

## بررسی جهش V617F ژن JAK<sub>2</sub> در بیماران مشکوک به ترومبوزیس به روش Taq man Allele Specific Real Time PCR

هانیه امینی نیا<sup>۱</sup>، علی ناظمی<sup>۲\*</sup>، شیوا ایرانی<sup>۱</sup>

۱- گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات، تهران، ایران

۲- گروه ژنتیک، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن، تنکابن، ایران

### چکیده

**سابقه و هدف:** ترومبوز یا ترومبوزیس، به تشکیل لخته خون در داخل یک رگ خونی می گویند. این عارضه با تجمع پلاکت های خون پدید می آید. این تمایل به لخته شدن ناشی از عوامل بیرونی و فاکتورهای ژنتیکی است که حاصل تغییر در مکانیسم لخته شدن می باشد.

این مطالعه با هدف به کارگیری از روش Taq man Allele-Specific Real-Time برای تشخیص و غربال گری جهش V617F ژن JAK<sub>2</sub> در بیماران مستعد به ترومبوزیس صورت گرفت.

**مواد و روش ها:** در این مطالعه با مراجعه به آزمایشگاه پاتوبیولوژی شهرستان رشت واقع در استان گیلان از میان مراجعین برای بررسی عوامل ترومبوزیس، ۱۱۰ خون کامل از افراد مبتلا و ۱۰۵ خون کامل از افراد عادی (بدون سابقه بیماری) تهیه شد و پس از استخراج DNA از تمامی نمونه ها، اقدامات لازم برای بررسی حضور جهش V617F ژن JAK<sub>2</sub> با روش Taq man Allele-Specific Real-Time PCR انجام گرفت و با استفاده از روش های آماری، نتایج مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

**یافته ها:** پس از تأیید صحت تکنیک مورد نظر بر روی نمونه های کنترل، نتایج غربال گری این روش در جمعیت افراد مراجعه کننده برای بررسی عوامل ترومبوزیس از جمله فاکتورهای ۲ و ۵ نشان از عدم حضور این تغییر بوده است. هم چنین با غربال گری روی نمونه های جمعیت کنترل، هیچ جهش V617F در ژن JAK<sub>2</sub> شناسایی نگردید.

**نتیجه گیری:** یافته ها نشان داد تکنیک به کار گرفته شده قابلیت کافی جهت تشخیص جهش V617F ژن JAK<sub>2</sub> را دارا است. هم چنین عدم شناسایی جهش V617F ژن JAK<sub>2</sub> در جمعیت مراجعین ترومبوزیس جهت بررسی فاکتورهای ۲ و ۵، نشان داد که جهش V617F ژن JAK<sub>2</sub> در جمعیت مورد مطالعه به عنوان یکی از عوامل ترومبوزیس مطرح نمی باشد.

**کلمات کلیدی:** ترومبوزیس، JAK<sub>2</sub> V617F، Taq man Allele-Specific Real-Time PCR

### مقدمه

به جز آسیب شناسی در نمونه هایی از انعقادهای ترومبوزیس. این عارضه به شکل های گوناگونی مانند ترومبوز قلبی<sup>۱</sup>، ترومبوز مغزی<sup>۲</sup>، ترومبوز ورید کلیوی<sup>۳</sup> و ترومبوز ورید عمقی<sup>۴</sup> و حتی در روده و اندام های دیگر خود را نشان می دهد. مسیر افزایش آن باعث بیماری و حتی مرگ و میر می شود (۱۱).

ترومبوز وریدی (سیاهرگی) شامل ترومبوز عمیق سیاهرگ (DVT) و انسداد جریان خون ریوی (PE) می باشد. سالیانه به طور تقریبی در ۱ نفر از ۱۰۰۰ نفر جمعیت بزرگ سالان رخ می دهد (۳۷). حدود دو سوم از این بیماری به صورت DVT ظاهر می شود و یک سوم به عنوان PE تظاهر می یابد.

ترومبوز یا همان ترومبوزیس<sup>۱</sup> به لخته خون در داخل یک رگ خونی گفته می شود. این عارضه به طور عمومی از طریق تجمع پلاکت ها به صورت پلاگین پلاکت و فعال شدن سیستم هومورال انعقادی پدید می آید.

به وجود آمدن لخته خون در زمان آسیب دیدگی طبیعی است،

مسئول نویسنده: گروه ژنتیک، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن، تنکابن،

ایران

پست الکترونیکی: alinazemy@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۰/۲۶

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۰۴/۲۳

2 . Coronary thrombosis

3 . Cerebral renous sinus thrombosis (CRST)

4 . Renal vein thrombosis (RVT)

5 . Deep vein thrombosis (DVT)

(۲).

ارتباط جهش V617F ژن JAK2 با نئوپلاسم های میلوپرولیفراتیو از جمله PV، ET، PMF اولین بار در سال ۲۰۰۵ توسط پنج گروه تحقیقاتی گزارش شد (۲، ۳۸).

جهش V617F ژن JAK<sub>2</sub> منجر به فعال شدن کیناز پروتئین هایی می شود که در بیماری های انسانی از جمله نئوپلاسم میلوپرولیفراتیو (MPN) شناسایی شده است. جهش شایع در این بیماری، جهش V617F است که نقش به سزایی در پاتوژنز MPN دارد. جهش های مکرر V617F ژن JAK2 باعث رشد سلول های خون ساز در مغز استخوان و ایجاد ترومبوآمبولی وریدی می شود و به عنوان شاخصی جدی برای بیماری های میلوپرولیفراتیو و در نتیجه ترومبوز وریدی می باشد. بنابراین شناسایی مولکولی و ساختار جهش V617F ژن JAK<sub>2</sub>، برای درمان و درک ارزش بالینی، اهمیت دارد. (۸).

با توجه به این که بیماری میلوپرولیفراتیو<sup>۹</sup> (MPN) یک عامل خطر برای حوادث ترومبوتیک شناخته شده است، از علائم آشکار MPN برای تشخیص زود هنگام ترومبوز استفاده می شود.

MPN یک دسته از بدخیمی های هماتولوژیکی در رده های میلوئیدی مشتق شده از سلول های بنیادی است که در بزرگ سالان رخ می دهد. از خصوصیت های آن، گسترش یک یا چند رده سلولی خون ساز و در نتیجه تجمع سلولی زیاد در مغز استخوان بوده و پس از ورود به جریان خون تعداد WBC<sup>۱۰</sup> و هموگلوبین و پلاکت را در خون زیاد می کند.

این افزایش در تعداد پلاکت ها و یا حتی سطح هموگلوبین، می تواند اطلاعاتی در زمینه ترومبوسیتوز در اختیار ما بگذارد (پلاکت بالا! خطر خونریزی زیاد). اگر تعداد پلاکت ها بیش تر از ۱۵۰۰ باشد، نشان دهنده ترومبوسیتوز است. هم چنین با افزایش سطح هموگلوبین، احتمال وقوع ترومبوز نیز در سطح بالاتری صورت می گیرد. این هموگلوبین بالا یا هماتوکریت، نشان دهنده توده سلول های قرمز است و متعاقباً به ترومبوز وریدی منتهی خواهد شد.

در تحقیقاتی، تکثیر و فعالیت گلبول سفید (WBC) را نیز عامل خطری در افزایش خطر ترومبوتیک عنوان کردند که از علائم آن خون ریزی خودبخودی زیر پوست و غشاهای مخاطی است. از انواع اریتروسیتوزها<sup>۱۱</sup> می توان به ترومبوسیتی مزمن (CML)<sup>۱۲</sup>، پلی سیتی می ورا (PV)<sup>۱۳</sup>، فیبروز اولیه (PMF)<sup>۱۴</sup> و حتی

تمایل به لخته شدن می تواند ناشی از فاکتورهای ژنتیکی و تغییر در مکانیسم لخته شدن باشد و یا به طور عادی واکنش بین عوامل ژنتیکی و فاکتورهای ایجاد کننده ترومبوزیس باشد که این فاکتورها شامل آنتی ترومبین و یا نقص در پروتئین C و ... می باشد (۲۰، ۲۹). وجود یک هموزیگوس و یا ترکیب دو یا چند هتروزیگوس غیرعادی در فاکتورها می تواند منجر به آشکار شدن اختلالات ترومبوتیک شود. هر چند ویژگی هتروزیگوس با بررسی های آزمایشگاهی در به نتیجه رسیدن تحقیق ها کمک بیش تری کرده است (۲۰).

در سلول های پستانداران، خانواده ای از پروتئین کینازی به نام janus kinase (JAK) وجود دارد که شامل JAK<sub>1,2,3</sub> و Tyk<sub>2</sub> می باشد. تمام خانواده های JAK، به جز JAK<sub>3</sub> که محدود به سلول های سیستم خون ساز<sup>۹</sup> هستند، بیان می شوند (۹).

در C- ترمینال اعضای خانواده JAK، یک دامنه تیروزین کینازی توسط دومین کینازی کاذب وجود دارد. و در بخش N- ترمینال نیمی از JAK ها، یک دومین فرضی FERM<sup>۷</sup> وجود دارد که به رسپتورهای سایتوکاین ها و دومین SH<sub>2</sub> متصل می شود (۱۰).

JAK<sub>2</sub> یک تیروزین کیناز سیتوپلاسمی است که نقش مهمی در انتقال پیام فاکتورهای رشد حاصل از چندین گیرنده خون ساز از جمله اریتروپوئیتین، ترومبوپوئیتین، فاکتور رشد کلنی گرانولوسیتی (G-CSF) و فاکتور رشد کلنی گرانولوسیتی- منوسیتی (GM-CSF) را به عهده دارد (۱۸، ۶). این تیروزین کیناز دارای یک دومین تیروزین کینازی فعال (JH1) و یک دومین سودوکینازی غیر فعال (JH2) می باشد. در اثر موتاسیون در ژن JAK2، دومین JH2 خاصیت خود مهارکنندگی<sup>۸</sup> که از فسفریلاسیون گیرنده جلوگیری می کند را از دست داده و باعث فعال شدن خود به خودی این تیروزین کیناز می شود که این تغییر با نئوپلاسم های میلوپرولیفراتیو همراه خواهد بود (۱۸، ۲۲، ۳۵).

ژن JAK2 بر روی بازوی کوتاه کروموزوم شماره ۹ قرار داشته و شامل ۲۵ اگزون است که جهش مذکور در اگزون ۱۲ اتفاق می افتد. در اثر این جهش، نوکلئوتید گوانین در جایگاه نوکلئوتیدی شماره ۱۸۴۹ به تیمین تغییر یافته و در نتیجه اسید آمینه فنیل آلانین در جایگاه شماره ۶۱۷ جایگزین والین می شود و از این رو جهش حاصل را، جهش V616F می گویند (۳). در حال حاضر اعتقاد بر این است که تمامی نئوپلاسم های میلوپرولیفراتیو، حاصل تغییر در سلول بنیادی بوده و اختلاف فنوتیپی آن ها به تفاوت در انتقال پیام (که ناشی از جهش های ایجاد شده در تیروزین کینازها یا مولکول های مرتبط است)، مربوط می باشد

6 . Hematopoitic  
7 . Four – Point – one, ezrin, radixin, moesin  
8 - Autoinhibitory

9 . Myeloproliferation neoplasm

10 . White Blood Cell

11 . Erythrocytosis

12 . Chronic myelogenousleakemia

13 . Polysythemiavera (PV)

14 . Primary myelofibrosis (PMF)

سندروم باد<sup>۱۵</sup> اشاره کرد.

اریتروسیتوز ثانویه با سطح پایینی از اریتروپوئتین دیده شده که آثار کاهش آن در نکرور کبدی، اریتروسیتوز و ترومبوسیتوز مشهود است.

در سال های اخیر پیشرفت های مهمی در درک نقض مادرزادی افرادی که مستعد ترومبوز هستند، صورت گرفته است. این امر منجر به درک کامل تری از فرایندهای بیماری و هم چنین ارائه پیشنهادهایی برای غربال گری مناسب، شناسایی، تشخیص و درمان گردید. حضور ترومبوز ارثی نباید شدت درمان ضد انعقادی را تغییر دهد. با توجه به این که کمبود آنتی ترومبین، لیدن و جهش پروترومبین V و یا فاکتور S، پروتئین C پروتئین، مقاومت ضد انعقادی مؤثری نیستند. اگرچه این G20210A ترکیبات در طول مدت درمان پس از اولین واقعه ترومبو آمبولی می توانند افزایش یابند (۷).

از اختلال های ترومبوفیلیک می توان به اختلال به صورت کاهش عمل کرد انعقاد خون (شامل کمبود ضد انعقاد خون درونی، ضد تروم بین، پروتئین C و پروتئین S) و اختلال به صورت افزایش عمل کرد انعقاد خون (شامل عامل V لیدن، انواع پروترومبین 20210A) اشاره کرد.

اولین بار در سال ۱۹۹۴، Bertine و همکارانش، نقص در فاکتور V لیدن را شرح دادند. آن ها بیان داشتند که با افزایش فعالیت پروتئین C، درصد غیر فعال شدن این فاکتور کاهش می یابد. هم چنین در تحقیقاتی نشان داده شد که فاکتور V به عنوان یک کوفاکتور عمل می کند و باعث غیر فعال شدن فاکتور VIIIa می شود. فعال شدن پروتئین C در پلاسماهای بیماران، باعث اختلال در زمان لخته شدن می شود که به این حالت، میزان مقاومت در فعالیت پروتئین C می گویند (۱۵، ۱۶، ۱۷).

در حال حاضر در افراد مبتلا به ترومبوزیس رگی به طور عمده غربال گری مولکولی بر روی فاکتورهای ۵ لیدن و فاکتور ۲ و پروتئین C، S، PTT، آنتی ترومبین و ... انجام می گیرد که در خیلی از بیماران منفی بوده و علت ترومبوزیس آن ها ناشناخته باقی می ماند. یک ارتباط قوی بین جهش V617F ژن JAK<sub>2</sub> و ترومبوزیس مشاهده شده است که نیازمند مطالعه ها بیش تر و بررسی جمعیت های مختلف می باشد.

Taq man Allele-Specific Real-Time در این مطالعه از روش و تشخیص JAK<sub>2</sub> ژن V617F برای شناسایی جهش PCR ارتباط یا عدم ارتباط آن با ترومبوزیس، استفاده شده است.

## مواد و روش ها

در این مطالعه ۱۱۰ نمونه خون مشکوک به ترومبوزیس (افراد مشکوک به ترومبوزیس که با نظر پزشک، برای انجام آزمایش Budd chairi 15

ها پارامترهای خونی پیرامون عوامل این بیماری، از جمله ppt، جهش فاکتورهای ۲ و ۵، ترومبین C و ... به آزمایشگاه های پاتوبیولوژی شهرستان رشت مراجعه کرده بودند) و ۱۰۵ نمونه خون کنترل تهیه شد. این نمونه های خون تا زمان انجام آزمایش، در ۲۰ °C - نگه داری شدند. سپس استخراج DNA از تمامی نمونه ها، با استفاده از کیت استخراجی DNA از کمپانی Viogene (China) صورت گرفت و کیفیت نمونه های استخراج شده به روش الکتروفورز ژل آگارز مورد تأیید قرار گرفت.

## - طراحی پرایمرها و پروب ها

برای طراحی پرایمرها و پروب های به کار گرفته شده در این روش از مطالعه ها (Horn Th, et al (2006) و Patriarca A, et al (2010) استفاده گردید. سنتز پرایمرهای طراحی شده نیز توسط شرکت Metabion(Germany) صورت گرفت (جدول شماره ۱).

Primer/probe	sequences	Reference
Forward Primer (Normal)	ATCTATAGTCATGCTGAAAGTAGGA- <sup>۱۰</sup> - <sup>۲</sup> -GAAAG	(۷)
Forward Primer (mutant)	AGCATTGGTTTAAATTATGGAGT- <sup>۱۰</sup> - <sup>۲</sup> -ATATT	
Revers Primer	CTGAATAGTCCTACAGTGTTCAG- <sup>۱۰</sup> - <sup>۲</sup> -TTTCA	
<sup>۱</sup> -Probe (Normal)	FAM- AGCTTGCTCATCATACTGCTGCTTC- BHQ <sup>۱</sup>	(۱۰)
<sup>۲</sup> -Probe (mutant)	VIC- AGAAAGGCATTAGAAAGCCTGTAGTT- BHQ <sup>۱</sup>	

جدول شماره ۱: پرایمرها و پروب های مورد استفاده در Real Time

## PCR

### - Taq man AS Real Time PCR

برای تشخیص جهش V617F ژن JAK<sub>2</sub> از ترکیبات و شرایط دمایی و زمانی مختلف استفاده شد. برای این منظور ابتدا بهینه سازی غلظت منیزیم و مقادیر پرایمر صورت گرفت. سپس بهینه سازی شرایط دمایی و زمانی به صورت زیر انجام شد.

polymerase activation در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد و طی ۱۰ دقیقه صورت گرفت و مرحله Denaturation در ۹۵ درجه سانتی گراد، طی ۲۵ ثانیه و مراحل Extention و Annealing در دمای ۵۹ درجه سانتی گراد و در مدت زمان ۱۲۰ ثانیه صورت گرفتند. هم چنین ۴۰ سیکل برای مراحل Denaturation و Extention- Annealing در نظر گرفته شد.

سپس از ترکیبات و مقادیر زیر در واکنش استفاده شد:

dH<sub>2</sub>O; Buffer 5X (1X); MgCl<sub>2</sub> 25mM (4mM);

dNTPmix 10Mm (0.1mM); Primer mix 10mM

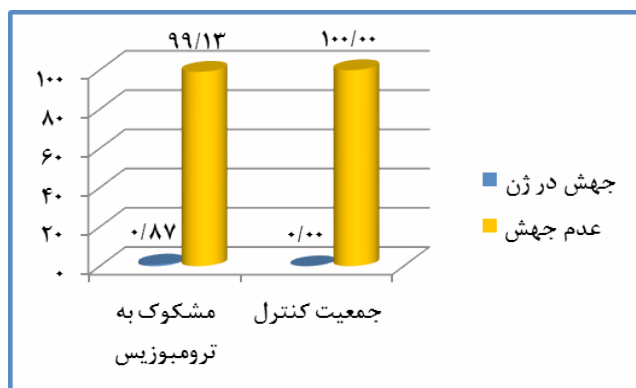
[FN(3pmol), FM(10pmol), R(10pmol)]; Hot start Taq

شیب بیش تری نسبت به کنترل منفی در حال افزایش می باشد. هم چنین نمودار شماره ۲ (Target 2) که مربوط به probe 2 (پروب جهش یافته) است و در کانال yellow (متناسب با طول موج ماده نشاندار VIC، ۵۳۸-۵۵۴ nm) مورد ارزیابی قرار گرفت که همانند نمودار قبلی، نمونه مثبت با شیبی صعودی در حال افزایش است.

این پیک ها نشان می دهند که تکنیک Taq man Allele-Specific با فرمت Real-Time توانایی تشخیص ژن های طبیعی و جهش یافته (جهش یافته) از JAK<sub>2</sub> را در قطعه های ۳۶۴ و ۲۰۳ جفت بازی را دارد.

### - نتایج به دست آمده از جامعه آماری

از میان ۱۱۵ نمونه کامل از افراد مشکوک به ترومبوزیس (۱۰۰٪)، تنها یک نمونه مثبت از جهش V617F ژن JAK<sub>2</sub> شناسایی شد که معادل ۰/۸۷٪ می باشد و در ۹۹/۱۳٪ از نمونه افراد، هیچ جهشی رخ نداده است. هم چنین در هیچ یک از افراد جمعیت کنترل (۱۱۰ نمونه خون کامل) جهش در ژن مشاهده نشده است (نمودار شماره ۳).



نمودار شماره ۳: فراوانی جهش ژن در افراد مورد بررسی

نشان دهنده عدم اختلاف بین میزان فراوانی جهش V617F ژن JAK<sub>2</sub> با ترومبوزیس در سطح اطمینان ۹۵٪

برای بررسی اختلاف در میزان تغییر نوکلئوتیدی بین بیماران و جمعیت کنترل از آزمون دقیق فیشر استفاده شده است. *p-value* برای این آزمون برابر با مقدار ۰/۵۱۱ شده است. بنابراین در سطح اطمینان ۹۵٪ به این نتیجه رسیدند که بین میزان فراوانی جهش V617F ژن JAK<sub>2</sub> با ترومبوزیس اختلاف وجود ندارد. با توجه به صحت تکنیک Real-time در شناسایی ژن طبیعی و جهش یافته از JAK<sub>2</sub> در قطعه ۳۶۴ جفت بازی و ۲۰۳ جفت بازی با انجام آزمایش هایی بر روی نمونه های جمع آوری شده از میان افراد مراجعه کننده جهت انجام آزمایش هایی برای بررسی فاکتورهای تشخیصی ترومبوزیس، تنها یک نمونه جهش یافته

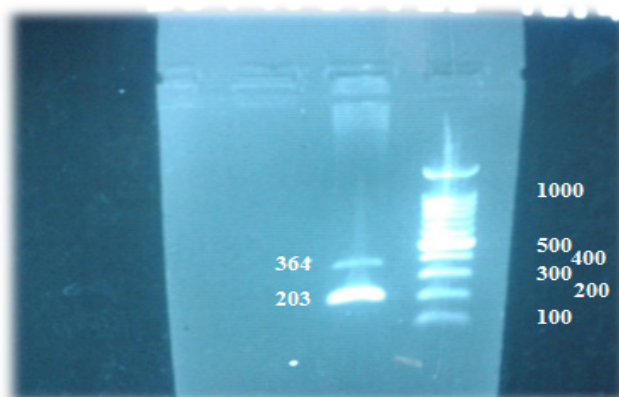
(2.5U); probe 1,2 mix (20pmol); Template (250ng)

در ادامه، برای انجام واکنش تکثیر و آنالیز اطلاعات از دستگاه Corbett 6000 استفاده شد.

### یافته ها

#### - توصیف جامعه مورد مطالعه

افرادی که در این تحقیق مورد مطالعه قرار گرفتند، ۲۱۵ نفر بودند که ۱۱۰ نفر از مراجعین برای انجام آزمایش هایی پیرامون عوامل ترومبوزیس (در بخش مواد و روش ها توضیح داده شد) و ۱۰۵ نفر نیز به عنوان جمعیت کنترل تحت بررسی قرار گرفتند (البته لازم به ذکر است که این کار با رضایت بیماران صورت گرفت).



تصویر شماره ۱: نتیجه حاصل از الکتروفورز نمونه PCR شده با شرایط

بهینه

حضور دو باند در ناحیه bp ۲۰۰ (ژن موتانت) و bp ۳۶۴ (ژن های طبیعی) تنها با مقدار متوسط ۰/۷ از Primer mix

نتایج حاصل از الکتروفورز نشان داد که شرایط بهینه برای به دست آوردن باند مورد نظر، تنها با مقدار متوسط ۰/۷ از Primer mix امکان پذیر می شد. در این حالت دو باند در محدوده bp ۲۰۰ (ژن موتانت) و bp ۳۶۴ (ژن های طبیعی) که این نتایج، شرایط را برای شروع آزمایش Real-Time فراهم کرد.

#### - نتیجه حاصل از Taq man AS Real-Time

با توجه به نتایج به دست آمده از PCR بهینه شده، نمونه های مشکوک به ترومبوزیس با آزمایش Real-Time و ترکیبات حاوی probe مورد مطالعه قرار داده شدند که نتایج آن به شرح زیر می باشد (نمودار شماره ۱)، (نمودار شماره ۲).

با توجه به نتایج به دست آمده از نمودار شماره ۱ (Target 1) که مربوط به probe 1 (پروب طبیعی) با ماده فلورسانس FAM می باشد و متناسب با طول موج (۴۹۴-۵۱۸ nm) در کانال Green مورد ارزیابی قرار گرفت. در این نمودار، نمونه کنترل مثبت با

پیدا شد که با استفاده از نتایج آماری گزارش شده، اختلافی در میزان تغییر نوکلئوتیدی بین افراد مشکوک به ترومبوزیس و جمعیت کنترل وجود ندارد. پس می توان این گونه نتیجه گرفت که ارتباط معناداری میان جهش V617F ژن JAK<sub>2</sub> و بیماری ترومبوزیس وجود ندارد. هم چنین با بررسی نمونه های کنترل نیز جهشی در ژن JAK<sub>2</sub> یافت نشد.

## بحث

علیرغم در دسترس بودن روش های جلوگیری از ترومبوز وریدی (VTE)، هنوز هم مرگ ناشی از آمبولی ریه یکی از علل مهم مرگ و میر در بیماران می باشد. به طوری که محاسبه شده است ۲۰۰,۰۰۰ مرگ در سال به این علت در کشور آمریکا اتفاق می افتد. به نظر می رسد روش های جلوگیری از ترومبوز عروقی در بیماران، یکی از راه کارهای حیاتی در کاهش مرگ و میر این بیماران می باشد. امروزه روش های مختلفی برای جلوگیری از ترومبوز عروقی در بیماران با ریسک خطر زیاد، متوسط و کم پیشنهاد شده است و راه کارهای متنوعی در این زمینه وجود دارد. علی رغم این که دسترسی به راه کارهای مختلف پروفیلاکسی، انواع داروهای آنتی کوآگولان و روش های آزمایشگاهی مولکولی جهت تشخیص زود هنگام این بیماری در اکثر مناطق دنیا امکان پذیر است ولیکن هنوز تعداد زیادی از بیماران از این امکانات محروم هستند (۱، ۱۲، ۲۱، ۳۴، ۳۷).

بیش از ۵٪ از مرگ بیماران به دنبال آمبولی ریه، در اولین ساعات پس از ایجاد علائم رخ می دهد که با در نظر گرفتن عدم دسترسی مداوم به پزشک از یک سو و حضور مداوم پرستاران بر بالین بیماران از سوی دیگر، پیش گیری از تشکیل آمبولی و تشخیص به موقع آن از اهمیت ویژه ای برخوردار است (۲۶). روش شناسایی و تشخیص به موقع کمک شایانی به پیش گیری از ترومبوز عروقی در بیماران می کند. خطر ابتلا به ترومبوز در کودکان نسبت به بزرگ سالان کم تر است. با این حال بیماری ترومبوآمبولیک نشان دهنده منبع قابل توجهی از مرگ و میر و ترومبوآمبولی وریدی است که به عنوان چالشی بزرگ برای پزشکان مطرح می باشد. اعمال جراحی مختلف، پروازهای طولانی مدت و مصرف قرص های ضد بارداری از جمله مهم ترین عوامل خطر ترومبوز ورید عمقی می باشد (۳۶).

تحقیقاتی نیز توسط گروهی از دانشمندان برای بررسی میزان ، با استفاده از مقایسه دو روش JAK<sub>2</sub> ژن V617F جهش و تعیین توالی (Allele-specific PCR) اختصاصی PCR صورت گرفت، به این نتایج دست یافتند: در (sequencings) ، میزان جهش بین ۹۳ تا (PV) بیماران مبتلا به پلی سیتمی ورا

بین PMF ۱۰۰ درصد (به طور متوسط ۹۷ درصد)، در بیماران ۲۶ تا ۷۴ درصد (به طور متوسط ۵۰ درصد) و در بیماران مبتلا ، بین ۴۳ تا ۷۰ درصد (به طور ET) به ترومبوسیتمی اساسی متوسط ۵۷ درصد) به دست آمد (۲).

نتایج حاصل از مطالعه ای در مورد جهش JAK<sub>2</sub> در بیماران مبتلا به ترومبوز وریدی با استفاده از روش های RFLP, ARMS-PCR، نشان داده که ۱۹ مورد از ۳۲۱ مورد جهش JAK<sub>2</sub> مثبت بوده است (۵/۹٪) و میزان شیوع جهش V617F ژن JAK<sub>2</sub> ۳٪، ۸/۸٪، ۵٪ و ۳٪ به ترتیب در DVT (ترومبوز وریدی عمیق)، BCS (سندروم باد چپاری)، PVT (ترومبوز وریدی سیاهرگی) و CVT (ترومبوز وریدی مغز) بود (۳۲).

در مطالعه ای دیگر که با هدف دست یابی به روش های جلوگیری از ترومبوز وریدی انجام گرفته، دو روش برای جلوگیری از ترومبوز عروقی و آمبولی در بیمارانی که مورد اعمال جراحی قرار گرفته بودند، عنوان شده بود که شامل پروفیلاکسی اولیه (استفاده از داروها) و یا روش های فیزیکی مؤثر در جلوگیری از ترومبوز وریدی عمقی (DVT) و پروفیلاکسی ثانویه شامل تشخیص زودرس و درمان ترومبوز وریدی ساب کلینیکال با استفاده از تست های غربال گری مؤثر در تشخیص زود هنگام می باشد (۲۳). با توجه به خطرها و عوارض روش های تهاجمی جهت درمان این بیماری و استفاده از داروهای با عوارض جانبی مختلف (در افراد سالم) تشخیص زودرس و به موقع بیماری با استفاده از تست های غربال گری مولکولی امری ضروری و مهم به نظر می رسد.

مطالعه های نیز توسط گروهی از دانشمندان روی ناهماهنگی جهش V617F ژن JAK<sub>2</sub> در BCR-ABL نئوپلاسم های میلوپرولیفراتیو منفی با استفاده از pyrosequencing , qPCR صورت گرفته است. کشف یک جهش نقطه ای در ژن JAK<sub>2</sub> در بیماران با BCR-ABL نئوپلاسم های میلوپرولیفراتیو منفی (MPNs) نه تنها بینش های جدیدی ایجاد می کند بلکه تشخیص بیماران با BCR-ABL نئوپلاسم های میلوپرولیفراتیو منفی (MPNs) را بسیار ساده تر می کند. نتایج در این مطالعه نشان می دهد که نسبت جهش V617F ژن JAK<sub>2</sub> در سطح RNA در مقایسه با DNA ژنومی به طور مشخصی افزایش می یابد (۱۶).

مطالعه ای نیز در نهایت بر روی بیماران مبتلا به ترومبوآمبولی وریدی صورت گرفت. این مطالعه یک متا آنالیز از جهش V617F ژن JAK<sub>2</sub> جهت تشخیص زود هنگام پی اچ- میلوپرولیفراتیو بود. نتایج نشان داد که جهش V617F ژن JAK<sub>2</sub>، جهشی شایع در بیماران مبتلا به ترومبوز وریدی احشایی است (SVT)، اما

نیازمند مطالعه ها بیش تر و بررسی جمعیت های مختلف می باشد.

هم چنین در مطالعه، سیستم Taq man Allele-Specific PCR که نیازمند به Post PCR می باشد در یک قالب Real Time PCR اجرا شده که علاوه بر عدم نیاز به Post PCR سبب افزایش قدرت تشخیص و کاهش احتمال آلودگی می گردد. برای طراحی پرایمرها و پروب ها نیز در این روش، از مطالعه ها محققین دیگری استفاده گردید که به نتایج مطلوبی نیز دست یافته بودند (۲۷،۱۳). هم چنین تکنیک به کار گرفته شده در مطالعه حاضر، قابلیت کافی جهت تشخیص جهش V617F ژن JAK<sub>2</sub> را دارا است. در ضمن این تکنیک می تواند جایگزین روش ARMS که نیازمند به Post-PCR است، گردد تا از بروز Carry Over و استفاده از سیستم الکتروفورزیس جلوگیری کند.

### نتیجه گیری

JAK<sub>2</sub> ژن V617F در این تحقیق علاوه بر غربال گری جهش ژن V617F در افراد مشکوک به ترومبوزیس رگی، جهش با فرمت Allele-Specific PCR را نیز از طریق تکنیک JAK<sub>2</sub> در دو کانال متفاوت یکی برای ژن طبیعی و Real Time PCR دیگری برای ژن جهش یافته شناسایی کرد. در مطالعه حاضر در جمعیت افراد مراجعه کننده برای بررسی عوامل ترومبوزیس از جمله فاکتورهای ۲ و ۵، عدم حضور این تغییر بوده است. هم چنین با غربال گری روی نمونه های جمعیت کنترل، هیچ شناسایی نگردید. هم چنین بررسی JAK<sub>2</sub> در ژن V617F جهش در جمعیت مراجعین مشکوک به ترومبوزیس جهت JAK<sub>2</sub> جهش بررسی فاکتورهای تشخیصی ترومبوزیس نشان داد که جهش در جمعیت مورد مطالعه به عنوان یکی از JAK<sub>2</sub> ژن V617F عوامل ترومبوزیس مطرح نمی باشد.

کارآزمایی های بالینی در درمان بیماران، بسیار ضروری است چرا که اطلاعات لازم به منظور تعیین یا چگونگی کار بالینی را برای پزشک فراهم می کند. عوامل خطر ارثی شناخته شده همراه با ارزیابی و مشاوره ژنتیک مناسب، به پزشک و بیمار در جهت مدیریت مناسب ترومبوز و جلوگیری از حوادث تأخیری ترومبوتیک کمک فراوانی می کند.

پیشنهاد می شود در بررسی های آتی از جامعه آماری بالاتری استفاده شود و هم چنین از روش Taq man Allele-Specific PCR برای بررسی و مقایسه جهش V617F ژن JAK<sub>2</sub> در همه انواع بیماری های ترومبوزیس (ترومبو آمبولیک وریدی، ترومبوز وریدی عمیق، ترومبوز وریدی سیاهرگی، ترومبوز وریدی مغز، ترومبوز وریدی احشایی و ...) به طور تفکیک استفاده شود.

در بین بیماران با رویداد ترومبوآمبولیک وریدی (VTE)، شایع نمی باشد. این مطالعه به بررسی سیستماتیک فراوانی جهش در ژن JAK<sub>2</sub> در بیماران با ترومبو آمبولیک وریدی (VTE) و نقش جهش V617F ژن JAK<sub>2</sub> در تشخیص میلوپروولیفراتیو نئوپلاسم در پایگاه داده های مدلین (MEDLINE) و امباس (EMBASE) پرداخت. جهش در ژن JAK<sub>2</sub> با افزایش ریسک بیماری ترومبوز وریدی احشایی (SVT) همراه بوده است. شیوع متوسط جهش در ژن JAK<sub>2</sub> بیماران با ترومبوآمبولیک وریدی (VTE)، پایین بوده است (۲/۵۷٪ - ۰/۸۸٪). در این مطالعه به این نتیجه رسیدند که جهش در ژن JAK<sub>2</sub> به طور یقین در ارتباط با بیماری ترومبوز وریدی احشایی، موثر می باشد و غربال گری روتین جهش در ژن JAK<sub>2</sub> در این بیماران، ضروری به نظر می رسد (۵).

مطالعه دیگری نیز با هدف تعیین شیوع و نقش محافظت کننده پلی مورفیسم FXIII Val34Leu در مقابل ترومبوز وریدی عمقی انجام شد. این مطالعه موردی - شاهدهی بر روی ۱۱۶ بیمار مبتلا به ترومبوز وریدی عمقی که از دی ماه سال ۱۳۸۱ تا خرداد ماه ۱۳۸۴ به آزمایشگاه مرکزی سازمان انتقال خون تهران ارجاع داده شده بودند و ۱۰۰ فرد همسان از نظر سن و جنس، انجام شد. پس از استخراج DNA و واکنش زنجیره ای پلی مرز (PCR)، ژنوتیپ های پلی مورفیسم FXIII Val34Leu با روش RFLP و در حضور آنزیم محدودگر CfoI شناسایی شدند. داده ها با آزمون آماری مجذور کای تحلیل شدند. بین شیوع این پلی مورفیسم و جنسیت افراد نیز ارتباط معنی داری مشاهده نشد (۳۰). با توجه به یافته ها، به نظر می رسد پلی مورفیسم FXIII Val34Leu فقط یک رخداد طبیعی است و فاقد تأثیر محافظتی در برابر ترومبوز وریدی عمقی است.

با توجه به داده ها و فراوانی های مطالعه پیشین و مطالعه حاضر نسبت مستقیمی بین دو مطالعه دیده نشده است اما از آنجایی که مطالعه پیشین از جامعه آماری بالایی برخوردار است به طور احتمال میزان برخورد تصادفی شیوع بیماری، بالاتر می شود.

جهش در ژن JAK<sub>2</sub> می تواند به صورت هتروزیگوت و هموزیگوت باشد اما به منظور جداسازی این دو از هم، توصیه بر این است که ابتدا گرانولوسیت ها از خون محیطی جدا شوند و تعیین جهش بر روی DNA جدا شده از گرانولوسیت انجام گیرد.

در این مطالعه، به منظور پیش گیری و تشخیص زود هنگام بیماری در افراد مشکوک به ترومبوزیس رگی، غربال گری مولکولی را بر روی دو ژن فاکتور ۵ لیدن و فاکتور ۲ انجام داد که در خیلی از بیماران منفی بوده است. البته ارتباط قوی بین و ترومبوزیس مشاهده شده است که JAK<sub>2</sub> ژن V617F جهش

## سپاسگزاری

این پژوهش در مرکز تحقیق‌ها ژنتیک دانشگاه آزاد واحد تنکابن انجام شده است. بدین وسیله از تمام کسانی که بنده را در انجام این پژوهش یاری نمودند، به ویژه استاد راهنمای محترم آقای دکتر علی ناظمی تشکر می‌نمایم. هم‌چنین از مسئولان محترم آزمایشگاه که امکان اجرای این پروژه را در اختیار این جانب قرار دادند، قدردانی می‌نمایم.

- 1- Anderson FA Jr, Zayaruzny M, Heit JA. Estimated annual numbers of US acute-care hospital, patients at risk for venous thromboembolism. *Am Hematol*, 2007; 82: 777.
- 2- Baxter E.J, Scott LM, Campbell PJ, East C, Fourouclas N, Swanton S, *et al*. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative diseases. *Lancet*, 2005; 365: 1054- 1061.
- 3- Berger R. A recurrent mutation of the JAK2 gene in chronic myeloproliferative disorders. *Pathologie Biologie*, 2006; 54: 182-184.
- 4- Campbell PJ, Scott LM, Buck G. Definition of subtypes of essential thrombocythaemia and relation to polycythaemia vera based on JAK2V617F mutation status. *Lancet*, 2005; 366: 1945- 53.
- 5- Dentali F, Squizzato A, Brivio L, Appio L, Campiotti L, Crowther M, *et al*. JAK2 V617F mutation for the early diagnosis of Ph- myeloproliferative neoplasms in patients with venous thromboembolism. 2014; 113: 5617- 5623.
- 6- Feener EP, Rosario F, Dunn SL, Stancheva Z, Myers MGJ. Tyrosine phosphorylation of Jak2 in the JH2 domain inhibits cytokine signaling. *Mol Cell Biol*, 2004; 24: 4968- 4978.
- 7- Folsom AR, Cushman M, Tsai MY, Heckbert SR, Aleksic N. Prospective study of the G20210A polymorphism in the prothrombin gene, plasma prothrombin concentration, and incidence of venous thromboembolism. *Am J Hematol*, 2002; 71: 285- 290.
- 8- Gnanasambandan K, Magis A, Sayeski P.P. The Constitutive Activation of JAK2-V617F is mediated by a  $\pi$  Stacking Mechanism Involving Phe 595 and Phe 617. *Biochemistry*, 2010; 49: 9972-9984.
- 9- Haan C, Kreis S, Margue C, Behrmann I. Jak2 and cytokine receptors- an intimate relationship. *Biochem Pharmacol*, 2006; 72: 1538- 546.
- 10- Hamada K, Shimizu T, Matsui T, Tsukita S, Hakoshima T. Structural basis of the membrane-targeting and unmasking mechanisms of the radixin FERM domain. *EMBO J*, 2000; 19: 4449- 4462.
- 11- Hoppe C, Matsunaga A. Pediatric Thrombosis. *Pediatric Clin of North America*, 2002; 49:1257- 1283.
- 12- Horlander KT, Mannino DM, Leeper KV. Pulmonary embolism mortality in the United States, an analysis using multiple-cause mortality data. *Arch Intern Med*, 2003; 163:1711.
- 13- Horn Th, Kremer M, Dechow T, Pfeifer W.M, Geist B, Perker M, *et al*. Detection of the Activating JAK2 V617F Mutation in Paraffin-Embedded Trepine Bone Marrow Biopsies of Patients with Chronic Myeloproliferative Diseases. *Journal of molecular diagnostics*, 2006; 8: 3.
- 14- Jeffery M, Ravi V, Friederike H. Molecular pathology of Myeloproliferative Neoplasms. *Am J clin pathol*, 2010; 133: 602- 615.
- 15- Kalafatis M, Bertina RM, Rand MD, Mann KG. Characterization of the molecular defect in factor VR506Q. *J Biol Chem*, 1995; 270: 4053- 7.
- 16- Kim H-R, Choi H-J, Kim Y-K, Kim H-J, Shin J-H. Allelic Expression Imbalance of JAK2 V617F Mutation in BCR-ABL Negative Myeloproliferative Neoplasms. *PLoS ONE*, 2013; 8: e52518, doi:10.1371/journal. Pone. 0052518.
- 17- Klippel S, Strunck E, Temerinac S. Quantification of PRV-1 mRNA distinguishes polycythemia vera from secondary erythrocytosis. 2003; 102: 3569- 74.

- 18- Kralovics R, Teo SS, Buser AS, Brutsche M, Tiedt R, Tichelli A. Altered gene expression in myeloproliferative disorders correlates with activation of signaling by the V617F mutation of JAK2. *Blood*, 2005; 106: 3374- 3376.
- 19- Lacout C, Pisani DF, Tulliez M, Moreau Gachelin F, Vainchenker W, Villeval JL, *et al.* JAK2 V617F expression in murine hematopoietic cells leads to MPD mimicking human PV with secondary myelofibrosis. *Blood*, 2006; 108: 1652– 1660.
- 20- Lane DA, Mannucci PM, Bauer KA. Inherited thrombophilia: part 1. *Thromb Haemost*, 1996; 76: 651.
- 21- Martino MA, Borges E, Williamson E. Pulmonary embolism after major abdominal surgery in gynecologic oncology. *Obstet Gynecol*, 2006; 107: 666.
- 22- McLornan D, Percy M, McMullin M. JAK2 V617F: A single Mutation in the myeloproliferative group of disorders. *Ulser Med*, 2006; 75: 112- 119.
- 23- Mousavi A.S. Prevention of venous thromboembolism in surgical patients, Associate professor of Obstetrics and Gynecology. 2011, Tehran University of Medical Sciences.
- 24- Neubauer H, Camano A, Muller M, Huffstadt U. JAK2 deficiency defines an essential developmental checkpoint in definitive hematopoiesis. *Cell*, 1998; 93: 397- 409.
- 25- Pargana SE, Warg D, Stravopodis D, Topham DJ, Marine JC. Jak2 is essential for signaling through a variety of cytokine receptors. 1998; 93:385- 395.
- 26- Pardanani A, Lasho TL, Hussein K. JAK2V617F mutation screening as part of the hypercoagulable work-up in the absence of splanchnic venous thrombosis or overt myeloproliferative neoplasm: assessment of value in a series of 664 consecutive patients. *Mayo Clin Proc*, 2008; 83: 457- 459.
- 27- Patriarca A, Pompetti F, Malizia R, Iuliani O, Marzio I.D, Spadano A, *et al.* Is the absence of JAK2 V617F mutation a risk factor for bleeding in essential thrombocythemia? An analysis of 106 patients. *Blood Transfus*, 2010; 8: 21- 7.
- 28- Poodt J, Fijnheer N, Walsh IB, Hermans MH. A sensitive and reliable semiquantitative real time PCR assay to detect JAK2 V617F in blood. *Hemat Oncol*, 2006; 24: 227- 33.
- 29- Rosendaal FR. Venous Thrombosis, a multicausal disease. *Lancet*, 1999; 353:1167-73.
- 30- Shabiri E, Razaziyan N. The incidence of cerebral venous thrombosis and its risk factors in the city of Kermanshah. 2009; 15: 64- 69.
- 31- Shen L, Dahlback B. Factor V and protein S as synergistic cofactors to activated protein C in degradation of factor VIIIa. *J Biol Chem*, 1994; 269: 18735- 8.
- 32- Shetty Sh, Kulkarni B, Pai N, Mukundan P, Kasatkar P, Ghosh K, *et al.* FRC Path JAK2 Mutations Across a Spectrum of Venous Thrombosis Cases. *Am J Clin Pathol*, 2010; 134: 82-85.
- 33- Stein PD, Henry JW. Prevalence of acute pulmonary embolism among patients in a general hospital and at autopsy. 1995; 108: 978.
- 34- Tabaczewski P, Nadesan S, Lim S.H. Early renal arterial stent thrombosis associated with the JAK2 V617F mutation. 2009; 33: 573–574.
- 35- Tefferi A. JAK2 Mutations in Polycythemia Vera, Molecular Mechanisms and Clinical Applications. *New England J of Medicine*, 2005; 356: 444- 445.
- 36- Ugo V, Le Gal G, Lecucq L. Prevalence of the JAK2 V617F mutation is low among unselected patients with a first episode of unprovoked venous thromboembolism. *J Thromb Haemost*, 2008; 6:

203- 205.

37- White RH. The epidemiology of venous thromboembolism. *Circulation*, 2003; 107: 1-4-1-8.

38- Zhao R, Xing S, Li Z, Fu X, Li Q, Krantz SB, *et al.* Identification of an Acquired JAK2 Mutation in Polycythemia vera. *J Biol Chem*, 2005; 280: 22788– 22792. 18- Zhao R, Xing S, Li Z, Fu X, Li Q, Krantz SB, *et al.* Identification of an Acquired JAK2 Mutation in Polycythemia vera. *J Biol Chem*, 2005; 280: 22788– 22792.