

# Mutacija V617F u genu za JAK2 u mijeloproliferativnim neoplazmama dijagnosticiranim u Kliničkom bolničkom centru Osijek

---

Gajdašić, Ivona

Master's thesis / Diplomski rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine Osijek / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:828168>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-27**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Medicine Osijek](#)



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU  
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**Diplomski sveučilišni studij Medicinsko laboratorijska  
dijagnostika**

**Ivona Gajdašić**

**MUTACIJA V617F U GENU ZA JAK2 U  
MIJELOPROLIFERATIVNIM  
NEOPLAZMAMA  
DIJAGNOSTICIRANIM U KLINIČKOM  
BOLNIČKOM CENTRU OSIJEK**

**Diplomski rad**

**Osijek, 2020.**

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU  
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**Diplomski sveučilišni studij Medicinsko laboratorijska  
dijagnostika**

**Ivona Gajdašić**

**MUTACIJA V617F U GENU ZA JAK2 U  
MIJELOPROLIFERATIVNIM  
NEOPLAZMAMA  
DIJAGNOSTICIRANIM U KLINIČKOM  
BOLNIČKOM CENTRU OSIJEK**

**Diplomski rad**

**Osijek, 2020.**

Ovaj diplomski rad izrađen je na Zavodu za hematologiju Klinike za unutarnje bolesti Kliničkog bolničkog centra Osijek pod vodstvom doc.dr.sc. Vlatke Periše i komentorice dr.sc. Mirjane Suver Stević.

Rad ima: četrdeset i jedan list, osam tablica i pet slika.

*Zahvaljujem mentorici, doc.dr.sc. Vlatki Periša, na velikoj pomoći, utrošenom vremenu i savjetima.*

*Zahvaljujem komentorici dr.sc. Mirjani Suver Stević, na dodatnim savjetima i utrošenom vremenu.*

*Zahvaljujem kolegicama na Kliničkom zavodu za transfuzijsku medicinu Kliničkoga bolničkog centra Osijek na suradnji i razumijevanju tijekom izrade ovoga rada.*

*Veliko hvala obitelji i prijateljima na razumijevanju i podršci, uz koje je ovo sve bilo lakše.*

*Rad posvećujem svojim roditeljima. Vi ste moja najveća podrška i oslonac.*

## POPIS KRATICA

MPN mijeloproliferativne neoplazme

KML kronična mijeloična leukemija

PRV policitemija rubra vera

PMF primarna mijelofibroza

Ph Philadelphia kromosom

JAK2 Janus kinaza 2 (engl. *januskinase 2*)

JH1 homologna domena 1 (engl. *jak homology 1*)

JH2 pseudokinazna domena 2 (engl. *pseudokinase domain 2*)

SH2 dio molekule protein tirozin kinaze (engl. *SRC homology 2*)

Tky2 tirozin kinaza 2 član porodice Janus kinaza (engl. *tyrosine kinase 2*)

STAT porodica transkripcijskih čimbenika (engl. *signal transducers and activators of transcription*)

V617F zamjena aminokiseline valina fenilalaninom u kodonu 617

BCR/ABL1 fuzijski gen nastao translokacijom genskog materijala s kromosoma 9 na kromosom 22

t(9;22) translokacija s kromosoma 9 na kromosom 22

MDS mijelodisplastični sindrom

CALR gen za kalretikulin (engl. *CALR gene*)

MPL mijeloproliferativni leukemijski gen (engl. *myeloproliferative leukemia protein*)

PI3K/AKT unutarstanični signalni put fosfatidil–inozitol–3–kinaza (engl. *phosphoinositol 3–kinase*) i *AKT protein kinaza B* (engl. *serine/threonine kinase, protein kinase B*)

MAPK/ERK unutarstanični signalni put protein kinaza aktivirana mitogenom (engl. *mitogen activated protein kinase*) i kinaza aktivirana izvanstaničnim signalom (engl. *extracellular signal regulated kinase*)

PCR lančana reakcija polimerazom (engl. *polymerase chain reaction*)

qPCR kvantitativna lančana reakcija polimerazom

NGS sekvenciranje sljedeće generacije (engl. *Next generation sequencing*)

HRM analiza krivulje taljenja visoke rezolucije (engl. *High resolution melting*)

KBCO Klinički bolnički centar Osijek

DNA deoksiribonukleinska kiselina

WT divlji tip (engl. *wild type*)

VF mutacija V617F

COS uzorak koji sadrži 1% V617F alela (engl. *crossing point cut off sample*)

Taq *Thermus aquaticus* DNA polimeraze s 5'→3' egzonukleaznom aktivnosti

SD standardna devijacija

PC pozitivna kontrola

NC negativna kontrola

Cp engl. *crossing point*

E eritrociti

Hct hematokrit

Hb hemoglobin

L leukociti

Tr trombociti

LDH laktat dehidrogenaza

KS koštana srž

ASH Američko hematološko društvo (engl. *The American Society of Hematology*)



## SADRŽAJ

1	UVOD .....	1
1.1	Mijeloproliferativne neoplazme .....	1
1.1.1	Policitemija rubra vera .....	2
1.1.2	Esencijalna trombocitemija .....	2
1.1.3	Primarna mijelofibroza.....	3
1.2	Vaskularne komplikacije .....	5
1.3	Stanično signaliziranje.....	5
1.4	Janus kinaze .....	6
1.5	JAK – STAT signalni put .....	6
1.6	Biologija mutacije V617F .....	7
1.7	Ostale mutacije MPN-i .....	7
1.8	Molekularna dijagnostika mutacije V617F gena JAK2.....	8
2	CILJEVI.....	9
3	ISPITANICI I METODE.....	10
3.1	Ustroj studije.....	10
3.2	Ispitanici .....	10
3.3	Metode .....	10
3.3.1	Izolacija DNA iz pune krvi .....	10
3.3.2	Određivanje koncentracije i čistoće DNA.....	11
3.3.3	Detekcija mutacije V617F gena JAK2 metodom alel specifičnog PCR u stvarnom vremenu (kvantitativni PCR, qPCR).....	11
3.3.4	Interpretacija rezultata.....	13
3.4	Statističke metode.....	14
4	REZULTATI.....	15
4.1	Demografski opis i klinička slika ispitanika.....	15
4.2	Razlika u promatranim parametrima s obzirom na jak status .....	16
4.3	Povezanost dijagnoza sa promatranim parametrima .....	18
4.4	ET i razlika u numeričkim parametrima s obzirom na JAK2 status.....	20
5	RASPRAVA .....	23
6	ZAKLJUČCI.....	25
7	SAŽETAK .....	26
8	SUMMARY .....	27

9	LITERATURA .....	27
10	ŽIVOTOPIS .....	31

# 1 UVOD

## 1.1 Mijeloproliferativne neoplazme

Mijeloproliferativne neoplazme (MPN), u literaturi poznate još pod nazivom *mijeloproliferativni poremećaji*, stanja su obilježena nereguliranom proliferacijom jedne ili više hematopoetskih staničnih linija, pretežno u koštanoj srži, ali ponekad i u jetri i slezeni (1). Abnormalnim klonalnim bujanjem može biti zahvaćena bilo koja mijeloidna loza (eritroidna, granulocitna, megakariocitna ili mastocitna). MPN se zapravo očituju terminalnim širenjem mijeloidnih klonalnih stanica unutar periferne krvi (2).

Prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji iz 2016. godine, u ovoj se skupini razlikuje osam kliničko-patoloških podentiteta: kronična mijeloična leukemija (KML), policitemija rubra vera (PRV), esencijalna trombocitemija (ET), primarna mijelofibroza (PMF), kronična neutrofilna leukemija, kronična eozinofilna leukemija koja nije drugačije specificirana i neklasificirana mijeloproliferativna neoplazma (3). Danas je utvrđeno da MPN imaju zajedničku genetičku predispoziciju za nastanak bolesti. Njihova se fenotipska raznolikost pripisuje razlikama u specifičnim genetskim preuređenjima ili mutacijama koja su zapravo osnova klonske mijeloproliferacije (4). Obzirom na to, utvrđena je podjela MPN na prisutnost ili odsutnost BCR/ABL1 fuzijskog gena odnosno Philadelphia kromosoma (Ph+, Ph-; engl. *Philadelphia chromosome*). Kronična mijeloična leukemija (KML) jedina je Ph+ MPN koju karakterizira prisutnost fuzijskog gena. Zbog toga se često KML razmatra odvojeno od ostalih MPN-i. Najčešća prepoznata mutacija kod Ph – MPN-i jest Janus kinaza 2 (JAK2) koja je prisutna u većini bolesnika s dijagnozom PRV, ET ili PMF. Te tri bolesti smatraju se najčešćim oblicima MPN-i (5).

S epidemiološke strane, MPN su prvenstveno neoplazme odrasle dobi s vrhuncem pojavnosti u starijoj dobi, između 40. i 80. godine života, premda su pojedinačni slučajevi KML-a i ET-a zabilježeni već u dječjoj dobi (6). Utvrđeno je da je rizik za razvoj MPN 5 – 7 puta veći među srodnicima u prvom koljenu bolesnika s MPN što ukazuje na mogućnost prisutnosti genske predispozicije za MPN (7).

### 1.1.1 Policitemija rubra vera

PRV je klonalni poremećaj kojeg obilježava hiperprodukcija morfološki normalnih crvenih krvnih stanica, eritrocita (E). Nerijetko se nalaze trombocitoza i leukocitoza na račun granulocitoze (8). Kroničnog je i progresivnog tijeka (9). Učestalost bolesti je 0,5 do 2 slučaja na 100.000 stanovnika. Najčešće se dijagnosticira u šestom i sedmom desetljeću života, nešto češće u muškaraca, nego u žena (10). Smetnje koje PRV uzrokuje najčešće su posljedica povećane viskoznosti krvi i sklonosti tromboembolijama. Pacijenti mogu biti asimptomatski u vrijeme postavljanja dijagnoze, imati izoliranu splenomegaliju, eritrocitozu ili trombocitozu. Međutim, kod većine pacijenata simptomi se razvijaju porastom broja hematokrita (Hct) i/ili trombocita (Tr). Povišen Hct povezan je sa simptomima hiperviskoznosti krvi, uključujući glavobolju, zamagljen vid i pletoričnost (8). Pri pregledu, bolesnik je obično zagasito crvene boje kože i vidljivih sluznica. Ova boja je posljedica kombinacije prepunjenosti kapilara eritrocitima (E) i povećane količine (ali normalnog udjela) deoksigeniranog hemoglobina (Hb). Primijećeni su simptomi i znakovi hipermetabolizma: obilno znojenje, subfebrilitet, pruritis, hiperuricemija. Otkriće tipičnog genetskog biljega značajno je promijenilo dijagnostički algoritam za PRV. Vjerojatno somatska mutacija uzrokuje razvoj bolesti, no njezina priroda nije poznata. Najčešće opisana genska promjena jest mutacija JAK2 V617F prisutna u više od 90% bolesnika. U slučaju negativnog JAK2 V617F i mutacije JAK2 na egzonu 12 treba odrediti eritropoetin u serumu. Pri povećanom broju E u PRV proizvodnja eritropoetina treba biti suprimirana. Ukoliko je povećano lučenje eritropoetina, diferencijalna dijagnoza apsolutne eritrocitoze obuhvaća stanja sekundarne policitemije. Da bi se PRV razlikovala od KML, potrebno je učiniti citogenetičke, odnosno molekularne analize koštane srži. Nalaz pozitivan za Ph kromosom, odnosno potvrđena prisutnost fuzijskog prijepisa BCR-ABL t(9;22) dijagnostička je potvrda KML-a. Za razlikovanje PRV od rane PMF potrebno je učiniti biopsiju i histološki pregled koštane srži. U PMF se nalaze atipični megakariociti i fibroza. Histološkim pregledom pacijenta s PRV uočava se hiperplazija svih triju krvnih loza (9). Sažeti prikaz dijagnostičkih kriterija za PRV prikazan je u Tablici 1.

### 1.1.2 Esencijalna trombocitemija

ET karakterizirana je kontinuiranom klonskom proliferacijom megakariocita u koštanoj srži, s brojem trombocita preko  $450 \times 10^9/L$  u perifernoj krvi. Prije postavljanja dijagnoze ET, uzroci

reaktivne trombocitoze moraju se isključiti. Bolest je kroničnog tijeka i rijetko prelazi u drugu MPN-u (11).

U kliničkoj slici dominira predispozicija za vaskularne okluzivne događaje i krvarenja, uključujući cerebrovaskularnu, koronarnu i perifernu cirkulaciju. Neki bolesnici su asimptomatski dok se kod drugih može javiti glavobolja, poremećaj vida, nesvjestica, netipična bol u prsima, distalne parestezije, eritromelalgija. Arterijske i venske tromboze, kao i prolazne okluzije mikrocirkulacije i krvarenja uzrokovana trombocitima predstavljaju glavne rizike za bolesnike s ET-om (11).

Prvi korak u dijagnozi ET jest dijagnoza trombocitoze u perifernoj krvi ponekad praćena blagom anemijom i leukocitozom. Prisutnost mutacije na JAK2 V617F omogućuje razlikovanje ET od reaktivne trombocitoze. Uzroci reaktivne trombocitoze mogu biti upalna i postoperativna stanja, različite infekcije, maligne bolesti.

Histološkim pregledom koštane srži uočava se megakariocitna hiperplazija s nukleranim pleomorfizmom i nakupinama megakariocita (2). Sažeti prikaz dijagnostičkih kriterija za ET prikazan je u Tablici 1.

### 1.1.3 Primarna mijelofibroza

PMF opisana je kao kronična idiopatska mijelofibroza i agnoga mijeloidna metaplazija. Karakterizirana je nastankom progresivne fibroze koštane srži. Kako koštana srž postaje fibrotična, javlja se esktramedularna hematopoeza (mijeloidna metaplazija) ponajprije u jetri i slezeni jer se hematopoeza više ne odvija normalno (2). Poremećaj je obično primaran i posljedica je neoplastičke pretvorbe multipotentnih matičnih stanica koje potiču fibroblaste u srži na stvaranje velikih količina kolagena (12).

Rani simptomi su većinom asimptomatski. Kasnije se javlja izrazita splenomegalija, progresivna anemija i opći simptomi poput malaksalosti, mršavljenja i znojenja.

Leukoeritroblasti u perifernoj krvi redovit su nalaz. Karakteristične su morfološke promjene eritrocita pa se tako pojavljuju nezreli eritrociti u obliku suza, tzv. dakrociti. Punkcije koštane srži često su otežane zbog izrazite fibroze koštane srži. Histološkim pregledom karakteristična je hiperplazija granulocitopoeze i megakariocitopoeze s postojanjem retikulinskih vlakana. Posebne mrlje biopsije koštane srži upućuju na fibrozu. Citogenetske abnormalnosti

pojavljaju se u oko 50% pacijenata s ovom dijagnozom, a JAK2 V617F mutacija prisutna je u većini pacijenata (13). Sažeti prikaz dijagnostičkih kriterija za PMF prikazan je u Tablici 1.

Tablica 1. Dijagnostički kriteriji Svjetske zdravstvene organizacije za policitemiju rubru veru, esencijalnu trombocitemiju i primarnu mijelofibrozu iz 2016. godine (3)

	<b>Veliki kriterij</b>	<b>Mali kriterij</b>
<b>PRV</b>  <i>Potrebno je ispuniti 2 velika i 1 mali ili 3 velika kriterija</i>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Hgb&gt; 16,5g/dL (M) ili Hb&gt; 16g/dL (Ž)</li> <li>2. Hct&gt; 49% (M) ili Hct&gt; 48% (Ž)</li> <li>3. Hipercelularnost KS uz panmijelozu</li> <li>4. Pozitivna JAK2 V617F ili ekson 12 JAK2 mutacija</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Serumski eritropoetin ispod referentne vrijednosti</li> </ol>
<b>ET</b>  <i>Potrebno je ispuniti sva 4 velika kriterija ili 3 velika i 1 mali kriterij</i>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Broj trombocita <math>\geq 450 \times 10^9/L</math></li> <li>2. Proliferacija zrelih megakariocita u KS, bez ili s malo eritrocitne i granulocitne proliferacije</li> <li>3. Neispunjeni kriteriji za PRV, KML, mijelodisplastični sindrom (MDS) i dr.</li> <li>4. Pozitivna JAK2 V617F, CALR ili MPL mutacija</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Prisutnost klonskih markera (abnormalan kariotip)</li> <li>2. Odsutnost dokaza za reaktivnu trombocitozu</li> </ol>
<b>PMF</b>  <i>Potrebno je ispuniti velike kriterije uz barem 1 mali kriterij</i>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Proliferacija i atipija megakariocita u KS uz retikulinsku ili kolagenu fibrozu ili nalaz prefibrozne celularne faze bolesti</li> <li>2. Neispunjeni kriteriji za PRV, KML, MDS i dr.</li> <li>3. Pozitivna JAK2 V617F, CALR ili MPL mutacija</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Leukocitoza <math>\geq 11 \times 10^9/L</math></li> <li>2. Leukoeritroblastozu</li> <li>3. Povišen serumski LDH</li> <li>4. Anemija</li> <li>5. Palpabilna splenomegalija</li> </ol>

## 1.2 Vaskularne komplikacije

Krvarenja i tromboze predstavljaju najčešće i najznačajnije komplikacije MPN-i. Tromboza je ujedno i vodeći uzrok smrtnosti kod bolesnika ove skupine bolesti (14). Vaskularne komplikacije najčešće se manifestiraju u obliku arterijskih i venskih tromboza i poremećaja mikrocirkulacije (15).

Poremećaji mikrocirkulacije tipične su trombotske manifestacije kod pacijenata s PRV i ET i odgovorne su za široki raspon kliničkih simptoma koji proizlaze iz nagomilavanja trombocita u perifernoj cirkulaciji. Najčešći simptomi su eritromelalgija, poremećaji vida ili sluha, glavobolje. Eritromelalgija se najčešće javlja u PRV i ET, ali nikada u sekundarnoj trombocitozi, čime je potvrđeno da glavnu ulogu u nastanku ovog fenomena imaju funkcionalno poremećeni trombociti (16).

Trombotske okluzije velikih arterija najčešće uključuju moždane ili koronarne žile. Manifestiraju se u obliku cerebrovaskularnog infarkta (CVI), akutnog infarkta miokarda (AIM) i okluzije perifernih arterija. Često su ove manifestacije prve od simptoma koje upućuju na dijagnozu MPN, PRV ili ET (15). Ishemijski moždani udar, jedan od najčešćih uzroka smrti neliječenih osoba s PRV-om i dalje čini 30-40% svih trombotskih događaja u PRV bolesnika (17).

Venska trombofilija obično se može manifestirati u vidu dubokih venskih tromboza donjih ekstremiteta, tromboembolije pluća i intraabdominalnih ili cerebralnih venskih tromboza. Površni flebitis je također čest, a venske tromboze na neuobičajenim mjestima nisu tako rijetke kao u općoj populaciji (15).

## 1.3 Stanično signaliziranje

Sve stanice primaju signale i odgovaraju na signale iz svoga okoliša. Brojni različiti oblici molekula poput jednostavnih plinova, neurotransmitera, čimbenika rasta, peptidnih hormona, prenose informacije između stanica. Signalne molekule razlikuju se po strukturi, načinu prijenosa signala, načinu djelovanja na ciljane stanice. Mogu djelovati lokalno, na velike udaljenosti, neke prolaze staničnu membranu i vežu se za unutarstanične receptore u citoplazmi ili jezgri, dok se većina veže za receptore izložene na površini ciljane stanice. Postoje različite strukturalne obitelji fizioloških receptora uključenih u proces stanične

signalizacije: receptori spregnuti s G-proteinima, receptori koji se koriste nereceptorskim tirozin kinazama, receptorske tirozin kinaze i ostale skupine receptora (18, 19)

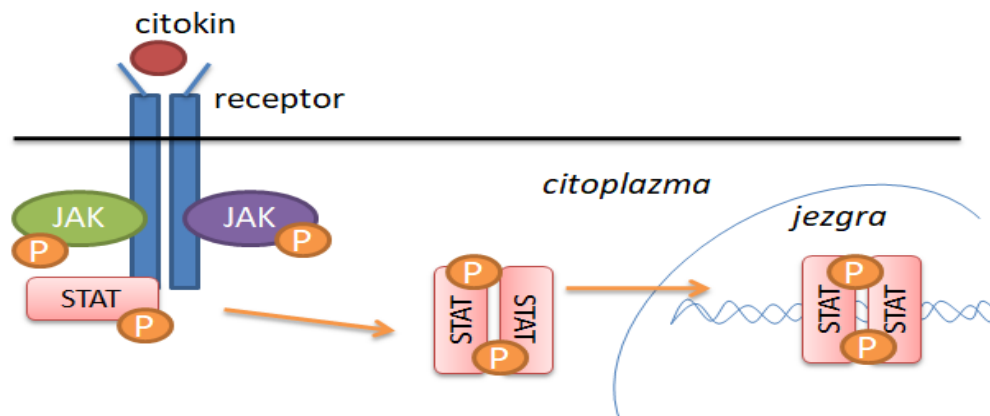
#### 1.4 Janus kinaze

Obitelj JAK pripada unutarstaničnim nereceptorskim tirozin kinazama. Naziv su dobile po rimskom bogu Janusu, bogu početka i svršetka, analogno njihovoj simetričnoj građi od dvije kinazne domene. JAK homologna domena 1 (JH1) je aktivna, dok druga domena (JH2) predstavlja katalitički neaktivnu pseudokinaznu domenu koja negativno regulira prvu domenu (20). JAK prenose signal putem transkripcijskih čimbenika STAT (eng. *Signal transducers and activators of transcription*). Sisavci imaju četiri člana ove obitelji; JAK1, JAK2, JAK3 i Tirozin kinaza 2 (Tyk2). Prilikom vezanja liganda na njihove membranske receptore, JAK se aktivira pokrećući specifičnu signalnu kaskadu koja sudjeluje u aktivaciji transkripcije gena uključenih u rast stanica, njihovu diferencijaciju ili funkciju (21).

#### 1.5 JAK – STAT signalni put

U sisavaca, JAK – STAT signalni put predstavlja glavni signalni mehanizam kojim se služe brojne molekule, a najviše citokini. U inaktivnom stanju, receptor za citokine nekovalentno je vezan za JAK. Nakon vezanja citokina na membranske receptore dolazi do aktivacije JAK-a zbog konformacijske promjene kompleksa. Naime, dva vezana JAK-a dolaze u neposrednu blizinu jedan drugome, omogućujući tako trans- i/ili auto-fosforilaciju. Aktivirani JAK-ovi nadalje fosforiliraju tirozinske ostatke u citoplazmatskim domenama receptora stvarajući vezno mjesto za SH2 domenu (eng. *Src homology 2*) monomernih STAT molekula, transkripcijskih čimbenika iz citoplazme. Kaskada se dalje nastavlja fosforilacijom tirozinskih ostataka u SH2 domeni. Nastali fosfotirozin omogućuje dimerizaciju STAT-a i njegov prijenos u jezgru (22, 23). Dimerizirani STAT-ovi ulaze u jezgru mehanizmom koji ovisi o importinu  $\alpha$ -5 i Ran malom proteinu (24) gdje se vežu za specifične regulatorne sekvence za aktiviranje ili utišavanje transkripcije ciljanih gena te tako izravno reguliraju ekspresiju gena (21, 22, 23)





Slika 1. Prikaz mehanizma aktivacije JAK2 kinazne aktivnosti mutacijom V617F

(autor slike: Ivona Gajdašić)

## 1.6 Biologija mutacije V617F

Somatska mutacija V617F JAK2 gena otkrivena je 2005. godine i predstavlja veliki napredak u razumijevanju, klasifikaciji i dijagnozi MPN(26)(27). JAK2 gen nalazi se na kratkom kraku kromosoma 9. Zbog mutacije jedne baze; gvanina u timin ( $G > T$ ) na 1849. poziciji u eksonu 14, dolazi do zamjene aminokiseline valin (V) u fenilalanin (F) na položaju 617 JH2 domene proteina(2, 28). Budući da se mutacija javlja u JH2, negativnoj regulatornoj domeni, dolazi do konstitutivne aktivacije JAK2 kinaze i aktivacije signalnih puteva JAK/STAT, PI3K/AKT, MAPK/ERK. Mutirani JAK2 protein aktivira transkripcijski čimbenik STAT5 potičući pojačanu proliferaciju stanica.

## 1.7 Ostale mutacije MPN-i

Osim JAK2 V617F mutacije, postoje i druge mutacije koje mogu sinergijski ili samostalno utjecati na razvoj MPN. Mutacije u eksonu12 gena JAK2 identificirane su u PRV. Opterećenje alelnih mutanata JAK2 može biti važno za identifikaciju visokorizičnih pacijenata s PRV ili ET (29). MPL gen (engl. *myeloproliferative leukemia protein*) koji kontrolira sintezu trombopoetinskog receptora identificiran je u ET i PMF. Sve češće se pojavljuju mutacije u genu koji kodira kalretikulin (CARL), a identificirane su u velikom udjelu pacijenata koji nisu imali JAK2 ili MPL mutaciju. Ove tri mutacije često su

međusobno isključive što znači ako je jedna mutacija prisutna, druge su odsutne. Ipak u 10% bolesnika nedostaje genska mutacija JAK2, CALR ili MPL i takvi su pacijenti „trostruko negativni“ (8).

## 1.8 Molekularna dijagnostika mutacije V617F gena JAK2

Identifikacija JAK2 V617F mutacije danas je važan marker u rutinskoj dijagnostici MPN-i. Provodi se u ranoj fazi obrade suspektog bolesnika. Pozitivan nalaz ključan je, ali nije jedini kriterij za postavljanje dijagnoze. U slučaju negativnog nalaza, dijagnoza bolesti ne može se isključiti te je potrebna daljnja obrada histološkim i kliničkim nalazima (28, 30, 31)

Od otkrića ove mutacije, veliki broj detekcijskih protokola postao je dostupan. Raznolikost dostupnih tehnika pruža fleksibilnost dizajna metoda koje se razlikuju po osjetljivosti, jednostavnosti izvođenja i interpretaciji rezultata. U dodatku, tehnike visoke osjetljivosti korisne su za nadziranje ostatne bolesti nakon liječenja. Neke od metoda jesu: kvantitativni PCR u stvarnom vremenu (qPCR), alel specifični PCR u stvarnom vremenu (engl. *Allele specific real time polymerase chain reaction*), analiza DNA cijepanjem pomoću restriksijskih enzima (engl. *restriction fragment length polymorphism; RFLP*), sekvenciranje sljedeće generacije (engl. *Next generation sequencing; NGS*) te mnoge druge. S obzirom na primijenjenu tehnologiju sama analiza može uključivati: analizu krivulje taljenja, analizu krivulje taljenja visoke rezolucije (engl. *HRM High resolution melting*) i druge, a sve su ovisne o specifičnim računalnim programima(31). Metoda kvantitativnog PCR-a pokazuje i do 10 puta veću osjetljivost u odnosu na druge metode.

## 2 CILJEVI

Ciljevi istraživanja su:

1. Ocijeniti učestalost prisutnosti somatske mutacije V617F u *JAK2* genu u skupinama oboljelih od MPN-i.
2. Ispitati postoji li razlika u ekspresiji mutacije V617F u *JAK2* genu između različitih podentiteta MPN-i.

### 3 ISPITANICI I METODE

#### 3.1 Ustroj studije

Istraživanje je ustrojeno kao presječno istraživanje na povijesnim podacima. Istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku (Ur.broj 2158-61-07-20-34).

#### 3.2 Ispitanici

U istraživanje su uključeni pacijenti kojima je u razdoblju od 1.01.2018. godine do 31.12.2019. godine dijagnosticirana MPN. Iz istraživanja su isključeni pacijenti s Ph pozitivnom MPN. Za dijagnozu bolesti korištena je elektronička baza podataka Laboratorija za molekularnu i HLA dijagnostiku Kliničkog zavoda za transfuzijsku medicinu te podatci medicinske dokumentacije pacijenata sa Zavoda za hematologiju Klinike za unutarnje bolesti Kliničkog bolničkog centra Osijek (KBCO).

#### 3.3 Metode

##### 3.3.1 Izolacija DNA iz pune krvi

Genomska DNA izolirana je iz 200  $\mu$ L pune krvi prikupljene u vakuteiner s  $K_2EDTA$  primjenom komercijalnog seta QIAamp DNA Blood Mini (Qiagen, Hilden, Njemačka) prema protokolu koji navodi proizvođač. Tehnika izolacije DNA temeljena je na selektivnom svojstvu vezanja DNA za silika membranu od koje su u seriji koraka ispiranja odvojeni stanični dijelovi i ostale nečistoće. Izolirana DNA eluirana je u 100  $\mu$ L elucijskog pufera, određena joj je koncentracija i do analize pohranjena je na  $-20^{\circ}C$ .

### 3.3.2 Određivanje koncentracije i čistoće DNA

Koncentracija DNA određuje se mjerenjem optičke gustoće na 260 nm pomoću UV/VIS spektrofotometra. Koncentracija DNA u svakom uzorku prilagođena na 5 ng/μL. Omjer apsorbancije  $A_{260}/A_{280}$  mora biti u rasponu od 1,7 do 1,9. Manji omjer od 1,7 upućuje na kontaminaciju proteinima ili organskim otapalima što može ometati PCR reakciju.

### 3.3.3 Detekcija mutacije V617F gena JAK2 metodom alel specifičnog PCR u stvarnom vremenu (kvantitativni PCR, qPCR)

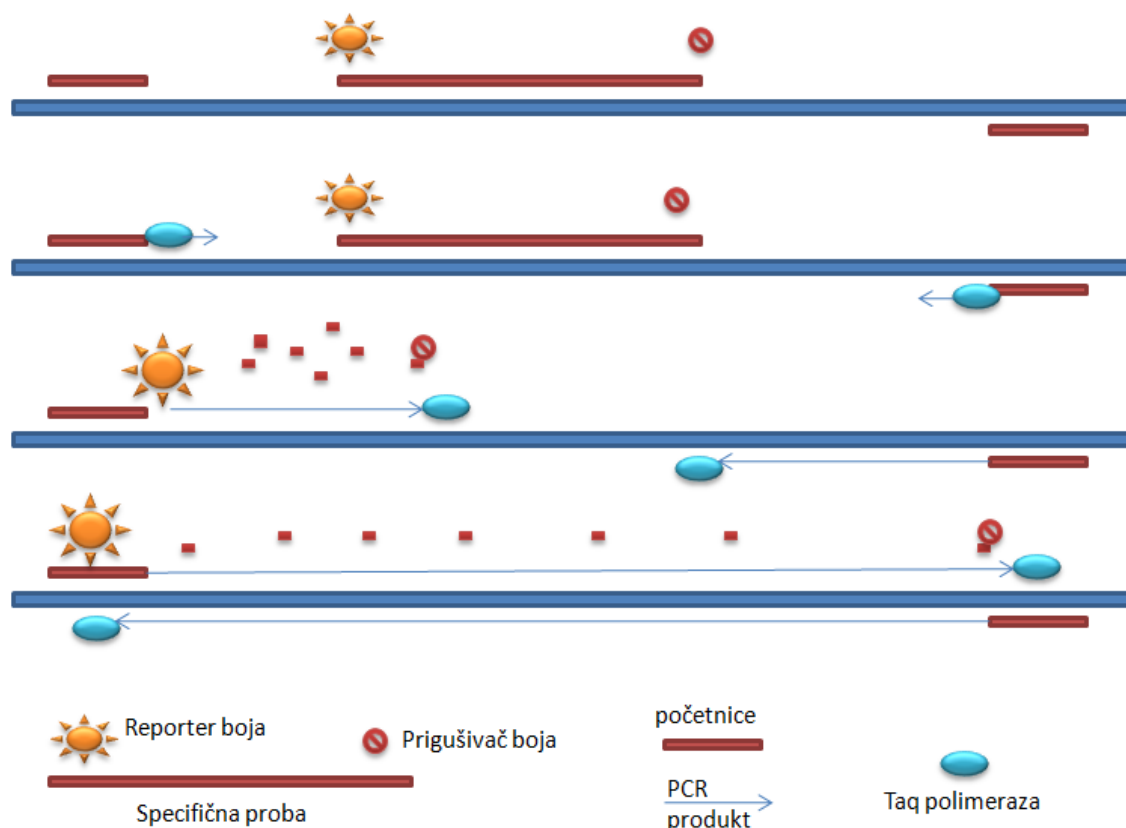
Za detekciju mutacije korišten je komercijalni set „Ipsogen JAK2 MutaSearch“ (Qiagen, Hilden, Njemačka) prema uputama proizvođača.

U testu su pripremane dvije odvojene reakcijske smjese, a svaka uključuje specifični set početnica i proba. Jedna reakcijska smjesa koristi se za umnažanje slijeda DNA bez mutacije ili divljeg tipa JAK2 domene (JAK2 WT), a druga reakcijska smjesa koristi se za umnažanje slijeda s mutiranim V617F JAK2 alelom (JAK2 VF). Ukupni volumen reakcijske smjese iznosio je 25 μL i sadržavao je: 5 μL izolirane DNA, 12,5 μL TaqMan Master Mixa 2x, 1 μL specifičnih primera i proba i 6,5 μL PCR vode. Svaki uzorak analiziran je u duplikatu za obje reakcijske smjese primjenom kvantitativnog PCR-a u stvarnom vremenu. U svaku analizu uvrštene su pozitivna kontrola (kontrola s V617F alelom), negativna kontrola (kontrola s normalnim slijedom DNA) te COS (uzorak u sivoj zoni; sadrži 1% V617F alela). Program umnažanja sastojao se od inicijalnih 10 minuta na 95°C (aktivacija) te 50 ciklusa po 15 sekundi na 95°C (denaturacija) i 60 sekundi na 62°C (ekstenzija). Za umnažanje i analizu odsječaka gena JAK2 korišten je PCR uređaj LightCycler 480 II (Roche) s pripadajućim računalnim programom.

Lančana reakcija polimerazom (PCR; engl. *Polimerase chain reaction*) omogućuje eksponencijalno umnožavanje određenog fragmenta molekule DNA. qPCR metoda mjeri akumulaciju PCR produkta označenog fluorescentnom probom (TaqMan probom) tijekom eksponencijalne faze PCR amplifikacije. Metoda omogućuje vrlo preciznu i reproducibilnu količinu umnoženog slijeda DNA. PCR u stvarnom vremenu ima vrlo velik dinamički raspon prepoznavanja početne ciljne molekule. Za razliku od drugih metoda, qPCR u stvarnom

vremenu ne zahtijeva dodatne metode za analizu produkta čime se sprječava potencijalna kontaminacija uzorka i omogućava dobivanje rezultata u kraćem vremenskom razdoblju.

Princip testa temeljen je na početnicama i oligonukleotidnim probama koje su obilježene s dvije fluorescnetne boje (quencher i reporter). Tijekom PCR-a početnice hibridiziraju na točno određeni slijed DNA nakon čega se oligonukleotidna proba veže za točno određeni komplementarni slijed unutar PCR produkta. Ukoliko je prisutna ciljna sekvenca proba se veže za nju te ju 5'→3' egzonukleazna aktivnost *Thermus aquaticus* (Taq) DNA polimeraze cijepa, pri čemu se oslobađaju boje i dolazi do emisije fluorescentnog signala (Slika 2). S povećanjem broja ciklusa povećava se količina PCR produkta, a time se akumulira i fluorescencija što bi značilo da je fluorescencija direktno proporcionalna s amplifikacijom ciljne sekvence. Ukoliko proba nije komplementarna ciljnoj sekvenci, neće doći do njezinog vezanja, a time i do egzonukleazne aktivnosti DNA polimeraze pa zbog udaljenost između quencher i reporter boje emisija fluorescencije će biti supresirana.

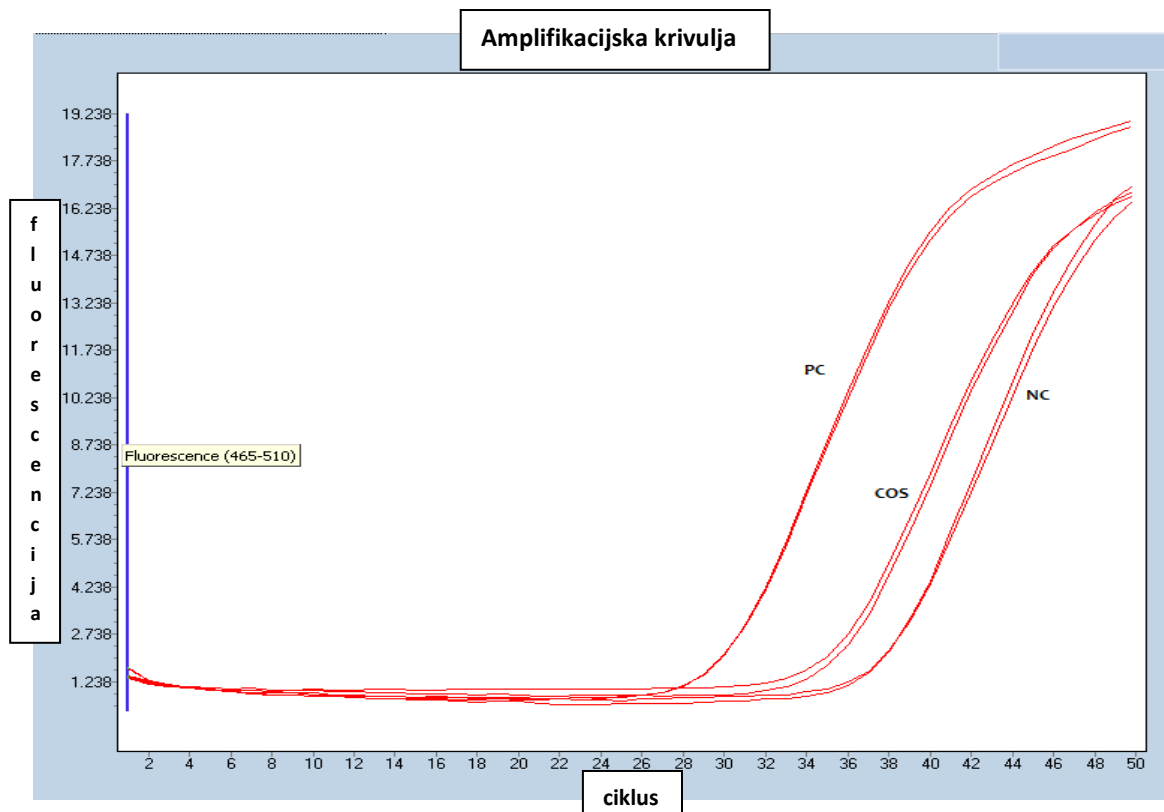


Slika 2. Princip PCR reakcije

(autor slike: Ivona Gajdašić)

### 3.3.4 Interpretacija rezultata

Krivulje amplifikacije predstavljaju grafički prikaz reakcije. Krivulja amplifikacije ovisi o razini fluorescencije (y os) i broju ciklusa (x os) (Slika 3). Svaki qPCR sastoji se od eksponencijalne faze, linearne faze i plato faze. Broj ciklusa u kojem na amplifikacijskoj krivulji dolazi do povećanja količine nastalog produkta, odnosno porasta fluorescencije naziva se  $C_p$  vrijednost (engl. crossing point). Za svaki uzorak očitavaju se  $C_p$  vrijednosti, uključujući  $C_p$  vrijednost za pozitivnu kontrolu (PC), negativnu kontrolu (NC) i uzorak u sivoj zoni (COS). Prema uputama proizvođača, za detekciju JAK2 V617F poznate  $C_p$  vrijednosti uvrštavaju se u jednadžbu za izračun rezultata. Mogući ishodi analize jesu: uzorak je pozitivan, negativan ili je u području sive zone ukoliko sadrži oko 1% V617F alelne varijante. U tome slučaju, potrebno je ponoviti analizu nakon određenog vremenskog razdoblja.



Slika 3. Primjer amplifikacijskih krivulja uzoraka pozitivne kontrole (PC), negativne kontrole (NC) i kontrolnog uzorka u sivoj zoni (COS) analiziranih u reakcijskoj smjesi koja sadrži specifične početnice i hibridizacijske probe za mutirani alel.

### 3.4 Statističke metode

Kategorijski podatci su predstavljeni apsolutnim i relativnim frekvencijama. Numerički podatci su opisani aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom u slučaju raspodjela koje slijede normalnu, a u ostalim slučajevima medijanom i granicama interkvartilnog raspona.

Za usporedbu kategorijskih podataka korišten je Hi-Kvadrat test, te po potrebi Fisherov egzaktni test, dok su za usporedbu numeričkih nezavisnih podataka korišteni Mann-Whitney U test te Kruskal-Wallis test i Conover post-hoc test.

Statistička analiza učinjena je programskim sustavom MedCalc (inačica 19.4.1, MedCalc Software bvba), uz odabranu razinu značajnosti od  $\alpha=0,05$ . Sve P vrijednosti su dvostrane.

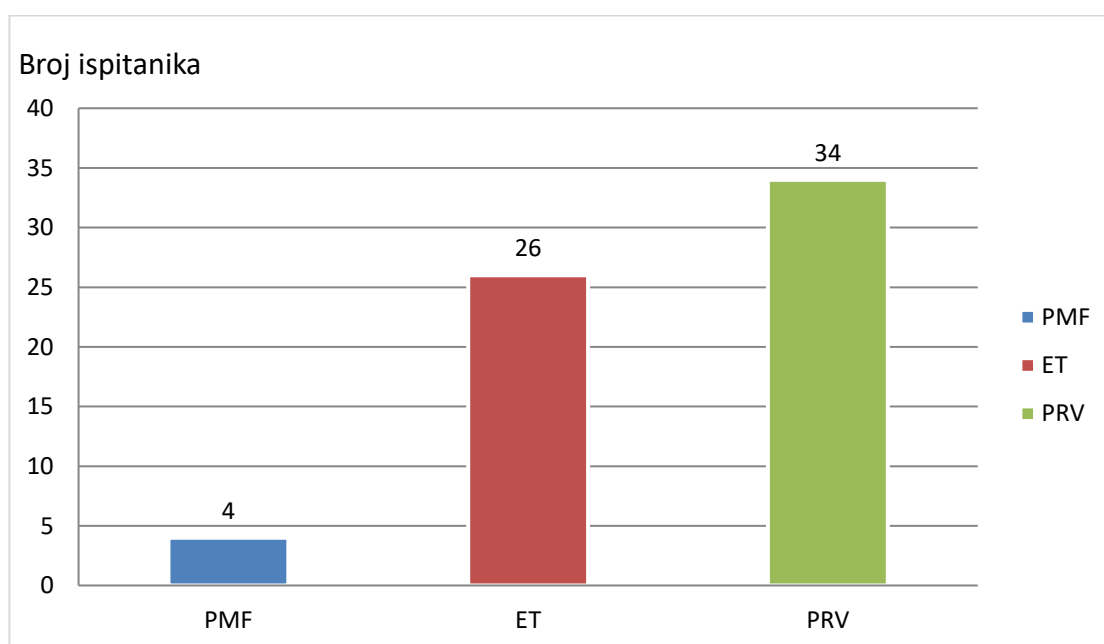


## 4 REZULTATI

### 4.1 Demografski opis i klinička slika ispitanika

U istraživanju je sudjelovalo ukupno 64 ispitanika. Medijan prosječne starosne dobi iznosio je 67,5 godina uz interkvartilni raspon od 61,0 do 74,0 godine, te ukupni raspon od 28,0 do 86,0 godina. Nije bilo značajne razlike u proporcijama prema spolu, ispitanika muškog spola je bilo 26 (40,6 %), a ispitanika ženskog spola 38 (59,4 %) (Hi-Kvadrat test,  $P = 0,29$ ).

Somatska mutacija V617F JAK2 gena, prisutna je kod većine ispitanika (Hi-kvadrat test,  $P < 0,001$ ), kod njih 56 (87,5 %). PMF dijagnoza je značajno rjeđa dijagnoza (Hi-kvadrat test,  $P < 0,001$ ) među ispitanicima (Slika 4).



Slika 4. Učestalost podentiteta MPN-i među ispitanicima

Trombozu je imalo značajno manje od polovice ispitanika (Hi-kvadrat test,  $P < 0,001$ ), njih 11 (17,2 %). Od toga broja njih 8 (72,7 %) je imalo arterijsku trombozu dok je njih 3 (27,3 %) imalo vensku trombozu (Fisherov egzakti test,  $P = 0,39$ ). Prosječne vrijednosti kliničkih parametara prikazane su u tablici (Tablica 2).

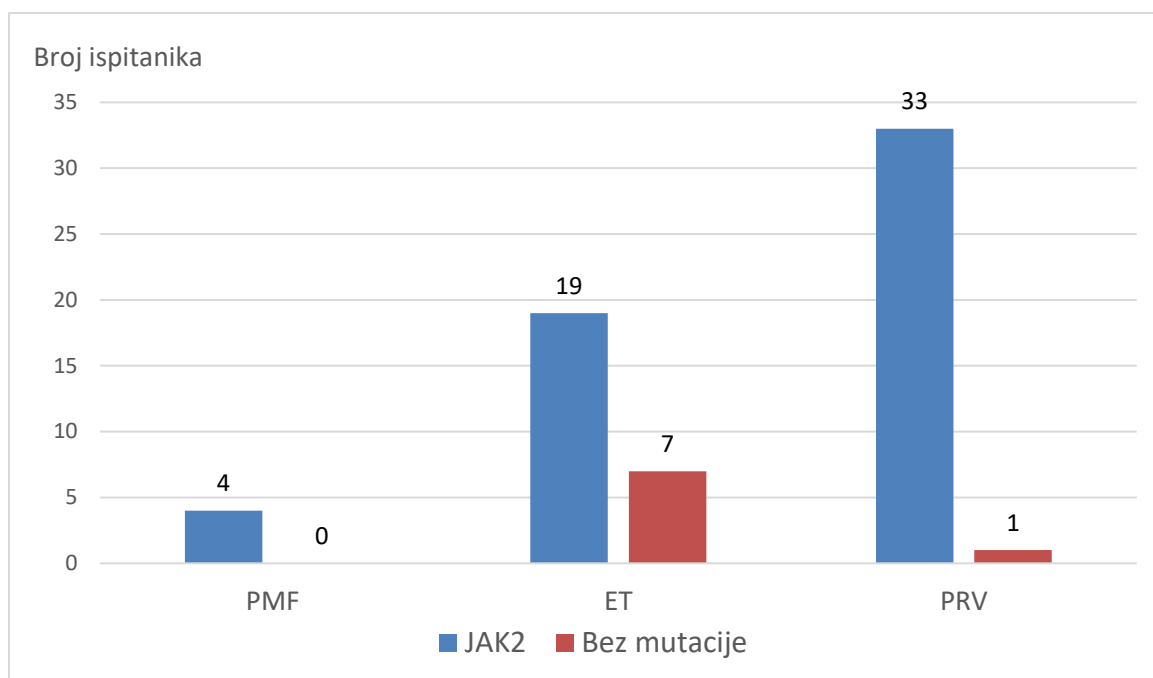
Tablica 2. Distribucija numeričkih vrijednosti kliničkih parametara među ispitanicima

Parametar (mjerna jedinica)	Prosječna vrijednost	Raspon (minimum-maksimum)
Eritrociti ( $10^{12}/L$ ) /aritmetička sredina (SD)	5,9 (1,3)	3,2 - 8,9
Hemoglobin (g/L) /aritmetička sredina (SD)	158,7 (24,9)	103,0 - 215,0
Hematokrit (L/L) /aritmetička sredina (SD)	0,49 (0,08)	0,31 - 0,69
Leukociti ( $10^9/L$ ) /median (interkvartilni raspon)	9,6 (8,2 - 13,7)	4,8 - 21,6
Trombociti ( $10^9/L$ ) /aritmetička sredina (SD)	626,8 (241,3)	112,0 - 1183,0
Laktat dehidrogenaza (U/L) /median (interkvartilni raspon)	233,0 (203,5 - 289,5)	163,0 - 654,0

#### 4.2 Razlika u promatranim parametrima s obzirom na jak status

Pronađena je značajna povezanost između JAK2 statusa i dijagnoze ispitanika (Fisherov egzaktni test,  $P = 0,03$ ) gdje su svi ispitanici s dijagnozom PMF pozitivni na JAK2 mutaciju (100%), 33 (97,06%) ispitanika s PRV dijagnozom pozitivno je na mutaciju, a samo 1 (2,94%) pacijent nema traženu mutaciju. Negativan nalaz na JAK2 mutaciju značajno je najčešća dijagnoza ET, odnosno 19 (73,08%) ispitanika je pozitivno, dok 7 (26,92%) ispitanika je negativno na JAK2 mutaciju (Slika 5).

Nije nađena povezanost JAK2 statusa sa spolom niti s prisutnošću tromboze kod ispitanika (Tablica 3).



Slika 5. Učestalost JAK2 mutacije među ispitanicima s različitim dijagnozama

Tablica 3. Distribucija prema spolu, dijagnozi i prisutnosti tromboze s obzirom na JAK status

Parametar		Broj (%) ispitanika		P*
		Prisutna mutacija	Nije prisutna mutacija	
Spol	Muški	23 (41,1)	3 (37,5)	>0,99
	Ženski	33 (58,9)	5 (62,5)	
Dijagnoza	Primarna mijelofibroza	4 (7,1)	0	0,03
	Esencijalna trombocitemija	19 (33,9)	7 (87,5)	
	Policitemija rubra vera	33 (58,9)	1 (12,5)	
Tromboza	Prisutna	10 (17,9)	1 (12,5)	>0,99
	Ne	46 (82,1)	7 (87,5)	
Ukupno		56 (100,0)	8 (100,0)	

\*Fisherov egzaktni test

Značajna razlika (Mann-Whitney U test,  $P < 0,05$ ) između ispitanika s mutacijom gena i bez prisutne mutacije nađena je i za sljedeće kliničke parametre: E, Hb, Hct te L. Za sve navedene parametre prosječna vrijednost je značajno veća kod ispitanika s prisutnom JAK2 mutacijom (Tablica 4).

Tablica 4. Razlika u numeričkim vrijednostima kliničkih parametrima s obzirom na JAK status

Parametar (mjerna jedinica)	median (interkvartilni raspon)		<i>P</i> *
	Prisutna mutacija	Nije prisutna mutacija	
Dob pri dijagnozi	68,5 (62,0 - 74,5)	61,0 (49,5 - 69,5)	0,08
Eritrociti ( $10^{12}/L$ )	5,9 (5,0 - 7,1)	4,7 (4,0 - 5,7)	0,009
Hemoglobin (g/L)	164,0 (148,5 - 173,0)	134,5 (121,0 - 148,0)	0,004
Hematokrit (L/L)	0,50 (0,44 - 0,55)	0,41 (0,37 - 0,46)	0,004
Leukociti ( $10^9/L$ )	9,9 (8,7 - 14,4)	7,9 (6,1 - 10,9)	0,006
Trombociti ( $10^9/L$ )	617,5 (453,0 - 772,0)	593,5 (544,0 - 731,5)	0,94
Laktat dehidrogenaza (U/L)	231,0 (202,8 - 273,5)	273,0 (240,3 - 493,3)	0,17

\*Mann-Whitney U test

### 4.3 Povezanost dijagnoza sa promatranim parametrima

Ispitanici s različitim dijagnozama ne razlikuju se značajno po spolu niti po prisutnosti tromboze (Tablica 5).

Tablica 5. Distribucija ispitanika prema spolu i trombozi s obzirom na dijagnozu

Parametar		Broj (%) ispitanika			P*
		Primarna mijelofibroza	Esencijalna trombocitemija	Policitemija rubra vera	
Spol	Muški	3 (75,0)	9 (34,6)	14 (41,2)	0,37
	Ženski	1 (25,0)	17 (65,4)	20 (58,8)	
Tromboza	Prisutna	0	5 (19,2)	6 (17,6)	>0,99
	Ne	4 (100,0)	21 (80,8)	28 (82,4)	
Ukupno		4 (100,0)	26 (100,0)	34 (100,0)	

\*Fisherov egzakti test

Značajne razlike među ispitanicima s različitim dijagnozama nađene su za vrijednosti E, Hb, HCT i Tr. Ispitanici sa PRV imaju značajno veće (Post-hoc Conover test,  $P < 0,05$ ) prosječne vrijednosti E, Hb, Hct, odnosno značajno manju (Post-hoc Conover test,  $P < 0,05$ ) vrijednost Tr u odnosu na ispitanike s ostale dvije dijagnoze (Tablica 6). Ispitanici s različitim dijagnozama se ne razlikuju niti po dobi niti po kliničkim parametrima L i LDH (Tablica 6).

Tablica 6. Razlika u numeričkim vrijednostima kliničkih parametara s obzirom na dijagnozu MPN-i

Parametar (mjerna jedinica)	median (interkvartilni raspon)			P*
	Primarna mijelofibroza	Esencijalna trombocitemija	Policitemija rubra vera	
Dob pri dijagnozi	59,0 (49,5 - 70,0)	69,0 (62,0 - 72,0)	66,5 (61,0 - 75,0)	0,50
Eritrociti (10 <sup>12</sup> /L)	4,9 (3,7 - 5,6)	4,9 (4,5 - 5,6)	6,7 (6,0 - 7,6)	<0,001
Hemoglobin (g/L)	125,5 (110,5 - 147,5)	141,0 (133,0 - 154,0)	170,5 (164,0 - 183,0)	<0,001
Hematokrit (L/L)	0,39 (0,32 - 0,44)	0,43 (0,40 - 0,46)	0,53 (0,49 - 0,59)	<0,001
Leukociti (10 <sup>9</sup> /L)	12,7 (7,2 - 19,2)	9,4 (8,3 - 11,4)	10,0 (8,0 - 14,5)	0,66
Trombociti (10 <sup>9</sup> /L)	611,0 (327,0 - 981,0)	694,0 (606,0 - 893,0)	500,5 (371,0 - 653,0)	<0,001
Laktat dehidrogenaza (U/L)	378,0 (224,0 - 588,0)	242,0 (227,0 - 273,0)	230,5 (190,0 - 308,0)	0,18

\*Kruskal-Wallis test

#### 4.4 ET i razlika u numeričkim parametrima s obzirom na JAK2 status

Kod ispitanika s PMF dijagnozom svi imaju JAK2 mutaciju, kod ispitanika s PRV dijagnozom također gotovo svi imaju JAK2 mutaciju (samo jedan od 34 ispitanika nema). Stoga slijedi analiza promatranih parametara na ispitanicima s ET dijagnozom.

Nije nađena povezanost između JAK statusa i spola, odnosno pojave tromboze (Tablica 7).

Tablica 7. Razlika prema spolu i učestalosti tromboze s obzirom na JAK status kod ET dijagnoze

Parametar		Broj (%) ispitanika		P*
		Prisutna mutacija	Nije prisutna mutacija	
Spol	Muški	6/19	3/7	0,66
	Ženski	13/19	4/7	
Tromboza	Prisutna	4/19	1/7	>0,99
	Ne	15/19	6/7	
Ukupno		19	7	

\*Fisherov egzakti test

Značajna razlika (Mann-Whitney U test,  $P < 0,05$ ) između ispitanika s mutacijom gena i bez prisutne mutacije, uz ET dijagnozu, nađena je za Hb i LDH vrijednosti. Vrijednost Hb je značajno veća, a vrijednost LDH je značajno manja kod ispitanika s prisutnim JAK statusom (Tablica 8).

Tablica 8. Razlika u numeričkim vrijednostima kliničkih parametara s obzirom na JAK status kod esencijalne trombocitemije

Parametar (mjerna jedinica)	median (interkvartilni raspon)		P*
	Prisutna mutacija	Nije prisutna mutacija	
Dob pri dijagnozi	69,0 (62,0 - 72,8)	62,0 (48,8 - 69,8)	0,19
Eritrociti ( $10^{12}/L$ )	4,9 (4,8 - 5,5)	4,4 (3,9 - 5,5)	0,18
Hemoglobin (g/L)	147,0 (139,3 - 154,0)	133,0 (119,0 - 137,5)	0,03
Hematokrit (L/L)	0,44 (0,42 - 0,47)	0,41 (0,36 - 0,42)	0,06
Leukociti ( $10^9/L$ )	9,6 (8,8 - 11,3)	8,3 (7,1 - 11,7)	0,27
Trombociti ( $10^9/L$ )	706,0 (625,3 - 929,8)	634,0 (547,0 - 753,8)	0,13
Laktat dehidrogenaza (U/L)	229,0 (222,0 - 252,0)	357,5 (266,5 - 544,5)	0,01

\*Mann-Whitney U test



## 5 RASPRAVA

Razumijevanju patogeneze MPN-i uvelike je pridonijelo otkriće JAK2 V617F mutacije 2005. godine, koja je danas prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji jedna od važnijih, ako ne i najvažniji dijagnostički kriterij. Međutim, u kojoj je mjeri JAK2 V617F uključen u određeni fenotip bolesti te koji podtip ima najveću učestalost mutacije i dalje je tema od interesa u hematološkom svijetu.

U ovo istraživanje je uključeno 64 pacijenta s pozitivnom dijagnozom MPN u KBC-u Osijek koji su oboljeli u prethodne dvije godine, s time da nije bilo značajne razlike u proporcijama prema spolu, odnosno oko 10% više oboljelih je žena nego muškaraca.

Dobiveni rezultati uspoređeni su s literaturnim podacima.

Prosječna dob pri obolijevanju od MPN naših bolesnika je 67,5 godina. Odnosno, bolesnici s dijagnozom pripadnici su stare populacije, a s obzirom na podtipove bolesti, najstariji bolesnici su s dijagnozom ET, čija prosječna starosna dob iznosi 69 godina. Gledajući JAK status, nema značajne razlike prema dobi pacijenata. Općenito, prema Američkom hematološkom društvu (engl. *The American Society of Hematology*; ASH), jedan od rizičnih faktora za obolijevanje upravo je dob > 60 godina (32).

Pronađena je značajna povezanost između JAK2 statusa i dijagnoze ispitanika. Pozitivan JAK status, odnosno JAK2 V617F mutacija prisutna je u 87,5% bolesnika s MPN. Od podtipova MPN, najviše pacijenata s dijagnozom PRV ima pozitivnu mutaciju, njih 97,06%. Naši rezultati istraživanja slični su većini istraživanja, posebno u slučaju PRV-a. U usporedbi s našim rezultatima, Horn i sur. detektirali su mutaciju u 96% slučajeva PRV-a što je najbližnji našem rezultatu (33). U navedenim istraživanjima različitih populacija, prisutnost mutacije u PRV-u iznosi preko 80% (34-37).

Kod oboljelih od ET u našem je istraživanju mutacija JAK2 V617F nađena u 73,8% pacijenata. U ovom slučaju, 26,92% pacijenata nema mutaciju, a imaju razvijenu bolest. Ovakvi rezultati preklapaju se s mnogim studijama u kojima, također, obzirom na druge podtipove MPN, ET bilježi visoku stopu negativnih na mutaciju s pozitivnom dijagnozom (34-37). Ženski spol prevladava u skupini bolesnika s ET kao i u studiji Horvat i sur. (38).

Sva četiri oboljela pacijenta od PMF pozitivna su na mutaciju, što bi značilo da je pozitivan JAK status 100% povezan s dijagnozom PMF, no uključeni broj pacijenata premali je za donošenje konačnih zaključaka temeljenih na statističkoj analizi. Prema studijama koje smo obradili, u svijetu su rezultati drugačiji: u indijskoj populaciji prema studiji Sazawal i sur. (34). JAK V617F mutacija prisutna je kod 52% PMF bolesnika, kod Egipćana 12,5%(36), a u studiji Basiquera i sur. (37) pozitivnu mutaciju ima 47% PMF bolesnika.

U istraživanju nije pronađena povezanost JAK statusa i pojave tromboze. Trombozu je imalo manje od polovice ispitanika. Moguće je da bismo dobili drugačije rezultate da je bio uključen veći broj pacijenata. Za buduće studije, valjalo bi ispitati povezanost JAK statusa i tromboze na većoj populaciji. U 72,7% pacijenata se radilo o arterijskoj trombozi, a samo njih 27,3% imalo je vensku trombozu. Sličan rezultat nalazimo u hrvatskoj studiji Horvat i sur. (38) u kojoj su potvrdili da je arterijska tromboza učestalija od venske tromboze u JAK2 V617F pozitivnih bolesnika.

Pacijenti pozitivni na traženu mutaciju imali su značajno veće vrijednosti pojedinih laboratorijskih parametara (E, Hb, Hct, te L). Ono što je zanimljivo primijetiti jesu razlike u kliničkim parametrima obzirom na JAK status kod dijagnoze ET. JAK pozitivni pacijenti imaju veće vrijednosti Hb, a manje vrijednosti LDH u odnosu na JAK negativne pacijente. U usporedbi s našim rezultatima, rezultati jedne riječke studije (35) povezuju JAK2 V617F mutaciju s većim vrijednostima L u ET skupini, a veći broj Tr i LDH u PRV skupini.

## 6 ZAKLJUČCI

Na temelju provedenog istraživanja može se zaključiti:

1. Somatska mutacija JAK2 V617F povezana je s dijagnozom MPN-i. Mutacija je prisutna kod većine pacijenata.
2. Učestalost mutacije JAK2 V617F viša je u oboljelih od PRV u odnosu na ET. U PMF svi oboljeli pozitivni su na JAK2 V617F mutaciju.
3. U ET najviše je pacijenata negativnih na somatsku mutaciju JAK2 V617F.
4. U objavljenim studijama, provedenim u Hrvatskoj i u drugim populacijama, podatci za učestalost mutacije JAK2 V617F kod oboljelih od PRV, ET i PMF variraju. Naši se rezultati za podtipove PRV i ET nalaze u okviru raspona učestalosti mutacije prisutnog u publiciranim studijama. U PMF uključeni broj pacijenata premali je za donošenje konačnih zaključaka baziranih na statističkoj analizi.

## 7 SAŽETAK

**Uvod:** Brojnim istraživanjima mijeloproliferativnih neoplazmi (MPN); policitemiji rubra vera (PRV), esencijalnoj trombocitemiji (ET) i primarnoj mijelofibrozi (PMF) primijećena je učestalost pojavljivanja mutacije V617F u Janus kinaza 2 genu (JAK2).

**Ciljevi istraživanja:** Ocijeniti učestalost prisutnosti somatske mutacije V617F u JAK2 genu u skupinama oboljelih od MPN te ispitati postoji li razlika u ekspresiji mutacije između različitih podentiteta MPN.

**Ispitanici i metode:** Istraživanje obuhvaća 64 bolesnika s dijagnozom MPN: PRV (34), ET (26) i PMF (4). DNA je izolirana iz uzoraka pune krvi. Detekcija JAK2 V617F učinjena je metodom kvantitativnog PCR u stvarnom vremenu.

**Rezultati:** Somatska mutacija V617F JAK2 gena, prisutna je kod većine ispitanika ( $P < 0,001$ ), kod njih 56 (87,5 %). Pronađena je značajna povezanost između JAK2 statusa i dijagnoze ispitanika ( $P = 0,03$ ). Učestalost mutacije u PMF je 100%, u PRV 97,06%, a u ET 73,08%. Trombozu je imalo 17,2% pacijenata ( $P < 0,001$ ). Od toga broja 72,7 % bila je arterijska tromboza. Prosječna vrijednost značajno je veća kod ispitanika s prisutnom JAK2 mutacijom za sljedeće kliničke parametre; eritrociti, hemoglobin, hematokrit i leukociti ( $P < 0,05$ ). Vrijednost Hb je značajno veća, a vrijednost LDH je značajno manja kod ispitanika s ET i prisutnim JAK statusom ( $P < 0,05$ ).

**Zaključak:** U objavljenim studijama provedenim u Hrvatskoj i u drugim populacijama podaci za učestalost mutacije JAK2 V617F kod oboljelih od PRV, ET i PMF variraju. Naši se rezultati za podtipove PRV i ET nalaze u okviru raspona učestalosti mutacije prisutnog u publiciranim studijama. U PMF uključeni broj pacijenata premali je za donošenje konačnih zaključaka baziranih na statističkoj analizi.

**Ključne riječi:** mutacija JAK2 V617F, mijeloproliferativne neoplazme, policitemija rubra vera, primarna mijelofibroza, esencijalna trombocitemija

## 8 SUMMARY

**Introduction:** In numerous studies of myeloproliferative neoplasms (MPN): polycythemia rubra vera (PRV), essential thrombocythemia (ET) and primary myelofibrosis (PMF), the incidence of the V617F mutation in the JAK2 gene has been observed.

**Objectives:** The aim of this research is to evaluate the frequency of the presence of somatic mutation V617F in the JAK2 gene in the groups of patients with MPN and to examine whether there is a difference in the expression of the mutation between different subtypes of MPN.

**Participants and Methods:** The group of participants includes 64 patients with MPN diagnoses: PRV (34), ET (26) and PMF (4). The DNA was isolated from a blood samples and analysis of JAK2 V617F was performed by quantitative real-time PCR.

**Results:** Somatic mutation of the V617F JAK2 gene was present in most patients ( $P < 0.001$ ), in 56 of them (87.5%). A significant correlation was found between JAK2 status and the diagnosis of the subjects ( $P = 0.03$ ). The frequency of mutation in PMF is 100%, in PRV 97.06%, and in ET 73.08%. 17.2% of patients had thrombosis ( $P < 0.001$ ). Of that number, 72.7% were arterial thrombosis. The mean value was significantly higher in subjects with the JAK2 mutation present for the following clinical parameters; E, Hb, Hct, L ( $P < 0.05$ ). The value of Hb is significantly higher, and the value of LDH is significantly lower in subjects with present JAK status ( $P < 0.05$ ).

**Conclusion:** In published studies conducted in Croatia and in other populations, data for the frequency of JAK2 V617F mutation in patients with PRV, ET and PMF vary. Our results for the PRV and ET subtypes are within the range of mutation frequencies present in published studies. The number of patients included in the PMF is too small to draw final conclusions based on statistical analysis.

**Keywords:** JAK2 V617F mutation, myeloproliferative neoplasms, polycythemia rubra vera, primary myelofibrosis essential thrombocythemia

## 9 LITERATURA

1. Passamonti F, Mora B, Maffioli M. New molecular genetics in the diagnosis and treatment of myeloproliferative neoplasms. *Curr Opin Hematol.* 2016;23:137–43.
2. Tefferi A, Pardanani A. Myeloproliferative neoplasms: A Contemporary Review. *JAMA Oncol.* 2015;1:97-105.
3. Barbui T, Thiele J, Gisslinger H, Kvasnicka MH, Vannucchi MA, Guglielmelli P, i sur. The 2016 WHO classification and diagnostic criteria for myeloproliferative neoplasms: document summary and indepth discussion. *Blood Cancer J.* 2018;8:15.
4. Tefferi A, Gilliland DG. Oncogenes in myeloproliferative disorders. *Cell Cycle.* 2007;550-566- 6.
5. Nangalia J, Green TR. The evolving genomic landscape of myeloproliferative neoplasms. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2014. 2014:287–96.
6. Sant M, Allemani C, Tereanu C, De Angelis R, Capocaccia R, Visser O, i sur. Incidence of haematological malignancy by in Europe by morphologic subtype: results of the HAEMACARE project. *Blood* 2010;116:3724–34.
7. Landgren O, Goldin LR, Kristinsson SY, Helgadóttir EA, Samuelsson J, Björkholm M. Increased risks of polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myelofibrosis among 24,577 first-degree relatives of 11,039 patients with myeloproliferative neoplasms in Sweden. *Blood* 2008;112:2199–204.
8. Cleveland Clinic, Center for Continuing Education. Myeloproliferative Neoplasms. Dostupno na adresi:  
<http://www.clevelandclinicmeded.com/medicalpubs/diseasemanagement/hematology-oncology/chronic-myeloproliferative-disorders/?fbclid=IwAR2TfbBVbepDA06e-MEBXfXLPmR7YzQnd0UaAZPXBo0oIUICFp3asU2Y7W0#bib3>. Pristup: 15.7.2020.
9. James C, Ugo V, Le Couedic JP, Delhommeau F, Lacout C, Garçon L , i sur. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature* 2005;434:1144-8.

10. Anía BJ, Suman VJ, Sobell JL, Codd MB, Silverstein MN, Melton LJ. Trends in the incidence of polycythemia vera among Olmsted County, Minnesota residents, 1935-1989. *Am J Hematol* 1994;47:89-93.
11. Essential thrombocythemia. Dostupno na adresi:  
<https://link.springer.com/article/10.1186/1750-1172-2-3>. Pristup:16.7.2020.
12. Tefferi A. Myelofibrosis with myeloid metaplasia. *N Engl J Med* 2000;342:1255–65.
13. Hussein K, Pardanani A, Van Dyke DL, Hanson CA, Tefferi A. International Prognostic Scoring System-independent cytogenetic risk categorization in primary myelofibrosis. *Blood* 2010;115:496–9.
14. Falanga A, Marchetti M, Barbui T, Smith CW. Pathogenesis of thrombosis in essential thrombocythemia and polycythemia vera: the role of neutrophils. *Semin Hematol*. 2005;42(4):239-47.
15. Falanga A, Marchetti M. Thrombotic disease in the myeloproliferative neoplasms. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2012;2012:571-81.
16. Landolfi R, Di Gennaro L, Falanga A. Thrombosis in myeloproliferative disorders: pathogenetic facts and speculation. *Leukemia* 2008;22:2020-8.
17. Marchioli R, Finazzi G, Landolfi R, Kutti J, Gisslinger H, Patrono C i sur. Vascular and neoplastic risk in a large cohort of patients with polycythemia vera. *J Clin Oncol* 2005;23:2224–32.
18. Cooper GM, Hausman RE. Stanica, molekularni pristup. 5 Izd.s.l.: Medicinska naklada Zagreb, 2009.
19. Mujagić Z, Mujagić H. Biohemizmi stanične transdukcije signala. Tuzla 2012. str. 2-17.
20. Harpur AG, Andres AC, Ziemiecki A, Aston RR, Wilks AF. JAK2, a third member of the JAK family of protein tyrosine kinases. *Oncogene*. 1992;7:1347-53.
21. Yamaoka, K., Saharinen, P., Pesu, M. i sur. The Janus kinases (Jaks). *Genome Biol* **5**, 253 2004.
22. Rawlings JS, Rosler K, Harrison D. The JAK/STAT signaling pathway. *J Cell Sci*. 2004;117:1281-3.

23. Murray JP. The JAK/STAT Signaling Pathway: Input and Output Integration. *J Immunol.* 2007;178(5):2623-29.
24. O'Shea J, Gadina M, Schreiber RD. Cytokine signaling in 2002: new surprises in the Jak/Stat pathway. *Cell.* 2002;109:121-31.
25. Aaronson DS, Horvath CM. A road map for those who know JAK-STAT. *Science.* 2002;296:1653-55.
26. James C, Ugo V, Le Couedic J. P, Staerk J, Delhommeau F, Lacout C i sur. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythemia vera. *Nature* 2005;434:1144.
27. Kralovics R, Passamonti F, Buser A. S, Teo S.S , Tiedt R, Passweg J R i sur. A gain of function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N. Engl. J. Med.* 2005;352(17):1779-90.
28. Tefferi A, Skoda R, Vardiman J W. Myeloproliferative neoplasms: contemporary diagnosis using histology and genetics. *Nat Rev Clin Oncol.* 2009;11:627-37.
29. Scott LM, Tong W, Levine RL i sur. JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis. *N Engl J Med* 2007;356:459–68.
30. Jones AV, Kreil S, Zoi K i sur. Widespread occurrence of the JAK2 V617 mutation in chronic myeloproliferative disorders. *Blood.* 2005;106:2162–8.
31. Chen Q, Lu P, Jones AV i sur. Amplification refractory mutation system, a highly sensitive and simple polymerase chain reaction assay, for the detection of JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders. *J Mol Diagn.* 2007;9:272–6.
32. Rumi E, Cazzola M. Diagnosis, risk stratification, and response evaluation in classical myeloproliferative neoplasms. *Blood.* 2017;129(6):680-92.
33. Horn T, Kremer M, Dechow T, Pfeifer W, Geist B, Perker M, Duyster J, Quintanilla-Martinez L, Fend F. Detection of the Activating JAK2 V617F Mutation in Paraffin-Embedded Trepine Bone Marrow Biopsies of Patients with Chronic Myeloproliferative Diseases. *J Mol Diagn.* 2006;8:299–304.



34. Sazawal S, Bajaj J, Chikkara S, Jain S, Bhargava R, Mahapatra M, i sur. Prevalence of JAK2 V617F mutation in Indian patients with chronic myeloproliferative disorders. *Indian J Med Res* 2010;132:423-7.
35. JAK2-V617F Mutation is Associated with Clinical and Laboratory Features of Myeloproliferative Neoplasms. *Portal hrvatskih znanstvenih časopisa Hrčak*. Dostupno na adresi: [https://hrcak.srce.hr/index.php?show=clanak&id\\_clanak\\_jezik=133777](https://hrcak.srce.hr/index.php?show=clanak&id_clanak_jezik=133777). 2. Datum pristupa: 15.7.2020.
36. Ebid GT, Ghareeb M, Salaheldin O, Kamel MM. Prevalence of the frequency of JAK2. (V617F) mutation in different myeloproliferative disorders in Egyptian patients. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8(9):11555–9.
37. Basquiera AL, Soria WN, Ryser R, Salguero M, Moiraghi B, Sackmann F, i sur. Clinical significance of V617F mutation of the JAK2 gene in patients with chronic myeloproliferative disorders. *Hematology*. 2009;(6):323-30.
38. Horvat I, i sur.. Razlike između V617F JAK2- pozitivnih bolesnika sa i bez tromboze ovisno o dijagnozi, dobi, spolu i opterećenju mutiranim alelom. *Zagreb Liječnički Vjesnik*, 2017. 46-46.

## 10 ŽIVOTOPIS

### OSOBNI PODATCI

Ime i prezime: Ivona Gajdašić

Datum i mjesto rođenja: 10.12.1996., Virovitica

E-pošta: [ivona.gajdasic@gmail.com](mailto:ivona.gajdasic@gmail.com)

### OBRAZOVANJE

2003. – 2011. – Osnovna škola Josipa Kozarca, Slatina

2011. – 2015. – Srednja škola Marka Marulića, Opća gimnazija, Slatina

2015. – 2018. – Medicinski fakultet Osijek, preddiplomski sveučilišni studij Medicinsko laboratorijske dijagnostike (univ.bacc.med.lab.diagn.)

2018. – 2020. - Medicinski fakultet Osijek, diplomski sveučilišni studij Medicinsko laboratorijske dijagnostike