که بیمار دارای جهش JAK2-V617F بود تکثیر می‌کردند. دماهای مورد استفاده جهت تکثیر ژن JAK2 در جدول ۲ آمده است.

جدول ۱: آغازگرهای استفاده شده جهت شناسایی جهش JAK2 V617F

|                                         |
|-----------------------------------------|
| <b>Reverse (J1):</b>                    |
| 5-CTGAATAGTCCTACAGTGTTCAGTTTCA-3        |
| <b>Forward (Specific) (J2):</b>         |
| 5-AGCATTGGTTTAAATTATGGAGTATATT-3        |
| <b>Forward (Internal control) (J3):</b> |
| 5-ATCTATAGTCATGCTGAAAGTAGGAGAAAG-3      |



شکل ۱: نتایج شناسایی جهش JAK2 V617F به روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز با آلل اختصاصی:

باند ۳۶۴ bp مربوط به آلل wild-type و جهش‌دار و باند ۲۰۳ bp مربوط به آلل موتان است. به دلیل هتروزیگوت بودن تمام موارد جهش‌دار، دو باند مشاهده می‌گردد، که یکی مربوط به آلل جهش‌دار و دیگری آلل wild type است. فرد فاقد جهش هموزیگوت و فقط یک باند ۳۶۴ bp مشاهده می‌شود.

ستون ۱ و ۲: بیماران دارای جهش، ستون ۳: بیمار فاقد جهش، ستون ۴: کنترل مثبت، ستون ۵: کنترل منفی (نمونه فرد سالم) SM، سایز مارکر، ۱۰۰ bp MM: کنترل منفی (فاقد DNA).

بعد از انجام، PCR، الکتروفورز بر روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد (سیگما، آلمان) با بافر TBE (Tris Borate EDTA Buffer) انجام شد و وجود یا عدم وجود جهش بر اساس باندهای مشاهده شده تعیین گردید. وجود یک باند ۳۶۴ bp نمایانگر عدم وجود جهش (wild type) و وجود باند ۳۶۴ bp و باند ۲۰۳ bp نمایانگر وجود جهش (mutant) از

پزشکان فوق تخصص خون و انکولوژی تهران از نظر جهش JAK2 بررسی شدند. تشخیص بیماری بر اساس یافته‌های بالینی، اسپیراسیون و بیوپسی مغز استخوان، رنگ‌آمیزی سیتوشیمی و معیارهای تشخیصی استاندارد این بیماری‌ها انجام شده بود. بیماران شامل ۴۴ بیمار پلی‌سپتیمی‌ورا، ۳۱ بیمار میلوفیبروز اولیه و ۲۵ بیمار ترومبوسیتمی اولیه بودند. ۶۰ بیمار (۶۰٪) مونث و ۴۰ بیمار (۴۰٪) مذکر بودند. میانگین سنی کل بیماران  $54 \pm 17$  سال با حداقل سنی ۲۷ سال و حداکثر ۸۹ سال بود.

#### استخراج DNA:

مقدار ۲ میلی‌لیتر خون محیطی بیماران با ضد انعقاد EDTA ۰/۵ مولار جمع‌آوری گردید. لایه مربوط به گلبول‌های سفید (بافی‌کوت) از نمونه‌های جمع‌آوری شده جدا و DNA آن‌ها با استفاده از کیت استخراج (High pure PCR template، روش، آلمان) استخراج شد. برای اطمینان از کیفیت DNA استخراج شده، مراحل کنترل کیفی که شامل تعیین غلظت DNA، درجه خلوص (OD ۲۶۰/۲۸۰)، الکتروفورز ژل آگاروز و انجام PCR با آغازگرهای ژن  $\beta$  گلوبین بود انجام شد.

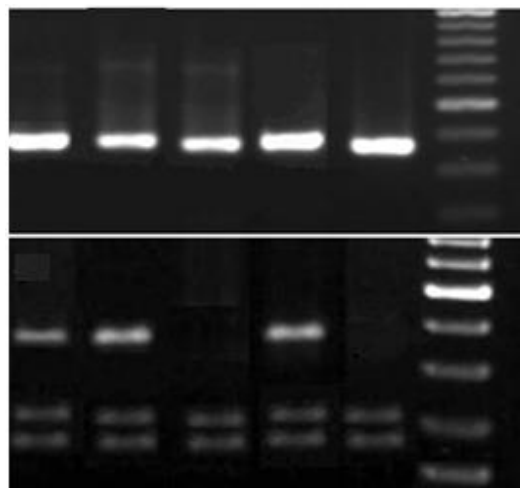
#### آزمایش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز با آلل اختصاصی (Allele Specific PCR):

برای تکثیر ژن JAK2 از روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز با آغازگرهای اختصاصی آلل (Allele Specific PCR) و به روش چند تایی (Multiplex) استفاده شد (۱۴).

واکنش PCR بعد از بهینه‌سازی، در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر و در ۳۵ چرخه انجام شد. برای هر واکنش از dNTP به غلظت ۲۰۰ میکرومول، کلرور منیزیم به غلظت ۱/۵ میلی‌مول، آغازگر J1 به غلظت ۲۰-۱۰ پیکومول و آغازگرهای J2 و J3 هر کدام به غلظت ۱۵-۱۰ پیکومول به همراه ۵۰ تا ۱۰۰ نانوگرم DNA استفاده گردید.

آغازگرهای استفاده شده برای هر واکنش PCR انجام شده، ۲ عدد آغازگر جلوبرنده که یکی اختصاصی موتان (J2)، دیگری به عنوان کنترل داخلی (J3) و یک عدد آغازگر عقب برنده که اختصاصی wild type است (J1) را

نوع هتروزیگوت بود (شکل ۱).



شکل ۲: نتایج شناسایی جهش JAK2 V617F به روش واکنش هضم آنزیمی بوسیله آنزیم BsaXI

الف: نتایج PCR با استفاده از دو آغازگر J1 و J3 :

باند ۳۶۴ bp محصول دو آغازگر J1 و J3 است. در همه نمونه‌های دارای جهش و فاقد جهش یک باند ۳۶۴bp تکثیر شد.

ب: نتایج واکنش هضم آنزیمی توسط آنزیم محدودالایر BsaXI : آلل wild-type دارای ناحیه برش برای این آنزیم است و دو قطعه ۱۶۱ bp و ۲۰۳ bp ایجاد می‌شود اما آلل موتان محل برش ندارد. نمونه‌های جهش‌دار چون هتروزیگوت هستند، قطعه ۳۶۴ bp که مربوط به آلل موتان است به صورت هضم نشده باقی می‌ماند و قطعه مربوط به آلل wild type برش می‌خورد. در نتیجه ۳ باند ۳۶۴ bp، ۱۶۱ bp و ۲۰۳ bp در این افراد دیده می‌شود. اما در فرد فاقد جهش هر دو آلل برش می‌خورد و تمام محصول دچار هضم آنزیمی می‌شود.

ستون ۱ و ۲: بیماران دارای جهش، ستون ۳: بیمار فاقد جهش، ستون ۴: کنترل مثبت، ستون ۵: نمونه کنترل منفی (فرد سالم)، SM: ساینز مارکر ۱۰۰ bp، MM: کنترل منفی (فاقد DNA)

جدول ۲: دماهای مورد استفاده در واکنش زنجیره پلی‌مراز جهت شناسایی جهش JAK2 V617F

| مراحل              | زمان     | دما (°C) |
|--------------------|----------|----------|
| واسرشته‌سازی اولیه | ۵ دقیقه  | ۹۴       |
| واسرشته‌سازی       | ۳۰ ثانیه | ۹۴       |
| اتصال              | ۴۵ ثانیه | ۵۸       |
| توسعه              | ۳۰ ثانیه | ۷۲       |
| توسعه نهایی        | ۵ دقیقه  | ۷۲       |

واکنش هضم آنزیمی به وسیله آنزیم محدودالایر (RFLP):

جهت تایید نتایج واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با آلل اختصاصی، آزمایش RFLP بر روی محصول PCR انجام شد. برای انجام آزمایش RFLP ابتدا یک واکنش PCR مشابه واکنش قبلی انجام شد با این تفاوت که آغازگرهای J1 و J3 و دمای اتصال ۶۰ درجه سانتی‌گراد به کار گرفته شد. محصول واکنش PCR یک قطعه ۳۶۴ bp بود که با اثر آنزیم محدودالایر BsaXI (بیولب، انگلستان) هضم آنزیمی در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۶ ساعت انجام شد. سپس محصول واکنش بر روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد با بافر TBE الکتروفورز شد. آلل wild-type دارای ناحیه برش برای آنزیم BsaXI می‌باشد و دو قطعه ۲۰۳ bp و ۱۶۱ bp در اثر برش ایجاد می‌شود، اما آلل موتان که دارای جابجایی باز آلی G با T نبود جایگاه برش آنزیمی نداشته و به صورت هضم نشده باقی ماند (شکل ۲).

#### یافته‌ها

بیماران مبتلا به بدخیمی‌های میلوپرولیفراتیو در این مطالعه از نظر وجود جهش JAK2 V617F مورد بررسی قرار گرفتند. ۷۲/۸۳ (۶۱-۹۵٪) (CI) بیماران مبتلا به نئوپلاسم‌های میلوئیدی مورد بررسی، دارای جهش بودند. از این میان، ۸۹/۱۰۰ (۷۸-۹۵٪) (CI) بیماران پلی‌سیتمی اولیه (۳۹/۴۴)، ۶۱/۱۰۰ (۲۲-۹۵٪) (CI) بیماران میلو فیروزاییدوپاتیک (۱۹/۳۱) و ۵۶/۱۰۰ (۱۲-۹۵٪) (CI) ترمبوسیتمی اولیه (۱۴/۲۵) بودند.

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

| نوع بیماری            | جهش مثبت    | جهش منفی    |
|-----------------------|-------------|-------------|
| پلی‌سیتمی‌ورا         | ۸۹ (۳۹/۴۴)  | ۱۱ (۵/۴۴)   |
| میلو فیروز ایدیوپاتیک | ۶۱ (۱۹/۳۱)  | ۳۹ (۱۲/۳۱)  |
| ترمبوسیتمی اولیه      | ۵۶ (۱۴/۲۵)  | ۴۴ (۱۱/۲۵)  |
| مجموع بیماران         | ۷۲ (۷۲/۱۰۰) | ۲۸ (۲۸/۱۰۰) |
| مرد به زن             | ۳۲/۴۰       | ۸/۲۰        |
| سن (سال)، میانگین ±   | ۵۸ ± ۱۵     | ۵۲ ± ۱۷     |
| انحراف معیار          |             |             |

میزان جهش در بیماران PV، ۶۵ درصد، در بیماران ET، ۲۳ درصد و در بیماران PMF، ۵۷ درصد گزارش شد (۱۶). جیمز و همکاران، میزان موتاسیون در بیماران PV را ۸۸ درصد و در بیماران ET و PMF ۴۳ درصد گزارش نمودند (۱۵).

پاسامونتی و همکاران با استفاده از روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز کمی، میزان جهش را در ۹۲ درصد بیماران PV، ۷۲ درصد بیماران PMF و ۵۳ درصد بیماران ET گزارش نمودند (۱۹).

به طور کلی در مطالعاتی که در کشورهای مختلف انجام شده است، میزان جهش JAK2 V617F در بیماران PV بین ۶۵ تا ۹۷ درصد، PMF ۳۵ تا ۵۷ درصد و ET ۲۳ تا ۵۷ درصد گزارش شده است (۱۹، ۱۸-۱۴).

اختلاف در میزان گزارش‌ها، احتمالاً به دلیل اختلاف در معیارهای تشخیص نئوپلاسم‌های ذکر شده از یک طرف و نوع روش به کار گرفته شده و حساسیت روش از طرف دیگر می‌باشد. هم چنین در مقایسه روش کمی با روش کیفی، شناسایی موتاسیون مشاهده می‌شود که ممکن است درمان بر روی میزان آلل موتان (Mutation allele burden) تاثیر بگذارد و باعث نتایج منفی کاذب گردد (۲۱، ۲۰). لوین و همکاران گزارش کردند، زمانی که از یک روش PCR کمی حساس استفاده می‌شود، میزان جهش در بیماران PV تا ۹۹ درصد افزایش می‌یابد. از طرفی برخی بیماران ET نیز که با روش تعیین توالی جهش را نشان ندادند، بعد از انجام PCR با روش کمی مثبت شدند و درصد جهش در این بیماران به ۷۲ درصد رسید، که این موضوع با مطالعه‌های دیگر نیز تایید شد (۲۲، ۱۷).

گروه‌های تحقیقاتی مختلف این جهش را در بیماری‌های خونی دیگر از جمله ۲۰ درصد مجموع نئوپلاسم‌های میلوپرولیفراتیو از قبیل بیماری ماست سل، سندرم هایپرائوزینوفیلی، لوسمی نوتروفیلیک مزمن، لوسمی میلومونوسیتی مزمن و لوسمی میلومونوسیتی جوانان و ۳ درصد موارد لوسمی میلوئیدی حاد و سندرم میلودیسپلاستیک گزارش نموده‌اند. اما در هیچ کدام از بدخیمی‌های غیر خونی و بدخیمی‌های خونی غیر میلوئیدی مانند لوسمی لنفوبلاستیک حاد و مزمن، لنفوم

میانگین سنی  $\pm$  انحراف معیار بیماران مبتلا به نئوپلاسم‌های مورد مطالعه که دارای این جهش بودند،  $58 \pm 15$  سال و میانگین سنی  $\pm$  انحراف معیار بیماران فاقد جهش  $52 \pm 17$  سال بود.

با وجودی که سن بیماران دارای جهش در مجموع بیماری‌ها و به تفکیک نوع بیماری بیشتر از بیماران فاقد جهش بود، اما این اختلاف معنی‌دار نبود. ضمناً میزان بروز جهش در مجموع بیماران زن بیشتر از مرد بود، اما این تفاوت نیز معنی‌دار نبود (جدول ۳).

جهت تحلیل نتایج از آزمون کای‌دو و محاسبه درصد فراوانی، میانگین و انحراف معیار از نرم‌افزار SPSS ۱۵ استفاده شد.

## بحث

در این مطالعه با استفاده از روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با آلل اختصاصی، موتاسیون JAK2 V617F بررسی شد و با روش RFLP نتایج حاصل از PCR تایید گردید. نتایجی که از این مطالعه به دست آمد نشان داد که موتاسیون JAK2 V617F را می‌توان در ۸۹ درصد بیماران مبتلا به PV، ۶۱ درصد بیماران MF و ۵۶ درصد بیماران ET مشاهده نمود.

به طور کلی این موتاسیون در ۷۲ درصد کل مبتلایان به این سه نوع MPNs وجود دارد که فراوانی این جهش تقریباً مشابه موارد گزارش شده از دیگر کشورهاست. با وجود این که میزان جهش در زنان بیمار بیشتر از مردان بود، اما این ارتباط معنی‌دار نبود، هم چنین میانه سنی افراد دارای جهش مثبت بیشتر از افراد جهش منفی بود اما این اختلاف نیز معنی‌دار نبود.

در تحقیقی که توسط باکستر و همکاران اولین بار در سال ۲۰۰۵ انجام شد، میزان جهش در بیماران با استفاده از مقایسه دو روش PCR اختصاصی آلل (Allele-specific PCR) و تعیین توالی (Sequencings)، در پلی‌سیتمی‌ورا بین ۹۳ تا ۱۰۰ درصد (به طور متوسط ۹۷ درصد)، در بیماران IMF بین ۲۶ تا ۷۴ درصد (به طور متوسط ۵۰ درصد) و در بیماران ET ۴۳ تا ۷۰ درصد (به طور متوسط ۵۷ درصد) به دست آمد (۱۴).

در پژوهش دیگری که توسط کراوودیک انجام شد،

هوچکین و غیر هوچکین و همین طور موارد تکثیر، واکنشی گزارش نشده است (۲۳-۳۳).

جهش در ژن JAK2 می‌تواند به صورت هتروزیگوت و هموزیگوت باشد اما به منظور جداسازی این دو از هم، توصیه بر این است که ابتدا گرانولوسیت‌ها از خون محیطی جدا شوند و تعیین جهش بر روی DNA جدا شده از گرانولوسیت انجام گیرد. با توجه به این که در مطالعه حاضر صرفاً از بافی‌کوت استفاده شد، به دلیل همراه شدن لنفوسیت‌ها که فاقد جهش می‌باشند افتراق هتروزیگوت و هموزیگوت امکان‌پذیر نبود. مطالعه‌ها نشان داده است هموزیگوسیتی در این بیماران به نوترکیبی میتوتیک کروموزوم ۹ (Loss Of Heterozygosity = LOH) مربوط می‌شود. با مطالعه بر روی گرانولوسیت‌های جدا شده از بیماران MPNs، هموزیگوسیتی در PV بیشتر از بقیه نئوپلاسم‌ها مشاهده شده و تا ۳۰ درصد موارد PV جهش مثبت را در برمی‌گیرد (۳۴، ۳۵).

با توجه به این که با معاینه‌های بالینی و تعیین برخی پارامترهای آزمایشگاهی مانند هموگلوبین، هماتوکریت، شمارش پلاکت، توده گلبول قرمز (Red Cell Mass) و غیره و برخی روش‌های دیگرمانند هیستولوژی مغز استخوان که به طور روتین صورت می‌گیرد، نمی‌توان تمام موارد پلی‌سپتیمی (اولیه، ثانویه و فامیلی) و نیز انواع ترومبوسیتمی را از هم افتراق داد، لذا استفاده از شناسایی جهش JAK2 V617 ژن JAK2 به منظور افتراق پلی‌سپتیمی اولیه از سایر موارد پلی‌سپتیمی و نیز ET از موارد واکنشی بسیار سودمند است. گاهی ممکن است در این بیماران به دلیل بزرگ شدن طحال، میزان پلاکت‌های به دام افتاده در آن باعث کاهش پلاکت خون به طور کاذب و از طرفی افزایش نسبی میزان پلاسمای خون و کاهش هماتوکریت به صورت کاذب شود و در نتیجه باعث ایجاد خطا در تشخیص گردد که در این گونه موارد بررسی جهش ژن JAK2 بسیار کمک کننده است (۱).

به دلیل درصد فراوانی بالای این جهش به خصوص در PV، شناسایی جهش JAK2 راه ساده و دقیقی است که وجود یک بیماری کلونال را اثبات می‌کند و در یک بیمار مشکوک به این نئوپلاسم‌ها در کنار سایر پارامترهای

تشخیصی، به تشخیص قطعی و تعیین کلونال بودن آن کمک می‌نماید (۲۴، ۱۴). لازم است در مواردی که بیمار دارای برخی علائم مانند ترومبوسیتوز، گرانولوسیتوز، فیبروز مغز استخوان، اسپلنومگالی بدون دلیل مشخص می‌باشد و مشکوک به یکی از بیماری‌های میلوپرولیفراتیو است، جهش JAK2 V617F مورد بررسی قرار گیرد. باید توجه داشت که مثبت بودن جهش JAK2 وجود یک نئوپلاسم میلوپرولیفراتیو را نشان می‌دهد اما منفی شدن آن وجود بیماری را رد نمی‌کند. علاوه بر تشخیص، مطالعه‌های انجام شده بیانگر ارتباط این موتاسیون با پیش آگهی بیماری است و بسیاری از مطالعه‌ها نشان داده است بیمارانی که دارای این موتاسیون هستند دارای هموگلوبین، هماتوکریت، شمارش پلاکت بالاتر هستند و اسپلنومگالی نیز در آن‌ها بیشتر است. هم چنین احتمال ترومبوز و هموراژی در آن‌ها شایع‌تر بوده، اگر چه در این مورد نظریه‌های مختلفی وجود دارد (۲۴، ۹).

شناسایی جهش در ژن JAK2 در ایجاد طبقه‌بندی جدید برای بدخیمی‌های میلوپرولیفراتیو نقش داشته است. در طبقه‌بندی جدید سازمان جهانی بهداشت در سال ۲۰۰۸ تعیین جهش JAK2 V617F به عنوان یک معیار اساسی به همراه ارزیابی ژن Bcr-Abl برای تشخیص نئوپلاسم‌های میلوپرولیفراتیو مطرح گردیده است و با توجه به فراوانی بالای آن در نئوپلاسم‌های ذکر شده، کمک می‌کند از دیگر لوسمی‌های میلوژنیک مزمن مانند لوسمی میلومونوسیتیک مزمن، لوسمی میلومونوسیتیک جوانان و لوسمی میلوئیدی آتپیک و هم چنین از سندرم میلودیسپلاستیک (MDS) جدا گردد (۳۶، ۱).

برخی محققین معتقدند می‌توان برای درمان نئوپلاسم‌های ذکر شده مهار کننده‌های پروتئین کینازی تهیه نمود تا با مهار جهش JAK2، بیماری را درمان نمود و برای رسیدن به این هدف نیاز به مطالعه بیشتر برای درک بهتر مکانیسم نئوپلاسم وجود دارد تا بتوان به درمان اختصاصی‌تری برای آن‌ها دست یافت (۳۷، ۱۹).

با توجه به این که جهش ژن JAK2 تنها در حدود ۵۰ درصد موارد PMF و ET وجود دارد و نیز نبود روش استاندارد شده برای شناسایی آن در دنیا و همچنین

برای بیماران پلی‌سیتمی‌ورا، ترومبوسیتمی اولیه و میلوپروزیروز اولیه با دیگر کشورهای جهان، استفاده از این آزمایش در تشخیص نئوپلاسم‌های میلوپرولیفراتیو امری ضروری بوده و قابلیت شناسایی موارد کلونال از خوش‌خیم را فراهم می‌سازد. در ضمن با توجه به اهمیت این جهش در پیش‌آگهی و انتخاب روش درمانی، ضرورت امر باید بیشتر مورد توجه قرار گیرد.

### تشکر و قدردانی

در خاتمه لازم می‌دانیم از آقایان دکتر صفایی و امیری، کارکنان بخش خون و انکولوژی بیمارستان امام خمینی و کارکنان محترم آزمایشگاه پیوند تشکر نمایم.

شناسایی جهش‌های جدید در آگزون ۱۲، این ژن در بیماران PV و جهش‌های دیگری علاوه بر جهش ژن JAK2 در این نئوپلاسم‌ها، باعث شده شناسایی این جهش به عنوان تنها آزمون تشخیص این نئوپلاسم‌ها نباشد و تعیین جهش JAK2 V617F در کنار سایر آزمایش‌ها از جمله اریتروپوئیتین، مغز استخوان و تعیین وجود بیان فیوژن ژن Bcr-Abl جهت تشخیص نئوپلاسم‌های میلوپرولیفراتیو به کار رود (۳۹، ۳۸، ۲۰).

### نتیجه‌گیری

با توجه به فراهم شدن آزمایش مولکولی جهت شناسایی جهش JAK2 و آمار قابل مقایسه جهش این ژن

### References :

- 1- Tefferi A, Vardiman JW. Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms. *Leukemia Research* 2008; 22:14-22.
- 2- Tefferi A, Pardanani A. Mutation screening for JAK2V617F: When to order the test and how to interpret the results. *Leukemia Research* 2006; 30: 739-744.
- 3- Li Y, Hetet G, Maurer AM, Chait Y, Dhermy D, Briere J. Spontaneous megakaryocyte colony formation in myeloproliferative disorders is not neutralizable by antibodies against IL3, IL6 and GM-CSF. *Br J Haematol* 1994; 87:471-76.
- 4- Axelrad AA, Eskinazi D, Correa PN, Amato D. Hypersensitivity of circulating progenitor cells to megakaryocyte growth and development factor (PEG-rHu MGDF) in essential thrombocythemia. *Blood* 2000; 96:3310-21.
- 5- Kralovics R, Teo SS, Li S, Theodorides A, Buser AS, Tichelli A, *et al.* Acquisition of the V617F mutation of JAK2 is a late genetic event in a subset of patients with myeloproliferative disorders. *Blood* 2006; 108:1377-1380.
- 6- Hinshelwood S, Bench AJ, Green AR. Pathogenesis of polycythaemia vera. *Blood Rev* 1997; 11:224-32.
- 7- Feener EP, Rosario F, Dunn SL, Stancheva Z, Myers MGJ. Tyrosine phosphorylation of Jak2 in the JH2 domain inhibits cytokine signaling. *Mol Cell Biol* 2004; 24:4968-4978.
- 8- Kralovics R, Teo SS, Buser AS, Brutsche M, Tiedt R, Tichelli A. Altered gene expression in myeloproliferative disorders correlates with activation of signaling by the V617F mutation of Jak2. *Blood* 2005; 106:3374-3376.
- 9- McLornan D, Percy M, McMullin M. JAK2V617F : A single Mutation in the myeloproliferative group of disorders. *Ulser Med* 2006; 75:112-119.
- 10- Tefferi A. JAK2 Mutations in Polycythemia Vera, Molecular Mechanisms and Clinical Applications. *New England J of Medicine* 2005; 356:444-445.
- 11- Lacout C, Pisani DF, Tulliez M, Moreau Gachelin F, Vainchenker W, Villeval JL, *et al.* JAK2V617F expression in murine hematopoietic cells leads to MPD mimicking human PV with secondary myelofibrosis. *Blood* 2006; 108:1652-1660.
- 12- Berger R. A recurrent mutation of the JAK2 gene in chronic myeloproliferative disorders. *Pathologie Biologie* 2006; 54:182-184.
- 13- Pivak JL. The chronic myeloproliferative disorders: clonality and clinical heterogeneity. *Semin Hematol* 2004; 41: Suppl 3.
- 14- Baxter E.J, Scott LM, Campbell PJ, East C, Fourouclas N, Swanton S, *et al.* Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative diseases. *Lancet* 2005; 365:1054-1061.
- 15- Kralovics R, Passamonti F, Buser AS. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med* 2005; 352:1779-1790.
- 16- James C, Ugo V, Le Couedic JP. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature* 2005; 434:1144-1148.
- 17- Levine R, Wadleigh M, Cools J, Ebert B.J, Werning G, Huntly B.J.P, *et al.* Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell* 2005; 7:387-397.
- 18- 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; 280:22788-22792.
- 19- Passamonti F, Rumi E, Pietra D, Della Porta MG, Boveri E, Pascutto C, *et al.* Relation between JAK2 (V617F) mutation status, granulocyte activation and constitutive mobilization of CD34- positive cells into

- peripheral blood in myeloproliferative disorders. *Blood* 2005; 106:3377-9.
- 20- Jones AV, Silver RT, Waghorn K, Curtis C, Kreil S, Zoi K. Minimal molecular response in polycythemia vera patients treated with imatinib or interferon alpha. *Blood* 2006; 107:3339-3341.
  - 21- Kiladjian JJ, Cassinat B, Turlure P, Cambier N, Roussel M, Bellucci S. High molecular response rate of polycythemia vera patients treated with pegylated interferon alpha-2a. *Blood* 2006; 108:2037-2040.
  - 22- Lippert E, Boissinot M, Kralovics R, Girodon F, Dobo I, Praloran V. The JAK2-V617F mutation is frequently present at diagnosis in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Blood* 2006; 108:1865-7.
  - 23- 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; 106:2162-8.
  - 24- Jelinek J, Oki Y, Gharibyan V, Bueso-Ramos C, Prchal JT, Verstovsek S. JAK2 mutation 1849G > T is rare in acute leukemias but can be found in CMML, Philadelphia chromosome-negative CML, and megakaryocytic leukemia. *Blood* 2005; 106:3370-3.
  - 25- Johan MF, Goodeve AC, Bowen DT, Frew ME, Reilly JT. JAK2 V617F mutation is uncommon in chronic myelomonocytic leukemia. *Br J Haematol* 2005; 130:968.
  - 26- 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; 19:1843-4.
  - 27- Steensma DP, McClure RF, Karp JE, Tefferi A, Lasho TL, Powell HL, *et al.* JAK2 V617F is a rare finding in de novo acute myeloid leukemia, but STAT3 activation is common and remains unexplained. *Leukemia* 2006; 20:971-978.
  - 28- Steensma DP, Dewald GW, Lasho TL, Powell HL, McClure RF, Levine RL *et al.* The JAK2 V617F activating tyrosine kinase mutation is an infrequent event in both 'atypical' myeloproliferative disorders and myelodysplastic syndromes. *Blood* 2005; 106: 1207-1209.
  - 29- Scott LM, Campbell PJ, Baxter EJ, Todd T, Stephens P, Eddins S, *et al.* The V617F JAK2 mutation is uncommon in cancers and in myeloid malignancies other than the classic myeloproliferative disorders. *Blood* 2005; 106:2920-1.
  - 30- Sulong S, Case M, Minto L, Wilkins B, Hall A, Irving J. The V617F mutation in Jak2 is not found in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Br J Haematol* 2005; 130:964-72.
  - 31- McClure R, Mai M, Lasho T. Validation of two clinically useful assays for evaluation of JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders. *Leukemia* 2006; 20:168-71.
  - 32- Melzner J, 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; 20:157-8.
  - 33- Tefferi A, Vardiman JW. The diagnostic interface between histology and molecular tests in myeloproliferative disorders. *Curr Opin Hematol* 2007; 14:115-122.
  - 34- Tefferi A, Lasho TL, Schwager SM, Strand JS, Elliott M, Mesa R, *et al.* The clinical phenotype of wild-type, heterozygous, and homozygous JAK2(V617F) in polycythemia vera. *Cancer* 2006; 106:631-5.
  - 35- Stauffer Larsen T, Hasselbalch H.C, Pallisgaard N, Kerndrup G.B. A der (18)t(9;18)(p13;p11) and a der(9;18)(p10;q10) in polycythemia vera associated with a hyperproliferative phenotype in transformation to postpolycythemic myelofibrosis. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 2007; 172:107-112.
  - 36- Prchal JT. The amount of JAK2 617V>F matters. *Blood* 2007; 110:796-797.
  - 37- Wadleigh M, DeAngelo DJ, Griffin JD, Stone RM. After chronic myelogenous leukemia: tyrosine kinase inhibitors in other hematologic malignancies. *Blood* 2005; 105:22-30.
  - 38- Scott L.M, Tong W, Levine RL, Scott M.A, Beer P.A, Stratton M.R, *et al.* JAK2 Exon 12 Mutations in Polycythemia Vera and Idiopathic Erythrocytosis. *N Engl J Med* 2007; 356:459-68.
  - 39- Haeflrich T, Bacher U, Kern W, Schnittger S, Haeflrich C. The diagnosis of BCR/ABL-negative chronic myeloproliferative diseases (CMPD): a comprehensive approach based on morphology, cytogenetics, and molecular markers. *Ann Hematol* 2008; 87:1-10

## Evaluation of JAK2 V617F mutation in Iranian patients with non-CML myeloproliferative neoplasms

Poopak B.<sup>1</sup>(PhD), Mirmongereh H.<sup>2</sup>(MS), Pourfathollah A.A.<sup>2</sup>(PhD), Sharifian R.A.<sup>3</sup>(MD), Rezvani H.<sup>4</sup>(MD), Elahi F.<sup>3</sup>(MD), Keyhani M.<sup>3</sup>(MD), Ghedyani M.<sup>4</sup>(MD), Kaviani S.<sup>2</sup>(PhD), Farahani K.<sup>1</sup>(BS), Yousefian A.<sup>7</sup>(MS), Jahangir pour M.A.<sup>5</sup>(BS), Shamsian M.A.<sup>6</sup>(BS)

<sup>1</sup>Tehran Medical Unit, Islamic Azad University, Iran

<sup>2</sup>Hematology and Blood Banking Department, Tarbiat Modarres University, Tehran, Iran

<sup>3</sup>Blood and Oncology Department, Tehran University of Medical Sciences, Iran

<sup>4</sup>Blood and Oncology Department, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

<sup>5</sup>Payvand Laboratory, Tehran, Iran

<sup>6</sup>Blood and Oncology Unit, Imam Khomeini Hospital, Tehran, Iran

<sup>7</sup>Iranian Blood Transfusion Organization Research Center, Tehran, Iran

### Abstract

#### Background and Objectives

Somatic point mutation in JAK2 gene is characterized by G to T transversion at nucleotide 1849 in exon 12 in the JAK2 gene and results in autonomous activation of JAK2 protein. JAK2 mutation leads to independent cytokine signaling and clonal proliferation of hematopoietic cells in MPNs. Due to absence of any reports for JAK2 V617F mutation in Iranian MPNs patients and its important role in diagnosis, we decided to carry out this study.

#### Materials and Methods

In this experimental study, we evaluated JAK2 mutation in 100 MPNs patients with diagnosis of PV (n=44), PMF (n=31) and ET(n=25) by simple randomized sampling. After extraction of genomic DNA from whole blood buffy coat, detection of mutation was done using allele specific PCR. Agarose gel electrophoresis was used for observation of PCR products. For confirmation of results, PCR-RFLP using BsaXI was applied.

#### Results

Using allele specific PCR and PCR-RFLP, frequency of JAK2 V617F mutation was evaluated to be 89%, 61%, and 56% in PV, PMF and ET, respectively.

#### Conclusions

Frequency of JAK2 mutation in our study is compatible with previous reports. According to WHO criteria, allele specific PCR can be applied for detection of JAK2 mutation in Iranian patients with diagnosis of MPNs.

**Key words:** JAK2, Protein Tyrosine Kinase, Polymerase Chain Reaction, Mutation, Neoplasms  
*SJIBTO* 2009; 5(4): 237-245

Received: 16 June 2008

Accepted: 14 Jan 2009

Correspondence: Poopak B., PhD of Hematology. Assistant Professor of Tehran Medical Unit, Islamic Azad University.

P.O.Box: 15101816413, Tehran, Iran. Tel: (+9821) 22257438; Fax : (+9821) 22257438

E-mail: bpoopak@yahoo.com