

## فراوانی و اهمیت بررسی موتاسیون JAK2 V617F در بیماران ایرانی مبتلا به پلی‌سیتمی ورا، ترومبوسیتمی اساسی و میلو فیبروز اولیه

بهزاد پوپک<sup>۱</sup>، ابوالفضل یوسفیان<sup>۲</sup>، حمید رضوانی<sup>۳</sup>، رمضانعلی شریفیان<sup>۴</sup>، مجتبی قدیانی<sup>۳</sup>، فاضل الهی<sup>۵</sup>، عبدالعلی شهراسبی<sup>۶</sup>، محمد علی جهانگیرپور<sup>۷</sup>، بهاره صادقی<sup>۸</sup>، گلاره خسروی پور<sup>۹</sup>، میترا صلاح‌مندی<sup>۷</sup>، کبری فراهانی<sup>۱۰</sup>

<sup>۱</sup> استادیار، دکترای هماتولوژی و بانک خون آزمایشگاهی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد پزشکی تهران  
<sup>۲</sup> کارشناس ارشد هماتولوژی، آزمایشگاه تشخیص طبی پیوند  
<sup>۳</sup> استادیار، فوق تخصص هماتولوژی و انکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی  
<sup>۴</sup> استاد، فوق تخصص هماتولوژی و انکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تهران  
<sup>۵</sup> استادیار، فوق تخصص هماتولوژی و انکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تهران  
<sup>۶</sup> استادیار، فوق تخصص هماتولوژی و انکولوژی، دانشگاه آزاد، واحد علوم پزشکی تهران  
<sup>۷</sup> کارشناس آزمایشگاه، آزمایشگاه تشخیص طبی پیوند  
<sup>۸</sup> دانشجوی کارشناسی ارشد هماتولوژی، دانشگاه تربیت مدرس  
<sup>۹</sup> پزشک عمومی، آزمایشگاه تشخیص طبی پیوند  
<sup>۱۰</sup> کارشناس آزمایشگاه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد پزشکی تهران

### چکیده

**سابقه و هدف:** بررسی موتاسیون JAK2V617F در تشخیص و طبقه‌بندی نئوپلاسم‌های میلوپرولیفراتیو کاربرد گسترده‌ای یافته است. در این مطالعه، فراوانی موتاسیون JAK2 V617F در بیماران ایرانی مبتلا به پلی‌سیتمی ورا، ترومبوسیتمی اساسی و میلو فیبروز اولیه بررسی شد. **روش بررسی:** در این مطالعه بنیادی، نمونه خون محیطی ۱۷۴ بیمار مبتلا به پلی‌سیتمی ورا (۵۷ بیمار)، ترومبوسیتمی اساسی (۸۴ بیمار) و میلو فیبروز اولیه (۳۳ بیمار) از نظر موتاسیون JAK2V617F بررسی شد. DNA نمونه‌ها با روش پروتئیناز k از باقی‌کوت بدست آمده از خون محیطی استخراج گردید. پس از انجام کنترل کیفی، برای ارزیابی وضعیت موتاسیون JAK2 از واکنش زنجیره پلیمرز با پرایمرهای اختصاصی الل استفاده شد. محصولات PCR، پس از الکتروفورز روی ژل پلی‌اکریل‌امید و انجام رنگ‌آمیزی تفره ارزیابی شدند. **یافته‌ها:** موتاسیون JAK2V617F در ۶۳/۸ درصد (۱۱۱ نفر) نئوپلاسم‌های میلوپرولیفراتیو مشاهده گردید. ۸۲ درصد (۴۷ نفر) مبتلایان به پلی‌سایتمی ورا، ۵۷ درصد (۴۸ نفر) موارد ترومبوسیتمی اساسی و ۴۸ درصد (۱۶ نفر) مبتلایان به میلو فیبروز اولیه این موتاسیون را داشتند. **نتیجه‌گیری:** این مطالعه نشان داد که بررسی موتاسیون JAK2V617f با استفاده از روش اختصاصی الل در بیماران ایرانی مبتلا به نئوپلاسم‌های میلوپرولیفراتیو سرعت و دقت تشخیص نئوپلاسم‌های میلوپرولیفراتیو و متعاقب آن عاقبت بیماران مبتلا را ارتقاء می‌دهد. **واژگان کلیدی:** نئوپلاسم‌های میلوپرولیفراتیو، موتاسیون JAK2V617f، واکنش زنجیره پلیمرز.

### مقدمه

در طبقه‌بندی نئوپلاسم‌های میلوئیدی که توسط سازمان بهداشت جهانی در سال ۲۰۰۸ منتشر شد، بیماری‌های میلوپرولیفراتیو مزمن، نئوپلاسم‌های میلوپرولیفراتیو (MPNs)

آدرس نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد پزشکی، دکتر بهزاد پوپک

(email: bpoopak@yahoo.com)

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۸/۳/۲۵

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۸۸/۱۱/۳

نام گرفتند. در واقع، شناسایی ناهنجاری‌های مولکولی شایع مانند موتاسیون JAK2 در این گروه از بیماری‌ها ماهیت، کلونال یا نئوپلاستیک آنها را مشخص ساخت و به همین علت واژه نئوپلاسم جایگزین بیماری گردید. نئوپلاسم‌های میلوپرولیفراتیو کلاسیک (پلی‌سایتمی‌ورا [PV]، ترومبوسیتمی اساسی [ET]، میلوفیبروز اولیه [PM] و لوسمی میلوئیدی مزمن [CML]) دارای ویژگی‌های بالینی و آزمایشگاهی مشترک هستند. این نئوپلاسم‌ها ناشی از تکثیر کلونال سلول بنیادی چند کاره هستند که قادر به تمایز در راستای رده‌های سلولی گرانولوسیتیک، اریتروئید و مگاکاریوسیتیک می‌باشند. به علاوه، این نئوپلاسم‌ها دارای سیری مزمن هستند که در اکثر موارد منتهی به لوسمی حاد، میلوفیبروز و یا کوآگولوپاتی می‌شوند. ویژگی‌های بالینی اصلی نئوپلاسم‌های میلوپرولیفراتیو مزمن شامل خون‌سازی بی‌رویه خارج از مغز استخوان همراه با اسپلنومگالی، تبدیل به لوسمی حاد، وقوع فیبروز با درجات مختلف در مغز استخوان و خطر بالای بروز وقایع ترومبوتیک و خونریزی دهنده می‌باشند (۴-۲).

کشف کروموزم فیلادلفیا در لوسمی میلوئیدی مزمن و به دنبال آن معرفی داروی imatinib انقلابی در تشخیص و درمان این بدخیمی ایجاد کردند. شناسایی ناهنجاری ژنتیکی شایع در سایر نئوپلاسم‌های میلوپرولیفراتیو کلاسیک (PV, ET, PM) سال‌های متوالی ذهن محققین را مشغول خویش ساخته بود تا اینکه سرانجام در سال ۲۰۰۵ تلاش‌ها به ثمر رسید و موتاسیون شایع JAK2-V617F توسط چند گروه تحقیقاتی مستقل شناسایی و گزارش شد. این موتاسیون اکتسابی بدنال تبدیل G به T در نوکلئوتید ۱۸۴۹ اگزون ۱۲ ژن JAK2 ایجاد می‌شود که منجر به جابجایی اسید آمینه والین با فنیل آلانین در جایگاه ۶۱۷ (V617F) پروتئین JAK2 می‌گردد (۹-۵).

کینازهای JAK از ۴ دومین (domain) تشکیل شده‌اند:

۱- دومین N انتهایی به نام FERM که برای برهم‌کنش با گیرنده‌های سیتوکین‌ها مورد نیاز است.

۲- دومین SH2

۳- دومین شبه‌کیناز Pseudo kinase (JH2)

۴- کیناز C انتهایی (JH1)

موتاسیون V617F در دومین شبه‌کیناز (JH2) ایجاد شده است و موجب اختلال در مهار فعالیت کینازی آن می‌گردد (۲، ۱۰). موتاسیون JAK2 V617F با حساس‌تر نمودن سلول‌ها به پیام‌های تحریکی، رشد کلونال پیش‌سازهای خونی در نئوپلاسم‌های میلوپرولیفراتیو را به دنبال خواهد داشت (۱۱).

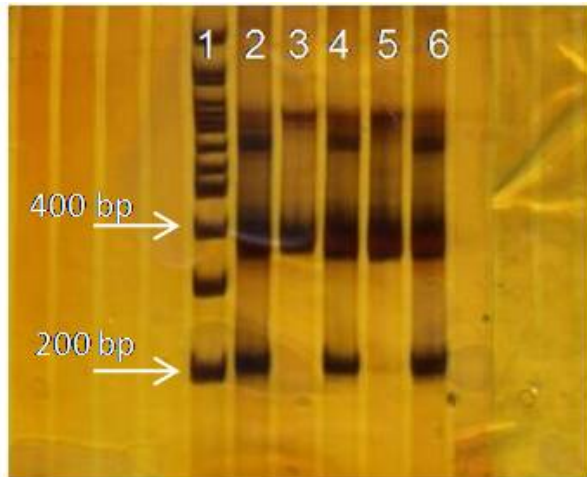
موتاسیون JAK2 در اکثر بیماران مبتلا به پلی‌سایتمی‌ورا (۹۷-۶۵ درصد) و با فراوانی کمتر در ترومبوسیتمی اولیه (۵۷-۲۳ درصد) و میلوفیبروز ایدیوپاتیک (۵۷-۳۵ درصد) گزارش شده است (۹-۵). بر اساس معیارهای سازمان بهداشت جهانی، بررسی موتاسیون JAK2 V617F در تمام بیماران مشکوک به پلی‌سایتمی‌ورا، میلوفیبروز اولیه و ترومبوسیتمی اساسی ضروری می‌باشد (۱). با در کنار هم قرار دادن اطلاعات بدست آمده از ارزیابی‌های بالینی، سیتومورفولوژیک و موتاسیون ژن JAK2، تشخیص قطعی در بسیاری از موارد مشکوک امکان‌پذیر می‌شود؛ به ویژه تشخیص افتراقی پلی‌سایتمی‌های ثانویه از پلی‌سایتمی‌ورا و ترومبوسیتوزهای واکنشی از ترومبوسیتمی اساسی تسهیل می‌گردد. به عبارت دیگر، از آنجایی که وجود موتاسیون در ژن JAK2 بیانگر کلونال بودن ماهیت بیماری است، واکنشی بودن آن را منتفی ساخته و تشخیص نئوپلاسم میلوپرولیفراتیو را مطرح می‌سازد (۱، ۲، ۱۲). موتاسیون JAK2 V617F در بیماران CML، بدخیمی‌های غیرخونی، لوسمی‌های حاد و مزمن لنفوئیدی، لنفوم‌های هوچکینی و غیرهوچکینی وجود ندارد؛ بنابراین در رد این تشخیص‌ها نیز کمک‌کننده است (۱۴، ۱۳).

تا کنون موتاسیون JAK2 V617F در کشورهای مختلف دنیا از جنبه‌های گوناگون مانند بیولوژی مولکولی، فراوانی و اهمیت آن در تشخیص افتراقی مورد تحقیق و بررسی قرار گرفته است. هدف از انجام مطالعه حاضر، تعیین فراوانی موتاسیون JAK2V617F در بیماران ایرانی مبتلا به پلی‌سایتمی‌ورا، ترومبوسیتمی اساسی و میلوفیبروز اولیه و تشخیص افتراقی این نئوپلاسم‌ها از موارد واکنشی بر اساس وجود یا عدم وجود این موتاسیون بود.

## مواد و روشها

در این مطالعه بنیادی، نمونه خون محیطی ۱۷۴ بیمار که با تشخیص‌های پلی‌سایتمی‌ورا (۵۷ بیمار)، ترومبوسیتمی اساسی (۸۴ بیمار) و میلوفیبروز اولیه (۳۳ بیمار) به مطب پزشکان فوق‌تخصص هماتولوژی تهران مراجعه کرده بودند از نظر موتاسیون JAK2V617F مورد ارزیابی قرار گرفتند. تشخیص بیماری بر اساس معیارهای منتشر شده و بدون بررسی موتاسیون JAK2V617F صورت گرفته بود. میانگین سنی بیماران ۵۶ سال بود (حداقل ۱۲ سال و حداکثر ۸۶ سال). ۳۵ درصد بیماران مونث و ۶۵ درصد مذکر بودند. DNA نمونه‌ها با استفاده از روش پروتئیناز (High Pure PCR K (ROCHE)

مورد ارزیابی قرار گرفتند و به منظور افزایش حساسیت واکنش PCR، آزمایش هر بیمار به صورت تک لوله با استفاده از پرایمرهای اختصاصی موتان (J1 و J2) نیز انجام شد که در صورت وجود موتاسیون JAK2V617F تنها یک محصول ۲۰۳ جفت بازی ایجاد می‌گردد (شکل ۱).



شکل ۱- بررسی وضعیت موتاسیون JAK2 با استفاده از واکنش زنجیره پلیمرز.

در بیماران بدون موتاسیون (wild type) تنها یک باند به طول ۳۶۴ جفت باز مشاهده می‌شود، در حالی که بیماران واجد موتاسیون علاوه بر باند ۳۶۴ جفت بازی یک باند به اندازه ۲۰۳ جفت باز (mutant type) نیز دارند. ستون ۱: سایز مارکر؛ ستون ۲: کنترل مثبت؛ ستون ۳: کنترل منفی؛ ستون ۴ و ۶: دو بیمار دارای موتاسیون؛ ستون ۵: بیمار فاقد موتاسیون.

### یافته‌ها

در این مطالعه ۱۷۴ بیمار مبتلا به سه نوع نئوپلاسم میلوپرولیفراتیو (پلی‌سیتمی ورا، ترومبوسیتمی اساسی و میلو فیروز اولیه) از نظر وجود موتاسیون JAK2V617F مورد ارزیابی قرار گرفتند. موتاسیون JAK2V617F در ۶۳/۸ درصد (۱۱۱ نفر) بیماران مبتلا به نئوپلاسم میلوپرولیفراتیو مشاهده گردید. ۸۲ درصد (۴۷ نفر) بیماران مبتلا به پلی‌سیتمی ورا، ۵۷ درصد (۴۸ نفر) بیماران مبتلا به ترومبوسیتمی اساسی و ۴۸ درصد (۱۶ نفر) بیماران با تشخیص میلو فیروز اولیه، دارای جهش JAK2V617F بودند. بیشترین شیوع موتاسیون در بیماران مبتلا به پلی‌سیتمی ورا و متعاقب آن ترومبوسیتمی اساسی و میلو فیروز اولیه بود. به منظور بررسی حضور هم‌زمان موتاسیون JAK2V617F و ژن ادغامی bcr/abl ده بیمار مبتلا به لوسمی میلوئیدی مزمن نیز از نظر موتاسیون JAK2V617F مورد ارزیابی قرار گرفتند که در هیچ‌کدام موتاسیون یافت نگردید. هم‌چنین در بررسی نمونه خون محیطی موارد کنترل منفی (۵۰ فرد سالم و ۱۰ فرد مبتلا به اریتروسیتوز واکنشی) موتاسیون JAK2V617F مشاهده نشد.

template استخراج گردید. برای اطمینان از کیفیت DNA استخراج شده مراحل کنترل کیفی شامل تعیین غلظت DNA و خلوص آن (OD260/280) با بیوفتومتر eppendorf انجام شد. سپس DNA استخراج شده بر روی ژل آگارز ۲ درصد جهت اطمینان از عدم قطعه‌قطعه شدن آن الکتروفورز شد. برای ارزیابی وضعیت موتاسیون JAK2 از واکنش زنجیره پلیمرز با پرایمرهای اختصاصی ال (جدول ۱) استفاده شد.

جدول ۱- پرایمرهای مورد استفاده در بررسی موتاسیون JAK2V617F

**Reverse (J1) :**  
5CTGAATAGTCCTACAGTGTTTTTCAGTTTCA3  
**Forward (specific) (J2) :**  
5AGCATTTGGTTTTAAATTATGGAGTATATT3  
**Forward (internal control) (J3) :**  
5ATCTATAGTCATGCTGAAAGTAGGAGAAAG3

پرایمرهای J1 و J2 برای تکثیر ژن موتان و پرایمرهای J1 و J3 برای تکثیر ژن طبیعی (کنترل داخلی) استفاده شد. در این واکنش‌ها، DNTTP: ۲۰۰ میکرومول،  $MgCl_2$ : ۱/۵ میلی‌مول، پرایمرهای J1 و J2 هر کدام ۱۰ پیکومول، پرایمر J3: ۲۰ پیکومول، Tag DNA polymerase به میزان ۱ واحد و DNA بیمار به میزان ۱۰۰ نانوگرم در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر بود. برنامه PCR که برای تکثیر ژن‌های JAK2 مورد استفاده قرار گرفت، در جدول ۲ آمده است.

جدول ۲- برنامه PCR مورد استفاده در بررسی موتاسیون JAK2V617F

مراحل واکنش	دما	زمان واکنش	تعداد سیکل
واسرشته سازی اولیه	۹۵	۵ دقیقه	۱
واسرشته سازی	۹۴	۳۰ ثانیه	۳۵
اتصال	۵۸	۳۰ ثانیه	۳۵
توسعه	۷۲	۳۰ ثانیه	۳۵
توسعه نهایی	۷۲	۵ دقیقه	۱

محصولات PCR پس از الکتروفورز روی ژل پلی‌اکریل‌امید و انجام رنگ‌آمیزی نقره مورد ارزیابی قرار گرفتند. در بیماران بدون موتاسیون (wild type) تنها یک محصول (باند) به طول ۳۶۴ جفت باز و در بیماران دارای موتاسیون علاوه بر باند ۳۶۴ جفت بازی یک باند به اندازه ۲۰۳ جفت باز (mutant type) مشاهده شد. اکثر نمونه‌ها به صورت دوتایی (duplicate)

## بحث

در این مطالعه ۱۷۴ بیمار با تشخیص سه نوع نئوپلاسم میلوپرولیفراتیو با استفاده واکنش‌های PCR به روش اختصاصی ال (Allele specific) از نظر موتاسیون JAK2V617F مورد ارزیابی قرار گرفتند. به طور کلی این موتاسیون در ۶۴ درصد بیماران مشاهده گردید که با نتایج به دست آمده از سایر مطالعات هم‌خوانی مناسبی دارد (۷،۵).

در مطالعه حاضر، ۸۲ درصد بیماران مبتلا به پلی‌سیتمی ورا دارای موتاسیون بودند که این مقدار بالاتر از درصد مشاهده شده در بیماران ترومبوسیتمی اساسی (۵۷ درصد) و میلو فیبروز اولیه (۴۸٪) بود. تاکنون در تمام مطالعات انجام شده، بالاترین میزان مشاهده موتاسیون فوق در میان انواع نئوپلاسم‌های میلوپرولیفراتیو مربوط به پلی‌سیتمی ورا بوده است (۹-۵). با توجه به گزارش‌های موجود، موتاسیون JAK2V617 در ۶۵ تا ۹۷ درصد بیماران مبتلا به پلی‌سیتمی ورا وجود دارد. درصد مشاهده موتاسیون JAK2V617 در بیماران مبتلا به پلی‌سیتمی ورا به صحت تشخیص بیماری و نیز روش مورد استفاده در بررسی این موتاسیون بستگی دارد (۲). بررسی میزان اریتروپویتین سرم در تمام بیماران مشکوک به پلی‌سیتمی ورا ضروری است (۱، ۱۷). بالا بودن میزان اریتروپویتین سرم، تشخیص پلی‌سیتمی ورا را رد می‌کند (۱۵، ۱۶). در مطالعه‌ای، هیچ‌کدام از ۹۹ بیمار مبتلا به پلی‌سیتمی ورا اریتروپویتین بیش از حد طبیعی نداشتند (۱۶). میزان اریتروپویتین سرم در هیچ‌کدام از بیماران مطالعه حاضر اندازه‌گیری نشده بود، از این رو شاید تعدادی از بیماران که با تشخیص پلی‌سیتمی ورا وارد این مطالعه شدند، مبتلا به سایر بیماری‌ها مانند اریتروسیتوزهای واکنشی بودند و منجر به کاهش میزان موتاسیون در این گروه شده باشند.

در مطالعه ما، ۵۷ درصد بیماران مبتلا به ترومبوسیتمی اساسی و ۴۸ درصد بیماران مبتلا به میلو فیبروز اولیه دارای موتاسیون JAK2V617 بودند. بررسی موتاسیون JAK2V617 در بیماران ترومبوسیتمی اساسی و میلو فیبروز اولیه نتایج متغیری در پی داشته است. James و همکاران موتاسیون را در ۵۰ درصد بیماران ترومبوسیتمی اساسی و ۴۳ درصد بیماران میلو فیبروز اولیه مشاهده کردند (۱۸). Jones و همکاران، موتاسیون را در ۴۱ درصد موارد ترومبوسیتمی اساسی و ۴۳ درصد موارد میلو فیبروز اولیه گزارش کردند (۱۹). در مطالعه‌ای که Barbara و همکارانش در برزیل انجام دادند، ۲۸ درصد بیماران ترومبوسیتمی اساسی و ۵۶ درصد

بیماران میلو فیبروز اولیه دارای این موتاسیون بودند (۲۰). وجود این اختلافات را می‌توان به چند عامل از جمله حساسیت روش‌های مورد استفاده و پروتوکول‌های متفاوت که برای تشخیص نئوپلاسم‌های میلوپرولیفراتیو مورد استفاده قرار گرفته‌اند، نسبت داد. حساسیت روشی که در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفت (روش اختصاصی ال) بیشتر از روش تعیین توالی مستقیم است که در بسیاری از مطالعات به کار رفته است (۲۱، ۲۲). بسیاری از مطالعات، پیش از انتشار آخرین طبقه‌بندی نئوپلاسم‌های میلوپرولیفراتیو توسط سازمان بهداشت جهانی انجام شده‌اند و برای تشخیص نئوپلاسم‌های میلوپرولیفراتیو سایر پروتوکول‌ها را مبنا قرار داده‌اند. در این مطالعه، تمام تشخیص‌ها با توجه به معیارهای ارائه شده در آخرین طبقه‌بندی سازمان بهداشت جهانی که در سال ۲۰۰۸ منتشر شد، صورت گرفت.

تا قبل از شناسایی موتاسیون JAK2 V617f، تشخیص PV مستلزم انجام تعداد زیادی بررسی‌های آزمایشگاهی بود. روش‌هایی مانند اندازه‌گیری توده گلبول قرمز بدن که برای دستیابی به تشخیص PV مورد نیاز بودند، به طور گسترده‌ای انجام نمی‌شدند و تنها در مراکز خاص آزمایشگاهی ارائه می‌گردیدند. به علاوه، این روش‌ها دارای تفسیر دشوار و امکان خطای زیادی بودند (۲۴، ۲۳، ۱۷). در معیارهای جدید جهانی تشخیص پلی‌سیتمی ورا بر اساس مقدار هموگلوبین و اریتروپویتین سرم و نیز وجود موتاسیون در ژن JAK2 صورت می‌گیرد و اگر چه اندازه‌گیری توده گلبول قرمز در طبقه‌بندی لحاظ شده است، اما در بسیاری از آزمایشگاه‌ها به طور کامل کنار گذاشته شده است (۲۵، ۲۶). بر اساس معیارهای WHO، اولین بررسی در بیمار مشکوک به پلی‌سیتمی ورا باید ارزیابی موتاسیون JAK2 V617f با استفاده از خون محیطی بیمار باشد. اندازه‌گیری اریتروپویتین سرم به عنوان آزمایش دوم باید مد نظر قرار گیرد تا تشخیص موارد فاقد موتاسیون از دست نرود (۲۷، ۱۶). وجود موتاسیون و پائین بودن سطح اریتروپویتین تشخیص پلی‌سیتمی ورا را قطعی می‌کند. در این حالت، انجام هیچ بررسی اضافی دیگری مانند روش تهاجمی نمونه‌برداری مغز استخوان ضروری نیست (۱).

میلو فیبروز مغز استخوان و اسپلنومگالی از ویژگی‌های مختص میلو فیبروز اولیه محسوب نمی‌گردند و در بسیاری از اختلالات خوش خیم و بدخیم دیگر مانند کارسینوم‌های متاستاتیک، لوسمی میلوئیدی مزمن، لوسمی سلول مویی، میلو م متعدد و عفونت‌ها ممکن است مشاهده گردند (۲، ۱۸). بدین ترتیب تشخیص افتراقی میلو فیبروز اولیه از اختلالات و بیماری‌های

اساسی، میزان ترومبوز وریدی و شریانی بالاتر از انواع فاقد موتاسیون است (۲۹،۲۸).

بررسی موتاسیون JAK2V617f، نقش مهمی در تشخیص افتراقی لوسمی میلوئیدی مزمن از سایر نئوپلاسم‌های میلوپرولیفراتیو ایفا می‌کند. لوسمی میلوئیدی مزمن در پاره‌ای از موارد به علت وجود میلوپروفیروز یا ترومبوسیتوز و کم بودن درصد سلول‌های نابالغ میلوئیدی در خون محیطی مشابه ترومبوسیتمی اساسی یا میلوپروفیروز اولیه به نظر می‌رسد (۳۱،۳۰،۱). گزارش‌های موجود و نتایج حاصل از بررسی ده بیمار مبتلا به لوسمی میلوئیدی مزمن در مطالعه حاضر بیانگر عدم وجود موتاسیون JAK2V617f در بیماران مبتلا به لوسمی میلوئیدی مزمن است. Jones، ۱۸ بیمار و Jelinek، ۹۹ بیمار مبتلا به لوسمی میلوئیدی مزمن را از نظر موتاسیون JAK2V617f بررسی کردند و در هیچ‌کدام از بیماران این موتاسیون را پیدا نکردند (۳۲،۱۹).

نئوپلاسم‌های میلوپرولیفراتیو در گروهی از بیماران با وقایع ترومبوتیک بروز می‌یابند و در ابتدا فاقد تظاهرات هماتولوژیک آشکار مانند ترومبوسیتوز و یا ایتروسیتوز قابل توجه می‌باشند. به عنوان مثال، بررسی‌ها نشان داده‌اند که در ۱۷ تا ۲۱ درصد بیماران دچار ترومبوز ورید احشایی، موتاسیون JAK2V617f وجود دارد (۳۳-۳۵). مشاهده موتاسیون در این بیماران، وجود یک نئوپلاسم میلوپرولیفراتیو پنهان را مطرح کرده و اقدامات تشخیصی اضافی و نیز تحت نظر قرار دادن بیمار را ضروری می‌سازد. بدین ترتیب احتمال از دست رفتن تشخیص به موقع بیماری کاهش یافته و برخوردار شدن بیمار از درمان‌های موثر در برابر وقایع ترومبوتیک مرگبار امکان بیشتری می‌یابد.

با توجه به قابل مقایسه بودن میزان فراوانی موتاسیون JAK2V617f در بیماران ایرانی مبتلا به نئوپلاسم‌های میلوپرولیفراتیو با گزارش‌های قبلی و به منظور استانداردسازی تشخیص و کنترل درمان و پیش‌آگهی، استفاده از این نوع ارزیابی ضروری به نظر می‌رسد. در ضمن، ارزیابی موتاسیون در بیماران مبتلا به ترومبوزهای وریدهای احشایی، در شناسایی نئوپلاسم‌های میلوپرولیفراتیو کمک کننده خواهد بود. تعیین میزان الل موتان نسبت به الل طبیعی در ارزیابی دقیق‌تر بیماران و برقراری ارتباط این میزان با تغییرات هماتولوژیک و علائم بالینی کمک‌کننده است.

ذکر شده دشوار به نظر می‌رسد. بر اساس یافته‌های مطالعه حاضر و مطالعات متعدد دیگر، موتاسیون JAK2 V617f در ۳۵ تا ۵۵ درصد موارد میلوپروفیروز اولیه وجود دارد (۵-۹). نشان داده شده است که سایر اختلالات هماتولوژیک نظیر لوسمی میلوئیدی مزمن و میلوم متعدد فاقد این موتاسیون اکتسابی می‌باشند. به علاوه، این موتاسیون در عفونت‌هایی که با میلوپروفیروز و اسپلنومگالی ممکن است همراه باشد، وجود ندارد (۱۳،۱۴). از آنچه ذکر گردید، می‌توان نتیجه گرفت که در تشخیص افتراقی میلوپروفیروز اولیه از سایر اختلالات و بیماری‌هایی که با میلوپروفیروز همراه هستند، می‌توان از بررسی موتاسیون ژن JAK2 سود برد. هر چند، از آنجایی که موتاسیون فوق در حداکثر نیمی از موارد میلوپروفیروز اولیه مشاهده می‌گردد، به عنوان یک مارکر مولوکولی اختصاصی و افتراق دهنده قطعی قابل استفاده نمی‌باشد.

موتاسیون JAK2 V617f در حدود ۵۰ درصد موارد ترومبوسیتمی اساسی مشاهده گردیده است. در مطالعه ما نیز ۵۷ درصد موارد ترومبوسیتمی اساسی دارای این موتاسیون بودند. تا قبل از شناسایی این موتاسیون، هیچ نوع مارکر کلونال در ترومبوسیتمی اساسی یافت نگردیده بود و تشخیص افتراقی طیف گسترده‌ای از بیماری‌ها و اختلالاتی که با ترومبوسیتوز همراه هستند، از ترومبوسیتمی اساسی فقط بر اساس معیارهای بالینی و بررسی‌های محدود آزمایشگاهی صورت می‌گرفت. وجود این موتاسیون در بیماران مشکوک به ترومبوسیتمی اساسی یافته‌ای است که به شدت از ترومبوسیتمی حمایت کرده و موارد واکنشی ترومبوسیتوز را رد می‌کند (۱،۵،۳۶). وجود موتاسیون JAK2V617F در بیماران مبتلا به ترومبوسیتمی اساسی، اطلاعات پیش‌آگهی ارزشمندی را فراهم می‌سازد. مشخص شده است که بیماران JAK2V617f مثبت مبتلا به ترومبوسیتمی اساسی شباهت‌های زیادی با پلی‌سیتمی ورا دارند، از جمله این که غلظت هموگلوبین آنها بالاتر، شمارش نوتروفیل بیشتر، ایتروپویز و گرانولوپوئز مغز استخوان فعال‌تر، ترومبوز وریدی شایع‌تر و به میزان بیشتری شانس تبدیل به پلی‌سایتمی ورا را در مقایسه با موارد موتاسیون منفی دارند (۲۱). علاوه بر این، بیماران JAK2V617F مثبت مبتلا به ترومبوسیتمی اساسی به درمان با هیدروکسی اوره حساس‌تر هستند و نیاز به مقادیر کمتر دارو برای درمان دارند. در انواع موتان ترومبوسیتمی

## REFERENCES

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

2. Bennett M, Stroncek D. Recent advances in the bcr-abl negative chronic myeloproliferative diseases. *J Transl Med* 2006; 4: 41.
3. Cervantes F. Modern management of myelofibrosis. *Br J Haematol* 2005; 128 :583-92.
4. Diez-Martin JL, Graham DL, Pettitt RM. Chromosome studies in 104 patients with polycythemia vera. *Mayo Clinic Proc* 1991; 66: 287-90.
5. Baxter EJ, Scott LM, Campbell P, East C, Fourouclas N, Swanton S, et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet* 2005; 365: 1054–61.
6. 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: 1144–48.
7. 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: 1779–90.
8. 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: 22788–92.
9. Levine RL, Wadleigh M, Cools J, Ebert BJ, Wernig G, Huntly BJP, et al. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell* 2005; 7: 387–97.
10. Kaushansky K. On the molecular origins of the chronic myeloproliferative disorders: it all makes sense. *Blood* 2005; 105: 4187-90
11. Wernig G, Mercher T, Okabe R, Levine RL, Lee BH, Gilliland DG. Expression of Jak2V617F causes a polycythemia vera like disease with associated myelofibrosis in a murine bone marrow transplant model. *Blood* 2006; 107: 4274-81.
12. Michiels JJ, De Raeve H, Hebeda K, Lam KH, Berneman Z, Schroyens W, et al. WHO bone marrow features and European clinical, molecular, and pathological (ECMP) criteria for the diagnosis of myeloproliferative disorders. *Leuk Res* 2007; 31: 1031-38.
13. Scott LM, Campbell PJ, Baxter EJ, Todd T, Stephens P, Edkins S, et al. The V617F JAK2 mutation is uncommon in cancers and in myeloid malignancies other than the classic myeloproliferative disorders. *Blood* 2005; 106: 2920–21.
14. 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: 964-65.
15. Messinezy M, Westwood NB, El-Hemaidi I, Marsden JT, Sherwood RS, Pearson TC, et al. Serum erythropoietin values in erythrocytoses and in primary thrombocythaemia. *Br J Haematol* 2002; 117: 47–53.
16. Mossuz P, Girodon F, Donnard M, Latger-Cannard V, Dobo I, Boiret N, et al. Diagnostic value of serum erythropoietin level in patients with absolute erythrocytosis. *Haematologica* 2004; 89: 1194–98.
17. Tefferi A. The diagnosis of polycythemia vera: new tests and old dictums. *Best Pract Res Clin Haematol* 2006; 19: 455–69.
18. James C, Ugo V, Casadevall N, Constantinescu SN, Vainchenker W. A JAK2 mutation in myeloproliferative disorders: pathogenesis and therapeutic and scientific prospects. *Trends Mol Med* 2005; 11: 546-54.
19. 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: 2162–68.
20. Monte- Mór BCR, Cunha AF, Barbosa KB, Saad ST, Lornad-Metze I, Costa FF. JAK2 V617F prevalence in Brazilian patients with polycythemia vera, idiopathic myelofibrosis and essential thrombocythemia. *Gen Mol Biol* 2007; 30: 336-38.
21. 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: 1945–53.
22. 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.
23. Standard techniques for the measurement of red-cell and plasma volume. A report by the international committee for standardization in hematology (ICSH): panel on diagnostic applications of radioisotopes in haematology. *Br J Haematol* 1973; 25: 801–14.

24. Hlad Jr. CJ, Tanz R. An analysis of technical errors in radioalbum in blood volume methods and presentation of a modified method. *J Lab Clin Med* 1958; 52: 289–98.
25. Tefferi A, Pardanani A. Evaluation of ‘increased’ hemoglobin in the JAK2 mutations era: a diagnostic algorithm based on genetic tests. *Mayo Clin Proc* 2007; 82: 599–604
26. 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; 108: 1865–67.
27. Remacha AF, Montserrat I, Santamaria A, Oliver A, Barcelo MJ, Parellada M. Serum erythropoietin in the diagnosis of polycythemia vera: a follow-up study. *Haematologica* 1997; 82: 406–10.
28. Antonioli E, Guglielmelli P, Pancrazzi A, Bogani C, Verrucci M, Ponziani V, et al. Clinical implications of the JAK2 V617F mutation in essential thrombocythemia. *Leukaemia* 2005; 19: 1847–49.
29. Carobbio A, Finazzi G, Guerin V, Spinelli O, Delaini F, Marchioli R, et al. Leukocytosis is a risk factor for thrombosis in essential thrombocythemia: interaction with treatment, standard risk factors, and Jak2 mutation status. *Blood* 2007; 109: 2310-13.
30. Cervantes F, Urbano-Ispizua A, Villamor N, Feliu E, Milla F, Lopez-Guillermo A. Ph-positive chronic myeloid leukemia mimicking essential thrombocythemia and terminating into megakaryoblastic blast crisis: report of two cases with molecular studies. *Leukemia* 1993; 7: 327-30.
31. Moon HW, Park JH, Yoon JS, Ahn JY, Huh JW, Hong KS, et al. Report of 3 Cases of Chronic Myelogenous Leukemia with Thrombocytopenic Onset. *Korean J Lab Med* 2002; 22:159-62.
32. Jelinek J, Oki Y, Gharibyan V, Bueso-Ramos C, Prchal JT, Verstovsek S, et al. JAK2 mutation 1849G OT is rare in acute leukemias but can be found in CMML, Philadelphia-chromosome negative CML and megakaryocytic leukemia. *Blood* 2005; 106: 3370-73.
33. McMahon C, Abu-Elmagd K, Bontempo FA, Kant JA, Swerdlow SH. JAK2 V617F mutation in patients with catastrophic intraabdominal thromboses. *Am J Clin Pathol* 2007; 127: 736-43.
34. Primignani M, Barosi G, Bergamaschi G, Gianelli U, Fabris F, Reati R, et al. Role of the JAK2 mutation in the diagnosis of chronic myeloproliferative disorders in splanchnic vein thrombosis. *Hepatology* 2006; 44: 1528-34.
35. Colaizzo D, Amitrano L, Iannaccone L, Vergura P, Cappucci F, Grandone E, et al. Gain-of-function gene mutations and venous thromboembolism: distinct roles in different clinical settings. *J Med Genet* 2007; 44: 412-16.