เทคนิคทางพันธุศาสตร์เพื่อการวินิจฉัยและตรวจติดตามผลการรักษาโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเรื้อรังแบบมัยอิลอยด์

Genetic Techniques for Diagnosis and Monitoring of Chronic Myeloid Leukemia

ธีระพงศ์ ศิริบูรณ์พิพัฒนา, นิตยา ลิ่มสุวรรณโชติ

และบุษบา ฤกษ์อำนวยโชค*

ห้องปฏิบัติการมนุษย์พันธุศาสตร์ ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล แขวงทุ่งพญาไท เขตราชเทวี กรุงเทพมหานคร 10400

Teerapong Siriboonpiputtana, Nittaya Limsuwanachot

and Budsaba Rerkamnuaychoke*

Human Genetic Laboratory, Department of Pathology, Faculty of Medicine, Ramathibodi Hospital, Mahidol University, Thung Phaya Thai, Ratchathewi, Bangkok 10400

บทคัดย่อ

โรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเรื้อรังแบบมัยอิลอยด์ (chronic myeloid leukemia, CML) เป็นโรคที่เกิดจากความผิดปกติของเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือด ทำให้ไม่สามารถสร้างเซลล์เม็ดเลือดชนิดต่าง ๆ เพื่อทำหน้าที่รักษาสมดุลของร่างกาย ความผิดปกติของโครโมโซมแบบ translocation ระหว่างโครโมโซมแท่งที่ 9 และ 22 (t(9;22)(q34;q11.2) ที่เรียกว่าโครโมโซมฟิลาเดลเฟีย ซึ่งสามารถตรวจพบมากกว่าร้อยละ 90 ของผู้ป่วย CML ความผิดปกติชนิดนี้ส่งผลให้เกิดยีนลูกผสมชนิด *BCR-ABL* ที่เป็นพยาธิกำเนิดของโรค ปัจจุบันการรักษาผู้ป่วย CML มีประสิทธิภาพมาก จากการใช้ยากลุ่ม tyrosine kinase inhibitors (TKIs) เช่น imatinib ซึ่งมีความจำเพาะต่อโปรตีนลูกผสม BCR-ABL ทำให้ยาออกฤทธิ์ต่อเซลล์มะเร็งเท่านั้น และเกิดผลข้างเคียงจากการใช้ยาน้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีรักษามะเร็งเม็ดเลือดขาวแบบอื่น แต่ปัจจุบันพบผู้ป่วย CML เกิดการดื้อต่อยา imatinib ได้ถึงร้อยละ 30 ซึ่งเกิดจากการกลายพันธุ์ของลำดับสารพันธุกรรมบริเวณที่เรียกว่า tyrosine kinase domain ของยีนลูกผสม *BCR-ABL* และเป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดโรคกลับ (relapse) ในผู้ป่วย CML การตรวจทางห้องปฏิบัติการเพื่อตรวจหา Ph chromosome การตรวจติดตามระดับการแสดงออกของยีนลูกผสมชนิด *BCR-ABL* และการตรวจหาการกลายของยีน *BCR-ABL* บริเวณ tyrosine kinase domain มีความสำคัญเป็นอย่างยิ่งในการเพิ่มความถูกต้องแม่นยำในการวินิจฉัย การประเมินผลการรักษา และการวางแผนปรับเปลี่ยนวิธีการรักษาผู้ป่วย CML ในกรณีเกิดการดื้อยา บทความนี้กล่าวถึงการใช้เทคนิคทางพันธุศาสตร์แบบบูรณาการเพื่อวินิจฉัย ตรวจติดตามการรักษา และวิเคราะห์รูปแบบการกลายของยีน *BCR-ABL* ที่มีผลต่อการดื้อยาในผู้ป่วย CML

***ผู้รับผิดชอบบทความ :** budsaba.rer@mahidol.ac.th

doi: 10.14456/tstj.2017.72

คำสำคัญ : เทคนิคทางพันธุศาสตร์; โรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเรื้อรังแบบมัยอิลอยด์; เซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือด; การดื้อยา

Abstract

Chronic myeloid leukemia (CML) is a clonal haematopoietic stem cell disorder. The presence of Philadelphia chromosome or t(9;22)(q34.1;q11.2) resulting in the formation of *BCR-ABL* chimeric protein is recognized as the pathogenesis of the disease. Nowadays, the effective therapy of CML is based on tyrosine kinase inhibitors (TKIs) (e.g. imatinib) which have been improved the overall survival as well as quality of life of CML patients. However, approximately to 30 % of these patients become imatinib resistance and relapse regarding to the acquired mutations of *BCR-ABL* tyrosine kinase domain. Thus, standard and effective laboratory techniques for routine diagnosis, monitoring, and detection of *BCR-ABL* kinase domain mutations should be established to gain better benefits for CML patients. Here, we described the comprehensive genetic testing including complete cytogenetic study (karyotyping), fluorescent *in situ* hybridization (FISH), reverse transcription PCR (RT-PCR), quantitative RT-PCR (qRT-PCR), and direct sequencing for the detection of *BCR-ABL* mutations in routine diagnosis and monitoring of CML after treatment.

Keywords: molecular genetics; chronic myeloid leukemia; hematopoietic stem cell; imatinib; acquired mutation

1. บทนำ

มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเรื้อรังแบบมัยอิลอยด์ (chronic myeloid leukemia, CML) เป็นโรคที่เกิดจากความผิดปกติของเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือด (HSC, hematopoietic stem cell) ทำให้ไม่สามารถสร้างเซลล์เม็ดเลือดปกติชนิดต่าง ๆ เช่น เม็ดเลือดขาว เม็ดเลือดแดง และเกล็ดเลือด เพื่อทำหน้าที่ควบคุมสมดุลของร่างกาย ทำให้ผู้ป่วยมีอาการแสดงออก เช่น ติดเชื้อหรือป่วยได้ง่าย มีอาการซีด และภาวะเลือดออกง่าย ร่วมกับภาวะตับและม้ามโต ผู้ป่วย CML ส่วนใหญ่จะมีการดำเนินโรคเป็น 3 ระยะ คือ (1) ระยะเรื้อรัง (chronic, CP/stable phase) ซึ่งสามารถตรวจพบภาวะ leucocytosis with circulating granulocytic precursor โดยพบเซลล์เม็ดเลือดตัวอ่อนได้น้อยกว่าร้อยละ 10 สามารถตรวจพบภาวะเกร็ดเลือดสูง (thrombocytosis) และมีเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดเบโซฟิล (basophil) จำนวนมาก ผู้ป่วยบางรายพบมีอาการเหนื่อยง่าย น้ำหนักลด และมีภาวะม้ามโตได้ (2) ระยะเร่ง (accelerated phase, AP) เป็นระยะที่ผู้ป่วยเริ่มแสดงอาการของโรคให้เห็นชัดเจนขึ้น โดยมีอาการเหนื่อยง่ายและน้ำหนักลดผิดปกติ พบมีม้ามโตส่งผลให้ผู้ป่วยรู้สึกไม่สบายและจุกแน่นในช่องท้องซึ่งมักเป็นระยะที่ผู้ป่วยมาพบแพทย์ การตรวจทางห้องปฏิบัติการสามารถตรวจพบเซลล์ตัวอ่อนได้ระหว่างร้อยละ 10 ถึง 30 และ (3) ระยะสุดท้าย (blast crisis, BC) หรือระยะเฉียบพลัน (acute phase) เป็นระยะที่ผู้ป่วยจะแสดงอาการคล้ายมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลัน เซลล์มะเร็ง (leukemic blast) จะถูกสร้างจำนวนมาก

อย่างรวดเร็วจนสามารถตรวจพบได้มากกว่าร้อยละ 30 และแพร่กระจายไปยังอวัยวะต่าง ๆ ซึ่งหากไม่ได้รับการรักษาโดยเร็วจะทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิต [1-3] การให้การวินิจฉัยผู้ป่วย CML ได้ในระยะแรกของการดำเนินโรค จะส่งผลดีให้ผู้ป่วยโดยจะช่วยให้แพทย์สามารถเริ่มให้การรักษาได้อย่างรวดเร็วและส่งผลดีต่อคุณภาพชีวิตของผู้ป่วย

โรค CML จัดเป็นมะเร็งชนิดแรกที่สามารถตรวจพบความผิดปกติของโครโมโซม โดยสามารถตรวจพบการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนของโครโมโซมที่เรียกว่า balanced translocation ระหว่างแขนข้างยาวของโครโมโซมแท่งที่ 9 และแขนข้างยาวของโครโมโซมแท่งที่ 22 t(9;22)(q34;q11.2) เรียกว่าโครโมโซมฟิลาเดลเฟีย (Philadelphia chromosome) ซึ่งตรวจพบได้ด้วยเทคนิคทางเซลล์พันธุศาสตร์ หรือ karyotyping สำหรับวินิจฉัยแยก CML ออกจากมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดอื่นได้

การเกิดโครโมโซมฟิลาเดลเฟีย ส่งผลทำให้เกิดยีนลูกผสม (fusion gene) ระหว่างยีน *BCR* (22q11.2) และ *ABL* (9q34) สำหรับสร้างโปรตีนลูกผสม (fusion protein) ที่เรียกว่า *BCR-ABL* ซึ่งพบว่าโปรตีนชนิดดังกล่าวเกี่ยวข้องกับพยาธิกำเนิดของ CML เนื่องจากสมบัติที่เรียกว่า constitutive phosphorylation [4-6] ที่กระตุ้นการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดขาวที่ผิดปกติเหล่านั้นปริมาณมากอย่างรวดเร็วและกลายเป็นเซลล์มะเร็งในที่สุด ปัจจุบันอาศัยเทคนิคทาง cytogenomics [ตัวอย่าง เช่น fluorescent *in situ* hybridization (FISH)] และ molecular genetics [reverse transcription PCR (RT-PCR) และ quantitative real time-PCR (qRT-PCR)] ที่มีความจำเพาะและความไวที่แตกต่างกัน เพื่อตรวจหายีนลูกผสม *BCR-ABL* fusion gene โดยปัจจุบันถือว่ามีความ สำคัญมากในการตรวจติดตามระดับการแสดงออกของ *BCR-ABL* mRNA โดยเทคนิค qRT-PCR เพื่อติดตามผลการรักษาผู้ป่วย CML

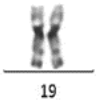
ภายหลังจากความสำเร็จในการการคิดค้นและพัฒนายา imatinib ซึ่งเป็นยาที่ออกฤทธิ์โดยตรงต่อโปรตีนลูกผสม BCR-ABL ที่สร้างจากเซลล์มะเร็งเท่านั้น ทำให้สามารถทำลายเฉพาะเซลล์มะเร็งและไม่ส่งผลกระทบต่อเซลล์เม็ดเลือดและเซลล์อวัยวะต่าง ๆ ที่ปกติ จึงเกิดผลข้างเคียงต่อผู้ป่วยน้อย ทำให้คุณภาพชีวิตของผู้ป่วยอยู่ในเกณฑ์ที่ดีมากเมื่อเปรียบเทียบกับการรักษาด้วยวิธีดั้งเดิมโดยการใช้เคมีบำบัด [7-12] ปัจจุบันผู้ป่วย CML มีอัตราการรอดชีวิต (survival rate) และระยะเวลาปราศจากโรค (disease free survival) อยู่ในเกณฑ์ที่ดีมากเมื่อเปรียบเทียบกับโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดอื่น และมะเร็งที่มีต้นกำเนิดจากอวัยวะอื่นๆ แต่ยังพบว่าประมาณร้อยละ 25-30 ของผู้ป่วย CML ภายหลังจากได้รับการรักษาด้วยยากลุ่ม imatinib เกิดการไม่ตอบสนองต่อการรักษา เนื่องมาจากการเกิดการกลาย (mutation) ของลำดับดีเอ็นเอในตำแหน่งที่สังเคราะห์ *BCR-ABL* โปรตีน ณ บริเวณที่จับได้อย่างจำเพาะของยา imatinib ทำให้ยาไม่สามารถเข้าจับหรือเกิดการจับแบบไม่เสถียร ทำให้ไม่สามารถทำลายเซลล์มะเร็งได้ [13] ซึ่งในปัจจุบันสามารถตรวจหาการกลายของยีนบริเวณดังกล่าว ด้วยเทคนิคทางอณูพันธุศาสตร์ทำได้หลายวิธี เช่น เทคนิค direct sequencing

บทความนี้คณะผู้นิพนธ์ได้สรุปเทคนิคทางพันธุศาสตร์ที่สำคัญสำหรับการวินิจฉัย ตรวจติดตามผลการรักษา และตรวจหาการกลายของยีน *BCR-ABL* ในผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเรื้อรังแบบมัยอิลอยด์ ซึ่งเป็นงานบริการการทดสอบในห้องปฏิบัติการมนุษย์พันธุศาสตร์ ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล

2. Cytogenetic study (Karyotyping)

การศึกษาด้านเซลล์พันธุศาสตร์ของผู้ป่วย CML ด้วยการทำ karyotyping ถือเป็นการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ ที่มีความสำคัญในการตรวจคัดกรองและวินิจฉัยโรค CML โดยสามารถตรวจพบโครโมโซมฟิลาเดลเฟีย ได้มากกว่าร้อยละ 95 ในผู้ป่วยกลุ่มนี้ karyotype หมายถึงชุดของโครโมโซมภายในหนึ่งเซลล์ โดยในเซลล์ร่างกายปกติของมนุษย์มีโครโมโซมทั้งสิ้น 46 แท่ง หรือ 23 คู่ โดยเป็นออโตโซมจำนวน 22 คู่ อีก 1 คู่ เป็นโครโมโซมเพศ คือ XX สำหรับเพศหญิง และ XY สำหรับเพศชาย โครโมโซมของสิ่งมีชีวิตชั้นสูงเกิดจากการขดม้วนของสายดีเอ็นเอพันรอบโปรตีนเชิงซ้อนชนิดฮิสโตน (histone complex) ที่ทำหน้าที่เป็นแกนกลาง เกิดเป็นโครงสร้างที่เรียกว่านิวคลีโอโซม (nucleosome) ซึ่งถือเป็นหน่วยย่อยของโครโมโซม เมื่อหลาย ๆ นิวคลีโอโซมถูกรวบรวมเข้ามาอยู่ใกล้ชิดกัน ทำให้เกิดโครงสร้างของโครโมโซมที่ใหญ่ขึ้น สามารถมองเห็นได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ภายหลังจากการย้อมด้วยสี Giemsa การสังเกตเห็นโครโมโซมจะมีความชัดเจนมากขึ้นในระยะเมทาเฟส metaphase [14] พบว่าในแต่ละโครโมโซมจะมีจำนวนยีนและมีลำดับ nucleotide ไม่เท่ากันทำให้เกิดความแตกต่างของขนาดของโครโมโซม ทำให้สามารถจัด karyotyping ของโครโมโซม โดยเรียงลำดับของโครโมโซมจากขนาดใหญ่ไปหาขนาดเล็ก (1 ถึง 22) และอาศัยตำแหน่งของ centromere บนแต่ละโครโมโซมสามารถแบ่งได้เป็น metacentric (centromere อยู่บริเวณกึ่งกลางของโครโมโซม) submetacentric (centromere อยู่บริเวณค่อนไปปลายด้านใดด้านหนึ่งของโครโมโซม) และ acrocentric (centromere อยู่บริเวณเกือบปลายสุดของโครโมโซม) ตำแหน่งของ centromere ทำให้แบ่งโครโมโซมแต่ละแท่งออกเป็นแขนข้างสั้น (p arm) และแขนข้างยาว (q arm) และ การแบ่งกลุ่มของโครโมโซมตามขนาดและตำแหน่งของ centromere แสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 การจัดกลุ่มของโครโมโซมมนุษย์ตามขนาดและตำแหน่งของเซนโทรเมียร์

Group	Chromosome	Characteristic	Example
A	1-3	Large metacentric chromosomes	
B	4-5	Large submetacentric chromosomes	
C	6-12 and X	Medium-sized submetacentric chromosomes	
D	13-15	Large acrocentric chromosomes	
E	16-18	Medium-sized acrocentric chromosomes	
F	19-20	Short metacentric chromosome	
G	21-22 and Y	Short acrocentric chromosome	

ที่มา : ห้องปฏิบัติการมนุษย์พันธุศาสตร์ ภาควิชาพยาธิวิทยา โรงพยาบาลรามาธิบดี

การจัดทำ karyotyping เพื่อวินิจฉัยโรค CML และโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดอื่น ๆ ทำได้โดยการเพาะเลี้ยงเซลล์จากไขกระดูก (bone marrow) หรือเลือด (peripheral blood) ของผู้ป่วย โดยใช้ sodium heparin เป็นสารยับยั้งการแข็งตัวของเลือด ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากสารกระตุ้นการแบ่งตัว

ของเซลล์ จากนั้นใช้สารละลาย colchicine เพื่อยับยั้งการแบ่งเซลล์โดยการรบกวนการสร้างสาย mitotic spindle ที่สำคัญต่อการแยกโครโมโซมในระยะ metaphase แล้วเก็บเกี่ยวเซลล์มะเร็งหลังการเพาะเลี้ยงด้วยการปั่นโดยใช้ความเร็วรอบที่เหมาะสม จากนั้นใช้สารละลายที่มีสมบัติเป็น hypotonic solution (0.075 M KCl) เพื่อให้สามารถสังเกตเห็นโครโมโซมได้ชัดเจนยิ่งขึ้น จากนั้นตรึงเซลล์บนแผ่นสไลด์แก้ว ด้วย Carnoy's solution หรือ fixative solution (สารสะลายที่มีส่วนผสมของ methanol และ acetic acid ในสัดส่วน 3:1 โดยปริมาตร ตามลำดับ) ย้อมเซลล์มะเร็งที่ตรึงบนแผ่นสไลด์แก้วด้วยสี Giemsa หรือที่เรียกว่าการทำ G-banding การตรวจความผิดปกติของ ในสัดส่วน โครโมโซมด้วยการทำ karyotyping สามารถวิเคราะห์ได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ปัจจุบันมีการพัฒนาเทคนิคการย้อมโครโมโซมและกล้องจุลทรรศน์ที่มีกำลังขยายสูงร่วมกับการใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ในการจัดเรียงโครโมโซม ทำให้ช่วยลดระยะเวลาเพิ่มประสิทธิภาพการวิเคราะห์ความผิดปกติของโครโมโซมได้อย่างถูกต้องแม่นยำ ปัจจุบันอาศัยการเรียกชื่อโครโมโซมที่ผิดปกติเชิงปริมาณ (numerical abnormality) และโครงสร้าง (structural abnormality) โดยอาศัยหลักเกณฑ์สากลของ International System for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN, 2016) [15] ในการเรียกชื่อความผิดปกติของโครโมโซมที่พบได้บ่อยในโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวและโรคทางพันธุกรรมอื่น ๆ แสดงในตารางที่ 2 แม้ว่าการทำ karyotyping เป็นเทคนิคมาตรฐานสำหรับการตรวจคัดกรองความผิดปกติทางพันธุกรรมระดับความผิดปกติของโครโมโซมในโรค CML (ตัวอย่าง karyotype ของผู้ป่วย CML ดังแสดงในรูปที่ 1) แต่พบว่า karyotyping ยังมีข้อจำกัดของการทดสอบหลายประการ เช่น ต้องใช้สิ่งส่งตรวจที่ประกอบด้วยเซลล์มีชีวิตเพื่อสามารถเพาะเลี้ยงได้ ต้องการบุคลากรที่มีความชำนาญสูงและใช้ระยะเวลานานในการวิเคราะห์ผล มีความไวไม่สูงมากนักเมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิค FISH และ PCR ปัญหาการปนเปื้อนในขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเซลล์ และไม่เหมาะในการใช้เป็นการทดสอบเพื่อตรวจติดตามระดับออโท-โซม fusion gene ระหว่างการรักษา เพื่อลดข้อจำกัดดังกล่าว จึงมีการพัฒนาเทคโนโลยีเพื่อใช้ตรวจหาความผิดปกติทางพันธุกรรมในกลุ่มโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวและโรคมะเร็งชนิดอื่น ๆ เช่น เทคนิคที่อาศัยการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในหลอดทดลอง [polymerase chain reaction (PCR)-based technology] [2] ซึ่งจะได้กล่าวถึงต่อไป

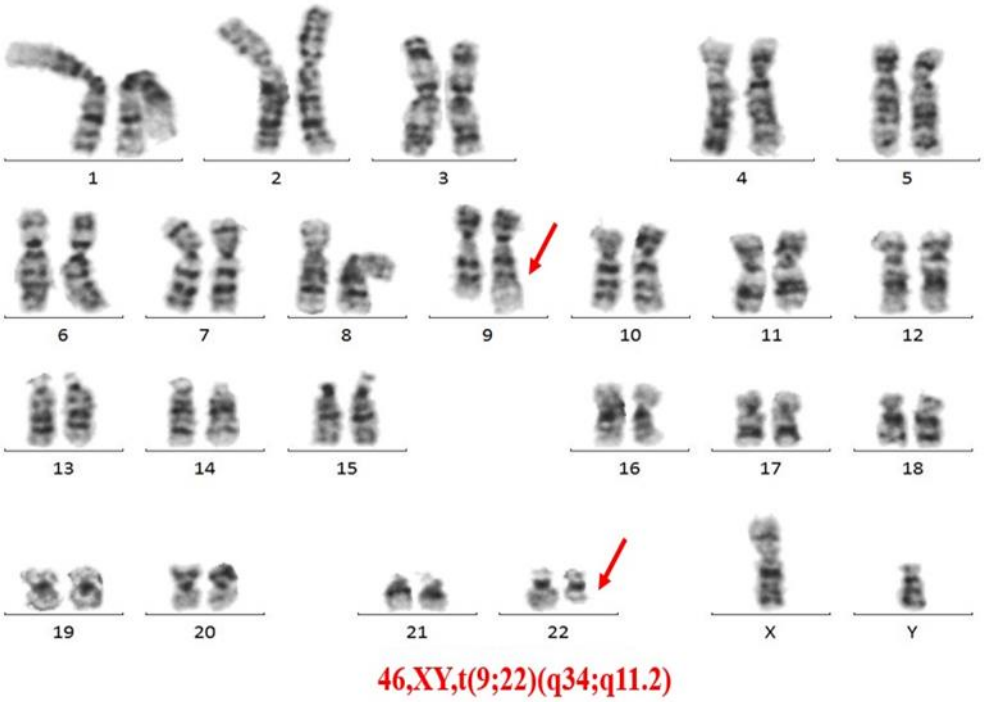
3. Fluorescent *in situ* hybridization (FISH)

FISH เป็นเทคนิคที่มีความสำคัญในการวิเคราะห์ความผิดปกติทางพันธุกรรมในโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาว จัดเป็นเทคนิคที่มีความไวและความจำเพาะสูง สามารถวิเคราะห์ความผิดปกติได้อย่างรวดเร็ว เมื่อเปรียบเทียบกับการทำ karyotyping หลักการของ FISH อาศัยการจับกันได้อย่างจำเพาะของตัวติดตามที่ติดฉลากสารเรืองแสง (fluorescent-labeled specific probe) กับลำดับสารพันธุกรรม หรือดีเอ็นเอเป้าหมาย (target DNA/target sequence) ในนิวเคลียสของเซลล์ สามารถวิเคราะห์จากสิ่งส่งตรวจที่เก็บจากผู้ป่วยโดยตรง เช่น ไขกระดูกและเลือด เซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยง และจากสิ่งส่งตรวจต่าง ๆ ที่ผ่านกระบวนการเก็บและเตรียมใน paraffin (paraffin embedded specimen/tissue) นอกจากนี้สามารถใช้เทคนิค FISH ในการวิเคราะห์ความผิดปกติของเซลล์ที่อยู่ในระยะ interphase และ metaphase ได้ โดยวิเคราะห์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ fluorescent microscope

เทคนิค FISH นอกจากสามารถวิเคราะห์ความผิดปกติของโครโมโซมขนาดใหญ่ เช่น balanced translocation ก็ยังสามารถวิเคราะห์ความผิดปกติของโครโมโซมชนิดเล็ก ๆ ได้ เช่น การเพิ่ม (gain) หรือขาดหาย (loss) ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอสั้น ๆ ได้ [14,16-20]

ตารางที่ 2 อักษรย่อที่ใช้เรียกความผิดปกติของโครโมโซมที่พบบ่อยในมะเร็งเม็ดเลือดขาว [2,14,15]

Aberration	Definition
add	additional material of unknown origin
cen	centromere
del	deletion (loss of part of chromosome)
dic	dicentric
der	derivative chromosome
dup	Duplication
fra	fragile site
i	isochromosome
idic	isodicentric chromosome
ins	insertion
inv	inversion
mar	marker chromosome; a structurally abnormal chromosome that cannot be identified with standard cytogenetics
mos	mosaic; two or more cell lines present in one individual (two or more cell types are present which differ in number of chromosomes or their structure)
p	short arm of chromosome
ph	Philadelphia chromosome
q	long arm chromosome
r	ring chromosome
rcp	reciprocal
rea	rearrangement
rec	recombinant chromosome
t	translocation
tel	telomere (end of chromosome arm)
ter	terminal end of chromosome
+	plus sign in front of chromosome number; gain of chromosome
-	minus sign in front of chromosome number; loss of chromosome
[]	square brackets; number of cells in each clone

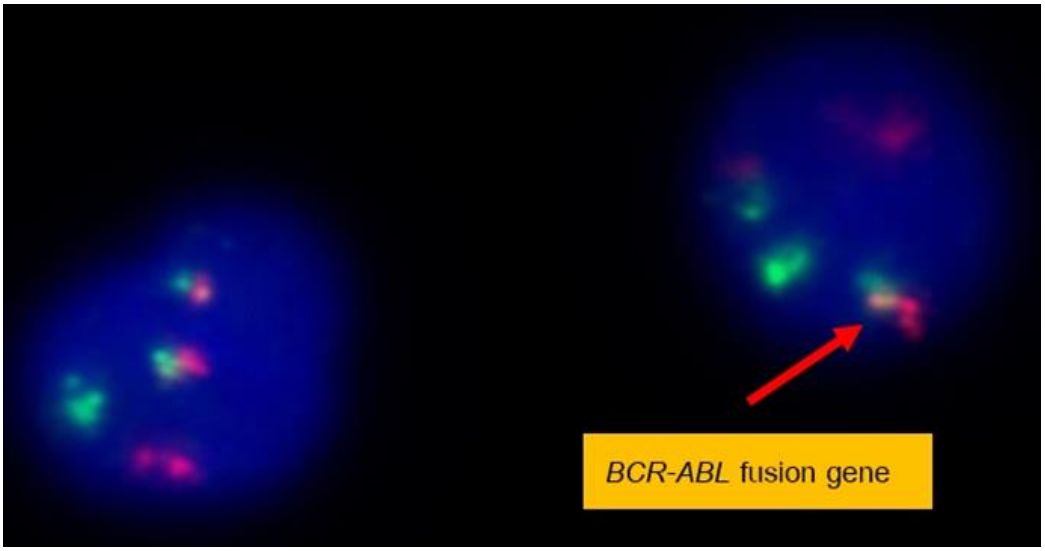


รูปที่ 1 Karyotype แสดง t(9;22)(q34;q11.2) หรือโครโมโซมฟิลาเดลเฟีย ซึ่งเตรียมจากเซลล์ไขกระดูกของผู้ป่วย CML (ที่มา : ห้องปฏิบัติการมนุษย์พันธุศาสตร์ ภาควิชาพยาธิวิทยา โรงพยาบาลรามาธิบดี)

สำหรับโรค CML และมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดอื่น ๆ เทคนิค FISH มีประโยชน์ในการช่วยสนับสนุนการวินิจฉัยโดยเฉพาะในกรณีที่ห้องปฏิบัติการไม่สามารถจัดเตรียม karyotyping ได้ และในผู้ป่วยบางรายที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงเซลล์จากสิ่งส่งตรวจได้ นอกจากนี้ เทคนิค FISH ยังมีบทบาทสำคัญสำหรับการติดตามผลการรักษาผู้ป่วย CML ได้ เนื่องจากเป็นเทคนิคที่มีความไวและความจำเพาะสูง [21-23] ปัจจุบันห้องปฏิบัติการนิยมใช้ dual-fusion probe ที่ประกอบด้วย probe ซึ่งติดฉลากสารเรืองแสงต่างชนิดกัน (*BCR* probe ติดฉลากด้วย FITC ให้แสงสีเขียว และ *ABL* ติดฉลากด้วย rhodamine ให้แสงสีแดง) สำหรับตรวจหาโครโมโซมฟิลาเดลเฟีย โดยเซลล์ปกติสามารถตรวจพบสัญญาณแสงสีเขียวและสีแดงชนิดละสองจุด สำหรับเซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วย CML เมื่อเกิด translocation ชนิด t(9;22)(q34;q11.2) หรือโครโมโซมฟิลาเดลเฟีย ทำให้เกิดการเชื่อมติดกันระหว่าง ยีน *BCR* และยีน *ABL* (*BCR-ABL* fusion gene) เมื่อ hybridization ด้วย probe ดังกล่าว ทำให้มองเห็นสัญญาณเป็นสีผสมระหว่างสีเขียวกับสีแดงหรือสีเหลือง (รูปที่ 2)

แม้ว่าเทคนิค FISH ช่วยเพิ่มขีดความสามารถในการตรวจหาความผิดปกติของโครโมโซมหรือลำดับสารพันธุกรรมที่ผิดปกติในผู้ป่วย CML ได้อย่างจำเพาะ และมีความไวสูง แต่ก็ยังมีข้อจำกัดหลายประการ เช่น ไม่เหมาะในการใช้เป็นการทดสอบเพื่อตรวจคัดกรองความผิดปกติ การทดสอบอาศัย probe ที่มีความจำเพาะ และไม่สามารถตรวจความผิดปกติของลำดับสารพันธุกรรมที่มีขนาดสั้นกว่า 20 กิโลเบส ดังนั้นจึงมีการพัฒนาเทคนิคการเพิ่มปริมาณสาร

พันธุกรรมในหลอดทดลองหรือ PCR เข้ามาใช้ในการตรวจหาทั้งรูปแบบ และระดับการแสดงออกของ *BCR-ABL* fusion (*BCR-ABL* transcripts) ซึ่งพบว่าเป็นเทคนิคที่มีความจำเพาะและความไวสูงมาก ซึ่งต่อมาได้กลายเป็นที่นิยมกันอย่างแพร่หลายในห้องปฏิบัติการทางโลหิตวิทยาสำหรับตรวจวิเคราะห์ความผิดปกติทางพันธุกรรมของโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดต่าง ๆ



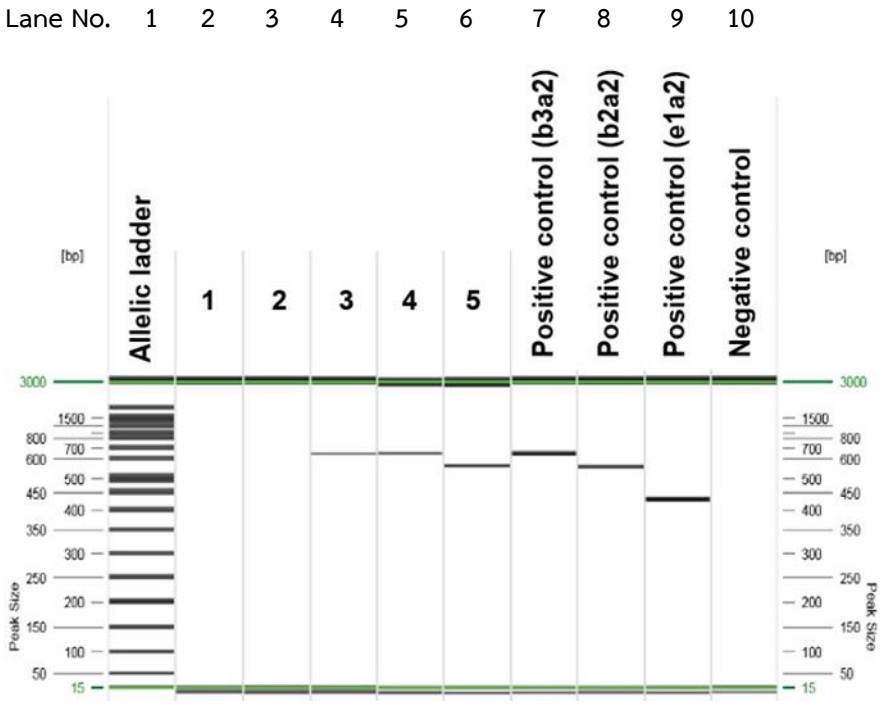
รูปที่ 2 การตรวจหา t(9;22)(q34;q11.2)(*BCR-ABL*) หรือโครโมโซมฟิลาเดลเฟียด้วยเทคนิค FISH แสดงการเรืองแสง fluorescent ของเซลล์ระยะ interphase ภายหลังการ hybridization ด้วย dual-fusion probe ที่จำเพาะต่อยีน *BCR* (สีเขียว) และยีน *ABL* (สีแดง) (ที่มา : ห้องปฏิบัติการมนุษย์พันธุศาสตร์ ภาควิชาพยาธิวิทยา โรงพยาบาลรามาธิบดี)

4. Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

เทคนิค RT-PCR มีบทบาทสำคัญในการตรวจหาความผิดปกติทางพันธุกรรมในโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดต่าง ๆ รวมทั้ง CML ได้อย่างจำเพาะเจาะจง จึงนิยมใช้เป็นเทคนิคในการคัดกรองความผิดปกติ และมีความไวสูงมากเมื่อเปรียบเทียบกับการทำ karyotyping หรือ FISH นอกจากนี้ยังสามารถตรวจวิเคราะห์ได้ในห้องปฏิบัติการขนาดเล็กเนื่องจากไม่ต้องอาศัยเครื่องมือที่มีราคาแพงเหมือนเทคนิคทางอณูพันธุศาสตร์อื่น ๆ เช่น RQ-PCR และการทำ DNA sequencing สามารถรายงานผลการวิเคราะห์ได้รวดเร็ว ภายใน 1-2 วัน และสามารถใช้สิ่งส่งตรวจได้หลากหลายชนิด เช่น เลือด ไขกระดูก หรือ จากอวัยวะอื่น ๆ เช่น ต่อมน้ำเหลือง น้ำไขสันหลัง และเซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยง จึงทำให้เทคนิค RT-PCR เป็นที่นิยมและเป็นที่ยอมรับกันอย่างแพร่หลาย

การใช้เทคนิค RT-PCR สำหรับการตรวจหายีนลูกผสม *BCR-ABL* ในผู้ป่วย CML สามารถทำได้โดยสกัดสารพันธุกรรมชนิดอาร์เอ็นเอ [16] จากเลือด หรือไขกระดูก ที่เก็บในสารกันเลือดแข็งชนิด ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) วัดปริมาณและวิเคราะห์คุณภาพของ RNA โดยวิธีวัดอัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร

จากนั้นเปลี่ยน RNA เป็น complementary DNA (cDNA) ด้วยเอนไซม์ reverse transcriptase หลังจากนั้นเพิ่มปริมาณ cDNA ที่ได้ด้วยปฏิกิริยา PCR โดยใช้ primer ที่มีความจำเพาะกับยีนลูกผสม *BCR-ABL* แล้ววิเคราะห์ผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR (PCR product) ด้วยเทคนิค gel electrophoresis การแปลผลการทดสอบทำได้โดยการตรวจสอบขนาดของ PCR product เปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA marker) และขนาดของ PCR product ที่ได้จากสารพันธุกรรมควบคุมที่ให้ผลบวก (positive control ที่ได้จาก RNA ที่สกัดจาก cell line) สำหรับยีนลูกผสม *BCR-ABL* ชนิด p210 ใช้ cell line ชนิด K562 หรือเป็น RNA ที่สกัดมาจากเซลล์ของผู้ป่วย CML และเปรียบเทียบกับสารพันธุกรรมควบคุมที่ให้ผลลบ (negative control ที่ได้จาก RNA ของคนปกติ) เทคนิค RT-PCR เป็นการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ (qualitative assay) โดยแปลผลการทดสอบเป็นผลบวก (positive) และผลลบ (negative) [24] ตัวอย่างการวิเคราะห์ดังแสดงในรูปที่ 3



รูปที่ 3 ผลจากการตรวจหายีนลูกผสมชนิด *BCR-ABL* ด้วยเทคนิค RT-PCR โดยที่ allelic ladder (เลนที่ 1) คือ แถบสารพันธุกรรมขนาดมาตรฐาน ผู้ป่วยหมายเลขที่ 1 และ 2 ให้ผลการทดสอบเป็น negative (เลนที่ 2-3), ผู้ป่วยหมายเลข 3 และ 4 ให้ผล positive ต่อ *BCR-ABL* p210 ชนิด b3a2 (เลนที่ 4-5), ผู้ป่วยที่ 5 ให้ผล positive ต่อ *BCR-ABL* p210 ชนิด b2a2 (เลนที่ 6), เลนที่ 7-9 เป็น positive control ของ *BCR-ABL* p210 ชนิด b3a2, b2a2 และ *BCR-ABL* p190 ตามลำดับ และเลนที่ 10 เป็น negative control (ที่มา : ห้องปฏิบัติการมนุษย์พันธุศาสตร์ ภาควิชาพยาธิวิทยา โรงพยาบาลรามาธิบดี)

5. Quantitative real-time RT-PCR (qRT-PCR)

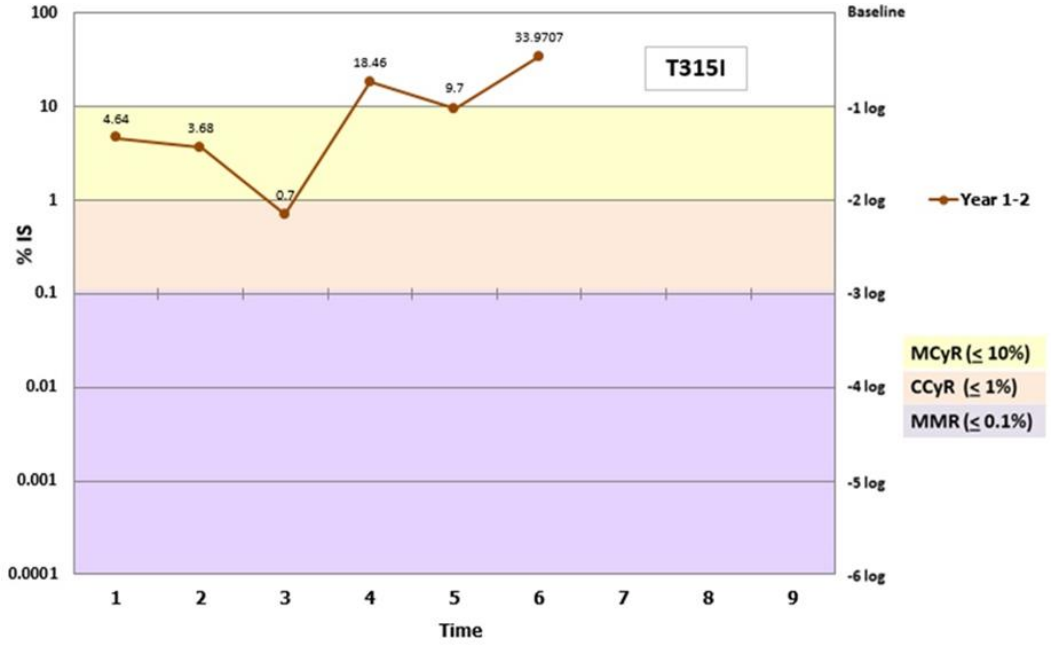
เทคนิค qRT-PCR เป็นเทคนิคที่พัฒนามาจาก RT-PCR เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ความผิดปกติทางพันธุกรรมเชิงปริมาณ (quantitative assay) ในผู้ป่วย CML โดยวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีนลูกผสม *BCR-ABL* ภายหลังจากการรักษาด้วยยา imatinib ในกรณีที่ผู้ป่วย CML มีการตอบสนองต่อยา ปริมาณของ *BCR-ABL* mRNA ในผู้ป่วยจะลดลงอย่างต่อเนื่องจนไม่สามารถตรวจพบได้ด้วยเทคนิค qRT-PCR แต่ในผู้ป่วย CML บางรายที่ไม่ตอบสนองด้วยยาดังกล่าว หรือ การเกิดโรคกลับ (relapse) ภายหลังจากการหยุดใช้ยา ทำให้สามารถตรวจพบ *BCR-ABL* mRNA หรือพบการแสดงออกในระดับที่สูงขึ้นอย่างต่อเนื่องตามความรุนแรงของโรค ดังนั้น เทคนิค qRT-PCR มีประโยชน์สำหรับการวางแผนการรักษาของแพทย์ได้ [25-28]

หลักการของเทคนิค qRT-PCR เพื่อตรวจหาระดับการแสดงออกของยีนลูกผสม *BCR-ABL* อาศัยเทคโนโลยี fluorescent resonance energy transfer (FRET) และ Taqman probe โดยอาศัย primer ที่จำเพาะต่อ ยีนลูกผสม *BCR-ABL* (p210) 1 คู่ และมี probe จำนวน 1 เส้น ที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสง fluorescent (reporter) ที่ปลายด้าน 5′ ส่วนปลายด้าน 3′ ถูกติดฉลากด้วยโมเลกุลที่ทำหน้าที่ดูดกลืนแสง fluorescent (quencher) เมื่ออยู่ในระยะห่างที่เหมาะสมซึ่งถูกกำหนดด้วยความยาวของ probe ที่ถูกออกแบบให้สามารถจับกับ fusion gene ระหว่างบริเวณที่จับได้อย่างจำเพาะของ primer ทั้งสองเส้น ในระหว่างขั้นตอนการทำ PCR โดยใช้ cDNA ที่ได้จากการเปลี่ยน mRNA ที่สกัดได้จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วย จากนั้น ลดอุณหภูมิในขั้นตอน PCR เพื่อให้เกิดการจับกันอย่างจำเพาะระหว่าง primer ทั้งสองเส้น และ probe (annealing) บริเวณดีเอ็นเอเป้าหมาย (*BCR-ABL* junction region) เมื่อเกิดกระบวนการสร้างสายดีเอ็นเอให้ยาวออกไปทางด้านปลาย 3′ ของ forward primer (elongation/extension) โดยอาศัยสมบัติ 5′ exonuclease activity ของเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ทำให้เกิดการย่อยสลาย probe ส่งผลให้ reporter และ quencher แยกออกจากกัน ซึ่งสามารถตรวจจับคลื่นแสงที่ถูกปลดปล่อยออกมาเมื่อถูกกระตุ้นด้วยแหล่งกำเนิดแสง (light source) ที่มีพลังงานสูง พลังงานแสงที่วัดได้ในแต่ละรอบของปฏิกิริยา PCR จะถูกบันทึก ซึ่งจะแปรผันตรงกับปริมาณ *BCR-ABL* mRNA โดย qRT-PCR สามารถวิเคราะห์ได้ทั้งแบบ absolute quantitative โดยการเปรียบเทียบกับ standard cDNA ที่ทราบปริมาณยีนที่แน่นอน ซึ่งได้จากการเตรียม plasmid DNA ในปฏิกิริยา PCR cloning ของ fusion gene ที่ต้องการตรวจวิเคราะห์ หรือการวิเคราะห์แบบ relative quantitative โดยการเปรียบเทียบกับปริมาณการแสดงออกของยีนควบคุม (control gene/house-keeping gene) เช่น *ABL* หรือ *GAPDH* ปัจจุบันมีการพัฒนาการรายงานผลเชิงปริมาณของ *BCR-ABL* mRNA ในรูปแบบ international scale (IS) ซึ่งเป็นมาตรฐานของการตรวจวิเคราะห์ในระดับสากล ตัวอย่างการตรวจวิเคราะห์ปริมาณ *BCR-ABL* mRNA ด้วยเทคนิค qRT-PCR ดังแสดงในรูปที่ 4

6. การตรวจหาการกลายของยีนลูกผสมชนิด BCR-ABL

ปัจจุบัน แม้ว่าการรักษาผู้ป่วย CML ด้วยยากลุ่ม TKIs เช่น imatinib ร่วมกับการตรวจติดตามผลการรักษาด้วยเทคนิค karyotyping, FISH และ qRT-PCR จะให้ผลการตอบสนองต่อการรักษาที่มีประสิทธิภาพมาก แต่มีรายงานพบว่าผู้ป่วย CML บางราย (ประมาณร้อยละ 20-30) แสดงอาการดื้อยา

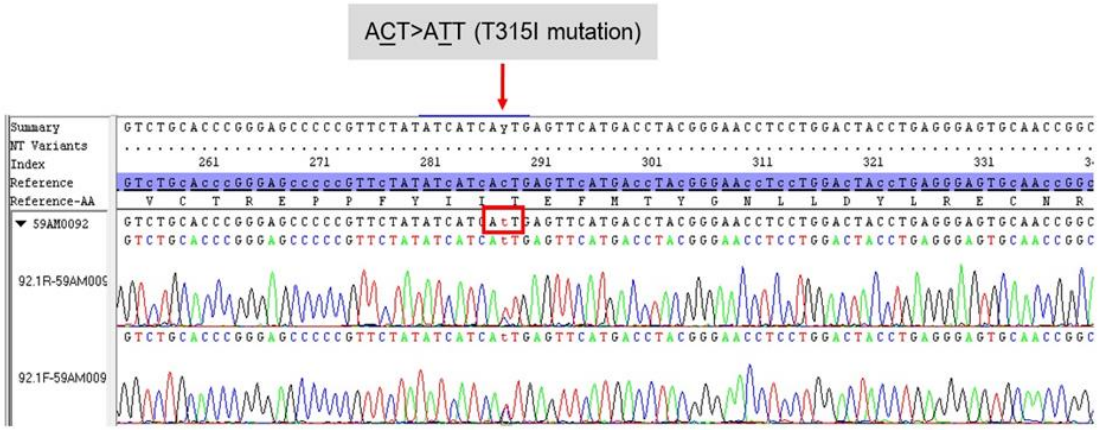
หรือไม่ตอบสนองต่อการรักษา โดยสามารถตรวจพบระดับ *BCR-ABL* mRNA ในผู้ป่วยกลุ่มนี้ได้ตลอดระยะของการตรวจติดตามผลการรักษา หรือตรวจพบระดับ *BCR-ABL* mRNA ที่เพิ่มสูงขึ้นเรื่อย ๆ หรือมีปริมาณลดลงในช่วงระยะเวลาใดเวลาหนึ่งแล้วมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้น หรือมีผลการตรวจทางโลหิตวิทยาอื่น ๆ ที่บ่งชี้ถึงการไม่ตอบสนองต่อการรักษา เช่น สามารถตรวจพบเซลล์มะเร็งตัวอ่อนในเสมียร์เลือด กลไกสำคัญที่ทำให้เกิดการดื้อยา TKIs จากการศึกษาพบว่าเกิดจากการกลายของลำดับสารพันธุกรรมของยีนลูกผสม *BCR-ABL* ภายหลังการรักษา [29] ส่งผลให้เกิดการสร้าง *BCR-ABL* fusion protein ที่มีโครงสร้างต่างไปจากเดิม โดยมักพบในบริเวณที่เกี่ยวข้องกับการจับกันของโปรตีนลูกผสมกับโครงสร้างของยาที่เรียกว่า kinase domain ทำให้ยากลุ่ม TKIs ไม่สามารถจับกับโปรตีนลูกผสม หรือจับได้แบบไม่เสถียร ส่งผลให้ยาไม่สามารถออกฤทธิ์ยับยั้ง tyrosine kinase activity ของ *BCR-ABL* protein ได้ ทำให้เซลล์มะเร็งที่มีความผิดปกติสามารถแบ่งตัวเพิ่มจำนวน และเป็นสาเหตุของการของการดื้อยา และการเกิดโรคกลับ (relapse) [30-34]



รูปที่ 4 ผลการตรวจติดตามระดับการแสดงออกของยีนลูกผสม *BCR-ABL* ใน 6 ช่วงเวลา ภายหลังการรักษาด้วยยา imatinib ในภาพผู้ป่วยมีการกลายแบบ T315I ที่มักไม่ตอบสนองต่อการรักษา ทำให้ระดับของ *BCR-ABL* mRNA มีแนวโน้มเพิ่งสูงขึ้นดังรูป (ที่มา : ห้องปฏิบัติการมนุษย์พันธุศาสตร์ ภาควิชาพยาธิวิทยา โรงพยาบาลรามาธิบดี)

การวิเคราะห์รูปแบบการกลายของยีนลูกผสม *BCR-ABL* สามารถทำได้โดยเทคนิค direct sequencing โดยออกแบบ primer ให้มีความจำเพาะต่อยีน *BCR-ABL* บริเวณที่จำเพาะต่อการแปรรหัส *ABL* tyrosine kinase domain (TKD) หลังจากนั้นจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ PCR product ที่ได้จากปฏิกิริยา PCR ด้วยเทคนิค sanger sequencing ตัวอย่างผลการตรวจการกลายของยีน *BCR-ABL* ดัง

แสดงในรูปที่ 5



รูปที่ 5 การจัดเรียงลำดับสารพันธุกรรมจากการตรวจการกลายของยีน *BCR-ABL* บริเวณ tyrosine kinase domain ในภาพเป็นการกลายแบบ T315I ที่พบได้บ่อยและให้ผลการพยากรณ์โรคไม่ดี (ที่มา : ห้องปฏิบัติการมนุษย์พันธุศาสตร์ ภาควิชาพยาธิวิทยา โรงพยาบาลรามาธิบดี)

7. สรุป

มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเรื้อรังแบบมัยอิลอยด์หรือ CML จัดเป็นมะเร็งที่พบอุบัติการณ์สูงเมื่อเปรียบเทียบกับมะเร็งในระบบเลือดชนิดอื่น ๆ และจัดเป็นปัญหาทางสาธารณสุขของประเทศ และในระดับสากลปัจจุบัน แม้มีวิธีการรักษาผู้ป่วย CML ด้วยยากลุ่ม TKIs เช่น ยา imatinib ที่ให้ผลการรักษาอย่างมีประสิทธิภาพ ช่วยยืดอายุผู้ป่วย และทำให้ผู้ป่วยมีคุณภาพชีวิตที่ดีขึ้น แต่ยังพบว่าผู้ป่วยบางรายไม่ตอบสนองต่อการรักษาเนื่องจากกลไกการดื้อยาดังกล่าว ดังนั้นการให้บริการตรวจวิเคราะห์ความผิดปกติทางพันธุกรรมในผู้ป่วย CML อย่างครบวงจรที่ประกอบไปด้วย เทคนิค karyotyping, FISH, RT-PCR, qRT-PCR และการตรวจหาการกลายของยีนลูกผสม *BCR-ABL* ด้วยเทคนิค direct sequencing ช่วยให้แพทย์สามารถวินิจฉัยผู้ป่วยได้อย่างถูกต้อง แม่นยำ และสามารถวางแผนการรักษาผู้ป่วยได้อย่างมีประสิทธิภาพ

8. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ศาสตราจารย์แพทย์หญิง แสงสุรีย์ จูฑา รองศาสตราจารย์นายแพทย์สุภร จันท์จารุณี และรองศาสตราจารย์แพทย์หญิงพิมพ์ใจ นิภารักษ์ ภาควิชาอายุรศาสตร์ รวมทั้งบุคคลากรห้องปฏิบัติการมนุษย์พันธุศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล

9. รายการอ้างอิง

[1] Savona, M. and Talpaz, M., 2008, Getting to the stem of chronic myeloid leukaemia 8, Nat. Rev. Cancer 5: 341-350.

[2] Kavalerchik, E., Goff, D. and Jamieson, C.H., 2008, Chronic myeloid leukemia stem cells 26, J. Clin. Oncol. 17: 2911-2915.

[3] Méndez-Ferrer, S., García-Fernández, M. and de Castillejo, C.L., 2015, Convert and

conquer: The strategy of chronic myelogenous leukemic cells 27, Cancer Cell 5: 611-613.

[4] Lugo, T.G., Pendergast, A.M., Muller, A.J. and Witte, O.N., 1990, Tyrosine kinase activity and transformation potency of *bcr-abl* oncogene products 247, Science 4946: 1079-1082.

[5] Maru, Y., 2001, Molecular biology of chronic myeloid leukemia 73, Int. J. Hematol. 3: 308-322.

[6] Sattler, M. and Griffin, J.D., 2003, Molecular mechanisms of transformation by the *BCR-ABL* oncogene 40, Semin. Hematol. Suppl 2: 4-10.

[7] Cortes, J.E., Talpaz, M., O' Brien, S., Faderl, S., Garcia-Manero, G., Ferrajoli, A., Verstovsek, S., Rios, M.B., Shan, J. and Kantarjian, H.M., 2006, Staging of chronic myeloid leukemia in the imatinib era: An evaluation of the World Health Organization proposal 106, Cancer 6: 1306-1315.

[8] Druker, B.J., Guilhot, F., O'Brien, S.G., Gathmann, I., Kantarjian, H., Gattermann, N., Deininger, M.W., Silver, R.T., Goldman, J.M., Stone, R.M., Cervantes, F., Hochhaus, A., Powell, B.L., Gabrilove, J.L., Rousselot, P., Reiffers, J., Cornelissen, J.J., Hughes, T., Agis, H., Fischer, T., Verhoef, G., Shepherd, J., Saglio, G., Gratwohl, A., Nielsen, J.L., Radich, J.P., Simonsson, B., Taylor, K., Baccarani, M., So, C., Letvak, L., Larson, R.A, IRIS Investigators, 2006, Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia 355, N. Engl. J. Med. 23: 2408-2417.

[9] Clarkson, B., Strife, A., Wisniewski, D., Lambek, C.L. and Liu, C., 2003, Chronic myelogenous leukemia as a paradigm of early cancer and possible curative strategies 17, Leukemia 7: 1211-1262.

[10] Druker, B.J., Tamura, S., Buchdunger, E., Ohno, S., Segal, G.M., Fanning, S., Zimmermann, J. and Lydon, N.B., 1996, Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of *Bcr-Abl* positive cells 2, Nat. Med. 5: 561-566.

[11] Druker, B.J., Talpaz, M., Resta, D.J., Peng, B., Buchdunger, E., Ford, J.M., Lydon, N.B., Kantarjian, H., Capdeville, R., Ohno-Jones, S. and Sawyers, C.L., 2001, Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia 344, N. Engl. J. Med. 14: 1031-1037.

[12] Sawyers, C.L., Hochhaus, A., Feldman, E., Goldman, J.M., Miller, C.B., Ottmann, O.G., Schiffer, C.A., Talpaz, M., Guilhot, F., Deininger, M.W., Fischer, T., O'Brien, S.G., Stone, R.M., Gambacorti-Passerini, C.B., Russell, N.H., Reiffers, J.J., Shea, T.C., Chapuis, B., Coutre, S., Tura, S., Morra, E., Larson, R.A., Saven, A., Peschel, C., Gratwohl, A., Mandelli, F., Ben-Am, M., Gathmann, I., Capdeville, R., Paquette,

R.L. and Druker, B.J., 2002, Imatinib induces hematologic and cytogenetic responses in patients with chronic myelogenous leukemia in myeloid blast crisis: Results of a phase II study 99, Blood 10: 3530-3539.

[13] Parker, W.T., Lawrence, R.M., Ho, M., Irwin, D.L., Scott, H.S., Hughes, T.P. and Branford, S., 2011, Sensitive detection of BCR-ABL1 mutations in patients with chronic myeloid leukemia after imatinib resistance is predictive of outcome during subsequent therapy 29, J. Clin. Oncol. 32: 4250-4259.

[14] Gorczyca, W., 2008, Cytogenetics, FISH and molecular testing in hematologic malignancies, 1st Ed., Informa Healthcare, United Kingdom, 319 p.

[15] McGowan-Jordan, J., Simons, A., Schmid, M., 2016, ISCN 2016: An international system for human cytogenetic nomenclature (2016), Basel, Karger, Switzerland.

[16] Tibiletti, M.G., Bernasconi, B.B., Dionigi, A. and Riva, C., 1999, The applications of FISH in tumor pathology 3, Adv. Clin. Path. 4: 111-118.

[17] Cook, J.R., 2004, Paraffin section interphase fluorescence *in situ* hybridization in the diagnosis and classification of non-hodgkin lymphomas 13, Diagn. Mol. Pathol. 4: 197-206.

[18] Dewald, G.W., 2002, Cytogenetic and FISH studies in myelodysplasia, acute myeloid leukemia, chronic lymphocytic leukemia and lymphoma 76, Int. J. Hematol. Suppl 2: 65-74.

[19] Amare, P.S., Baisane C.C., Saikia, T., Nair, R., Gawade, H. and Advani, S., 2001, Fluorescence *in situ* hybridization: A highly efficient technique of molecular diagnosis and predication for disease course in patients with myeloid leukemias 131, Cancer Genet. Cytogenet. 2: 125-134.

[20] Akel, S., Kolialexi, A., Mavrou, A., Metaxotou, C., Loukopoulos, D. and Yataganas, X., 2002, Efficiency of interphase fluorescence *in situ* hybridization for *BCR/ABL* on peripheral blood smears for monitoring of CML patients: A comparison with bone marrow findings 24, Clin. Lab. Haematol. 6: 361-367.

[21] Lee, Y.K., Lee, D.W., Kim, Y.L., Lee, S., Min, C.K., Kim, Y.J., Oh, I.H., Kim, T.G., Kim, C.C., Kim, D.W., 2002, Detection of the BCR-ABL gene by interphase fluorescence *in situ* hybridization (iFISH) in chronic myelogenous leukemia patients after hemopoietic stem cell transplantation: The feasibility of iFISH monitoring of therapeutic response in peripheral blood 76, Int. J. Hematol. 2: 180-185.

[22] Kim, Y.J., Kim, D.W., Lee, S., Kim, H.J., Kim, Y.L., Hwang, J.Y., Oh, I.H., Park, Y.H., Lee, Y.K., Min, C.K., Kim, T.G., Han, T.H., Min,

W.S. and Kim, C.C., 2002, Comprehensive comparison of FISH, RT-PCR, and RQ-PCR for monitoring the *BCR-ABL* gene after hematopoietic stem cell transplantation in CML 68, Eur. J. Haematol. 5: 272-280.

[23] Kitzis, A., Brizard F., Dascalescu, C., Chomel, J.C., Guilhot, F. and Brizard, A., 2001, Persistence of transcriptionally silent *BCR-ABL* rearrangements in chronic myeloid leukemia patients in sustained complete cytogenetic remission 42, Leuk. Lymphoma. 5: 933-944.

[24] van Dongen, J.J., Macintyre, E.A., Gabert, J.A., Delabesse, E., Rossi, V., Saglio, G., Gottardi, E., Rambaldi, A., Dotti, G., Griesinger, F., Parreira, A., Gameiro, P., Diáz, M.G., Malec, M., Langerak, AW., San Miguel, J.F. and Biondi, A., 1999, Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease, Report of the BIOMED-1 Concerted Action: Investigation of minimal residual disease in acute leukemia 13, Leukemia 12: 1901-1928.

[25] Gabert, J., Beillard, E., van der Velden, V.H., Bi, W., Grimwade, D., Pallisgaard, N., Barbany, G., Cazzaniga, G., Cayuela, J.M., Cavé, H., Pane, F., Aerts, J.L., De Micheli, D., Thirion, X., Pradel, V., González, M., Viehmann, S., Malec, M., Saglio, G. and van Dongen, J.J., 2003, Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia – a Europe Against Cancer program 17, Leukemia. 12: 2318-2357.

[26] Pongers-Willemse, M.J., Verhagen, O.J., Tibbe, G.J., Wijkhuijs, A.J., de Haas, V., Roovers, E., van der Schoot, C.E. and van Dongen, J.J., 1998, Real-time quantitative PCR for the detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia using junctional region specific TaqMan probes 12, Leukemia 12: 2006-2014.

[27] Branford, S., Hughes, T.P. and Rudzki, Z., 1999, Monitoring chronic myeloid leukaemia therapy by real-time quantitative PCR in blood is a reliable alternative to bone marrow cytogenetics, Br. J. Haematol, 107: 587-599.

[28] Mahon, F.X. and Etienne, G., 2014, Deep molecular response in chronic myeloid leukemia: the new goal of therapy? 20, Clin. Cancer Res. 2: 310-322.

[29] Moore, F.R., Yang, F. and Press, R.D., 2013, Detection of BCR-ABL1 kinase domain mutations causing imatinib resistance in chronic myelogenous leukemia, Methods Mol. Biol. 999: 25-39.

[30] Iqbal, Z., Aleem, A., Iqbal, M., Naqvi, M.I., Gill, A., Taj, A.S., Qayyum, A., ur-Rehman, N., Khalid, A.M., Shah, I.H., Khalid, M., Haq, R., Khan, M., Baig, S.M., Jamil, A., Abbas,

M.N., Absar, M., Mahmood, A., Rasool, M. and Akhtar, T., 2013, Sensitive detection of pre-existing BCR-ABL kinase domain mutations in CD34+ cells of newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia patients is associated with imatinib resistance: Implications in the post-imatinib era 8, PLoS One 2: e55717.

[31] Elias, M.H., Baba, A.A., Azlan, H., Rosline, H., Sim, G.A., Padmini, M., Fadilah, S.A. and Ankathil, R., 2014, BCR-ABL kinase domain mutations, including 2 novel mutations in imatinib resistant Malaysian chronic myeloid leukemia patients-Frequency and clinical outcome 38, Leuk. Res. 4: 454-459.

[32] Qin, Y., Chen, S., Jiang, B., Jiang, Q., Jiang, H., Li, J., Li, L., Lai, Y., Liu, Y. and Huang, X., 2011, Characteristics of BCR-ABL kinase domain point mutations in Chinese imatinib-resistant chronic myeloid leukemia patients 90, Ann. Hematol. 1: 47-52.

[33] Nardi, V., Azam, M. and Daley, G.Q., 2004, Mechanisms and implications of imatinib resistance mutations in BCR-ABL 11, Curr. Opin. Hematol. 1: 35-43.

[34] Khorashad, J.S., Kelley, T.W., Szankasi, P., Mason, C.C., Soverini, S., Adrian, L.T., Eide, C.A., Zabriskie, M.S., Lange, T., Estrada, J.C., Pomicter, A.D., Eiring, A.M., Kraft, I.L., Anderson, D.J., Gu, Z., Alikian, M., Reid, A.G., Foroni, L., Marin, D., Druker, B.J., O'Hare, T. and Deininger, M.W., 2013, BCR-ABL1 compound mutations in tyrosine kinase inhibitor-resistant CML: frequency and clonal relationships 121, Blood 3: 489-498.