

Strokovni prispevek/Professional article

KLINIČNI POMEN MUTACIJE V617F JAK2 GENA PRI KRONIČNIH MIELOPROLIFERATIVNIH BOLEZNIH – PRVE IZKUŠNJE

CLINICAL MEANING OF JAK2 V617F MUTATION IN CHRONIC
MYELOPROLIFERATIVE DISORDERS – THE FIRST EXPERIENCE

Joško Vučković^{1,2}, Tadej Pajič⁴, Rajko Kušec³, Mateja Grat¹, Marjan Lorbek¹, Dinko Rogulj², Rok Pavlič¹, Ivan Žuran¹

¹ Splošna bolnišnica Celje, Oblakova 5, 3000 Celje

² Splošna bolnišnica Brežice, Černelčeva 8, 8000 Brežice

³ Klinična bolnišnica Merkur, 41000 Zagreb

⁴ Klinični oddelek za hematologijo, Klinični center, Zaloška 7, 1525 Ljubljana

Prispelo 2006-05-18, sprejeto 2006-09-11; ZDRAV VESTN 2006; 75: 629-34

Ključne besede kronične mieloproliferativne bolezni; esencialna trombocitoza; policitemija vera; mielo-fibroza; V617F mutacija JAK2

Izvleček

- Izhodišča** Pridobljeno mutacijo V617F v genu JAK2 so ugotovili pri večini bolnikov s pravo policitemijo (PP) in pri približno polovici bolnikov z esencialno trombocitemijo (ET) in kronično idiopatsko mielofibrozo (KIMF). To je prvi označevalec za ločevanje reaktivnih motenj krvne slike od omenjenih kroničnih mieloproliferativnih bolezni (KMPB). Začetne raziskave so pokazale, da bi lahko na osnovi mutacije JAK2 razdelili bolnike z ET v dve različni skupini, pri čemer bi skupina s prisotno mutacijo imela nekatere klinične in laboratorijske značilnosti PP.
- Metode** Mutacije V617F smo določali z načinom alelna-specifične verižne reakcije s polimerazo DNK vzorcev 53 bolnikov s KMPB (35 ET, 12 PP in 6 KIMF). Ugotavljali smo razlike v kliničnih in laboratorijskih značilnostih med bolniki z ET in prisotno ali odsotno mutacijo.
- Rezultati** Mutacija V617F je bila prisotna pri 12 od 12 bolnikov s PP (100 %), pri 15 od 35 z ET (43 %) in pri 2 od 6 (33 %) z KIMF. Bolniki z ET, ki so bili za mutacijo pozitivni, so imeli večjo koncentracijo Hb in manjše število trombocitov že ob diagnozi. Pri teh bolnikih je povprečna koncentracija Hb v obdobju spremljanja (35 mesecev) naraščala in pri 2 bolnikih se je bolezen preobrazila v očitno PP. Nasprotno je pri bolnikih brez mutacije koncentracija Hb ostala enaka oz. se je celo rahlo zmanjšala v obdobju spremljanja (42 mesecev). Pri številu levkocitov, pojavnostjo splenomegalije, potrebe po antiproliferativnih zdravilih in prisotnostjo z boleznijo povezanih zapletov med za mutacijo pozitivnimi in negativnimi bolniki z ET nismo zaznali statistično pomembnih razlik. Ugotovili smo statistično pomembno razliko v vrednosti koeficienta variacije volumna trombocitov (KVVT), vrednost, izražena v odstotkih, je bila večja pri bolnikih z ET, katerim smo dokazali mutacijo.

Avtor za dopisovanje / Corresponding author:

Joško Vučković, Splošna bolnišnica Celje, Oblakova 5, 3000 Celje

Zaključki *Delež bolnikov z mutacijo V617F v JAK2, ki smo ga določali z načinom alelna-specifične verižne reakcije pri bolnikih s PP, ET in KIMF, je podoben deležem, ki so bili objavljeni v literaturi. Test se je izkazal za koristnega za ločevanje KMPB od reaktivnih motenj krvne slike. Skupina bolnikov ET, pri katerih obstaja mutacija, ima nekatere podobnosti s PP in lahko bi vsaj pri nekaterih bolnikih šlo za zgodnjo obliko PP.*

Key words *chronic myeloproliferative disorders; essential thrombocythaemia; polycythaemia vera; idiopathic myelofibrosis; V617F mutation of JAK2*

Abstract

Background *An acquired V617F mutation in the JAK2 gene was found to occur in most patients with polycythaemia vera (PV), and about a half of those with essential thrombocythaemia (ET) and chronic idiopathic myelofibrosis (CIMF). It is the first clonal marker that allows differentiation between reactive thrombocytosis and erythrocytosis from some chronic myeloproliferative disorders (CMPD) – ET, PV and CIMF. It has been proposed that the JAK2 status could also divide ET patients in two distinct subgroups, with mutation positive one showing clinical and laboratory features of PV.*

Patients and methods *Allele-specific PCR for JAK2 mutation was done in 53 patients (35 ET, 12 PV and 6 CIMF). In the group of ET patients, some clinical and laboratory features of mutation positive and mutation negative subgroup were compared.*

Results *In general we found V617F mutation in 12/12 (100 %) PV, in 15/35 (43 %) ET and in 2/6 (33 %) CIMF. Mutation positive ET patients had higher haemoglobin (Hb) level and lower platelet counts already at diagnosis. The Hb level had the tendency to increase (observation period 35 months) and 2 patients converted to overt PV. In mutation negative patients the Hb level remained equal or even was slightly decreased after observation period (42 months). Up to now there is no statistical difference in leukocyte count, incidence of splenomegaly, anti-proliferative drugs demand or disease related complications. Platelet distribution width (PDW) was higher in mutation positive group.*

Conclusions *The fraction of V617F mutation positive patients with CMPD in our work is similar to that found by others. We found this test very useful in differentiation of some CMPD cases from the reactive states. Mutation positive ET shares some clinical and laboratory features with PV and overt polycythemic transformation in such patients is possible.*

Uvod

Kronične mieloproliferativne bolezni (KMPB) so klonske bolezni, ki izvirajo iz multipotentne matične celice, za katere je značilna čezmerna tvorba ene ali več celičnih vrst ob odsotnosti določenega znanega sprožilnega dejavnika (1). V zadnjih letih so zelo intenzivno iskali molekularni mehanizem nenadzorovane proliferacije pri KMPB in se osredotočili na možne mutacije v genu za tirozin kinazo (TK). Mutacije, ki aktivirajo TK, vplivajo na celično proliferacijo in poti preživetja in jih vedno bolj priznavajo kot osnovni vzrok za nastanek človeškega raka (2). Z diagnostičnega stališča mutacije lahko služijo kot biološki označevalec določenih bolezni in so hkrati dokaz klonskosti. Do nedavnega so bile pri KMPB znane mutacije v TK le bcr/abl fuzije, ki so značilne za kronično mieloično levkemijo (KML) (3). Pogrešali smo specifični molekularni označevalec, podoben bcr/abl, kar je bila pomembna ovira pri diagnosticiranju in razumevanju drugih KMPB (4). Gre predvsem za bolj pogoste KMPB, to so po klasifikaciji Svetovne zdravstvene organizacije (SZO)

prava policitemija (PP), esencialne trombocitemije (ET) in kronična idiopatska mielofibroza (KIMF) (5).^{*} Leta 2005 so na kromosomu 9 pri večini bolnikov s PP in približno polovici z ET in KIMF odkrili mutacijo V617F v genu za Janus kinazo 2 (JAK2) (6–10). Do danes te mutacije niso zaznali pri zdravih kontrolnih osebah, pri drugih mieloproliferativnih in mielodisplastičnih motnjah pa je redka (10, 11). Celice z omenjeno mutacijo so hipersenzitivne za citokine in imajo proliferativno prednost. To odkritje je že začelo spreminjati pristop k ugotavljanju in razvrščanju KMPB. Poleg tega ugotavljajo, da imajo bolniki z ET in mutacijo več značilnosti PP (pomembno zvečano koncentracijo Hb, večje število nevtrofilcev, manjše vrednosti eritropoetina in feritina) (12). Teh značilnosti bolniki brez mutacije nimajo, imajo pa večje število trombocitov kot za mutacijo pozitivni bolniki (12, 13). To kaže na možnost, da ET, pri kateri

^{*} Mieloproliferativne bolezni so po SZO še: kronična nevtrofilna levkemija, kronična eozinofilna levkemija (in idiopatski hipereozinofilni sindrom), neklasificirana kronična mieloproliferativna bolezen.

obstaja mutacija V617F, in PP tvorita biološki kontinuum, stopnjo eritrocitoze in drugih fenotipskih znakov pa določajo fiziološki ali genetski modifikatorji. V članku predstavljamo rezultate ugotavljanja mutacije V617F JAK2 pri 53 bolnikih s KMPB. Določili smo delež bolnikov s PP, ET in KIMF z mutacijo in poskušali ugotoviti nekatere laboratorijske in klinične razlike med skupinama za mutacijo pozitivnih in negativnih bolnikov z ET.

Bolniki in metode

Ugotavljali smo prisotnost mutacije V617F JAK2 pri 53 bolnikih s KMPB (26 moških, 27 žensk, srednja starost 56 let). Večina bolnikov je ob diagnozi imela ET (35 bolnikov), 12 jih je imelo PP in 6 bolnikov je imelo KIMF. V času spremljanja sta se 2 bolnika z ET preobrazila v PP, dodatna 2 pa iz PP v KIMF. Ugotavljanje mutacije JAK2 s PCR smo izvajali od julija 2005 do marca 2006 pri bolnikih, ki jih rutinsko spremljamo v hematoloških ambulantah in oddelkih SB Celje in SB Brežice. Mutacijo V617F smo dokazali z alelna specifičnim PCR na genomski DNK iz periferne krvi po objavljeni metodi (Baxter, Lancet 2005) (6). Od decembra 2005 smo sočasno uporabljali še drugo metodo, ki temelji na restriktivni razgradnji pomnoženih kopij PCR z encimom BsaXI in jo je zasnoval In VivoScribe Technologies (San Diego, Ca, USA). Po naših izkušnjah je korelacija med obema metodama zelo visoka (14).

Diagnozo bolnikov smo postavili na osnovi meril Skupine za policitemijo vero (Polycythemia vera study group, PPSG) (15). Kasneje smo diagnoze revidirali v skladu z merili SZO (5). Analizo prisotnosti mutacije V617F v genu JAK2 smo izvedli večino pri mlajših bolnikih in pri tistih, kjer je obstajal dvom glede izpolnjevanja diagnostičnih meril

SZO (na primer število trombocitov od 400–600, dvomljiva histologija).

V skupini bolnikov z ET (35 bolnikov, 14 moških, 21 žensk, mediana starost 55 let) smo želeli preveriti, ali obstajajo klinične in laboratorijske razlike med skupinama glede na dokazano prisotnost mutacije. Laboratorijske in klinične značilnosti smo primerjali ob ugotovitvi bolezni retrospektivno iz medicinske dokumentacije in jih primerjali s tistimi ob zadnjem kontrolnem pregledu. V skupini z ET smo iz celotne krvne slike v času postavitve diagnoze in ob zadnji kontroli izračunali srednje vrednosti za koncentracijo Hb, število levkocitov in trombocitov, povprečni volumen eritrocitov in trombocitov (PPE in PPT) in koeficiente variacije volumna trombocitov (KVVT). Srednje vrednosti med skupinama bolnikov z ET smo primerjali s Studentovim t-testom. Primerjavo kategoričnih spremenljivk (prisotnost splenomegalije, z boleznijo povzročenih zapletov in potrebe po anti-proliferativnih zdravilih) smo izvedli s hi-kvadratnim in Fischerjevim testom. Merilo za splenomegalijo je bila tipljivost vranice vsaj 1 cm pod rebrnim lokom

Razpr. 1. Značilnosti bolnikov z ET, odvisne od JAK2 V617F mutaciji.

Table 1. Clinical and laboratory characteristics of patients with ET in relation on JAK2 V617F mutation.

	JAK2 V617F poz.	JAK2 V617F neg.	p vrednost p value
Število bolnikov Number of patients	15	20	
Moški Male	6	8	ns [†]
Ženske Female	9	12	ns
Starost (leta, mediana) Age (year, median)	55	57	ns
Trajanje bolezni (meseci) Disease duration (months)	35	42	ns
Prisotnost Ph kromosoma Ph chromosome presence	0	2	ns
Splenomegalija Splenomegaly	6	3	ns
Antiproliferativno zdravljenje Antiproliferative treatment	7	14	ns
Hemoglobin 1* (g/L, povprečna vrednost) Haemoglobin 1* (g/L, mean value)	147	139	0,03
Hemoglobin 2 [†] Haemoglobin 2 [†]	154	134	0,0004
Število trombocitov 1* ($\times 10^9/L$, povprečna vrednost) Number of thrombocytes 1* ($\times 10^9/L$, mean value)	755	1074	0,0025
Število trombocitov 2 [†] Number of thrombocytes 2 [†]	708	762	ns
Število levkocitov 1* ($\times 10^9/L$, povprečna vrednost) Number of leukocytes 1* ($\times 10^9/L$, mean value)	9,6	9,3	ns
Število levkocitov 2 [†] Number of leukocytes 2 [†]	9,5	6,7	0,004
KVVT [§] ≥ 17 Thrombocyte volume variation coefficient	12	8	0,026
PVE [‡] Mean erythrocyte volume	90	91	ns

* vrednost ob diagnozi / value at diagnosis

† zadnja registrirana vrednost / last registered value

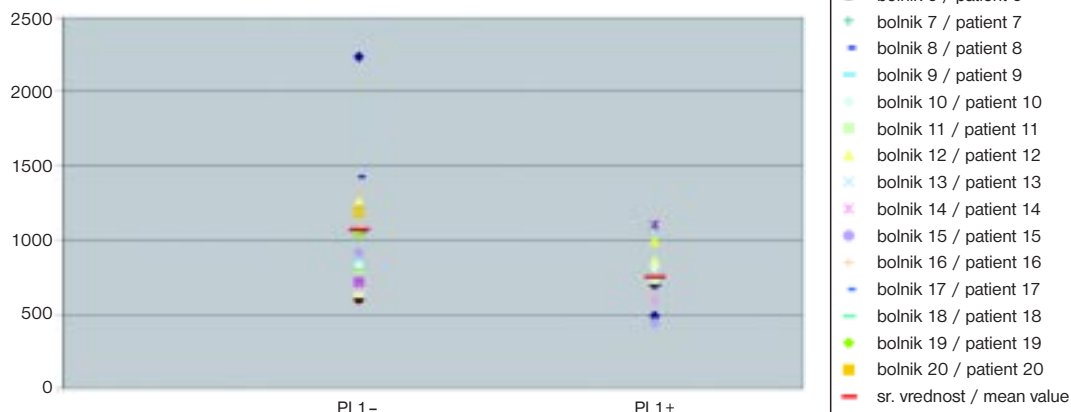
‡ nesignifikantno / insignificant

§ koeficient variacije volumna trombocitov / thrombocyte volume variation coefficient

ε povprečni volumen eritrocitov / mean erythrocyte volume

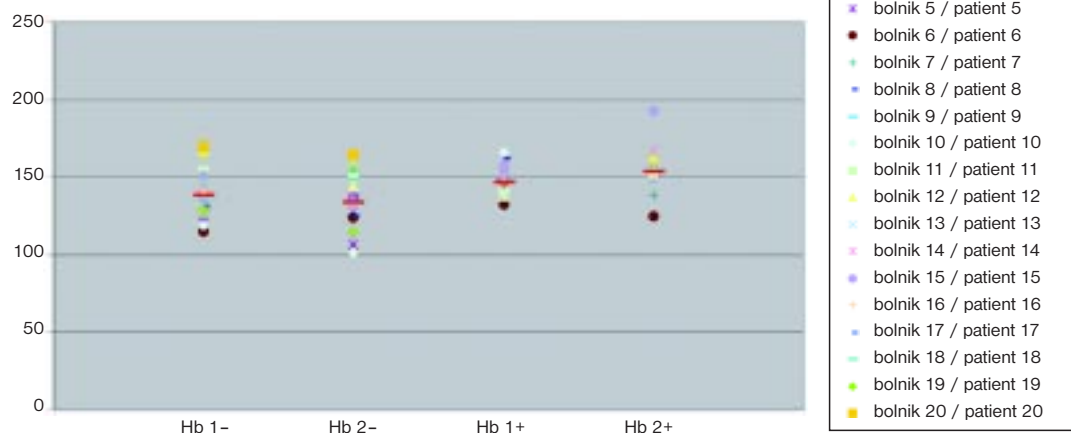
Sl. 1. Število trombocitov pri za mutacijo V617F JAK2 negativni ET (PI1-) in pozitivni ET (PI1+).

Figure 1. Platelet count in V617F JAK2 mutation negative ET (PI1-) and positive ET (PI1+).



Sl. 2. Koncentracija hemoglobina pri ET ob diagnozi (Hb1) in po obdobju spremljanja (Hb2) v odvisnosti od prisotnosti V617F JAK2 mutacije ($\pm$).

Figure 2. Haemoglobin concentration in ET at diagnosis (Hb1) and after a period of follow-up (Hb2).



in/ali longitudinalni premer vranice pri ultrazvočni preiskavi ≥ 12 cm.

Rezultati

Mutacija V617F je bila prisotna pri 12 od 12 (100 %) bolnikov s PP, pri 2 od 6 (33 %) s KIMF in pri 15 od 35 (43 %) z ET. Pri dveh bolnikih z ET smo dokazali prisotnost BCR-ABL fuzijskega gena (Ph pozitivna ET). Ko smo jih izločili, je delež bolnikov z mutacijo znašal 45 % (15 od 33). V Razpredelnici 1 predstavljamo klinične in laboratorijske značilnosti bolnikov z ET glede na prisotnost mutacije V617F. Pri razporeditvi po starosti in spolu med pozitivnimi in negativnimi bolniki ni bilo razlik. Povprečno trajanje bolezni pri pozitivnih je bilo 35 mesecev in pri negativnih 42 mesecev. Bolniki z mutacijo so ob času diagnoze imeli večje

vrednosti trombocitov (Sl. 1). Skrajna trombocitoza ($> 1000 \times 10^9/L$) je bila ugotovljena pri 10 izmed 20 bolnikov brez mutacije in le pri 2 od 15 z mutacijo. Koncentracija Hb je bila v skupini z mutacijo višja ob obeh pregledih. Statistična razlika je večja, ko med pozitivnimi in negativnimi primerjamo koncentracijo ob zadnji kontroli (Sl. 2). Pri srednji vrednosti levkocitov med obema skupinama ET bolnikov ob času diagnosticiranja ni bilo pomembnejše razlike, ugotovili pa smo jo ob kontroli. Čeprav je bila splenomegalija pogostejše prisotna pri bolnikih z mutacijo (6 od 15 proti 3 od 20), razlika ni bila statistično značilna.

PVE in PVT so ob času ugotavljanja diagnoze in ob zadnji kontroli skoraj enaki pri obeh skupinah, medtem ko je KVVVT večji pri pozitivni skupini. Razlike v pogostnosti z boleznijo povezanih zapletov kot tudi v potrebi po antiproliferativnih zdravilih ni.

Razpravljanje

V našem vzorcu 53 bolnikov s KMPB smo pri 100 % s PP, 45 % Ph negativnih z ET in 33 % s KIMF odkrili mutacijo V617F JAK2. Deleži so zelo podobni že objavljenim (6–13). Čeprav je bil vzorec bolnikov z ET sorazmerno majhen, smo našli pomembne razlike pri nekaterih laboratorijskih kazalcih med bolniki, pozitivnimi in negativnimi za mutacijo. To kaže na možen obstoj dveh različnih tipov ET, kar so predlagali že nekateri drugi raziskovalci (12, 13). Naši bolniki z mutacijo V617F so imeli manjše vrednosti števila trombocitov in večje vrednosti Hb od tistih brez. Medtem ko je bila razlika v trombocitih velika že ob času diagnosticiranja, pa je bila razlika v koncentraciji Hb ob diagnosticiranju le zmerna in je postala bolj izražena kasneje. Tendencia večanja koncentracije Hb pri skupini z mutacijo kaže na podobnost z bolniki s PP in odpira možnost, da gre za zgodnjo fazo PP. Na mehanizem preobrazbe bi lahko vplivali biološki in genetski modifikatorji. Homozigotnost za mutacijo V617F bi lahko govorila v prid policitemičnemu tipu, saj jo najdemo pri približno 30 % bolnikov s PP, je pa redka pri bolnikih z ET (6). Razlike v številu levkocitov ob diagnozi, ki jih opisujejo drugi avtorji, nam ni uspelo potrditi verjetno zaradi manjšega vzorca. Razlika, ki se je pojavila v kontrolnem vzorcu, pa ni zanesljiva, ker ni izključen vpliv antiproliferativnega zdravljenja. Podskupina pozitivnih ET ima torej molekularni označevalec, ki zanesljivo kaže na klonski izvor in take primere loči od možnih reaktivnih stanj. Razlike v ostalih parametrih, ki jih opisujejo drugi avtorji, pri nas doslej nismo ugotovili. V do sedaj največji raziskavi so Campbell in sodelavci analizirali klinične in laboratorijske parametre 776 bolnikov z ET (414 pozitivnih in 362 negativnih za mutacijo V617F) in odkrili velike razlike v celotni krvni sliki ter histoloških značilnostih kostnega mozga med obema skupinama (12). Že ob diagnosticiranju so imeli pozitivni bolniki pomembno zvečano koncentracijo Hb, število levkocitov, celičnost kostnega mozga in zmanjšano število trombocitov, zmanjšano koncentracijo eritropoetina in feritina. Poleg tega so odkrili, da so pozitivni bolniki bolj občutljivi na zdravljenje s hidroksiureo in so potrebovali manjše odmerke. Pri retikulinskem gradusu in morfologiji megakariocitov ni bilo razlik med obema skupinama. Med spremljanjem so bolniki z mutacijo pogosteje preobrazili v PP (12). Povečane incidence venske tromboze pri bolnikih, pozitivnih na JAK2, o kateri poročajo Campbell in sodelavci, drugim raziskovalcem ni uspelo potrditi (13). Skupna incidenca splenomegalije pri ET je v različnih poročilih precej različna (od 3–4 % pa do 35 %), nikomur pa ni uspelo incidence povezati s prisotnostjo mutacije V617F (12, 13). Prav tako prisotnost mutacije ni neodvisni napovednik slabšega preživetja (13).

Vsa ta spoznanja so pripeljala do zaključka, da mutacija V617F JAK2 nedvomno razdeli ET v dva podtipa, od katerih za mutacijo pozitivni kaže fenotipsko podobnost PP in da s PP tvori biološki kontinuum, pri katerem je stopnja eritrocitoze verjetno odvisna od fizioloških in genetskih modifikatorjev. Naši rezultati, čeprav na manjšem vzorcu, to potrjujejo.

Problematika pri ET negativnih za mutacijo, je nekoliko drugačna. Še vedno pogrešamo molekularni označevalec in razlikovanje od reaktivnih stanj je lahko včasih težavno. Kljub temu bolniki iz te skupine kažejo mnoge klinične in laboratorijske značilnosti mieloproliferativnih motenj. Morfološka analiza megakariocitov, ki je še vedno odločilna pri razlikovanju ET od reaktivne trombocitoze, ni pokazala razlike v morfologiji megakariocitov med ET, pozitivnimi in negativnimi za mutacijo. Campbell in sodelavci niso zaznali pomembnih razlik v deležu razvejanih in oblakastih megakariocitov pri obeh skupinah (12). Prav tako niti mi nismo našli razlike v deležu hiperploidnih megakariocitov s ploidnostjo $>96n$ (neobjavljeni rezultati). Megakariocitna hiperploidija je po drugi strani po naših izkušnjah pomemben parameter pri ločevanju ET od reaktivnih stanj (16).

Zaključki

Pridružujemo se mnenju, da ugotavljanje mutacije V617F JAK2 izjemno dobro napoveduje klonalnost bolezni, čeprav klinična uporaba niso povsem opredeljena. Zdaj je to prvi označevalec za ločevanje reaktivnih motenj krvne slike od nekaterih KMPB. Pomagala nam je, da je bila bolezen odkrita v nekaterih mejnih primerih, ki se niso popolnoma ujemali z diagnostičnimi merili SZO. Pri naših bolnikih s KMPB smo našli podobne deleže mutacije V617F JAK2 kot jih navajajo prvi članki iz svetovne literature. Ugotovili smo laboratorijske razlike med ET z mutacijo in ET brez mutacije za JAK2-V617F. Prisotnost mutacije V617F JAK2 pri ET veča možnost preobrazbe bolezni v PP.

Literatura

- Spivak JL, Barosi G, Tognoni G, Barbui T, Finazzi G, Marchioli R, et al. Chronic myeloproliferative disorders. In: Broudy VC, Prchal JT, Tricot GJ, eds. Hematology 2003 Education Program Book. San Diego, CA: American Society of Hematology; 2003. p. 200–24.
- Krause DS, Van Etten RA. Tyrosine kinase as targets for cancer therapy. *N Engl J Med* 2005; 353: 172–87.
- Deininger MW, Goldman JM, Melo JV. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood* 2000; 96: 3343–56.
- Green AR, Vassiliou GS, Curtin N, Campbell PJ. Management of the myeloproliferative disorders; distinguishing data from dogma. *Hematol J* 2004; 5 Suppl 3: 126–32.
- Thiele J, Kvasnicka HM. Chronic myeloproliferative disorders. The new WHO classification. *Pathologie* 2001; 6: 429–43.
- 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: 1054–61.
- 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: 1144–8.
- Levine RL, Wadleigh M, Cools J, Ebert BL, Wernig G, Huntly BJ, et al. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell* 2005; 7: 387–97.
- Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, Soon-Siong T, Tiedt R, Passweg JR, et al. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med* 2005; 352: 1779–90.
- Jones AV, Kreil S, Zoi K, Waghorn K, Curtis C, Zhang L, et al. Widespread occurrence of the JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders. *Blood* 2005; 106(6): 2162–8.

11. Steensma DP, Dewald GW, Lasho TL, Powell HL, McClure RF, Levine RL, et al. The JAK2 V617F activating tyrosine kinase mutation is an infrequent event in both «atypical» myeloproliferative disorders and myelodysplastic syndromes. *Blood* 2005; 106(4): 1207-9.
 12. Campbell PJ, Scott LM, Buck G, Wheatley K, East CL, Marsden JT, et al. Definition of subtypes of essential thrombocythemia and relatio to polycythaemia vera based on JAK2 V617F mutation status. *Lancet* 2005; 366: 1945-53.
 13. Wolanskyj AP, Lasho TL, Schwager SM, McClure RF, Wadleigh M, Lee SJ, et al. JAK2 V617F mutation in essential thrombocythemia: clinical association and long-term prognostic relevance. *Br J Haematol* 2005; 131: 208-13.
 14. Pajič T, Vučković J, Gorišek L, Černelč P, Mlakar U. Comparison of the results for the JAK2 V617F mutation detection by two methods; allele specific PCR and restriction digestion assay on polycythemia vera and essential thrombocythemia DNA samples. In: Abstract Book 11th Congress of the European Hematology Association; 2006 June 15-18; Amsterdam, the Netherlands. *Haematologica/The Hematology journal*; vol. 91; Suppl 1: 404, 2006.
 15. Murphy S. Diagnostic criteria and prognosis in polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Semin Hematol* 1999; 36: 9-13.
 16. Vučković J, Pavlič R, Grat M, Žuran I, Krive CŠ. Image DNA analysis of bone marrow megakaryocytes in differential diagnosis of thrombocytosis. *Zdrav Vestn* 2004; 73 Suppl 1: 23-5.
-