مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و دوم/شماره ۳۰۱/هفته دوم آبان ماه ۱۳۹۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۴/۱۳
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۷/۳

بررسی میزان شیوع موتاسیون‌های ژن c-MPL و Jak۲V۶۱۷F در بیماران ایرانی با اختلالات میلوپرولیفراتیو فیلادلفیا منفی و ارتباط آن با یافته‌های آزمایشگاهی و بالینی

عباس قوطاسلو[۱]، دکتر فاطمه نادعلی[۲]، دکتر بهرام چهاردولی[۳]، علی قاسمی[۱]، صادق عباسیان[۱]، کاظم غفاری[۱]، دکتر شهربانو رستمی[۳]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: اختلالات میلوپرولیفراتیو گروهی از بیماری‌ها هستند که به واسطه‌ی افزایش تکثیر در رده‌ی میلوئیدی شناخته می‌شوند. علاوه بر جهش Jak۲V۶۱۷F، چندین موتاسیون در ژن c-MPL در بیماران با اختلالات میلوپرولیفراتیو مزمن فیلادلفیا منفی معرفی شده است که می‌تواند در پاتوژنز بیماری نقش داشته باشد. هدف مطالعه‌ی حاضر، بررسی میزان فراوانی موتاسیون‌های ژن c-MPL و Jak۲V۶۱۷F در بیماران ایرانی دارای اختلالات میلوپرولیفراتیو فیلادلفیا منفی بود.

روش‌ها: نمونه‌ی خون محیطی از ۶۰ بیمار با تشخیص اختلالات میلوپرولیفراتیو مزمن فیلادلفیا منفی شامل زیر گروه ET (Essential thrombocythemia) و PMF (Primary myelofibrosis) و ۲۵ فرد سالم به عنوان شاهد، به منظور بررسی وضعیت موتاسیون در ژن‌های c-MPL و Jak۲V۶۱۷F انتخاب و با استفاده از تکنیک‌های Sequencing، ARMS-PCR (Amplification refractory mutation system-polymerase chain reaction) و AS-PCR (Allele specific- polymerase chain reaction) بررسی شدند.

یافته‌ها: از مجموع ۶۰ بیمار، به ترتیب در ۳۴ (۵۶/۶ درصد) و ۱ (۱/۷ درصد) بیمار در ژن‌های Jak۲V۶۱۷F و c-MPL موتاسیون یافت شد. بیماران دارای موتاسیون Jak۲V۶۱۷F نسبت به افراد بدون موتاسیون شمارش WBC (White blood cells) و غلظت هموگلوبین بالاتری داشتند (P = ۰/۰۰۵ و P = ۰/۰۰۳). علاوه بر این، موتاسیون‌ها در هیچ یک از افراد شاهد شناسایی نشد.

نتیجه‌گیری: موتاسیون ژن c-MPL بر خلاف موتاسیون Jak۲V۶۱۷F، در بیماران MPD فیلادلفیا منفی ایرانی کم است و این شیوع پایین، باید در طراحی استراتژی‌های غربالگری بیماران MPD در نظر گرفته شود.

واژگان کلیدی: اختلالات میلوپرولیفراتیو مزمن، Jak۲V۶۱۷F، موتاسیون c-MPL، Amplification refractory mutation system-polymerase chain reaction

ارجاع: قوطاسلو عباس، نادعلی فاطمه، چهاردولی بهرام، قاسمی علی، عباسیان صادق، غفاری کاظم، رستمی شهربانو. **بررسی میزان شیوع موتاسیون‌های ژن c-MPL و Jak۲V۶۱۷F در بیماران ایرانی با اختلالات میلوپرولیفراتیو فیلادلفیا منفی و ارتباط آن با یافته‌های آزمایشگاهی و بالینی.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۳؛ ۳۲ (۳۰۱): ۱۴۹۵-۱۴۸۷

۱- کارشناس ارشد، گروه هماتولوژی، دانشکده‌ی پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۲- دانشیار، گروه هماتولوژی، دانشکده‌ی پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۳- استادیار، مرکز تحقیقات خون، انکولوژی و پیوند سلول‌های بنیادی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر شهربانو رستمی
Email: drostamy@yahoo.com

مقدمه

اختلالات یا نئوپلاسم‌های میلوپرولیفراتیو (MPN یا Myeloproliferative neoplasms و MPD یا Myeloproliferative disease) گروهی از بدخیمی‌های کلونال سلول‌های بنیادی خون‌ساز هستند که به واسطه‌ی افزایش تکثیر در رده‌ی میلوئیدی با یک دوره‌ی بالینی طولانی مدت شناسایی می‌شوند. پلی‌سایتمی ورا (PV یا Polycythemia vera)، ترومبوسیتمی اولیه (ET یا Essential thrombocythemia) و میلوفیبروز اولیه (PMF یا Primary myelofibrosis) سه عضو مهم از خانواده‌ی MPN هستند که BCR/AB هستند و با اختلالاتی مانند ترومبوز، هموراژی، اسپلنومگالی و خطر تبدیل به لوسمی حاد میلوئیدی (AML یا Acute myeloid leukemia) همراه می‌باشند (۳-۱).

معیارهای تشخیصی برای ET، PMF و PV که توسط WHO (World Health Organization) پذیرفته شده‌اند، شامل تعیین کلونالیتی و همچنین بررسی موتاسیون Jak۲V۶۱۷F هستند. موتاسیون Jak۲V۶۱۷F در اکثر بیماران مبتلا به پلی‌سیتمی ورا (۹۵ درصد) و در حدود نیمی از موارد میلوفیبروز اولیه و ترومبوسیتی اولیه وجود دارد (۵-۴). این جهش از طریق تغییر G به T در نوکلئوتید ۱۸۴۹ در اگزون ۱۲ ژن JAK۲ واقع بر روی کروموزم ۹ مشخص می‌شود که منجر به جایگزینی فنیل الانین به جای والین در موقعیت ۶۱۷ از پروتئین JAK۲ می‌گردد.

پروتئین‌های خانواده‌ی JAK۲ به واسطه‌ی اثرات سایتوکاین‌های هماتوپوتیک و جهش منجر به فعال‌سازی مدام JAK۲ در غیاب سایتوکاین می‌شوند. بنابراین جهش Jak۲V۶۱۷F یک عامل مستعد کننده برای پیشرفت MPN محسوب می‌گردد.

نتایج مطالعات مختلف نشان می‌دهد که تشخیص جهش Jak۲V۶۱۷F نه تنها دارای اهمیت تشخیص است، بلکه در درمان بیماری نئوپلاسم‌های میلوپرولیفراتیو مزمن (MPNs) از طریق داروهای مهار کننده‌ی مسیر STAT/JAK نیز نقش دارد (۶). از آن جایی که بخش عمده‌ای از بیماران مبتلا به ET و PMF برای موتاسیون Jak۲V۶۱۷F منفی بودند، بررسی برای کشف اتیولوژی بیماران PV، ET و PMF با کروموزوم فیلادلفیا منفی و Jak۲V۶۱۷F به کمک تعیین سکانس گیرنده‌های EPO، TPO و GMCSFR منجر به شناسایی انواع موتاسیون‌های جانشینی در موقعیت تریپتوفان ۵۱۵ (W۵۱۵) در نزدیکی بخش غشایی گیرنده‌ی ترومبوپویتین شد. این موتاسیون‌ها به واسطه‌ی فعال‌سازی عوامل نسخه‌برداری JAK۲/STAT منجر به تکثیر سلولی می‌شوند. اتصال TPO (Temporo parieto occipital) به دومین خارج سلولی MPL، باعث دایمر شدن دومین‌های داخل سلولی گیرنده می‌شود؛ به صورتی که باعث فسفریلاسیون متقابل JAK۲ می‌گردد. JAK۲ به نوبه‌ی خود فسفریله و فعال می‌شود و ریشه‌های تیروزین را در دومین سیتوپلاسمی MPL فسفریله می‌کند و یک Docking sites برای مولکول‌های سیگنالی پایین دست را فراهم می‌کند. طبق مطالعات انجام شده، موتاسیون‌های ژن c-MPL و Jak۲V۶۱۷F در کشورهای غربی به ترتیب در ۱۰-۵ درصد و حدود نیمی از بیمارن PMF و ET گزارش شده است (۹-۷).

تعیین این موتاسیون‌ها می‌تواند در غربالگری و تشخیص بیماران ارزشمند باشد. نظر به اهمیت ذکر

شده، مطالعه‌ی حاضر به منظور بررسی میزان شیوع موتاسیون‌های ژن c-MPL و JakV۶۱۷F در بیماران میلوپرولیفراتیو مزمن (زیر گروه‌های ET و PMF) انجام شد.

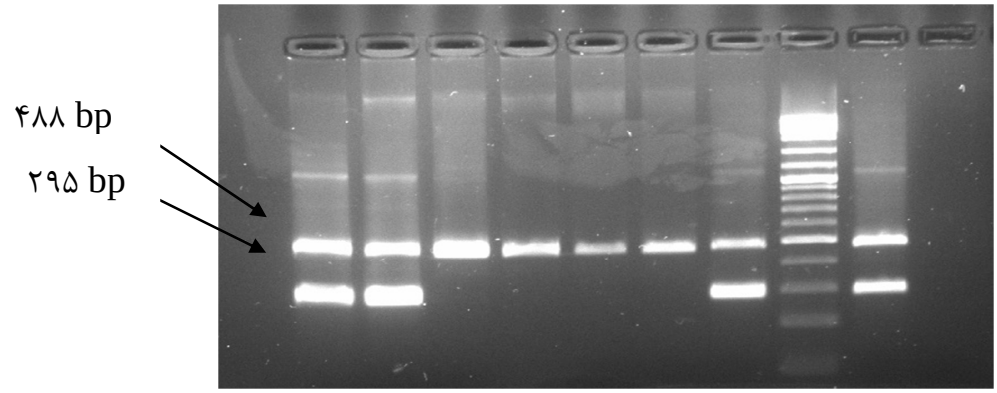
روش‌ها

مطالعه‌ی حاضر بر روی ۶۰ بیمار با تشخیص اولیه‌ی اختلالات میلوپرولیفراتیو مزمن با زیر گروه ET وPMF و فیلادلفیا منفی که به مرکز تحقیقات خون، انکولوژی و پیوند مغز استخوان بیمارستان شریعتی مراجعه کرده بودند و ۲۵ فرد سالم به عنوان شاهد، از نظر موتاسیون ژن‌های c-MPL و Jak۲V۶۱۷F مورد بررسی قرار گرفتند.

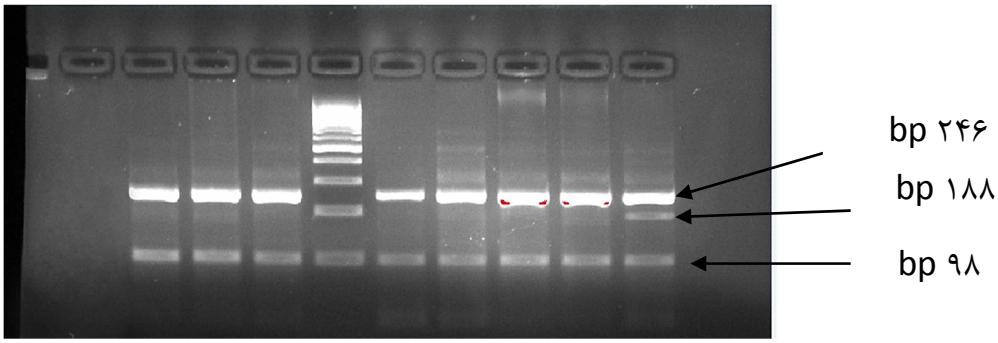
اطلاعات آزمایشگاهی و بالینی بیماران شامل شمارش گلبول‌های سفید، شمارش پلاکت، سن، غلظت هموگلوبین و وضعیت طحال، از پرونده‌های پزشکی بیماران استخراج شد. از تمامی افراد مورد مطالعه پس از کسب رضایت‌نامه، مقدار ۱۰ ml نمونه‌ی خون محیطی در لوله‌های حاوی ضد انعقاد EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) گرفته شد. سپس DNA با روش استاندارد نمک اشباع و RNA با استفاده از ترایزول (Sigma ,USA) استخراج و از RNA جدا شده cDNA (Complementary DNA) بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده (Fermentas) و با استفاده از Random hexamer سنتز شد.

برای بررسی موتاسیون Jak۲V۶۱۷F از تکنیک AS-PCR (Allele specific- polymerase chain reaction) و برای بررسی موتاسیون‌های ژن c-MPL از تکنیک‌های تعیین توالی (Sequencing) و ARMS (Amplification refractory mutation system) استفاده شد. شرایط واکنش PCR برای بررسی موتاسیون ها و نیز توالی های پرایمر استفاده شده از مطالعات قبلی گرفته شد. در تکنیک AS-PCR از ۳ پرایمر Forward، Reverse و Mutant استفاده شد (۱۰).

در این روش با استفاده از پرایمرهای Forward و Reverse یک باند ۴۸۸ bp از آلل طبیعی (wt) تکثیر می‌شود و آلل موتانت در صورت وجود موتاسیون یک باند ۲۹۵ bp را ایجاد خواهد کرد (شکل ۱).



شکل ۱. AS-PCR (Allele specific-Polymerase chain reaction) جهت غربالگری موتاسیون Jak۲V۶۱۷F، از راست به چپ ستون ۱ شاهد منفی، ستون ۲ شاهد مثبت، ستون ۳ اندازه‌ی نشانگر، ستون‌های ۴، ۹ و ۱۰ بیمار دارای موتاسیون و ستون ۸ بیمار فاقد موتاسیون، ستون‌های ۵، ۶ و ۷ شاهد سالم را نشان می‌دهند



شکل ۲. ARMS-PCR (Amplification refractory mutation system-Polymerase chain reaction) جهت غربالگری موتاسیون‌های c-MPL، از چپ به راست ستون ۱ شاهد منفی، ستون‌های ۲، ۳ و ۴ شاهد سالم، ستون ۵ اندازه‌ی نشانگر، ستون‌های ۶، ۷، ۸ و ۹ بیمار فاقد موتاسیون و ستون ۱۰ بیمار دارای موتاسیون c-MPL را نشان می‌دهند

جهت بررسی موتاسیون‌های ژن c-MPL، نمونه‌های بیماران جهت یافتن شاهد مثبت تعیین توالی شدند. نمونه‌هایی که به روش تعیین توالی، وجود موتاسیون در آن‌ها ثابت شد، جهت راه‌اندازی آزمایش ARMS-PCR استفاده شدند. در تکنیک ARMS-PCR از ۶ پرایمر استفاده شد که شامل FO، RO، Riwt، FiK، FiL، FiR بودند (۱۱). پرایمرهای FO و RO از ژن c-MPL یک باند شاهد bp ۲۴۶ می‌دهند. پرایمرهای Riwt و FO یک آلل Wild-type را تکثیر می‌کنند و باعث تولید یک باند bp ۹۸ می‌شوند و پرایمرهای RO و FiL/FiK/FiR یک باند bp ۱۸۸ از آلل موتانت ایجاد می‌کنند (شکل ۲).

محصولات واکنش بر روی ژل آگارز ۳ درصد مورد ارزیابی قرار گرفتند. برای بررسی ارتباط بین موتاسیون‌ها با یافته‌های آزمایشگاهی و بالینی بیماران از آزمون‌های دو طرفه‌ی Fisher's exact و χ^2 استفاده شد. همه ی داده‌های جمع‌آوری شده توسط نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۱۶ (version 16 ,SPSS Inc., Chicago, IL) آنالیز و $P < ۰/۰۵۰$ از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

از مجموع ۶۰ بیمار مورد مطالعه، ۴۶ بیمار (۷۶/۷ درصد) ترومبوسیتمی اولیه و ۱۴ بیمار (۲۳/۳ درصد) میلوفیبروز اولیه (PMF) داشتند. همچنین از نظر جنسیتی، ۳۰ بیمار مرد و ۳۰ بیمار زن بودند. میانگین سنی کل بیماران ۶۱/۹ سال با محدوده‌ی سنی ۸۳-۳۰ سال بود. هیچ گونه ارتباط معنی‌داری بین موتاسیون Jak۲V۶۱۷F با پارامترهای دموگرافی بیماران شامل جنس، سن مشاهده نشد ($P = ۰/۱۰۰$).

در مجموع، از ۶۰ بیمار مورد مطالعه، ۳۴ بیمار (۵۷/۰ درصد) از نظر موتاسیون Jak۲V۶۱۷F (شامل ۳۱ بیمار (۶۷/۰ درصد) از ۴۶ بیمار ET و ۳ بیمار (۲۲/۰ درصد) از ۱۴ بیمار PMF) و نیز در کل، ۱ بیمار (۱/۷ درصد) از نظر موتاسیون c-MPL مثبت بودند (جدول ۱).

ارتباط معنی‌داری بین زیر گروه‌های بیماری و وجود موتاسیون Jak۲V۶۱۷F مشاهده شد ($P = ۰/۰۰۲$). میانه و میانگین شمارش گلبول‌های سفید و هموگلوبین در بیماران دارای موتاسیون Jak۲V۶۱۷F، به ترتیب ۱۲/۵ هزار در میکرولیتر و

g/dl ۱۳/۱۸ که نسبت به افراد بدون موتاسیون بالاتر بود (P = ۰/۰۰۵ و P = ۰/۰۰۳).

همچنین شمارش پلاکتی در بیماران واجد این موتاسیون دارای میانه‌ی بالاتری نسبت به افراد فاقد موتاسیون بود که به نظر می‌رسد از نظر آماری معنی‌دار باشد (P = ۰/۰۳۰)؛ اما با توجه به ضریب همبستگی ۶۴/۲ بین زیر گروه‌های بیماری و شمارش پلاکتی این احتمال رد می‌شود و در حقیقت، علت معنی‌دار شدن شمارش پلاکتی با موتاسیون Jak۲V۶۱۷F، توزیع زیاد و نامتناسب بیماران در گروه ET است؛ به طوری که میانگین شمارش پلاکتی در ۳۱ بیمار ET واجد موتاسیون ۲۶۳/۱۲ ± ۹۴۵/۵ هزار در میکرولیتر (P = ۰/۵۰۰) و میانگین شمارش پلاکتی در ۳ بیمار PMF واجد موتاسیون ۳۶۳/۵ ± ۳۸۲/۳۲ (P = ۰/۹۰۰) بود. از ۳۴ بیمار دارای موتاسیون، ۲۰ مورد (۵۸/۵ درصد) اسپلنومگالی داشتند. هیچ ارتباط معنی‌داری بین وجود موتاسیون و اسپلنومگالی مشاهده نشد (P = ۰/۳۰۰) (جدول ۱).

تنها بیمار واجد موتاسیون c-MPL، از نظر موتاسیون Jak۲V۶۱۷F منفی، مذکر، دارای ۶۰ سال سن و مبتلا به ET با شمارش پلاکتی ۸۹۷ هزار در میکرولیتر و طحال بزرگ در زمان تشخیص بود (جدول ۲).

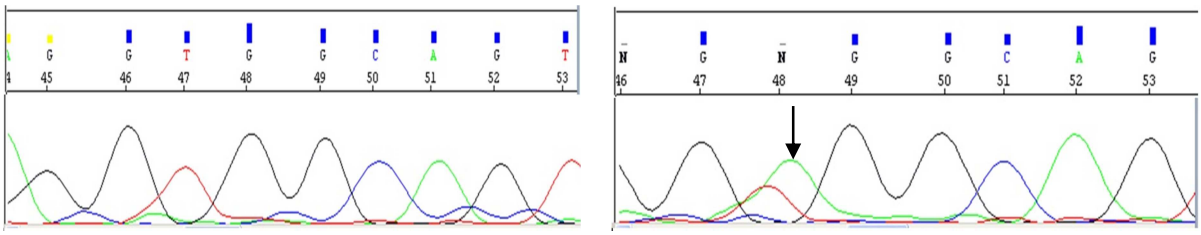
جدول ۱. وضعیت موتاسیون Jak۲V۶۱۷F در بیماران مورد مطالعه و ارتباط آن با یافته‌های آزمایشگاهی و بالینی

		موتاسیون Jak۲V۶۱۷F		
		مثبت	منفی	مقدار P
زیر گروه	ترومبوسیتمی اولیه	۳۱ (۹۱/۲)	۱۵ (۵۷/۷)	۰/۰۰۲
تعداد (درصد)	میلوفیبروز اولیه	۳ (۸/۸)	۸ (۴۲/۳)	۰/۰۰۲
جنس	زن	۲۰ (۵۸/۸)	۱۰ (۳۸/۵)	۰/۱۰۰
تعداد (درصد)	مرد	۱۴ (۴۱/۲)	۱۶ (۶۱/۵)	۰/۱۰۰
سن (سال) (میانگین ± انحراف معیار)		۶۲/۰۳ ± ۱۳/۱۵	۶۱/۸۱ ± ۱۳/۲۵	۰/۹۰۰
آزمایش‌ها	هموگلوبین (g/dl) (میانگین ± انحراف معیار)	۱۳/۱۸ (± ۱/۶۷)	۱۱/۵۸ (± ۲/۲۶)	**۰/۰۰۳**
	شمارش گلبول‌های سفید ($\times 10^3 \mu l$) میانه (چارک اول–چارک سوم)	۱۲/۵ (۹/۰–۲۰/۵)	۹ (۶/۰–۱۳/۲)	**۰/۰۰۵**
	شمارش پلاکت ($\times 10^3 \mu l$) میانه (چارک اول–چارک سوم)	۸۵۸ (۷۵۹/۵–۱۰۶۲/۰)	۶۹۳ (۳۱۹/۵–۹۰۳/۲)	**۰/۰۳۰**
علایم بالینی	اسپلنومگالی	۲۰ (۵۸/۸)	۱۶ (۶۱/۵)	۰/۳۰۰
تعداد (درصد)	اسپلنوکتومی	۱ (۲/۹)	۳ (۱۱/۵)	۰/۳۰۰
	طحال طبیعی	۱۳ (۳۸/۲)	۷ (۲۶/۹)	۰/۳۰۰

جدول ۲. پارامترهای آزمایشگاهی و بالینی در تنها بیماری که واجد موتاسیون در ژن c-MPL بود

ویژگی طول درمان	شمارش WBC (× ۱۰^{۳} µl)	هموگلوبین (g/dl)	شمارش پلاکتی (× ۱۰^{۳} µl)	نوع دارو و دوز	وضعیت طحال
در زمان تشخیص	۸/۴	۱۴/۴	۸۹۷	–	اسپلنومگالی
چهار ماه پس از درمان	۳/۸	۱۳	۳۲۱	هیدروکسی اوره ۵۰۰ mg روزانه Acetylsalicylic acid ،mg ۸۰ روزانه	طبیعی
شش ماه پس از درمان	۶/۴۳	۱۴	۵۹۸	هیدروکسی اوره ۵۰۰ mg روزانه Acetylsalicylic acid ،mg ۸۰ روزانه	طبیعی

WBC: White blood cells



شکل ۳. نتیجه‌ی تعیین توالی ژن در بیمار دارای موتاسیون W۵۱۵R در ژن c-MPL، از چپ به راست ژن c-MPL طبیعی و موتانت

همچنین در بیوپسی مغز استخوان، بافت نورموسلولار با افزایش متوسط در تعداد مگاکاریوسیت‌ها و بدون هیچ گونه نشانه از فیبروز را نشان می‌داد. آنالیز نمونه‌ی بیمار از نظر توالی ژن c-MPL نشان داد که موتاسیون موجود، ناشی از جایگزینی نوکلئوتید T با A و موتاسیون بیمار از نوع W۵۱۵R است (شکل ۳). علاوه بر این، در هیچ یک از ۲۵ فرد سالم گروه شاهد، جهش در ژن‌های مورد بررسی مشاهده نشد.

بحث

فعال‌سازی مسیر JAK/STAT، یک نقش محوری در پاتوژنز اختلالات میلوپرولیفراتیو مزمن دارد. موتاسیون Jak۲V۶۱۷F در ۹۵ درصد موارد پلی‌سایتمی ورا و در حدود نیمی از موارد میلوفیبروز اولیه و ترومبوسیتی اولیه وجود دارد (۵). بررسی برای کشف اتیولوژی بیماران ET و PMF با کروموزوم فیلادلفیا منفی و Jak۲V۶۱۷F، منجر به شناسایی موتاسیون‌ها در ژن c-MPL گردید. موتاسیون‌های ژن MPL در پاتوژنز بیماری نقش دارد؛ چرا که بیان بالای آن در رده‌ی سلولی در آزمایشگاه، منجر به رشد سلولی بدون وابسته به عامل رشد می‌شود. مطالعات دیگر نشان داده‌اند که بیان ژن موتانت MPLW۵۱۵L در موش‌های پیوند شده منجر به ایجاد یک فنوتیپ مشابه میلوفیبروز خواهد شد (۱۳-۱۲).

همچنین مشخص شده است که بیماران واجد موتاسیون‌های ژن MPL دارای مقادیر هموگلوبین کمتر و شمارش پلاکتی بیشتر (بیماران ET) هستند و نیز خطر اختلال در عروق کوچک در بیماران ET واجد موتاسیون بالا است (۱۴). در مطالعه‌ی حاضر،

از مجموع ۶۰ بیمار مورد مطالعه ۳۴ بیمار (۵۷ درصد) از نظر موتاسیون Jak۲V۶۱۷F و یک بیمار (۱/۷ درصد) از نظر موتاسیون c-MPL مثبت بودند. در راستای یافته‌های مطالعه‌ی حاضر، Pardanani و همکاران با بررسی این موتاسیون در بیماران با ا ختلالات میلوپرولیفراتیو و دیگر اختلالات میلوئیدی، نشان دادند که موتاسیون‌ها در ۱ درصد از بیماران ET و نیز ۵ درصد بیماران PMF مثبت است (۸).

همچنین نتایج مطالعه‌ی Hu و همکاران نشان داد که موتاسیون‌های ژن c-MPL در ۸ درصد از بیماران PMF مثبت است (۱۵). مطالعه‌ی Beer و همکاران نشان داد که این موتاسیون‌ها در ۸/۵ درصد از بیماران ET و PMF شناسایی می‌شود (۹). به نظر می‌رسد علت بالا بودن میزان موتاسیون‌های c-MPL گزارش شده در مطالعات اخیر، بزرگ‌تر بودن جامعه‌ی آماری است؛ اما با وجود این که مطالعه Hu و همکاران (۱۵) بزرگ‌ترین مطالعه از نظر تعداد بیمار است، نسبت به سایر مطالعات مانند Beer و همکاران (۹)، درصد کمی از موتاسیون را در بیماران گزارش کردند.

نتایج مطالعه‌ی حاضر در مورد بیماران ET مانند نتایج مطالعه‌ی Hu و همکاران (۱۵)، هر دو یکسان و حدود ۱ درصد بود. همچنین نتایج مطالعه‌ای که توسط Lieu و همکاران بر روی ۱۰۵ بیمار تایوانی مبتلا به اختلالات میلوپرولیفراتیو انجام شد، نشان داد که تمام بیماران مورد مطالعه از نظر موتاسیون‌های ژن c-MPL منفی بودند. در این مطالعه، موتاسیون Jak۲V۶۱۷F در ۵۹ درصد بیماران ترومبوسیتمی اساسی و ۳۳ درصد بیماران میلوفیبروز مثبت بود که به طور تقریبی با یافته‌های مطالعه‌ی حاضر یکسان بود (۱۶).

نتایج مطالعه‌ی کریم‌زاده و همکاران و همچنین مطالعه‌ی اصغری و همکاران در زمینه‌ی بررسی شیوع موتاسیون Jak۲V۶۱۷F در بیماران ایرانی با اختلالات میلوپرولیفراتیو مزمن نشان داد که این موتاسیون به ترتیب در ۵۳ درصد و ۴۵ درصد بیماران ترومبوسیتمی اساسی و ۶۲ درصد بیماران میلوفیبروز مثبت بود (۱۷، ۱۰). تفاوت موجود بین مطالعه‌ی حاضر و این گروه‌ها (۲۷ درصد در مقابل ۶۲ درصد)، در بیماران PMF با وجود یکسانی تقریبی افراد مورد بررسی است.

همچنین مطالعه‌ی حاضر نشان داد که بیماران دارای موتاسیون Jak۲V۶۱۷F نسبت به افراد بدون موتاسیون به ترتیب میانه و میانگین شمارش WBC و غلظت هموگلوبین بالاتری داشتند (P = ۰/۰۰۵ و P = ۰/۰۰۳). هم جهت با مطالعه‌ی حاضر، در مطالعه‌ی Campbell و Green بر روی بیماران ET، موتاسیون در ۵۳ درصد بیماران مشاهده شد (۱). در این مطالعه، همچنین ارتباط معنی‌داری بین وجود موتاسیون و میزان هموگلوبین و شمارش نوتروفیل بیماران وجود داشت.

نتیجه‌ی کلی این که موتاسیون ژن c-MPL بر خلاف موتاسیون Jak۲V۶۱۷F در بیماران MPD فیلادلفیا منفی ایرانی کم است. با توجه به شیوع کم این موتاسیون ها، انجام این آزمایش در بیماران با اختلالات میلوپرولیفراتیو به لحاظ اقتصادی مقرون به صرفه نیست و جهت غربالگری بیماران توصیه نمی‌شود. با این حال، با توجه به ماهیت اختصاصی بودن موتاسیون‌های ژن c-MPL (بر خلاف Jak۲V۶۱۷F) که فقط در زیر گروه ET و PMF دیده می‌شود، انجام این آزمایش در موارد مشکوک به این دو اختلال، می‌تواند در تشخیص بیماری کمک کننده باشد.

References

1. Campbell PJ, Green AR. The myeloproliferative disorders. N Engl J Med 2006; 355(23): 2452-66.
2. Michiels JJ, Bernema Z, Van BD, De RH, Schroyens W. Current diagnostic criteria for the chronic myeloproliferative disorders (MPD) essential thrombocythemia (ET), polycythemia vera (PV) and chronic idiopathic myelofibrosis (CIMF). Pathol Biol (Paris) 2007; 55(2): 92-104.
3. Panani AD. Cytogenetic and molecular aspects of Philadelphia negative chronic myeloproliferative disorders: clinical implications. Cancer Lett 2007; 255(1): 12-25.
4. 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(12): 546-54.
5. Kilpivaara O, Levine RL. JAK2 and MPL mutations in myeloproliferative neoplasms: discovery and science. Leukemia 2008; 22(10): 1813-7.
6. Panani AD. Janus kinase 2 mutations in Philadelphia negative chronic myeloproliferative disorders: clinical implications. Cancer Lett 2009; 284(1): 7-14.
7. Pecquet C, Staerk J, Chaligne R, Goss V, Lee KA, Zhang X, et al. Induction of myeloproliferative disorder and myelofibrosis by thrombopoietin receptor W515 mutants is mediated by cytosolic tyrosine 112 of the receptor. Blood 2010; 115(5): 1037-48.
8. Pardanani AD, Levine RL, Lasho T, Pikman Y, Mesa RA, Wadleigh M, et al. MPL515 mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: a study of 1182 patients. Blood 2006; 108(10): 3472-6.
9. Beer PA, Campbell PJ, Scott LM, Bench AJ, Erber WN, Bareford D, et al. MPL mutations in myeloproliferative disorders: analysis of the PT-1 cohort. Blood 2008; 112(1): 141-9.
10. Karimzadeh P, Ghaffari SH, Chahardouli B, Zaghal A, Einollahi N, Mousavi SA, et al. Evaluation of JAK2V617F mutation prevalence in myeloproliferative neoplasm by AS-RT-PCR. Iran J Pediatr Hematol Oncol 2011; 1(2): 38-42.
11. Zhuge J, Zhang W, Zhang W, Xu M, Hoffman R. Sensitive detection of MPLW515L/K mutations by amplification refractory mutation system (ARMS)-PCR. Clin Chim Acta 2010; 411(1-2): 122-3.
12. Pikman Y, Lee BH, Mercher T, McDowell E, Ebert BL, Gozo M, et al. MPLW515L is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia. PLoS Med 2006; 3(7): e270.
13. Chaligne R, Tonetti C, Besancenot R, Roy L, Marty C, Mossuz P, et al. New mutations of MPL in primitive myelofibrosis: only the MPL W515 mutations promote a G1/S-phase transition. Leukemia 2008; 22(8): 1557-66.
14. Vannucchi AM, Antonioli E, Guglielmelli P, Pancrazzi A, Guerini V, Barosi G, et al. Characteristics and clinical correlates of MPL 515W>L/K mutation in essential thrombocythemia. Blood 2008; 112(3): 844-7.
15. Hu WY, Zhao Y, Ishii T, Sozer S, Shi J, Zhang W, et al. Haematopoietic cell lineage distribution of MPLW515L/K mutations in patients with idiopathic myelofibrosis. Br J Haematol 2007; 137(4): 378-9.
16. Lieu CH, Shen YJ, Lai WC, Tsai WH, Hsu HC. Prevalence of MPL W515L/K mutations in Taiwanese patients with Philadelphia-negative chronic myeloproliferative neoplasms. J Chin Med Assoc 2010; 73(10): 530-2.
17. Asghari A, Shahriari Ahmadi A, Basi A, Vakili M, Razavi M, Arabi M, et al. The association between prevalence of JAK2V617F mutation and blood indicies in groups of patients with myeloproliferative neoplasms in Rasul Akram Hospital. Int J Hematol Oncol Stem Cell Res 2011; 5(4): 10-3.

Journal of Isfahan Medical School
Received: 04.07.2014
Vol. 32, No. 301, 2nd Week, November 2014
Accepted: 25.09.2014

Frequency of c-MPL and JAK2V617F Mutations in Iranian Patients with Philadelphia-Negative Myeloproliferative Disorders and its Association with Clinical and Laboratory Findings

Abbas Ghotaslou MSc[1], Fatemeh Nadali PhD[2], Bahram Chahardouli PhD[3], Ali Ghasemi MSc[1], Sadegh Abbasian MSc[1], Kazem Ghaffari MSc[1], Shahrbanoo Rostami PhD[3]

Original Article

Abstract

Background: Myeloproliferative disorders are a group of diseases characterized by increased proliferation of myeloid lineage. In addition to JAK2V617F mutation, several mutations in the c-MPL gene were described in patients with Philadelphia-negative Chronic Myeloproliferative disorders (Ph-negative MPNs) that could be important in the pathogenesis of diseases. The aim of the present study was to investigate the frequency of c-MPL and JAK2V617F mutations in Iranian patients with Philadelphia-negative Myeloproliferative disorders.

Methods: Peripheral blood samples from 60 patients with Philadelphia-negative Myeloproliferative disorders, subgroups of essential thrombocythemia (ET) and primary myelofibrosis (PMF) and 25 healthy subjects, as control, were taken. In order to investigate the mutation status of c-MPL and Jak2 V617F via using sequencing, the amplification refractory mutation system-polymerase chain reaction (ARMS-PCR) and allele specific-polymerase chain reaction (AS-PCR) were used.

Findings: Of the total of 60 patients, 34 (56.6%) and 1 (1.7%) had Jak2V617F and c-MPL mutations, respectively. Patients with Jak2V617F mutation had higher white blood cell (WBC) counts (P = 0.005) and hemoglobin concentrations than those without the mutation (P = 0.003). In addition, for all healthy subjects in control group, mutation was negative.

Conclusion: The present study revealed that the c-MPL mutations, unlike the Jak2V617F mutations, are rare in Iranian patients with Philadelphia-negative Chronic Myeloproliferative disorders and the low mutation rate should be considered in the design of screening strategies of patients with myeloproliferative disorders.

Keywords: Amplification refractory mutation system-polymerase chain reaction (ARMS-PCR), c-MPL mutation, JAK2V617F, Myeloproliferative disorders

Citation: Ghotaslou A, Nadali F, Chahardouli B, Ghasemi A, Abbasian S, Ghaffari K, et al. **Frequency of c-MPL and JAK2V617F Mutations in Iranian Patients with Philadelphia-Negative Myeloproliferative Disorders and its Association with Clinical and Laboratory Findings.** J Isfahan Med Sch 2014; 32(301): 1487-95

1- MSc Student, Department of Hematology, School of Allied Medical Sciences, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
2- Associate Professor, Department of Hematology, School of Allied Medical Sciences, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
3- Hematology-Oncology and Stem Cell Transplantation Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
Corresponding Author: Shahrbanoo Rostami PhD, Email: drostamy@yahoo.com