

УДК 616-006.44:616.155.392-085:575+577.21

О. М. Костюкевич, І. В. Дмитренко, С. В. Клименко\*

ДНУ "Науково-практичний центр профілактичної  
та клінічної медицини" ДУС, м. Київ

Державна установа "Національний науковий центр радіаційної медицини  
Національної академії медичних наук України",  
бул. Мельникова, 53, м. Київ, 04050, Україна

## ВИЗНАЧЕННЯ МУТАЦІЇ ГЕНА JAK2 V617F У ХВОРИХ НА РАДІАЦІЙНО-АСОЦІЙОВАНУ СПРАВЖНЮ ПОЛІЦІТЕМІЮ

Наведені дані визначення поширеності мутації *JAK2 V617F* у хворих на спонтанну та радіаційно-асоційовану справжню поліцитемію, оцінені чутливість та специфічність тесту на наявність мутації *JAK2 V617F* в якості маркера диференційної діагностики симптоматичних еритроцитозів та справжньої поліцитемії.

**Ключові слова:** *справжня поліцитемія, симптоматичний еритроцитоз, мутація JAK2 V617F.*

**Вступ.** Справжня поліцитемія (СП) є клональним набутим захворюванням, що характеризується аномальним гемопоезом, появою незалежних або гіперчутливих до еритропоетину клітин-попередників еритропоезу. Визначення мутації *V617F* гена *JAK2* в клітинах периферичної крові є ключовим тестом алгоритму діагностики СП [1], який дозволяє провести ефективну та малоінвазивну диференційну діагностику між *JAK2 V617F* позитивними пацієнтами зі СП та хворими з вторинними симптоматичними еритроцитозами (СЕ) [2]. Результати крупних досліджень продемонстрували значну розповсюдженість мутації *V617F* гена *JAK2* в популяції пацієнтів з хронічними мієлопроліферативними захворюваннями. Однак, існують суттєві розбіжності в частоті виявлення мутації у хворих на СП за даними різних авторів — від 65% до 97% [3–6]. Не проводились дослідження з визначення поширення мутації у хворих на радіаційно-асоційовані мієлойдні неоплазії. Невідомо, чи буде алгоритм діагностики СП, що базується на

\* Клименко Сергій Вікторович, e-mail: klymenko\_sergiy@yahoo.co.uk  
© Костюкевич О. М., Дмитренко І. В., Клименко С. В., 2012

критеріях ВООЗ 2008 р. [7], надійно відтворюватися щодо хворих, які постраждали внаслідок аварії на Чорнобильській АЕС.

**Мета роботи.** Визначити поширення мутації та оцінити можливості використання показника мутаційного статусу гена *JAK2 V617F* для диференційної діагностики СЕ та СП у хворих, які зазнали дії іонізуючої радіації внаслідок аварії на Чорнобильській АЕС.

**Матеріали та методи.** Проведено обстеження 88 пацієнтів зі СП (основна група) — 49 чоловіків (55,7%) та 39 жінок (44,3%). Вік обстежених був від 22 до 80 років, в середньому —  $(56,69 \pm 1,48)$  року. Двадцять сім пацієнтів (30,7%) мали статус потерпіліх від наслідків аварії на ЧАЕС — 19 учасників ліквідації наслідків аварії (ЛНА) на ЧАЕС у 1986—1991 рр., 6 постійно проживаючих на контролюваних територіях, 2 евакуйованих із зони радіаційного забруднення. Шістдесят один пацієнт (69,3%) зі спонтанною СП зазнав опромінення виключно в межах природного радіаційного фону. Всім пацієнтам зі СП діагноз було встановлено згідно з критеріями ВООЗ 2001 року. Тривалість захворювання на момент обстеження становила від 1 до 264 місяців, в середньому —  $(37,79 \pm 6,07)$  міс.

Обстежено 119 пацієнтів із СЕ (опозитна група), серед яких було 16 осіб (13,4%), що зазнали дії іонізуючого випромінювання. Опозитна група включала 103 пацієнтів (86,6%), які не мали в анамнезі свідоцтв про контакт з іонізуючою радіацією. Серед обстежених було 107 чоловіків (89,9%) та 12 жінок (10,1%). Вік обстежених коливався від 21 до 82 років, в середньому —  $(48,82 \pm 1,38)$  року. Тривалість захворювання на момент обстеження становила від 3 до 120 місяців, в середньому —  $(13,57 \pm 2,08)$  міс.

Контрольну групу склали 30 осіб, що були порівнюваними з пацієнтами досліджуваних груп за віком, статтю та супутньою патологією.

Дослідження периферичної крові виконували на гематологічному аналізаторі “Micros” (Франція). Біохімічні дослідження (визначення рівня білірубіну, холестерину, лактатдегідрогенази) виконували на біохімічних аналізаторах “Human” (Німеччина) та “Vitalab Selectra” (Нідерланди). Мутаційний статус гена *JAK2 V617F* визначали за допомогою мультиплексної полімеразної ланцюгової реакції з алельспеціфічними праймерами за Baxter зі співавт. [2].

Чутливість тесту на мутаційний статус гена *JAK2 V617F* визначали як частку спостережень з наявністю досліджуваного критерію (позитивний результат тесту) у групі, яка має характеризуватися його наявністю, а специфічність — як частку спостережень з відсутніс-

тю досліджуваного критерію (негативний результат тесту) в групі, для якої декларується його нетиповість за результатами обстеження існуючим стандартом діагностики — діагностичними критеріями ВООЗ 2001 року. За прогностичну цінність позитивного результату вважали вірогідність наявності захворювання при позитивному результаті тесту, за прогностичну цінність негативного результату — вірогідність відсутності захворювання при негативному результаті тесту. Формалізовані коефіцієнти розраховували за допомогою чотирипольної таблиці.

Математична обробка виконувалась з використанням стандартних статистичних пакетів STATISTICA 6.0. Вірогідність відмінностей між показниками визначали з використанням t-критерію Стьюдента (параметричні критерії) та критерію Фішера (непараметричні критерії).

**Результати та їх обговорення.** При аналізі показників периферичної крові достовірної різниці між середнім числом еритроцитів, середнім рівнем гемоглобіну, наявністю еритроцитозу та підвищеннем гемоглобіну вище референтних показників в обох досліджуваних групах виявлено не було. Всі вищезазначені показники статистично достовірно перевищували значення в осіб контрольної групи.

Середнє число тромбоцитів було достовірно вищим у групі хворих на СП ( $522,67 \pm 27,38$ ) в порівнянні з групою пацієнтів з СЕ ( $235,68 \pm 7,67$ ,  $p < 0,01$ ) та контрольною групою ( $217,29 \pm 7,97$ ,  $p < 0,01$ ). Також частіше спостерігався і тромбоцитоз в основній групі (підвищення числа тромбоцитів вище  $400 \cdot 10^9 / \text{л}$ ) — 60,2% проти 4,2% ( $\varphi^*_{\text{ЕМП}} = 9,441$ ,  $p < 0,01$ ). В контрольній групі тромбоцитозу не виявлено у жодного з пацієнтів.

Достовірно вищими в групі поліцitemій були також середнє число лейкоцитів ( $11,74 \pm 0,55$  проти  $7,48 \pm 0,22$  в групі еритроцитозів та  $6,29 \pm 0,30$  в групі контролю,  $p < 0,01$ ), наявність лейкоцитозу (підвищення числа лейкоцитів вище  $9,0 \cdot 10^9 / \text{л}$ ) — 61,36% проти 20,17% в групі еритроцитозів ( $\varphi^*_{\text{ЕМП}} = 6,166$ ,  $p < 0,01$ ) та 3,33% в контрольній групі ( $\varphi^*_{\text{ЕМП}} = 6,556$ ,  $p < 0,01$ ), наявність нейтрофільозу — 72,73% проти 5,88% в групі еритроцитозів ( $\varphi^*_{\text{ЕМП}} = 10,883$ ,  $p < 0,01$ ) та 3,33% в групі контролю ( $\varphi^*_{\text{ЕМП}} = 7,634$ ,  $p < 0,01$ ).

Основні показники периферичної крові представлені у табл. 1.

Мутацію *JAK2 V617F* виявлено у 43 хворих на СП (95,6%). У чотирьох випадках СП, встановлена згідно з критеріями ВООЗ 2001 р., була *JAK2 V617F* негативною. Критерієм постановки діагнозу були результати гістологічного дослідження кісткового мозку.

У двох пацієнтів з симптоматичним еритроцитозом (1,7%) виявлено мутацію *JAK2 V617F*, при цьому, згідно з критеріями ВООЗ 2001 р., діагноз

Таблиця 1. Показники периферичної крові у обстежених осіб

Показники	СП (n=88)	СЕ (n=119)	Контроль (n=30)
Еритроцити, Т/л	6,64±0,10**	6,13±0,38**	4,97±0,08
Еритроцити вище референтних показників, н, %	87 (98,86%)**	112 (94,12%)**	—
Гемоглобін, г/л	184,74±2,42**	182,07±1,44**	153,14±1,94
Гемоглобін вище референтних показників, н, %	69 (78,41%)**	101 (84,87%)**	—
Середній об'єм еритроцитів, MCV	81,11±0,78*,**	87,05±0,64*	88,96±0,65
Гематокрит, %	57,97±0,01*,**	52,89±0,01*,**	44,25±0,005
Тромбоцити, Г/л	522,67±27,38*,**	235,68 ± 7,67*	217,29±7,97
Тромбоцити вище референтних показників, н, %	53 (60,22%)*,**	5 (4,2%)*	—
Лейкоцити, Г/л	11,74±0,55*,**	7,48±0,22*	6,29±0,30
Лейкоцити вище референтних показників, н, %	54 (61,36%)*,**	24 (20,17%)*,**	1 (3,33%)
Нейтрофільоз, н, %	64 (72,73%)*,**	7 (5,88%)*	1 (3,33%)

Примітки: \* — достовірна різниця ( $p<0,05$ ) між показниками обох досліджуваних груп;  
\*\* — достовірна різниця ( $p<0,05$ ) по відношенню до контрольної групи.

гноз СП або іншого хронічного мієлопроліферативного захворювання неможливо було встановити. Результати визначення мутаційного статусу представлені в табл. 2.

Загальна чутливість використання тесту на наявність мутації *JAK2* V617F в якості маркера СП склала 95,6%, специфічність — 98,3%. Прогностична цінність позитивного результату (вірогідність наявності СП при виявленні мутації *JAK2* V617F) становить 97,7%. Прогностична цінність негативного результату (вірогідність відсутності СП, якщо мутація *JAK2* V617F не виявлена) становить 96,7%.

В групі постраждалих від наслідків аварії на ЧАЕС чутливість використання тесту на наявність мутації *JAK2* V617F в якості маркера СП склала 96,3%, специфічність — 93,8%. Прогностична цінність позитивного результату становить 96,3%, прогностична цінність негативного результату — 93,8%.

У хворих, які були опромінені виключно в межах природного радіаційного фону, чутливість використання тесту на наявність мутацій

Таблиця 2. Результати визначення мутаційного статусу у обстежених пацієнтів

Наявність мутації JAK2 V617F у хворих основної групи		
Показник	СП (n=88)	СЕ (n=119)
Мутація виявлена	84 (95,6%)	2 (1,7%)
Мутація не виявлена	4(4,4%)	117 (98,3%)
Наявність мутації JAK2 V617F в групі постраждалих внаслідок аварії на ЧАЕС		
Показник	СП (n=27)	СЕ (n=16)
Мутація виявлена	26 (96,3%)	1 (6,2%)
Мутація не виявлена	1(3,7%)	15 (93,8%)
Наявність мутації JAK2 V617F в осіб зі спонтанною патологією		
Показник	СП (n=61)	СЕ (n=103)
Мутація виявлена	58 (95,1%)	1 (1,0%)
Мутація не виявлена	3(4,9%)	102 (99,0%)

*JAK2* V617F в якості маркера СП склала 95,1%, специфічність — 99,0%. Прогностична цінність позитивного результату становила 98,3%, прогностична цінність негативного результату — 97,1%.

#### Висновки.

1. Частота мутації V617F гена JAK2, визначена за допомогою мультиплексної полімеразною ланцюговою реакцією з алельспецифічними праймерами, у хворих на спонтанні та радіаційно-асоційовані СП становила 96,3% та 95,1% відповідно.

2. Використання тесту на наявність мутації JAK2 V617F для діагностики СП радіаційно-асоційованої та спонтанної етіології характеризується порівнянними операційними характеристиками, зокрема чутливістю, специфічністю, значущістю для прогнозування позитивності та негативності.

3. Алгоритм діагностики СП, що базується на визначені мутаційного статусу гена JAK2, може надійно відтворюватися щодо хворих, які постраждали внаслідок аварії на Чорнобильській АЕС.

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders / E. J. Baxter, L. M. Scott, P. J. Campbell // Lancet. — 2005. — Vol. 365. — P. 1054–1061.
2. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera // C. James, V. Ugo, J. P. Le Couedic [et al.] // Nature. — 2005. — Vol. 434: — P. 1144–1148.
3. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders / R. Krafovics, F. Pasamonti, A. S. Buser [et al.] // N. Engl. J. Med. — 2005. — Vol. 352. — P. 1779–1790.

4. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis / R. L. Levine, M. Wadleigh, J. Cools [et al.] // Cancer Cell. — 2005. — Vol. 7. — P. 387–397.
5. Philadelphia-negative classical myeloproliferative neoplasms: critical concepts and management recommendations from European LeukemiaNet / T. Barbu, G. Barosi, G. Birgegard [et al.] // J. Clin. Oncol. — 2011. — Vol. 29. — № 6. — P. 761–770.
6. Tefferi A. Myeloproliferative neoplasms: Molecular pathophysiology, essential clinical understanding, and treatment strategies / A. Tefferi, W. Vainchenker // J. Clin. Oncol. — 2011. — Vol. 29. — № 2. — P. 573–582.
7. Thiele J. The 2008 WHO Diagnostic criteria for polycythemia vera, essential thrombocythemia, and primary myelofibrosis / J. Thiele, H. M. Kvasnicka // Curr. Hematol. Malignancy Reports — 2009. — Vol. 4. — P. 33–40.

Стаття надійшла до редакції 23.07.2012.

O. M. Костюкевич, I. V. Дмитренко, S. V. Клименко

ГНУ “Научно-практический центр профилактической  
и клинической медицины” ГУД, г. Киев

Государственное учреждение “Национальный научный центр радиационной  
медицины Национальной академии медицинских наук Украины”,  
53, ул. Мельникова, г. Киев, 04050, Украина

### ОПРЕДЕЛЕНИЕ МУТАЦИИ ГЕНА JAK2 V617F У БОЛЬНЫХ С РАДИАЦИОННО-АССОЦИИРОВАННОЙ ИСТИННОЙ ПОЛИЦИТЕМИЕЙ

Представлены данные выявления частоты мутации JAK2 V617F у больных со спонтанной и радиационно-ассоциированной истинной полицитемией, определены чувствительность и специфичность теста на наличие мутации JAK2 V617F в качестве маркера дифференциальной диагностики симптоматических эритроцитозов и истинной полицитемии.

**Ключевые слова:** истинная полицитемия, симптоматический еритроцитоз, мутация JAK2 V617F.

O. M. Kostyukovich, I V. Dmytrenko, S. V. Klymenko

SSI “Научно-практический центр профилактической  
и клинической медицины” ГУД, г. Киев

State Institution “National Research Center for Radiation Medicine  
of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine”,  
53, Melnykova str., Kyiv, 04050, Ukraine

### DEFINITION OF THE JAK2 V617F MUTATION IN PATIENTS WITH RADIATION-ASSOCIATED POLYCYTHEMIA

The article provides data regarding frequency of JAK2 V617F mutation identification in patients with spontaneous and radiation-associated polycythemia. The sensitivity and specificity of the test for the presence of JAK2 V617F mutation as a marker for differential diagnosis of symptomatic erythrocytosis and polycythemia vera were determined.

**Key words:** polycythemia vera, symptomatic erythrocytosis, mutation JAK2 V617F.