

Primjena algoritama u svrhu smanjenja broja molekularnih određivanja točkaste mutacije V617F u genu za tirozin kinazu JAK2

Horvat, Martina

Postgraduate specialist thesis / Završni specijalistički

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:293736>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-29**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Martina Horvat

PRIMJENA ALGORITAMA U SVRHU SMANJENJA BROJA
MOLEKULARNIH ODREĐIVANJA TOČKASTE MUTACIJE
V617F U GENU ZA TIROZIN KINAZU JAK2

Specijalistički rad

Zagreb, 2024.

Poslijediplomski specijalistički studij: Medicinska biokemija i laboratorijska medicina

Mentor rada: nasl. izv. prof. dr. sc. Mirjana Mariana Kardum Paro, spec. medicinske biokemije

Specijalistički rad obranjen je dana 26. rujna 2024. godine na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu pred povjerenstvom u sastavu:

1. prof. dr. sc. Karmela Barišić
2. nasl. izv. prof. dr. sc. Mirjana Mariana Kardum Paro
3. prof. dr. sc. József Petrik

Rad ima 33 lista.

Predgovor

Specijalistički rad je izrađen u Kliničkom zavodu za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu Kliničke bolnice Merkur, pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Mirjane Mariane Kardum Paro, spec. medicinske biokemije.

Zahvaljujem mentorici izv. prof. dr. sc. Mirjani Mariani Kardum Paro na stručnom vodstvu, podršci i nesebično uloženom trudu te Laboratoriju za molekularnu dijagnostiku na neumornom timskom duhu.

Zahvaljujem se dr.sc. Ivanu Vlahek na nesebičnom dijeljenju znanja i podršci pri statističkoj obradi podataka.

Hvala mojim prijateljicama i kolegicama Andreama na podršci i stručnim, osobnim i svim drugim savjetima.

Veliko hvala mojoj obitelji na strpljivosti, razumijevanju i potpori u svim mojim pothvatima.

Sažetak

Cilj istraživanja: Prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji (SZO), jedan od glavnih dijagnostičkih kriterija za postavljanje dijagnoze mijeloproliferativne neoplazme je molekularno utvrđivanje prisutnosti mutacije V617F u genu za Janus kinazu 2 (*JAK2*). Radi značajnog porasta zahtjeva posljednjih godina, neophodno je procijeniti opravdanost navedenih testiranja. Cilj istraživanja je odrediti udio pozitivnih rezultata molekularnog utvrđivanja prisutnosti mutacije V617F u genu *JAK2* u ukupnom broju testiranih nakon primjene dvaju algoritama (SZO i Mahe i sur.) temeljenih na parametrima krvne slike (koncentracija hemoglobina, broj leukocita i trombocita), odrediti parametre dijagnostičke točnosti primjenjenih algoritama te ustanoviti je li primjenom algoritama smanjen broj zahtjeva za molekularnim utvrđivanjem prisutnosti mutacije V617F u genu *JAK2*.

Ispitanici i metode: Podaci o ukupnom broju testiranih pacijenta na mutaciju V617F u genu *JAK2* te udjelu pozitivnih rezultata prikupljeni su iz Laboratorijskog informacijskog sustava Kliničkog zavoda za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu Kliničke bolnice Merkur. Mutacija V617F u genu *JAK2* određena je kvalitativno, alel-specifičnom lančanom reakcijom polimerazom. Na rezultate molekularnog utvrđivanja prisutnosti mutacije V617F u genu *JAK2* retrogradno su primijenjeni algoritmi SZO i autora Mahe i sur. Podaci su obrađeni statistički korištenjem testa usporedbe proporcija.

Rezultati: U statističku analizu uključeno je 284 molekularnih utvrđivanja prisutnosti mutacije V617F. Primjenom oba algoritama smanjen je broj zahtjeva za molekularnim utvrđivanjem prisutnosti mutacije V617F u genu *JAK2* ($P < 0,0001$) na 198 (smanjenje za 30,3 %) primjenom algoritma SZO-a, odnosno 250 (smanjenje za 12,0 %) primjenom algoritma Mahe i sur.). Nije ustanovljena statistički značajna razlika između udjela pozitivnih rezultata bez primjene algoritma i primjenom algoritma SZO-a ($P = 0,4095$), odnosno primjenom algoritma Mahe i sur. ($P = 0,9339$). Osjetljivost algoritma SZO te Mahe i sur. bila je redom 90,00 % i 93,33 %, specifičnost 32,68 % i 12,99 %, pozitivna prediktivna vrijednost 13,64 % i 11,24 % te negativna prediktivna vrijednost 96,51 % i 94,29 %.

Zaključak: Primjenom algoritama SZO-a i Mahe i sur. dokazano je smanjenje broja zahtjeva za utvrđivanjem prisutnosti mutacije V617F u genu *JAK2*, ali nije dokazano povećanje udjela pozitivnih rezultata testiranja. Oba algoritma pokazala su visoku osjetljivost i negativnu prediktivnu vrijednost, te nisku specifičnost i pozitivnu prediktivnu vrijednost.

Summary

Objectives: According to the World Health Organization (WHO), one of main diagnostic criteria for diagnosis of myeloproliferative neoplasm is molecular detection of V617F mutation in Janus kinase 2 gene (*JAK2*). Due to significant increase in requests in recent years, it is necessary to evaluate justification of such tests. Aim of the research is to determine proportion of positive results in total number of *JAK2* V617F molecular detections after application of algorithms (according to WHO and Mahe et al.) based on blood count parameters (hemoglobin concentration, number of leukocytes and platelets), determine applied algorithms' diagnostic accuracy parameters and examine whether algorithm application reduces number of *JAK2* V617F molecular detections.

Patients and Methods: Number of *JAK2* V617F mutation determinations and proportion of positive results was extracted from the Laboratory Information System of the Clinical Institute for Medical Biochemistry and Laboratory Medicine of University Hospital Merkur. Qualitative allele-specific polymerase chain reaction was used to determine *JAK2* V617F mutation. Algorithms (WHO and Mahe et al.) were applied on *JAK2* V617F molecular detections data in retrograde. Data was compared using statistical test for proportion comparison.

Results: 284 *JAK2* V617F mutation determinations were included in statistical analysis. Application of both algorithms reduced number of *JAK2* V617F molecular detections ($P < 0.0001$): to 198 (30.3 % reduction) by WHO algorithm and to 250 (12.0 % reduction) by Mahe et al. algorithm. Proportion of positive results in total number of *JAK2* V617F molecular detections with and without application of WHO algorithm ($P = 0.4095$) or Mahe et al. algorithm ($P = 0.9339$) was statistically insignificant. Sensitivity measured for WHO and Mahe et al. algorithm was 90.00 % and 93.33 %, specificity 32.68 % and 12.99 %, positive predictive value 13.64 % and 11.24 %, negative predictive value 96.51 % and 94.29 %, respectively.

Conclusion: Reduction in *JAK2* V617F molecular detections was determined after application of WHO and Mahe et al. algorithms, but proportion of positive results was not statistically different. Both algorithms demonstrated high sensitivity and negative predictive value, while specificity and positive predictive value were low.

Sadržaj

1. Uvod i pregled područja istraživanja	1
1.1 Mijeloproliferativne neoplazme	1
1.2 Janus kinaza 2	2
1.3 Mutacija V617F u genu <i>JAK2</i>	5
1.4 Ostale pogonske mutacije u mijeloproliferativnim neoplazmama	5
1.5 Policitemija vera	6
1.6 Esencijalna trombocitemija	7
1.7 Primarna mijelofibroza	9
1.8 Utvrđivanje prisutnosti mutacije V617F u genu <i>JAK2</i>	10
2. Cilj istraživanja	14
3. Ispitanici i metode	15
3.1 Ispitanici i prikupljanje podataka	15
3.2 Molekularna analiza mutacije V617F u genu <i>JAK2</i>	15
3.3 Algoritmi	16
3.4 Prikupljanje podataka i statistička analiza	16
4. Rezultati	17
4.1 Primjena algoritama SZO te Mahe i sur.	19
4.2 Dijagnostička točnost	21
5. Rasprava	23
6. Zaključci	27
7. Literatura	28
8. Popis skraćenica	32

1. Uvod i pregled područja istraživanja

1.1 Mijeloproliferativne neoplazme

Mijeloproliferativne neoplazme (MPN) karakterizira klonalna proliferacija multipotentne hematopoetske matične stanice. Manifestiraju se panmijelozom koštane srži uz eritrocitozu, granulocitozu i/ili trombocitozu u perifernoj krvi. Najčešće je jedna loza zahvaćenija od drugih te se mogu transformirati u akutnu mijeloičnu leukemiju (AML). U Tablici 1. nabrojane su mijeloproliferativne neoplazme prema klasifikaciji Svjetske zdravstvene organizacije (SZO) iz 2022. (1).

Tablica 1. Mijeloproliferativne neoplazme prema klasifikaciji Svjetske zdravstvene organizacije iz 2022. godine.

Mijeloproliferativne neoplazme
Kronična mijeloična leukemija
Policitemija vera
Esencijalna trombocitemija
Primarna mijelofibroza
Kronična neutrofilna leukemija
Kronična eozinofilna leukemija
Juvenilna mijelomonocitna leukemija
Mijeloproliferativna neoplazma, drugačije neodređena

Kroničnu mijeloičnu leukemiju (KML) karakterizira recipročna translokacija t(9;22)(q34;q11) te posljedično prijepis fuzijskog gena *BCR::ABL1*. Gen *ABL1* kodira nereceptorsku tirozin kinazu na 9. kromosomu, dok je *BCR* (engl. *breakpoint cluster region*) na 22. kromosomu. Ovisno o mjestu prekrajanja RNA nastali fuzijski protein može biti p210, p190 ili p230. Za kroničnu mijeloičnu leukemiju karakterističan je protein p210 veličine 210 kD koji potiče leukemogenezu djelovanjem na signalne puteve JAK/STAT, PI3K/AKT, RAS/MEK te potiče proliferaciju stanica, preživljenje, inhibiciju apoptoze i aktivaciju transkripcijskih faktora (2). Bolest se danas najčešće otkriva u kroničnoj fazi uz izrazito povećanu granulocitopoezu s brojem leukocita u perifernoj krvi $50 - 200 \times 10^9/L$. Dominiraju zreli neutrofili uz skretanje ulijevo sve do stadija blasta (3).

Kod *BCR::ABL1* negativnih MPN najčešće se pronalaze mutacije u genima *JAK2*, *CALR*, i *MPL*. Prema nalazima krvne slike, molekularne dijagnostike i morfologije koštane srži razlikuju se policitemija vera, esencijalna trombocitemija i primarna mijelofibroza. Osim navedenih mutacija koje se smatraju pogonskim (engl. *driver*) mutacijama, kod preko polovice pacijenata s MPN prisutne su i mutacije u genima: *TET2*, *ASXL1* i *DNMT3A* (1).

Kronična neutrofilna leukemija je *BCR::ABL1* negativna MPN koju karakterizira neutrofilija ≥ 80 % u perifernoj krvi uz broj leukocita $\geq 25 \times 10^9/L$ te hipercelularna koštana srž i splenomegalija. Kod preko 60 % pacijenata s neutrofilnom leukemijom nalaze se mutacije u genu *CSF3R* (1, 4).

Kod kronične eozinofilne leukemije dolazi do klonalne proliferacije abnormalnih eozinofila i eozinofilnih prekursora što rezultira hipereozinofilijom u krvi ($> 1,5 \times 10^9/L$) i koštanoj srži te višeorganskim oštećenjima (1, 5, 6).

Juvenilna mijelomonocitna leukemija je MPN koja se javlja u ranom djetinjstvu, a nastaje zbog mutacija unutar gena koji kodiraju za proteine signalnog puta RAS te posljedično povećane osjetljivosti na faktor stimulacije granulocitno-monocitnih kolonija (GM-CSF, engl. *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*). Javljaju se hiperleukocitoza, monocitoza, povišene vrijednosti fetalnog hemoglobina i prisutnost mijeloidnih prekursora (1, 7).

MPN, drugačije neodređena (engl. *MPN-not otherwise specified*), označava slučajeve s elementima mijeloproliferativne neoplazme, no istovremeno ne zadovoljava potrebne dijagnostičke kriterije za određenu mijeloproliferativnu neoplazmu ili postoje preklapanja (1).

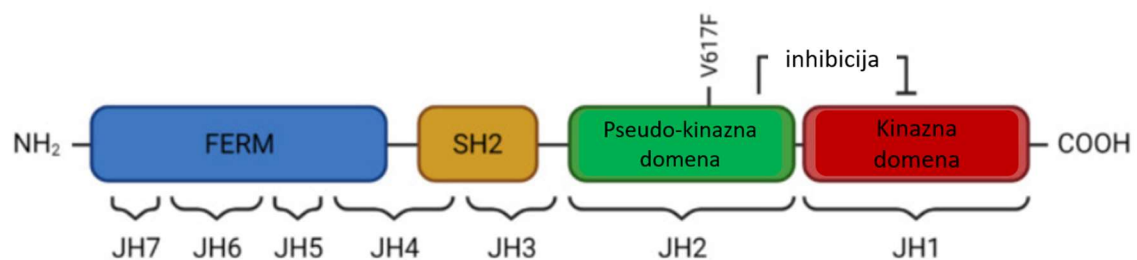
1.2 Janus kinaza 2

Janus kinaza 2 (JAK2) je unutarstanična nerekceptorska tirozinska kinaza koja ima ključnu ulogu u provođenju signala citokinskih receptora: interleukina (IL), interferona (INF) i hormona unutar stanice (8, 9), budući da citokinski receptori nemaju katalitičku aktivnost (10).

Unutar obitelji Janus kinaza kod sisavaca, JAK1, JAK2 i TYK2 su sveprisutne, dok se JAK3 nalazi u mijeloidnom i limfatičnom tkivu (11). Vezane su za unutarstanične segmente citokinskih receptora i fosforiliraju proteine STAT (engl. *Signal Transducer and Activators of*

Transcription) signalnog puta u svrhu regulacije imunskog sustava, hematopoeze, staničnog metabolizma i rasta (9, 11).

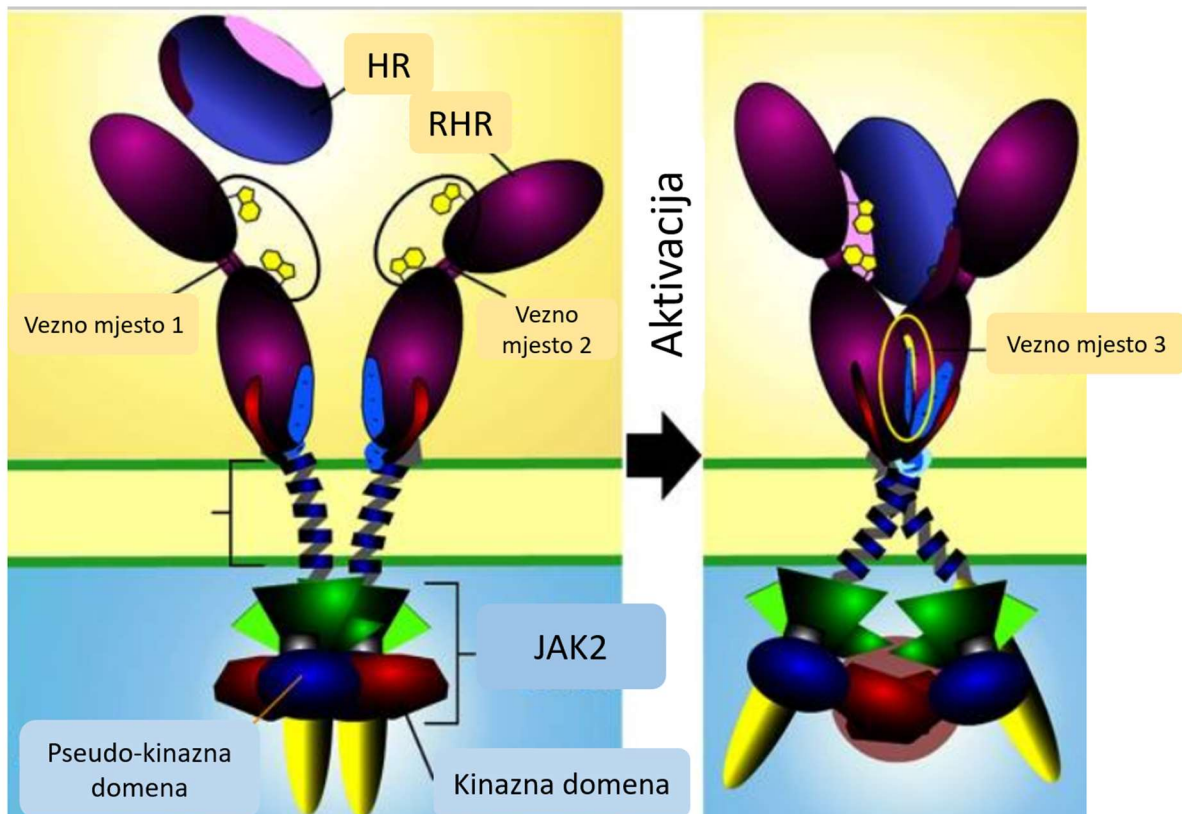
Gen *JAK2* nalazi se na 9. kromosomu (lokus 9p24), a sintetizirani protein JAK2 sastoji se od sedam strukturno sličnih domena JH (engl. *Janus Homology*) koje tvore četiri glavne domene. C-terminalna domena JH1 visoko je očuvana kinazna domena koja sadrži aktivacijsku petlju, primarna mjesta fosforilacije i vezno mjesto za ATP. JH2 je pseudo-kinazna domena čija je struktura slična onoj JH1, no nema katalitičku sposobnost. Autoinhibira kinaznu domenu putem fosforilacije aminokiselinskih ostataka S523 i Y570, a koja se uklanja stimulacijom citokinskog receptora (12, 13). Uz domenu JH2 nalazi se domena SH2 (engl. *Src Homology 2*). Na N-kraju proteina nalazi se domena FERM (akronim izveden iz naziva proteina u kojima je opisana, engl. *protein 4.1, Ezrin, Radixin, Moesin*) koja zajedno s domenom sličnoj SH2 omogućava interakciju JAK2 i receptora na površini stanica (Slika 1.) (11, 14, 15, 16).



Slika 1. Shematski prikaz strukture domena Janus kinaze 2. Sedam JH domena (engl. *Janus Homology*) tvore četiri glavne domene: kinaznu, pseudo-kinaznu, SH2 i FERM. Mutacija V617F nalazi se u pseudo-kinaznoj domeni čime je onemogućen bazalni inhibični učinak na kinaznu domenu. Preuzeto i prilagođeno iz Bader MS, Meyer SC. *JAK2 in Myeloproliferative Neoplasms: Still a Protagonist*. *Pharmaceuticals*. 2022 28;15(2):160 (17).

U svom neaktivnom stanju domena JH1 i domena JH2 tvore stabilan kompleks u kojoj domena JH2 inhibira domenu JH1. Domena slična SH2 i domena FERM također zajedno tvore strukturnu cjelinu. Temeljem istraživanja na insektima gdje cjelina JH2-JH1 nije bila potpuno autoinhibirana, smatra se da je međudjelovanje između cjelina JH2-JH1 i FERM-SH2 ključno za potpunu autoinhibiciju JAK2 (18).

Nakon aktivacije receptora signalnom molekulom dolazi do konformacijske promjene receptora gdje se transmembranske domene iz paralelnog položaja unutar citoplazme razdvajaju. Takva promjena udaljava pseudokinaznu inhibitornu domenu JAK2 od kinazne domene drugog proteina JAK2 u kompleksu dimerni receptor-JAK2 te omogućava međusobnu fosforilaciju (transaktivacija ili transfosforilacija) proteina JAK2 (Slika 2.) (19).



Slika 2. Prikazan je aktivacijski model homodimernog citokinskog receptora klase 1 (vezanje hormona rasta (HR) na receptor za hormon rasta (RHR)). Dolazi do konformacijske promjene receptora te posljedično udaljavanja pseudokinaznih domena proteina Janus kinaza 2. Preuzeto i prilagođeno iz Waters MJ, Brooks AJ. JAK2 activation by growth hormone and other cytokines. *Biochem J.* 2015; 15;466(1):1-11.

Nakon aktivacije, JAK2 fosforiliraju tirozinske ostatke receptora što je daljnje mjesto vezivanja za proteine STAT (20), koje JAK2 fosforiliraju zbog čega se proteini STAT odvajaju, dimeriziraju te reguliraju gensku ekspresiju i na taj način odgovaraju na izvanstanični signal (21, 22).

Proteini STAT se vežu na promotorsko mjesto na DNA, formiraju transkripcijski kompleks s ne-STAT transkripcijskom faktorom ili DNA-vezujućim elementom i potiču gensku ekspresiju (21).

Konzervirani tirozinski ostaci u JAK2 su Y1007 i Y1008 (8, 15). Sudjeluju u prijenosu signala receptora iz obitelji s podjedinicom glikoproteina 130 (GP130) (npr. receptor IL-6, receptor IL-11), citokinskih receptora klase II (npr. receptor za IFN α/β , receptor za IFN γ , citokinski receptor iz obitelji IL-10), receptora obitelji IL-3 (IL-3R), IL-5R, receptora GM-CSF, receptora za eritropetin, faktor rasta, prolaktin, trombopoetin) (21, 23).

1.3 Mutacija V617F u genu *JAK2*

Mutacija V617F u genu *JAK2* najčešća je somatska mutacija kod MPN-i. Prisutna je u više od 95 % slučajeva policitemije vere te u oko 50 % slučajeva esencijalne trombocitemije i mijelofibroze (24, 25). U egzonu 14 dolazi do zamjene gvanina timinom (c.1849 G>T) što mijenja aminokiselinu valin u fenilalanin na poziciji 617 u pseudo-kinaznoj domeni te posljedično uzrokuje smanjenje inhibitorne funkcije domene JH2 te konstitutivnu aktivaciju. Također, omogućava daljnju aktivaciju proteina STAT5 neovisno o vezivanju citokina na receptor i posljedično daje stanicama proliferacijsku prednost. (26, 27). Postoji značajna korelacija između mutacije V617F i učestalosti komplikacija poput sekundarne fibroze, krvarenja i tromboze (27).

1.4 Ostale pogonske mutacije u mijeloproliferativnim neoplazmama

Kod oko 5 % pacijenata s policitemijom verom bez mutacije V617F u genu *JAK2* nalazi se mutacija egzona 12 (28, 29). Obuhvaća više desetaka mogućih različitih mutacija (zamjena, delecija, duplikacija) koje uzrokuju zamjenu jedne ili više aminokiselina u proteinu. Mutacija egzona 12 ometa pseudo-kinaznu funkciju i dolazi do stalne aktivacije kinazne domene, a uzrokuje izoliranu proliferaciju eritroidne loze (30).

Kod 1 – 4 % pacijenata s esencijalnom trombocitemijom i 5 – 8 % pacijenata s primarnom mijelofibrozom bez mutacije u *JAK2* nalazi se točkasta mutacija u genu *MPL*, u egzonu 10. Protein MPL (engl. *myeloproliferative leukemia*) je receptor hematopoetskih citokina, trombopoetina te koristi JAK2 za intracelularni prijenos signala. Uz prisutnost mutacije, dolazi do aktivacije JAK2 bez vezivanja trombopoetina (31, 32).

Kod pacijenata s esencijanom trombocitemijom i mijelofibrozom dokazano je nekoliko desetaka različitih mutacija u genu za kalretikulin (*CALR*), od kojih su najčešće delecija 52 parova baza (pb) (tip I) i insercija 5 pb (tip II). Gen *CALR* kodira šaperon endoplazmatskog retikuluma te mutacija aktivira MPL i JAK2 signalni put (33).

1.5 Policitemija vera

Policitemija vera klonalna je mijeloproliferativna bolest nastala transformacijom multipotentne matične stanice. Javlja se najčešće između 50. i 60. godine, a učestalost je dva oboljela na 100 000 stanovnika godišnje. U više od 95 % pacijenata prisutna je mutacija V617F u genu *JAK2*, u manjem broju (3 %) nalazi se mutacija egzona 12 u genu *JAK2* (34). Eritroidne matične stanice imaju sposobnost autonomnog rasta i bez prisutnosti eritropoetina. Imaju pretjeranu ekspresiju antiapoptotičkog proteina Bcl-x1 te su otporne na apoptozu u odsutnosti eritropoetina. Bolest se često otkriva slučajno pregledom krvne slike, a najčešći simptomi u početku su glavobolja, slabost, svrbež, vrtoglavice. Osim navedenih simptoma koža i sluznice su izrazito crvene, uz prisutnu cijanozu distalnih dijelova ekstremiteta te povećanu slezenu. Najčešće komplikacije su tromboze (češće arterijske) i krvarenja (35).

Od laboratorijskih pokazatelja broj eritrocita je izrazito povećan te su u početku eritrociti normocitni i normokromni. Kasnije, nakon ponovljenih flebotomija javljaju se hipokromija i mikrocytoza te nesrazmjerno veći broj eritrocita u odnosu na koncentraciju hemoglobina i hematokrit. Moguć je i nedostatak željeza. Broj retikulocita je normalan ili lagano povišen. Leukociti su često povišeni zbog povećanja granulocita, uz skretanje ulijevo. Prisutna je bazofilija, a alkalna fosfataza u leukocitima je najčešće povišena. Trombociti mogu biti povećani uz abnormanu sposobnost agregacije, što može uzrokovati okultna krvarenja te sekundarnu sideropeniju. Urati su često povišeni kao i vrijednost vitamina B12 u serumu, dok je eritropoetin snižen, a saturacija arterijske krvi kisikom normalna (26, 35).

Većina pacijenata s policitemijom verom ima hipercelularnu koštanu srž, uz povećanu eritropoezu i granulopoezu, dok je omjer mijelo:eritro obično normalan. Povećani je broj megakariocita i eozinofila. U kasnijim fazama, učestala je fibroza uz smanjenu eritropoezu i granulopoezu.

Prema SZO kriteriji za dijagnozu policitemije vere su sljedeći (1):

Glavni kriteriji:

- 1) hemoglobin > 165 g/L (muškarci), > 160 g/L (žene) ili hematokrit > 49 % (muškarci) ili > 48 % (žene),
- 2) hipercelularna koštana srž s trilinejskom mijeloproliferacijom (uključuje izraženu eritroidnu, granulocitnu i megakariocitnu proliferaciju s polimorfnim, zrelim megakariocitima različite veličine),
- 3) mutacija V617F ili mutacija egzona 12 u genu *JAK2*.

Sporedni kriterij:

- 1) serumski eritropoetin ispod donje granice referentnog intervala.

Za dijagnozu policitemije vere potrebna su sva tri glavna kriterija ili prva dva glavna i sporedni kriterij.

1.6 Esencijalna trombocitemija

Esencijalna trombocitemija je MPN koja zahvaća primarno megakariocitnu lozu. Osim povećanog broja trombocita ($\geq 450 \times 10^9/L$) prisutna je i trombocitopatija. Najčešće se javlja između 50. i 60. godine života neovisno o spolu te između 20. i 30. godine života kod žena uz incidenciju od otprilike 2 oboljela na 100 000 stanovnika godišnje. Zloćudnom tumorskom klonu pripadaju sve krvne loze. Zbog hiperosjetljivosti klona na IL-3, IL-6, ali ne i na GM-CSF te smanjene osjetljivosti na transformirajući faktor rasta β (engl. *transforming growth factor β* , TGF- β), koji inhibira tromboezu, izražena je megakariocitna proliferacija. Zbog defekta u ekspresiji receptora MPL za tromboezu, postoji poremećaj u vezivanju tromboezina te za razliku od eritropoetina u policitemiji, tromboezin u esencijalnoj trombocitemiji je povišen. Uz to, megakariociti su pretjerano osjetljivi na djelovanje tromboezina što dodatno pojačava njihovu proliferaciju. Oko 50 % pacijenata s esencijalnom trombocitemijom pozitivno je na mutaciju V617F mutaciju u genu *JAK2*. U 1 – 4 % oboljelih nalazi se mutaciju u genu *MPL* (najčešća je W515L).

Esencijalna trombocitemija se često otkriva slučajnim pregledom krvne slike jer su mnogi oboljeli asimptomatski. Simptomi koji su najčešći su tromboze i manja krvarenja, glavobolje,

parestezije, krvarenja u gastrointestinalni i urinarni trakt te kožu. Tromboze su češće u arterijama (cerebrovaskularne, periferne, koronarne). Splenomegalija je prisutna u 40 % oboljelih. Trombocitoza je često ekstremna ($1000 - 5000 \times 10^9/L$), a prisutne su i abnormalnosti u agregaciji i adheziji trombocita, a samim time i u njihovoj funkciji. Moguća je prisutnost anemije, zbog hemoragičnih epizoda. Leukocitoza vrijednosti $22 - 40 \times 10^9/L$ je skoro uvijek prisutna, uz pokoji metamijelocit i mijelocit. Mogu biti prisutne i blaga eozinofilija i bazofilija.

Koštana srž pacijanata s esencijalnom trombocitemijom je hipercelularna uz megakariocitnu proliferaciju te grupiranje uz sinusoide. Eritroidna i mijeloidna hiperplazija su također prisutne (26, 36).

Prema SZO kriteriji za dijagnozu esencijalne trombocitemije su sljedeći (1):

Glavni kriteriji:

- 1) trombociti $\geq 450 \times 10^9/L$,
- 2) megakariocitna proliferacija u koštanoj srži uz povećan broj uvećanih i zrelih megakariocita s hiperlobuliranom jezgrom; kod neutrofilne granulopoeze i eritropoeze nema značajnog pomaka ulijevo te je rijetko prisutno blago umnažanje retikulinskih vlakna,
- 3) odsustvo kriterija SZO za *BCR::ABL1*-pozitivnu KML, policitemiju veru, primarnu mijelofibrozu, mijelodisplastični sindrom i ostale mijeloidne neoplazme,
- 4) mutacije u genima *JAK2*, *CALR* ili *MPL*.

Sporedni kriterij:

- 1) prisustvo klonalnog markera (npr. abnormalni kariotip) ili odsustvo dokaza za reaktivnu trombocitozu.

Za dijagnozu esencijalne trombocitemije potrebna su sva četiri glavna kriterija ili prva tri glavna i sporedni kriterij.

1.7 Primarna mijelofibroza

Primarna mijelofibroza klonalni je poremećaj matične stanice uz splenomegaliju, leukoeritroblastozu, ekstramedularnu hematopoezu i progresivnu fibrozu koštane srži. Najčešće se javlja nakon 50. godine života, jednako u oba spola uz učestalost 1 do 2 oboljela na 100 000 stanovnika. Klonalni poremećaj rezultira proliferacijom svih triju loza, uz izraženiju proliferaciju granulocita i megakariocita. Karakteristična fibroza nije dio zloćudnog klona već je sekundarna pojava zbog pojačanog lučenja citokina koji stimuliraju fibroblaste (faktor nekroze tumora β , engl. *tumor necrosis factor- β* , TNF- β). Ekstramedularna hematopoeza događa se u jetri i slezeni, zbog čega se javljaju hepato- i splenomegalija. Zbog nedjelotvorne hematopoeze i redistribucije krvi zbog splenomegalije, prisutna je i anemija.

Kod 50 % oboljelih prisutna je mutacija V617F u genu *JAK2*, a mutacija *MPL* kod 5 % oboljelih. U početku su prisutni opći simptomi poput umora, slabosti, dispneje, gubitka na težini, palpacije, pritiska pod lijevim rebranim lukom ili osjećaja brze sitosti. Osim normocitne i normokromne anemije, prisutni su i eritroblasti u perifernoj krvi te često i dakriociti, eliptociti i ovalociti. Leukocitoza je umjerena ($15 - 30 \times 10^9/L$), javlja se uz skretanje u lijevo i moguća je pojava blasta te bazofilija. Broj trombocita može biti snižen, normalan ili povišen što je češći slučaj u početnoj fazi bolesti. Zbog fibroze, aspiracijska punkcija koštane srži često može biti neuspješna. Biopsija otkriva hipercelularnost uz različite stupnjeve fibroze te prisutnih agregata megakariocita (26, 37).

Prema SZO kriteriji za dijagnozu esencijalne trombocitemije su sljedeći (1):

Glavni kriteriji:

- 1) proliferacija i atipija megakariocita uz fibrozu retikulina ili/i fibrina (stupanj 2 ili 3),
- 2) odsutstvo kriterija SZO za *BCR::ABL1*-pozitivnu KML, policitemiju veru, esencijalnu trombocitemiju, mijelodisplastični sindrom ili ostale mijeloidne neoplazme,
- 3) mutacije *JAK2*, *CALR* ili *MPL* ili drugi klonalni markeri ili odsustvo dokaza reaktivne fibroze koštane srži.

Sporedni kriteriji:

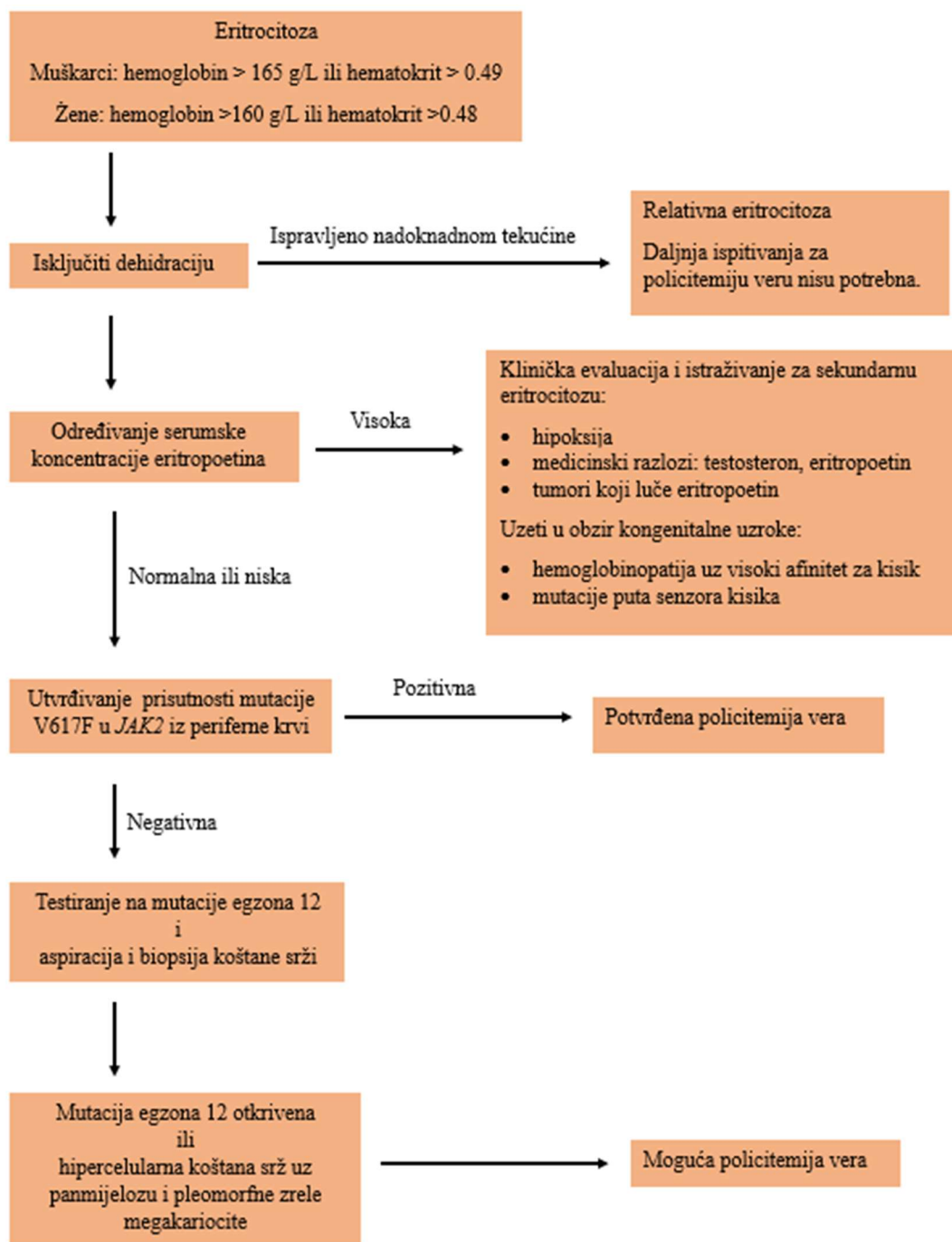
- 4) prisustnost jednog ili više parametara potvrđenih u dva uzastopna određivanja:
 - anemija koja nije uzrokovana komorbiditetima,
 - leukocitoza ($\geq 11 \times 10^9/L$),

- splenomegalija,
- aktivnost laktat dehidrogenaze iznad referentnog intervala,
- leukoeritroblastoza.

Za dijagnozu primarne mijelofibroze potrebna su sva tri glavna kriterija i barem jedan od sporednih.

1.8 Utvrđivanje prisutnosti mutacije V617F u genu *JAK2*

Osim što je mutacija V617F u genu *JAK2* jedan od glavnih kriterija za dijagnozu *BCR::ABL1*-negativnih MPN-a, također omogućava razlikovanje između primarne i sekundarne eritrocitoze/trombocitoze te je jedan od ranijih koraka u diferencijalnoj dijagnostici eritrocitoze (Slika 3.) (38, 39).



Slika 3. Dijagnostički pristup eritrocitozi. Preuzeto i prilagođeno iz Mithoowani S, Laureano M, Crowther MA, Hillis CM. Investigation and management of erythrocytosis. CMAJ. 2020;192:E913-E918.

Dostupne metode detekcije mutacije V617F su kvantitativna lančana reakcije polimerazom (qPCR, engl. *quantitative polymerase chain reaction*), alel-specifični PCR, polimorfizam duljine restrikcijskih fragmenata (RFLP, engl. *restriction fragment length polymorphism*) Sangerovo sekvenciranje, tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC, engl. *high performance liquid chromatography*), analiza krivulje taljenja visoke rezolucije (HRM, engl.

high resolution melting) i druge. Periferna krv, najčešći uzorak izbora, je lako dostupna, a analitički jednako vrijedna kao i punktati koštane srži (40). Zbog lake dostupnosti i neinvazivnosti testa, podložan je neprikladnom i neopravdanom zadavanju.

Mahe i sur. izvijestili su o povećanom broju zahtjeva za molekularnim utvrđivanjem prisutnosti mutacije V617F u genu *JAK2* uz smanjenje udjela pozitivnih rezultata molekularnog utvrđivanja prisutnosti mutacije u ukupno testiranim (engl. *hit rate*), unatoč stabilnim parametrima kvalitete (41).

Langabeer i sur. u istraživanju provedenom u razdoblju od 2006. do 2012. bilježe porast broja zahtjeva za molekularnim utvrđivanjem prisutnosti mutacije V617F u genu *JAK2* unatoč stalnom broju novootkrivenih mutacija, najvjerojatnije uslijed smanjenja kriterija testiranja i/ili veće dostupnosti molekularne dijagnostike. Primjećeno je da su indikacije za molekularnim utvrđivanjem prisutnosti mutacije V617F u genu *JAK2* različite, a raspon *hit rate* mutacije V617F u genu *JAK2* s obzirom na ustanove iz kojih su uzorci upućeni je širok: 8,5 – 38,8 % (medijan 21,8 %) što upućuje na nepostojanje nacionalnog konsenzusa pri odabiru testiranja *JAK2* u Republici Irskoj (42).

S obzirom da porast zahtjeva za molekularnim utvrđivanjem prisutnosti mutacije V617F u genu *JAK2* posljednjih godina dodatno opterećuje sustav i produljuje vrijeme testiranja, potreba za racionalnim korištenjem molekularne dijagnostike i razvoja algoritama koji bi u tome pomogli postaje sve izraženija (41, 42, 43).

Mahe i sur. su za procjenu opravdanosti molekularnog utvrđivanja prisutnosti mutacije V617F u genu *JAK2* koristili algoritam koji su nazvali *JAK2-tree*, a koji je utemeljen na vrijednostima slijedećih parametara krvne slike:

- hemoglobin > 165 g/L (muškarci), > 160 g/L (žene),
- broj trombocita > 350 x 10⁹/L,
- broj leukocita > 7 x 10⁹/L.

Primjenom navedenih parametara krvne slike algoritma Mahe i sur. broj zahtjeva za molekularnim utvrđivanjem prisutnosti mutacije V617F u genu *JAK2* u razdoblju od 2009. do 2017. u odnosu na ukupno testirane uzorke bi bio manji za 15 %. Algoritam Mahe i sur. pokazao je osjetljivost od 94 %, specifičnost od 17 % i 1,2 % lažno negativnih rezultata (propuštenih pozitivnih rezultata). Udio pozitivnih rezultata u odnosu na ukupni broj testiranih primjenom algoritma Mahe i sur. bi se povećao na 21 % u odnosu na 19 % bez primjene algoritma (41).

Istraživanje Catherwood i sur. pokazalo je da je od 300 testiranih, mutacija V617F u genu *JAK2* otkrivena kod njih 50 (16,7 %), od kojih 43 (43/50; 86 %) je imalo vrijednosti hemoglobina, hematokrita, broja eritrocita i trombocita iznad gornjih granica referentnih intervala. Povišene vrijednosti parametara krvne slike korištene su kao algoritam za daljnje upućivanje na utvrđivanje prisutnosti mutacije V617F u genu *JAK2* genu. Većina pozitivnih pacijenata na mutaciju V617F u genu *JAK2* bili bi upućeni na molekularno utvrđivanje prisutnosti mutacije već samo temeljem povišenih spomenutih parametara krvne slike uz značajno smanjenje broja analiza od 51 % (43).

U retrospektivnom istraživanju naziva JACKPOT autori su koristili hematološke vrijednosti:

- broj eritrocita $> 6,45 \times 10^{12}/L$,
- broj trombocita $> 350 \times 10^9/L$,
- broj neutrofila $> 6,2 \times 10^9/L$,

kao pokazatelje rizika pozitivnosti mutacije *JAK2* (V617F i egzon 12) kod pacijenata primljenih u obradu zbog povišenih vrijednosti hemoglobina. Uz nedostatak svih navedenih kriterija mutacije u genu *JAK2* su isključene s osjetljivošću od 94,7 % i 100 % (derivacijska i validacijska kohorta) i negativnom prediktivnom vrijednošću od 98,8 % i 100 % uz ukupnu stopu lažno negativnih od 0,4 %. Primjenom ovih kriterija autori bi imali 50 % manje testova (44).

2. Cilj istraživanja

Hipoteza ovoga istraživanja jest da se primjenom algoritama SZO te iz istraživanja Mahe i sur. očekuje:

- a) smanjenje broja zahtjeva za molekularnim utvrđivanjem prisutnosti mutacije V617F u genu *JAK2*.,
- b) povećanje udjela pozitivnih rezultata u odnosu na ukupni broj testiranih molekularnom metodom.

Ciljevi ovoga istraživanja su:

- 1) odrediti broj zahtjeva za molekularnim utvrđivanjem prisutnosti mutacije V617F u genu *JAK2* pretraživanjem laboratorijskog informacijskog sustava (LIS-a) za razdoblje od 2016. do 2022.>,
- 2) primjenom dvaju algoritama (SZO te Mahe i sur.) sukladno vrijednostima parametara krvne slike testirati hipotezu,
- 3) odrediti dijagnostičku točnost primjenjenih algoritama u odnosu na molekularno utvrđivanje prisutnosti mutacije V617F u genu *JAK2*.

3. Ispitanici i metode

3.1 Ispitanici i prikupljanje podataka

Iz LIS-a filtriranjem rezultata retrogradno su prikupljeni rezultati pacijenata kojima je provedena molekularna analiza prisutnosti mutacije V617F tijekom 2022. godine. Također je utvrđen broj zahtjeva za molekularnom analizom prisutnosti mutacije V617F na godišnjoj razini u periodu od 2016. do 2022.

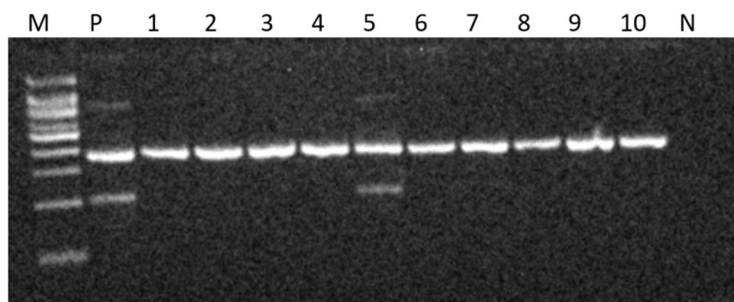
Ispitanici su bili pacijenti Kliničke bolnice (KB) Merkur koji su zaprimljeni na odjel ili ambulantno te pacijenti vanjskih ustanova čiji uzorci su dostavljeni u Klinički zavod za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu (KZMBLM) radi laboratorijskih analiza. Odjelnim pacijentima uzorkovanje krvi provelo je medicinsko osoblje odjela, dok je ambulantnima krv uzorkovana u ambulanti KZMBLM-a. Korišteni su uzorci periferne krvi ili punktata koštane srži uzetih uz antikoagulant K₂EDTA.

Parametri krvne slike određeni su na uređajima Sysmex XN2000 ili Sysmex XN1000 (Siemens, Norderstedt, Njemačka) u Odjelu za medicinsku biokemiju ili Odjelu za hitnu i transplantacijsku laboratorijsku dijagnostiku KZMBLM-a.

3.2 Molekularna analiza mutacije V617F u genu *JAK2*

Izdvajanje DNA iz leukocita uzoraka periferne krvi ili punktata koštane srži provedeno je na kolonama, korištenjem komercijalno dostupnog kompleta QIAamp® DNABlood Mini Kit (Qiagen, Hilden, Njemačka) uz postupke unutarnje kontrole kvalitete (određivanje koncentracije i čistoće izolirane DNA, ispitivanje integriteta te umnažanje i detekcija kontrolnog gena *ABL*).

Prisutnost mutacije V617F u genu *JAK2* određena je kvalitativnom metodom, alel-specifičnim PCR-om uz UV vizualizaciju produkata umnažanja etidijevim bromidom nakon provedene elektroforeze na 3 %-tnom agaroznom gelu prema Baxter i sur. uz analitičku osjetljivost 3 % (24). Pozitivan rezultat molekularne analize vizualiziran je prisutnošću umnoženog mutacijskog produkta veličine 203 pb uz prisutnost umnoženog unutarnjeg kontrolnog fragmenta veličine 364 pb. Negativan rezultat vizualiziran je prisutnošću samo umnoženog unutarnjeg kontrolnog fragmenta veličine 364 pb (Slika 4.).



Slika 4. Prikaz produkata alel-specifične lančane reakcije polimerazom za utvrđivanje prisutnosti mutacije V617F u genu *JAK2* uz UV vizualizaciju etidijevim bromidom nakon provedene elektroforeze na 3 %-tnom agaroznom gelu. M – standard veličina po 100 parova baza (pb), P – pozitivna kontrola (vrpca veličine 203 i 364 pb), N – negativna kontrola, 1-10 – uzorci pacijenata.

3.3 Algoritmi

Na rezultate molekularnog utvrđivanja prisutnosti mutacije V617F u genu *JAK2* (pozitivan/negativan) retrogradno su primijenjeni sljedeći algoritmi:

- 1) algoritam SZO-a (kriteriji parametara krvne slike: hemoglobin > 165 g/L kod muškaraca, odnosno > 160 g/L kod žena, broj trombocita $\geq 450 \times 10^9/L$ te broj leukocita $\geq 11 \times 10^9/L$),
- 2) algoritam Mahe i sur. (kriteriji parametara krvne slike: hemoglobin > 165 g/L kod muškaraca, odnosno > 160 g/L kod žena, broj trombocita > $350 \times 10^9/L$ te broj leukocita > $7 \times 10^9/L$).

3.4 Prikupljanje podataka i statistička analiza

Prikupljanje podataka i statistička analiza provedeni su u programu Excel (2021., Microsoft, SAD) i MedCalc (verzija 9.6.2.0., Medisoftware, Mariakerke, Belgija). Razlika između broja zahtjeva za molekularnim utvrđivanjem prisutnosti V617F u genu *JAK2* prije i nakon primjene algoritama te udjela pozitivnih rezultata uz primjenu algoritama i bez algoritama ispitana je testom usporedbe proporcija (McNemar i z-test) uz $P < 0,05$.

Svi postupci istraživanja provedeni su u skladu s relevantnim bioetičkim standardima te uz odobrenje Etičkog povjerenstva Kliničke bolnice Merkur te Povjerenstva za etičnost eksperimentalnog rada Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

4. Rezultati

Broj zahtjeva za molekularnim utvrđivanjem prisutnosti mutacije V617F u genu *JAK2* pretraživanjem LIS-a za razdoblje od 2016. do 2022. prikazan je u Tablici 2.

Tablica 2. Broj utvrđivanja prisutnosti mutacije V617F u genu *JAK2* u razdoblju od 2016. do 2022.

Godina	Broj zahtjeva
2016.	185
2017.	161
2018.	182
2019.	200
2020.	192
2021.	306
2022.	307

Tijekom 2022. godine u Laboratoriju za molekularnu dijagnostiku KZMBLM-a analizirano je 307 uzoraka na prisutnost mutacije V617F u genu *JAK2*. Među njima bilo je 266 uzoraka venske krvi (86,6 %) te 41 uzorak koštane srži (13,4 %). Tablica 3. prikazuje broj utvrđivanja prisutnosti mutacije V617F u genu *JAK2* po mjesecima. Maksimalan broj utvrđivanja bio je u ožujku, a minimum u lipnju. Prosječan mjesečni broj utvrđivanja bio je 26.

Prikaz broja zahtjeva po odjelima odakle su upućeni prikazan je u Tablici 4.

Tablica 3. Prikaz broja utvrđivanja prisutnosti mutacije V617F u genu *JAK2* po mjesecima tijekom 2022.

Mjesec	Broj utvrđivanja prisutnosti mutacije V617F u genu <i>JAK2</i>
siječanj	26
veljača	37
ožujak	38
travanj	22
svibanj	34
lipanj	14
srpanj	20
kolovoz	16
rujan	29
listopad	25
studeni	22
prosinac	24

Tablica 4. Prikaz broja zahtjeva za utvrđivanjem prisutnosti mutacije V617F u genu *JAK2* po odjelima odakle su upućeni.

Odjel / ambulanta	Broj zahtjeva (%)
Hematološka ambulanta, Interna hematologija, Odjel za transplantaciju krvotvornih matičnih stanica i intenzivno liječenje, Dnevna bolnica hematologije	238 (77,5 %)
Odjel za nefrologiju, nefrološka transplantacijska, Dnevna nefrološka bolnica	16 (5,2 %)
Odjel za gastroenterologiju, Dnevna gastroenterološka bolnica	7 (2,3 %)
Dnevna bolnica dijabetologije, Zavod za šećernu bolest	5 (1,6 %)
Intenzivna koronarna	2 (0,7 %)
Opća internistička	1 (0,3 %)
Vanjske ustanove	38 (12,4 %)

Od 307 uzoraka, zaprimljeno je 15 uzoraka vanjskih pacijenata za koje podaci krvne slike u trenutku molekularne analize nisu bili poznati te ih nije bilo moguće uvrstiti u korištene algoritme. Također, pregledom uzoraka uočeno je da je 8 analiza bilo ponovljeno te su iste izuzete iz statističke obrade. Svim pacijentima rezultati ponovljenih analiza podudarali su se s prvim utvrđivanjem prisutnosti mutacije V617F u genu *JAK2*.

U statističku analizu uključeno je 284 utvrđivanja prisutnosti mutacije V617F, a parametri opisne statistike sumarno su prikazani u Tablici 5.

Tablica 5. Statistički podaci za pacijente uključene u istraživanje.

Broj pacijenata	284
Godine (raspon)	56 (12 – 90)
Muškarci (%)	148 (52,1)
Broj uzoraka kojima su parametri krvne slike određeni isti dan (%)	245 (86,3)
Prosječni protekli broj dana od ranijeg određivanja kompletne krvne slike (raspon)	17 (1 – 210)

Kod većine pacijenata korišteni su parametri krvne slike izrađeni istog dana od zaprimanja uzorka. Ukoliko ti podaci nisu bili poznati, pregledom LIS-a i bolničkog informacijskog sustava (BIS) uzeti su prethodno dostupni podaci. 95 % pacijenata imalo je podatke dostupne krvne slike unutar zadnjih 35 dana. Od 284 analiziranih uzoraka, 30 ih je bilo pozitivno na prisutnost mutacije V617F u genu *JAK2* (10,7 %)

4.1 Primjena algoritama SZO te Mahe i sur.

Primjenom oba algoritama bio bi smanjen broj zahtjeva za molekularnim utvrđivanjem prisutnosti mutacije V617F u genu *JAK2* ($P < 0,0001$) i to za 30,3 % primjenom algoritma SZO-a, odnosno 12,0 % primjenom algoritma Mahe i sur. Primjenom testa usporedbe proporcija na prikupljenim podacima nije ustanovljena statistički značajna razlika između udjela pozitivnih rezultata bez primjene algoritma i primjenom algoritma SZO-a ($P = 0,4095$), odnosno primjenom algoritma Mahe i sur. ($P = 0,9339$). Podaci su prikazani u Tablici 6.

Tablica 6. Prikaz podataka prije i nakon primjene algoritama SZO i Mahe i sur.

	Bez primjene algoritma	Algoritam SZO	Algoritam Mahe i sur.
Broj testiranih (udio u odnosu na broj bez primjene algoritma, %)	284	198 (69,7)	250 (88,0)
P	-	P < 0,0001	P < 0,0001
Broj pozitivnih	30	27	28
Udio pozitivnih rezultata u odnosu na ukupni broj testiranih molekularnom metodom (%)	10,6	13,6	11,2
P	-	P = 0,4095	P = 0,9339
Broj propuštenih pozitivnih rezultata (%)	-	3 (1,1 %)	2 (0,7 %)

Primjenom algoritma SZO-a bila bi propuštena tri pacijenta pozitivna na mutaciju V617F u genu *JAK2*, a primjenom algoritma Mahe i sur. dva pacijenta. Uvidom u BIS, utvrđeno je da je prvi pacijent zaprimljen na liječenje pod dijagnozom febrilne neutropenije/pancitopenije uz leukocite $0,91 \times 10^9/L$, hemoglobin 65 g/L i trombocite $5 \times 10^9/L$. Ubrzo je postavljena dijagnoza mijeloproliferativnog sindroma, a uslijed pogoršanja stanja pacijenta isti je nakon šest dana preminuo.

Drugi pacijent je testiran uz uputnu dijagnozu mijelofibroze uz leukocite $5,89 \times 10^9/L$, hemoglobin 112 g/L i trombocite $320 \times 10^9/L$.

Treći pacijent je prvi put pregledan u KB Merkur u svibnju 2022. zbog povišenih vrijednosti trombocita unazad nekoliko godina. Parametri krvne slike bili su: leukociti $13,75 \times 10^9/L$, hemoglobin 140 g/L i trombociti $767 \times 10^9/L$. Pacijent je upućen na testiranje na mutaciju u genu *JAK2* te prisutnost fuzijskog prijepisa *BCR/ABL1*. Uzorci za testiranje nisu zaprimljeni u KZMBLM KB Merkur te je pretpostavka da je pacijent testiranje obavio u drugoj ustanovi.

Postavljena je dijagnoza esencijalne trombocitemije te je započeta terapija hidroksiurejom. Dolaskom na kontrolni pregled u listopadu 2022. ponovno je postavljen zahtjev za utvrđivanjem prisutnosti mutacije V617F u genu *JAK2* te prisutnost fuzijskog prijepisa *BCR/ABL1* u KZMBLM te je utvrđena prisutnost mutacije V617F. Parametri krvne slike bili su: leukociti $7,69 \times 10^9/L$, hemoglobin 132 g/L i trombociti $403 \times 10^9/L$. Primjenom algoritma SZO-a pacijent ne bi bio upućen na testiranje V617F u genu *JAK2*, dok bi primjenom algoritma Mahe i sur. bio upućen. S obzirom na parametre krvne slike pri prvom pregledu u svibnju, pacijent bi bio upućen na testiranje mutacije V617F u genu *JAK2* primjenom oba algoritma.

4.2 Dijagnostička točnost

Tablica 7. prikazuje rezultate primjene algoritma SZO-a, a Tablica 8. rezultate primjene algoritma Mahe i sur. Karakteristike primijenjenih algoritma prikazuje Tablica 9.

Tablica 7. Rezultati primjene algoritma Svjetske zdravstvene organizacije (SZO).

	<i>JAK2</i> V617F pozitivni (%)	<i>JAK2</i> V617F negativni (%)
Testirati (%)	27 (9,5)	171 (60,2)
Ne testirati (%)	3 (1,1)	83 (29,2)

Tablica 8. Rezultati primjene algoritma Mahe i sur.

	<i>JAK2</i> V617F pozitivni (%)	<i>JAK2</i> V617F negativni (%)
Testirati (%)	28 (9,9)	221 (77,8)
Ne testirati (%)	2 (0,7)	33 (11,6)

Tablica 9. Karakteristike dijagnostičke točnosti i pripadajućih intervala pouzdanosti primijenjenih algoritma: Svjetske zdravstvene organizacije (SZO) te Mahe i sur.

	Algoritam SZO	Algoritam Mahe i sur.
Osjetljivost	90,00 % (73,44 % – 97,77 %)	93,33 % (77,89 % – 98,99 %)
Specifičnost	32,68 % (26,95 % – 38,82 %)	12,99 % (9,12 % – 17,76 %)
Pozitivna prediktivna vrijednost	13,64 % (9,18 % – 19,22 %)	11,24 % (7,60 % – 15,84 %)
Negativna prediktivna vrijednost	96,51 % (90,13 % – 99,23 %)	94,29 % (80,81 % – 99,13 %)
Omjer vjerojatnosti za pozitivan ishod testa	1,34 (1,15 – 1,55)	1,07 (0,96 – 1,19)
Omjer vjerojatnosti za negativan ishod testa	0,31 (0,10 – 0,91)	0,51 (0,13 – 2,03)

5. Rasprava

Primjenom algoritma SZO-a i algoritma Mahe i sur. na uzorcima Laboratorija za molekularnu dijagnostiku KZMBLM-a KB Merkur smanjio bi se broj zahtjeva za testiranjem mutacije V617F u genu *JAK2* uz niski postotak lažno negativnih rezultata. Nije ustanovljena statistički značajna razlika između udjela pozitivnih rezultata bez primjene algoritma te primjenom algoritma SZO-a i algoritma Mahe i sur. Algoritmi SZO-a i Mahe i sur. pokazali su visoku osjetljivost i negativnu prediktivnu vrijednost, dok su specifičnost i pozitivna prediktivna vrijednost očekivano niske.

Rezultati su usporedivi s istraživanjem Mahe i sur. koje je izrađeno na značajno većem setu podataka. Od 2989 rezultata utvrđivanja prisutnosti mutacije V617F u genu *JAK2*, 580 utvrđivanja bilo je pozitivno, uz *hit rate* 21 % što je statistički neznajno u odnosu na stvarni *hit rate* od 19 % ($P = 0,073$). Algoritam je smanjio broj utvrđivanja prisutnosti mutacije za 15 %, uz grešku lažno negativnih rezultata od 1,2 %. Primjena algoritma *JAK2-tree* pokazala je osjetljivost od 94 %, negativnu prediktivnu vrijednost od 92 %, specifičnost od 17 % i pozitivnu prediktivnu vrijednost od 21 % (41).

U istraživanju Catherwood i sur. analizirani su parametri krvne slike (hemoglobin, hematokrit, broj eritrocita i broj trombocita) kod 300 uzoraka testiranih na mutaciju V617F u genu *JAK2* te su klasificirani prema vrijednostima referentnih intervala prilagođenih za spol na povišene i normalne. 43 uzoraka od 50 pozitivnih na mutaciju, imalo je povišen barem jedan od parametara (86 %), dok je njih 7 (14 %) imalo normalne parametre krvne slike. Prema autorima, većina pozitivnih pacijenata bilo bi testirano na mutaciju ako bi se primijenili samo kriteriji referentnih intervala, uz značajno smanjenje broja testova za 51 % (43).

U velikom retrospektivnom JACKPOT istraživanju Chin-Yee i sur., 901 pacijent s povišenom vrijednosti hemoglobina podijeljeni su u derivacijsku kohortu na temelju koje su izrađeni kriteriji te validacijsku na temelju koje su isti testirani. Uzorci su testirani na mutaciju V617F te egzona 12 u genu *JAK2*. Na temelju izrađenih kriterija koji su uzimali u obzir vrijednosti eritrocita, trombocita i neutrofila, algoritam je smanjio broj testova za 50 % uz ukupnu stopu lažno negativnih od 0,4 %. Prikazana osjetljivost derivacijske i validacijske kohorte bila je 94,7 % i 100 %, a negativna prediktivna vrijednost 98,8 % i 100 %. Navedene vrijednosti dijagnostičke točnosti prikladnije su u odnosu na snižene serumske vrijednosti eritropoetina (90,3 %) u odbacivanju dijagnoze policitemije vere u sličnoj populaciji pacijenata (44, 45). U odnosu na istraživanje Mahe i sur. gdje je koncentracija hemoglobina > 165 g/L za muškarce i

> 160 g/L za žene već dovoljan kriterij za upućivanje na molekularno testiranje, kriteriji JACKPOT istraživanja su više diskriminatorni. Svi pacijenti uključeni u JACKPOT istraživanje imali su povišene vrijednosti hemoglobina, tj. zadovoljen kriterij iz istraživanja Mahe i sur. Nadalje, s obzirom da su vrijednosti hemoglobina i hematokrita vezane uz veličinu eritrocita, volumen plazme i zalihe željeza, pojedini autori smatraju da je broj eritrocita bolji pokazatelj eritropoeze i mase crvenih krvnih stanica (46).

Piris-Villaespesa i sur. u svojem istraživanju razvili su algoritam koji se sastoji od dva koraka. U prvom koraku izdvojeni su uzorci s vrijednostima hemoglobina > 165 g/L ili hematokrita > 49 % za muškarce, odnosno hemoglobina > 160 g/L ili hematokrita > 48 % za žene (kriteriji SZO-a iz 2016.). Potom su izdvojeni uzorci s brojem neutrofila > $5,98 \times 10^9/L$ i brojem trombocita > $248 \times 10^9/L$. Pronađeno je sedam uzoraka pozitivnih na mutaciju V617F u genu *JAK2* od ukupno 501 testiranih. Uz stopu pozitivnosti od samo 1,2 %, primjena takvog algoritma u rutini nije opravdana (47).

Dizajn provedenog istraživanja u Laboratoriju za molekularnu dijagnostiku KZMBLM-a usporediv je s onim Mahe i sur. (41) dok su rezultati usporedivi s navedenim rezultatima dostupnim u literaturi.

Udio pacijenata koji bi bio propušten za molekularno testiranje korištenjem algoritama SZO-a i algoritma Mahe i sur. usporediv je s ranije navedenim istraživanjima Mahe i sur. (41) te JACKPOT (44). Istraživanje Catherwood i sur. ovdje značajno odudara s udjelom V617F pozitivnih pacijenata s normalnim parametrima krvne slike od čak 14 % (43). Iako je statistička analiza izrađena na relativno malom broju uzoraka u odnosu na ostala istraživanja (300 u odnosu na 2989 kod Mahe i sur. (41) i 901 kod Chin-Yee (41)), iz navedenih podataka može se zaključiti da oslanjanje na vrijednosti krvne slike iznad gornje granice referentnih intervala kao kriterij za molekularno testiranje prisutnosti mutacije V617F ipak nije dovoljno osjetljivo.

Korištenjem algoritma SZO-a u ovome istraživanju bilo bi propušteno molekularno testiranje kod tri pacijenta, odnosno korištenjem algoritma Mahe i sur. kod dva pacijenta. Jedan je imao izrazito niske vrijednosti hematoloških parametara te algoritmi koji detektiraju povišene vrijednosti u takvim slučajevima očekivano nisu učinkoviti. Kod drugog pacijenta pronađene su uredne vrijednosti leukocita i trombocita te snižen hemoglobin. Kod njega je postavljena sumnja na mijelofibrozu. To su slučajevi s opravdanim zahtjevom za testiranjem na prisutnost mutacije V617F u genu *JAK2*, uz obaveznu biopsije koštane srži koja je kriterij za

postavljanje dijagnoze MPN-a (1). Treći pacijent s pozitivnom mutacijom koji bi bio propušten primjenom algoritma SZO-a već je primao terapiju u trenutku molekularnog testiranja, što govori o uspješnom učinku njene primjene. Iz navedenoga, možemo zaključiti da u praksi među ispitivanim uzorcima postavljanje dijagnoze od strane liječnika niti za jednog pacijenta ne bi bilo propušteno.

Brojne istraživačke skupine navode potrebu za racionalnijem testiranjem na mutaciju V617F u genu *JAK2* te posljedično razvijaju i testiraju algoritme koji bi mogli tome pridonijeti (41, 42, 43, 44, 47). Pojedini autori navode povećanje broja zahtjeva uz konstantan broj novodijagnoasticeranih (41, 42, 44). Iako ne navode egzaktne brojeve, istraživanje iz KZMBLM-a gdje je prikazano povećanje broja zahtjeva za testiranjem na mutaciju V617F u genu *JAK2* od 66 % unutar šest godina, to potvrđuje. Ipak, podaci pokazuju da povećanje broja zahtjeva kroz godine nije bio progresivan već se dogodio skok za 59 % s 2020. na 2021.

Razlozi za povećanje broja molekularnih utvrđivanja prisutnosti mutacije V617F u genu *JAK2* mogu biti povećano znanje o testu, povećana dostupnost i manje pridržavanje preporučenih kriterija testiranja. Svakako kao značajan razlog povećanja broja testova treba spomenuti i promjenu dijagnostičkih kriterija SZO-a u smjernicama iz 2016. Zbog propuštanja dijagnoze policitemije vere u ranoj fazi, vrijednosti hemoglobina prema smjernicama SZO-a iz 2008. od 185 g/L za muškarce i 165 g/L za žene (48), u smjernicama iz 2016. granice snižene su na 165 g/L za muškarce i 160 g/L za žene te su uvedene vrijednosti hematokrita > 49 % za muškarce i > 48 % za žene (49). Promijenjeni kriteriji preklapaju se s referentnim intervalima zdravih osoba te otvaraju mogućnost prekomjernog testiranja pacijenata s povišenim hemoglobinom.

Prekomjerna i neopravdana laboratorijska testiranja donose dodatna opterećenja na zdravstveni sustav u pogledu financija, vremena i stručnog kadra. Produljuju vrijeme izdavanja nalaza i dijagnostike, a time i eventualni bolnički boravak i troškove (50).

Provedeno istraživanje ima nekoliko ograničenja. Uključen je relativno mali broj ispitanih uzoraka i ograničen vremenski period u usporedbi s provedenim istraživanjima u velikim centrima objavljenim u literaturi. Radi postizanja bolje snage dokaza, potrebno je istraživanje proširiti na duži vremenski period, a time obuhvatiti i veći broj uzoraka te ispitati i dodatne parametre (primjerice broj eritrocita, broj neutrofila) kao kriterije algoritma. Nadalje, kao statistički test za usporedbu udjela pozitivnih rezultata genotipizacije V617F u genu *JAK2* prije i nakon primjene algoritama primijenjen je z test proporcija. S obzirom da podaci korišteni u istraživanju su zavisnog karaktera, test izbora bio bi McNemarov test zavisnih

nominalnih podataka. Ipak, s obzirom na prirodu ovoga istraživanja gdje je broj uzoraka nakon primjene algoritma smanjen u odnosu na broj uzoraka poslije primjene algoritama, McNemarov test nije bilo moguće koristiti. Umjesto toga korišten je z test proporcija po uzoru na istraživanje Mahe i sur.

6. Zaključci

Ovim istraživanjem:

- 1) dokazano je smanjenje broja zahtjeva za utvrđivanjem prisutnosti mutacije V617F u genu *JAK2* nakon primjene algoritama,
- 2) nije dokazano povećanje udjela pozitivnih rezultata utvrđivanja prisutnosti mutacije V617F u genu *JAK2* nakon primjene algoritama,
- 3) oba algoritma pokazala su visoku osjetljivost i negativnu prediktivnu vrijednost, dok su specifičnost i pozitivna prediktivna vrijednost očekivano niske.

7. Literatura

1. Khoury JD, Solary E, Abla O i sur. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Myeloid and Histiocytic/Dendritic Neoplasms. *Leukemia* 2022;36:1703–19.
2. Eden RE, Coviello JM. Chronic Myelogenous Leukemia. U: StatPearls, Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK531459/>. Pristupljeno 10. travnja 2024.
3. Sertić D, Labar B. Kronična mijeloična leukemija, *BCR/ABL* pozitivna. U: Labar B. i sur. *Hematologija*. Školska knjiga; 2017, str 201-14.
4. Maxson JE, Gotlib J, Pollyea DA i sur. Oncogenic CSF3R mutations in chronic neutrophilic leukemia and atypical CML. *N Engl J Med*. 2013;368:1781-90.
5. Shomali W, Gotlib J. World Health Organization-defined eosinophilic disorders: 2019 update on diagnosis, risk stratification, and management. *Am J Hematol* 2019;94: 1149–67.
6. Wang J, Lin M, Wang F. Epidemiology and prognostic nomogram for chronic eosinophilic leukemia: a population-based study using the SEER database. *Sci Rep* 2024, 14, 4594.
7. Gupta AK, Meena JP, Chopra A, Tanwar P, Seth R. Juvenile myelomonocytic leukemia-A comprehensive review and recent advances in management. *Am J Blood Res*. 2021; 11:1-21.
8. O'Shea JJ, Holland SM, Staudt LM. JAKs and STATs in immunity, immunodeficiency, and cancer. *N Engl J Med* 2013; 368, 161–70.
9. Ayaz P, Hammarén HM, Raivola J, Sharon, D i sur. Structural models of full-length JAK2 kinase. 2019. Dostupno na <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/727727v1.full>. Pristupljeno 16. travnja 2024.
10. Ihle JN, Witthuhn BA, Quelle FW, Yamamoto K, Silvennoinen O. Signaling through the hematopoietic cytokine receptors. *Annu Rev Immunol*. 1995;13:369-98.
11. Gnanasambandan K, Sayeski PP. A structure-function perspective of Jak2 mutations and implications for alternate drug design strategies: the road not taken. *Curr Med Chem*. 2011;18:4659-73.
12. Saharinen P, Takaluoma K, Silvennoinen O. Regulation of the Jak2 Tyrosine Kinase by Its Pseudokinase Domain. *Mol. Cell. Biol*. 2000;20:3387–95.

13. Argetsinger LS, Kouadio J-LK, Steen H, Stensballe A, Jensen ON, Carter-Su C. Autophosphorylation of JAK2 on Tyrosines 221 and 570 Regulates Its Activity. *Mol. Cell. Biol.* 2004;24:4955–67.
14. Imada K, Leonard WJ. The jak-STAT pathway. *Mol. Immunol*, 2000; 37, 1–11.
15. Leonard WJ, O'Shea JJ. Jaks and STATs: biological implications. *Annu. Rev. Immunol*, 1998; 16, 293–322.
16. Haan C, Kreis S, Margue C, Behrmann I. Jaks and cytokine receptors—an intimate relationship. *Biochem. Pharmacol.* 2006; 72, 1538–46.
17. Bader MS, Meyer SC. JAK2 in Myeloproliferative Neoplasms: Still a Protagonist. *Pharmaceuticals.* 2022;15:160.
18. Varghese LN, Ungureanu D, Liau NPD i sur.. Mechanistic insights into activation and SOCS3-mediated inhibition of myeloproliferative neoplasm-associated JAK2 mutants from biochemical and structural analyses. *Biochem. J.* 2014, 458, 395–405.
19. Waters MJ, Brooks AJ. JAK2 activation by growth hormone and other cytokines. *Biochem J.* 2015;466:1-11.
20. Darnell JE Jr, Kerr IM, Stark GR. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science.* 1994;264:1415–21.
21. Hu X, li J, Fu M i sur. The JAK/STAT signaling pathway: from bench to clinic. *Sig Transduct Target Ther* 2021;6, 402.
22. O'Shea JJ, Schwartz DM, Villarino AV, Gadina M, McInnes IB, Laurence A. The JAK-STAT pathway: impact on human disease and therapeutic intervention. *Annu Rev Med.* 2015;66:311-28.
23. Schindler C. Strehlow I. Cytokines and STAT signaling. *Adv. Pharm.* 2000; 47, 113–174.
24. Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ i sur. Cancer Genome Project. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet.* 2005;365:1054-61.
25. Levine RL, Wadleigh M, Cools J i sur. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell.* 2005;7:387-97.
26. Randolph TR: Myeloproliferative Neoplasms. U: Clinical Laboratory Hematology ur. McKenzie SB, Williams JL. Pearson, 2015, str. 446-77.
27. Kralovics R, Passamonti F, Buser AS i sur. A Gain-of-Function Mutation of *JAK2* in Myeloproliferative Disorders. *N Engl J Med* 2005;352: 1779-90.

28. 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.
29. Lakey MA, Pardonani A, Hoyer JD i sur. Bone marrow morphologic features in polycythemia vera with JAK2 exon 12 mutations. *Am J Clin Pathol.* 2010;133:942–8.
30. Leszczynska A, Grzenkowicz-Wydra J, Chmielewska-Gorycka L, Bieniaszewska M, Hellmann A. Detection of JAK2 Exon 12 Mutations in JAK2 V617F-Negative Polycythemia Vera Patients by Cloning Technique. *Acta Haematol.* 2016; 136: 123–8.
31. Pardanani AD, Levine RL, Lasho T i suradnici. MPL515 mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: a study of 1182 patients. *Blood.* 2006; 108:3472-6.
32. Ahmed RZ, Rashid M, Ahmed N, Nadeem M, Shamsi TS. Coexisting JAK2V617F and CALR exon 9 mutations in myeloproliferative neoplasms - Do they designate a new subtype? *Asian Pac J Cancer Prev.* 2016;17:923–6.
33. Prins D, González Arias C, Klampfl T, Grinfeld J, Green AR. Mutant Calreticulin in the Myeloproliferative Neoplasms. *Hemasphere.* 2020;4: e333.
34. Pardanani A, Lasho T, Finke C. i sur. Prevalence and clinicopathologic correlates of *JAK2* exon 12 mutations in *JAK2V617F*-negative polycythemia vera. *Leukemia* 2007;21:1960–63.
35. Verstovšek S, Labar B. Policitemija vera. U: Labar B i sur. Hematologija, Školska knjiga, 2017. 215-22.
36. Verstovšek S, Labar B. Esencijalna trombocitemija. U: Labar B i suradnici. Hematologija, Školska knjiga, 2017. 223-27.
37. Verstovšek S, Labar B. Primarna mijelofibroza. U: Labar B i suradnici. Hematologija, Školska knjiga, 2017. 229-35.
38. McMullin MF, Harrison CN, Ali S. i sur. A guideline for the diagnosis and management of polycythaemia vera. A British Society for Haematology Guideline. *Br J Haematol*, 2019; 184: 176-91.
39. Mithoowani S, Laureano M, Crowther MA, Hillis CM. Investigation and management of erythrocytosis. *CMAJ.* 2020;192:E913-E918.
40. Gong JZ, Cook JR, Greiner TC i sur. Laboratory practice guidelines for detecting and reporting JAK2 and MPL mutations in myeloproliferative neoplasms: a report of the Association for Molecular Pathology. *J Mol Diagn* 2013;15:733–44.
41. Mahe E, Pedersen KM, Çolak Y, i sur. JAK2-tree: a simple CBC-based decision rule to guide appropriate JAK2 V617F mutation testing. *J Clin Pathol* 2019;72:172–6.

42. Langabeer SE. Referral centre variation in requesting JAK2 V617F mutation analysis for the investigation of myeloproliferative neoplasm. *J Clin Pathol* 2012;65:1149-50.
43. Catherwood MA, McAllister R, McCallion i suradnici. A molecular diagnostic algorithm for JAK2 V617F investigations in suspected myeloproliferative neoplasms. *Irish journal of medical science* 2020;189:621–6.
44. Chin-Yee B, Bhai P, Cheong I i sur. A Rational Approach to JAK2 Mutation Testing in Patients with Elevated Hemoglobin: Results from the JAK2 Prediction Cohort (JAKPOT) Study. *J Gen Intern Med.* 2023;38:1828-33.
45. Chin-Yee B, Cheong I, Matyashin M i sur. Serum erythropoietin levels in 696 patients investigated for erythrocytosis with JAK2 mutation analysis. *Am J Hematol.* 2022;97:E150-E153.
46. Hasselbalch HC. Time for revival of the red blood cell count and red cell mass in the differential diagnosis between essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Haematologica.* 2019;104:2119-25
47. Piris-Villaespesa M, Álvarez-Larrán A, Saez-Marín A i sur. Development and validation of a sequential two-step algorithm for the screening of individuals with potential polycythaemia vera. *Sci Rep.* 2021;11:209.
48. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA i sur. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood.* 2009;114:937-51.
49. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R i sur. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* 2016;127: 2391–405.
50. Devis L, Catry E, Honore, PM i sur. Interventions to improve appropriateness of laboratory testing in the intensive care unit: a narrative review. *Ann. Intensive Care.* 2024; 14: 9.

8. Popis skraćenica

AML – akutna mijeloična leukemija

BCR – engl. *breakpoint cluster region*

BIS – Bolnički informacijski sustav

CALR – kalretikulin

FERM - akronim izveden iz naziva proteina u kojima je opisana, engl. *protein 4.1, Ezrin, Radixin, Moesin*

GM-CSF – faktor stimulacije granulocitno-monocitnih kolonija, engl. *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*

HPLC – tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti, engl. *high performance liquid chromatography*

HRM - taljenje visoke rezolucije, engl. *high resolution melting*

IL – interleukin

INF – interferon

JAK2 – Janus kinaza 2

JH – engl. *Janus homology*

KB – Klinička bolnica

KML – kronična mijeloična leukemija

KZMBLM – Klinički zavod za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicine

LIS – Laboratorijski informacijski sustav

MPL – engl. *myeloproliferative leukemia*

MPN – mijeloproliferativna neoplazma

qPCR – kvantitativna lančana reakcije polimerazom, engl. *quantitative polymerase chain reaction*

RFLP – polimorfizam duljine restrikcijskih fragmenata, engl. *restriction fragment length polymorphism*

SH 2 – engl. *Src homology 2*

STAT – engl. *Signal Transducer and Activators of Transcription*

SZO – Svjetska zdravstvena organizacija

TGF β - transformirajući faktor rasta β , engl. *transforming growth factor β*