

JAK2V617F MUTASYONU İLE SERUM ERİTROPOİETİN DÜZEYLERİ ARASINDAKİ İLİŞKİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

EVALUATION OF THE RELATIONSHIP BETWEEN JAK2V617F MUTATION AND SERUM ERYTHROPOIETIN LEVELS

Giray BOZKAYA¹ Erdi DİLAVER¹ Çağatay HASIP²

¹ Sağlık Bilimleri Üniversitesi İzmir Bozyaka Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Biyokimya Laboratuvarı, İzmir

² Katip Çelebi Üniversitesi Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Biyokimya Laboratuvarı, İzmir

Anahtar Sözcükler: Eritropoietin, janus kinaz 2, miyeloproliferatif bozukluklar
Keywords: Erythropoietin, janus kinase 2, myeloproliferative disorders

Yazının alınma tarihi: 03.06.2022 Yazının kabul tarihi: 30.06.2022 Online basım: 04.10.2022

ÖZ

Giriş: Janus kinaz (JAK) 2 mutasyonlarının keşfi ile Philadelphia-negatif (Ph-negatif) miyeloproliferatif neoplazmaların (MPN) moleküler temeli daha da anlaşılmiş olup, güncel tanı kriterleri arasına girmiştir. JAK2V617F mutasyonunun nicel ölçümü bu hastalıkların klinik seyir ve tedavi yanıtını değerlendirmede kullanılmaktadır. Çalışmada özellikle Polisitemia vera (PV) tanısında kullanılan JAK2V617F mutasyonu ile serum eritropoietin (EPO) düzeyleri arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: SBÜ İzmir Bozyaka EAH'ye 2013-2021 yılları arası başvuran 773 hastanın moleküler analiz raporlarındaki JAK2V617F sonuçları ve bu hastaların Katip Çelebi Üniversitesi Atatürk EAH Tıbbi Biyokimya Laboratuvarında eş zamanlı çalışılan serum EPO düzeyleri retrospektif olarak incelendi. JAK2V617F pozitif(+) olan hastalar, Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) 2016 PV tanı kriterlerinden biri olan hemoglobin eşik değerlerine (erkek:>16.5 g/dl; kadın:>16 g/dl) göre grup 1 (eşik değer üstü), grup 2 (eşik değer ve altı) olarak ayrıldı.

Bulgular: JAK2V617F (+) olan 106 hastada EPO düzeyleri ile JAK2V617F allel yükünün arasındaki ilişkiye bakıldığında anlamlı negatif korelasyon olduğu bulundu ($r=-0.456$; $p<0.001$). Bu durum alt gruplarda incelendiğinde 1. gruptaki korelasyonun ($r=-0.563$; $p<0.001$), 2. gruba göre daha kuvvetli olduğu görüldü ($r=-0.391$; $p=0.004$). Bu iki grup arasında JAK2V617F allel yükü açısından anlamlı bir fark bulunmadı ($p=0.388$).

Sonuç: Çalışmamızdaki bulgulara göre JAK2V617F mutasyonunun nicel olarak ölçülemeyişi durumlarda serum EPO seviyelerinin kullanımı faydalı olabilir. JAK2V617F mutasyon durumu ile serum EPO düzeyleri arasındaki bu anlamlı ilişkiyi aydınlatmak için daha geniş bir popülasyonda yapılacak prospektif çalışmalara ihtiyaç vardır.

SUMMARY

Introduction: With the discovery of Janus kinase (JAK) 2 mutations, the molecular basis of Philadelphia-negative (Ph-negative) myeloproliferative neoplasms (MPN) has been further understood and has become one of the current diagnostic criteria. Quantitative measurement of JAK2V617F mutation is used to evaluate the clinical course and treatment response of these diseases. In this study, it was aimed to evaluate the relationship between the JAK2V617F mutation and serum erythropoietin (EPO) levels, which is especially used in the diagnosis of Polycythemia vera (PV).

Material and Method: JAK2V617F results in molecular analysis reports of 773 patients who applied to HSU İzmir Bozyaka TRH between 2013-2021 and serum EPO levels of these patients, which were studied simultaneously in

Katip Çelebi University Atatürk TRH Medical Biochemistry Laboratory, were retrospectively analyzed. Patients with JAK2V617F(+) were divided into group 1 (above threshold) and group 2 (threshold value and below) according to hemoglobin threshold values (male:>16.5 g/dl; female:>16 g/dl), which is one of the World Health Organization (WHO) 2016 PV diagnostic criteria.

Results: Considering the relationship between EPO levels and JAK2V617F allele load in 106 patients with JAK2V617F(+), a significant negative correlation was found ($r=-0.456$; $p<0.001$). When this situation was examined in subgroups, it was seen that the correlation in the 1st group ($r=-0.563$; $p<0.001$) was stronger than in the 2nd group ($r=-0.391$; $p=0.004$). There was no significant difference between these two groups in terms of JAK2V617F allele load ($p=0.388$).

Conclusion: According to the findings of our study, in cases where the JAK2V617F mutation cannot be quantified, it may be beneficial to use serum EPO levels instead. Prospective studies in larger populations are needed to elucidate this significant relationship between JAK2V617F mutation status and serum EPO levels.

GİRİŞ

Ph-negatif MPN'ler, hematopoetik kök/progenitör hücrelerin klonal, kontrolsüz proliferasyonu ve kan akışı içinde olgun görünen kan hücrelerinin artışı ile karakterizedir. PV, esansiyel trombositemi (ET) ve primer miyelofibroz (PMF) gibi hastalıklar bu grubun klasik üyeleridir (1).

Bu hastalıkların moleküler temeli JAK2 genindeki mutasyonların keşfi ile gün yüzüne çıkmış ve bu mutasyon güncel tanı kriterleri arasına girmiştir. Bu gen 9. kromozomun kısa kolunda bulunur ve 14. ekzonundaki mutasyon, JH2 (psödokinaz) alanında, 617. pozisyonundaki valin yerine fenilalanin gelmesiyle JAK2V617F olarak tanımlanmıştır (2-5). Hücre büyümesi ve farklılaşmasını düzenleyen önemli yollardan biri JAK-STAT yolağıdır. JAK2V617F mutasyonu, hematopoetik progenitör hücrelerin büyüme faktörlerine ve diğer sitokinlere karşı aşırı duyarlılığına neden olur (6,7). Bu mutasyon PV'de %90-95, ET'de %50-70 ve PMF'de %40-50 sıklıkta bulunmakta olup, MPN'ler için önemli bir teşhis aracıdır (8). Ayrıca nitel JAK2 mutasyonunun ölçümü, daha önce pozitif bulunan hastalarda tedaviye yanıtı değerlendirmede önemlidir (9).

Serum EPO düzeyi ise primer ve sekonder eritrositöz ayırımında kullanılan bir tetkiktir. Özellikle PV hastalarında düzeyinin düşük olması beklenmektedir. MPN grubu bir hastalık olan PV'nin, grubun diğer hastalıkları ET ve PMF ile klinik açıdan benzerlik göstermesi nedeniyle tanısının doğru konulabilmesi için tanı kriterlerine ihtiyaç duyulmuş olup; tarihsel süreçte farklı gruplar (Osler, PVSG, BCSH, DSÖ) tarafından tanı kriterleri belirlenmiştir. En güncel tanı kriterleri 2016'da yayımlanmış olup Dünya Sağlık

Örgütü (DSÖ) grubuna aittir (1). Bu çalışmada özellikle PV hastalığının tanısında iki önemli invaziv olmayan yöntemden JAK2V617F mutasyon analizi ve serum EPO düzeyleri arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Sağlık Bilimleri Üniversitesi İzmir Bozyaka EAH'ye 2013-2021 yılları arası başvuran 773 hastanın moleküler analiz raporlarındaki JAK2V617F sonuçları ve bu hastaların Katip Çelebi Üniversitesi Atatürk EAH Tıbbi Biyokimya Laboratuvarında eş zamanlı çalışılan serum EPO düzeyleri retrospektif olarak incelendi.

Mutasyon tespitinde kullanılan DNA'lar 200 µl kan örneklerinden EZ1 DNA Blood 200 µL Kit in Advanced XL (Qiagen, ABD) cihazı kullanılarak saflaştırıldı. Real-Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) yönteminde JAK2 MutaScreen Kit & Reference Scale Assay (Ipsogen, Qiagen Strasse 1, 40724 Hilden, Germany) kiti kullanıldı. Sonuçlar, toplam JAK2 içindeki JAK2 V617F'nin yüzdesi olarak ifade edildi. Eşik değerinden daha yüksek sonuçlar mutant olarak kabul edildi.

EPO düzeyleri ise kemilüminesans yöntemi ile IMMULITE 2000 EPO (Siemens Healthcare Diagnostics Products Ltd, Llanberis, UK) kiti kullanılarak ölçüldü. Sonuçlar mIU/ml olarak ifade edildi.

JAK2V617F (+) olan hastalar, PV tanı kriterlerinden hemoglobin (Hb) eşik değerlerine (erkek:>16.5 g/dl; kadın:>16 g/dl) göre grup 1 (eşik değer üstü), grup 2 (eşik değer ve altı) olarak ayrıldı.

İstatistiksel analizler ve hesaplamalar için Statistical Package for Social Sciences (SPSS)

21.0 (IBM, ABD) kullanıldı. Değişkenlerin dağılımı Kolmogorov-Smirnov testi ile değerlendirildi. Dağılımların normal olup olmadığına bağlı olarak gruplar Student t testi veya Mann-Whitney U testi kullanılarak karşılaştırıldı. Değişkenler arası korelasyon, Pearson veya Spearman korelasyon analizi ile saptandı. Anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ olarak belirlendi.

Çalışmamızın etik kurul onayı 2021/77 karar numarası ile Sağlık Bilimleri Üniversitesi İzmir Bozyaka Eğitim ve Araştırma Hastanesi Etik Kurulu'ndan alınmıştır.

BULGULAR

Çalışmamızda 773 hastanın 106'sı (75 erkek, 31 kadın) JAK2V617F(+) olarak bulundu. Pozitif olan

hastalar, negatif olanlarla karşılaştırıldığında; Hb düzeylerinin düşük ($p=0.004$), EPO düzeylerinin düşük ($p < 0.001$) ve ileri yaşta olduğu görüldü ($p < 0.001$) (Tablo 1).

Grup 1'in yaş ve EPO düzeyleri düşüktü. Bu iki grup arasında JAK2V617F allel yükü arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p=0.388$) (Tablo 2).

JAK2V617F (+) olan 106 hastada EPO düzeyleri ile JAK2V617F allel yükünün arasındaki ilişkiye bakıldığında anlamlı negatif korelasyon olduğu bulundu ($r=-0.456$; $p < 0.001$). Bu durum alt gruplarda incelendiğinde 1. gruptaki korelasyonun ($r=-0.563$; $p < 0.001$), 2. gruba göre daha kuvvetli olduğu görüldü ($r=-0.391$; $p=0.004$). Ayrıca bu negatif korelasyon hem erkeklerde ($r=-0.439$; $p < 0.001$) hem de kadınlarda ($r=-0.413$; $p=0.021$) vardı. (Tablo 3).

Tablo 1. Tüm hastaların JAK2V617F mutasyon durumuna göre tanımlayıcı istatistikleri

	JAK2 V617F		p değeri
	Pozitif (n=106)	Negatif (n=567)	
Cinsiyet (erkek/kadın)	75/31	556/111	
Hb (g/dL)	16.5 (3.78)	17.2 (1.60)	0.004
Yaş*	56 (19-88)	46 (18-96)	<0.001
EPO mIU/ml	4.06 (8.09)	8.58 (7.2)	<0.001
JAK2V617F (%)	11 (32.53)		

*Median (min-max), diğerleri median (IQR)

Tablo 2. JAK2V617F mutasyonu pozitif olan hastaların Hb değerlerine göre tanımlayıcı istatistikleri

	Grup 1 (n=54)	Grup 2 (n=52)	p değeri
Hb (g/dL)	17.7 (1.15)	13.95 (9.6)	<0.001
Yaş*	54 (19-75)	62 (19-88)	0.004
EPO (mIU/ml)	2.61 (6.55)	5.35 (10.64)	0.002
JAK2V617F (%)	8.51 (31.32)	12.63 (33.67)	0.388

*Median (min-max), diğerleri median (IQR)

Tablo 3. EPO düzeyleri ve JAK2V617F allel yükü arasındaki korelasyon

	n	r	p değeri
Kadın	31	-0.413	0.021
Erkek	75	-0.439	<0.001
Grup 1	54	-0.563	<0.001
Grup 2	52	-0.391	0.004
Toplam	106	-0.456	<0.001

TARTIŞMA

Çalışmamızda JAK2V617F mutasyonu pozitif olan hastaların yaşı literatürle uyumlu olarak daha yüksekti (10-13). Yaşla birlikte artan oksidatif stres ve buna bağlı oluşabilecek genetik kararsızlığın JAK2 mutasyona sebep olabileceği düşünülmektedir (13-14). Benzer çalışmalarda olduğu gibi serum EPO düzeyleri de mutasyon pozitif olan grup da daha düşük bulundu (12). Wolanskyi ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada hematopoetik kök hücrelerin klonal ve kontrolsüz çoğalmasına bağlı olarak EPO seviyesinin baskılanmış olduğu ortaya konmuştur (14). Bu sonuçlar ile bulgularımızdaki serum EPO seviyeleri ile JAK2V617F allel yükü arasındaki anlamlı negatif korelasyon ve grup 2'deki anlamlı EPO düşüklüğü desteklenmektedir.

Çalışmamızda grup 2'nin yaş ortalamasının yüksek olduğu bulundu. Çalışmamızdaki düşük hemoglobin seviyeleri ile ileri yaş arasındaki bu ilişki, hastalık komplikasyonuna bağlı zamanla miyelofibrozis gelişmesi ve buna bağlı eritropoetin azalması ile açıklanabilir. Bir çalışmada PV'li hastaların sırasıyla 10 ve 25 yıllık takipte miyelofibrotik evreye dönüşme şansı yaklaşık yüzde 10 ve 25 olduğu gösterilmiştir (15).

Birçok çalışmada JAK2V617F allel yükleri; yüksek hematokrit (Htc), Hb, lökosit sayısı, alkalen fosfataz düzeyi, laktat dehidrojenaz düzeyi ve düşük ortalama korpüsküler hacim (MCV), serum ferritin düzeyi ile ilişkili bulunmuştur (16-19). Aynı çalışmalarda mutasyon yükü arttıkça ciddi klinik tabloların görüldüğü, tıbbi komplikasyonların şiddetinin arttığı gözlenmiştir. Ancak çalışmamızda allel yükü ve Hb düzeyleri arasında anlamlı bir

korelasyon bulunmadı. Çalışmamız retrospektif olması, hastaların klinik durumu ve diğer parametreleri değerlendirilememesi çalışmamızın kısıtlılıklarındandır.

Kronik obstrüktif akciğer hastalığı, obstrüktif uyku apnesi, konjestif kalp yetmezliği ve karaciğer sirozu gibi çoklu komorbiditeler Hb ve Htc düzeyini etkileyerek yüksek EPO düzeyine yol açar. Yapılan bir çalışmada PV tanısı olan hastaların üçte biri normal veya yüksek EPO düzeylerine sahipti. Bu durum obez hastalarda ve her gün sigara içenlerde daha sık görüldü (20). Bu yüzden Hb, Htc artışı olan hastalarda komorbid durumlara ikincil EPO artışı göz ardı edilmemelidir. Çalışmamızdaki bir diğer kısıtlılık ise serum EPO seviyelerini etkileyen ikincil durumların değerlendirilememesidir.

Hastalıkların klinik seyri ve test parametrelerinin düzeyleri MPN alt gruplarında farklılık göstermektedir. Ayrıca JAK2V617F allel yükü tanı ve tedavi durumundan, serum EPO seviyeleri ise sigara kullanımı, obezite gibi faktörlerden etkilenmektedir. Daha geniş bir popülasyonda MPN subtipleri, hastaların tedavi durumu ve fizyolojik özellikleri de dikkate alınarak yapılacak prospektif çalışmalar JAK2V617F mutasyon durumu ile serum EPO düzeyleri arasındaki bu anlamlı ilişkiyi aydınlatmada faydalı olacaktır.

SONUÇ

Çalışmamızdaki bulgulara göre EPO seviyesi ile JAK2V617F mutasyon yükü arasındaki anlamlı korelasyondan yola çıkarak JAK2V617F mutasyonun nicel olarak ölçülemediği durumlarda serum EPO seviyelerinin kullanımı faydalı olabilir.

KAYNAKLAR

1. Barbui T, Thiele J, Gisslinger H, Kvasnicka HM, Vannucchi AM, Guglielmelli P, et al. The 2016 WHO classification and diagnostic criteria for myeloproliferative neoplasms: document summary and in-depth discussion. *Blood Cancer Journal*. 2018; 8(2): 15-25.
2. Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, East C, Fourouclas N, Swanton S, et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet* 2005;365(9464):1054-61.
3. James C, Ugo V, Le Couedic JP, Staerk J, Delhommeau F, Lacout C, et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature* 2005;434(7037):1144-8.
4. Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, Teo SS, Tiedt R, Passweg JR, et al. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med* 2005;352(17):1779-90.
5. Levine RL, Wadleigh M, Cools J, Ebert BJ, Wernig G, Huntly BJP, et al. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell* 2005;7(4):387-97.
6. Campbell PJ, Green AR. The myeloproliferative disorders. *N Engl J Med* 2006; 355(23):2452-66.

7. Dupont S, Massé A, James C, Teyssandier I, Lécluse Y, Larbret F, et al. The JAK2 617V> F mutation triggers erythropoietin hypersensitivity and terminal erythroid amplification in primary cells from patients with polycythemia vera. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology* 2007;110(3): 1013-21.
8. Tefferi A, Lasho TL, Gilliland G. JAK2 mutations in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med* 2005;353(13):1416-7.
9. Malysz J, Crisan D. Correlation of JAK2 V617F mutant allele quantitation with clinical presentation and type of chronic myeloproliferative neoplasm. *Ann Clin Lab Sci.* 2009; 39(4): 345-50.
10. Karkucak M, Yakut T, Ozkocaman V, Ozkalemkas F, Ali R, Bayram M, et al. Evaluation of the JAK2-V617F gene mutation in Turkish patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Mol Biol Rep* 2012;39(9):8663-7.
11. Ünal K, Erdoğan S, Yılmaz FM. JAK 2 V617F gen mutasyon sıklığı ve tam kan sayımı parametreleri ile ilişkisi. *Turk J Biochem* 2014;39(1): 93-8.
12. Speletas M, Katodritou E, Daiou C, Mandala E, Papadakis E, Kioumi A, et al. Correlations of JAK2-V617F mutation with clinical and laboratory findings in patients with myeloproliferative disorders. *Leuk Res.* 2007;31(8):1053-62.
13. Aksit M, Bozkaya G, Uzuncan N, Bilgili S, Ozlu C, Aksit M.Z Relationship between JAK2-V617F mutation and hematologic parameters in Philadelphia-negative chronic myeloproliferative neoplasms. *Turk J Biochem* 2020;45(6): 899-905.
14. Wolanskyi AP, Lasho TL, Schager SM, McClure RF, Wadleigh M, Lee SJ, et al. JAK2V617F mutation in essential thrombocythaemia: clinical associations and long-term prognostic relevance. *Br J Haematol* 2005;131(2):208-13.
15. Vannucchi AM, Lasho TL, Guglielmelli P, Biamonte F, Pardanani A, Pereira A et al. Mutations and prognosis in primary myelofibrosis. *Leukemia* 2013; 27(9):1861-9.
16. Vannucchi AM, Antonioli E, Guglielmelli P, Longo G, Pancrazzi A, Ponziani V, et al. Prospective identification of high-risk polycythemia vera patients based on JAK2(V617F) allele burden. *Leukemia* 2007;21(9):1952-9.
17. Tefferi A, Lasho TL, Schwager SM, Strand JS, Elliott M, Mesa R, et al. The clinical phenotype of wild-type, heterozygous, and homozygous JAK2V617F in polycythemia vera. *Cancer* 2006;106(3):631-5.
18. Tefferi A, Strand JJ, Lasho TL, Knudson RA, Finke CM, Gangat N, et al. Bone marrow JAK2V617F allele burden and clinical correlates in polycythemia vera. *Leukemia* 2007;21(9):2074-5.
19. Vannucchi AM, Antonioli E, Guglielmelli P, Rambaldi A, Barosi G, Marchioli R, et al. Clinical profile of homozygous JAK2 617V>F mutation in patients with polycythemia vera or essential thrombocythemia. *Blood* 2007;110(3):840-6.
20. Lupak O, Han X, Xie P, Mahmood S, Mohammed H, Donthireddy V. The role of a low erythropoietin level for the polycythemia vera diagnosis. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 2020;80:102355.

Sorumlu yazar

Giray BOZKAYA (Doç. Dr.)
Sağlık Bilimleri Üniversitesi,
İzmir Bozyaka Eğitim ve Araştırma Hastanesi,
Tıbbi Biyokimya Laboratuvarı, İzmir
Tel: 05326681597
E-posta: giraybozkaya@yahoo.com
ORCID: 0000-0002-5756-5796

Erdi DİLAVER (Asist. Dr.) ORCID: 0000-0002-4853-4832
Çağatay HASİP (Asist. Dr.) ORCID: 0000-0002-5969-6327