Филадельфи хромосомыг илрүүлсэн генетикийн шинжилгээний зарим үр дүн

Б.Пүрэвбуян[1,3], Б.Батнасан[3], Э.Солонго[3], Э.Баасансүрэн[3], Ц.Одгэрэл[2], Ц.Алтансүх[1]

[1]АШУҮИС, Био-Анагаахын сургууль, Молекул биологи-Удамзүйн тэнхим
[2]АШУҮИС, Анагаах ухааны сургууль, Цус судлалын тэнхим
[3]Бона вита эмнэлзүйн нэгдсэн төв лаборатори
Цахим шуудан: Bpurevbuyan@gmail.com, Утас: 99836306

Түлхүүр үг:
Транслокаци
BCR-ABL1
Полимеразын гинжин урвал
Экзон
Тирозин киназа

Товч утга:
Үндэслэл: Архаг миелоид эсийн цусны хорт хавдар үүсгэдэг гол шалтгаан нь филадельфи хромосом юм. Филадельфи хромосом нь 9 болон 22 дугаар хромосомын хооронд хромосомын транслокаци явагдаж *BCR-ABL1* генийг үүсгэснээр нөхцөлддөг. Архаг миелоид лейкемийн оношийг тодруулах, эмийн тун болон эмчилгээний үр дүнг хянах зорилгоор *BCR-ABL1* генийг илрүүлэх болон тоолох шинжилгээг хийх зайлшгүй шаардлагатай байдаг. **Зорилго:** Бодит хугацааны полимеразын гинжин урвалын (БХ-ПГУ) шинжилгээгээр цусны хавдартай хүмүүсийн дунд Филадельфи хромосомыг илрүүлж, хувилбаруудыг тодорхойлох, эмчилгээний үр дүнтэй харьцуулах зорилгын хүрээнд судалгааг хийлээ. **Арга, аргачлал:** Судалгааг 2022 оны 8 дугаар сараас 2023 оны 1 дүгээр сарын хооронд нийт 15 үйлчлүүлэгчийн сорьцод мультиплекс полимеразын гинжин урвалын шинжилгээ болон бодит хугацааны полимеразын гинжин урвалын шинжилгээг хийж тоон болон чанарын үнэлгээ хийсэн. **Үр дүн:** Бидний судалгаанд 14-72 насны 15 хүн хамрагдсан бөгөөд дундаж нас нь 42.9 жил байв. Судалгаанд хамрагдагсдад мутаци тодорхойлох шинжилгээ хийхэд 13 оролцогчид BCR-ABL1 P210 хувилбар илэрсэн ба эмчилгээ болон шинжилгээний үр дүнг харгалзан үзэж 13 оролцогчид мутаци тоолох шинжилгээ хийж олон улсын стандарт хэмжилзүйн аргаар үнэлэхэд 46.1% (6)-д нь *BCR-ABL1* ген өндөр тоологдсон бол үлдсэн 53.9% (7)-д нь *BCR-ABL1* ген хяналтын түвшинд буюу молекулын түвшин (МТ) болон цитогенетикийн түвшинд (ЦГТ) байлаа. **Дүгнэлт:** BCR-ABL1 шинжилгээ нь архаг миелоид лейкемитэй өвчтөнүүдийн эмчилгээний үр дүнг хянах болон оношийг баталгаажуулахад өндөр ач холбогдолтой байна.

Үндэслэл: Дэлхийн Эрүүл Мэндийн Байгууллагын (ДЭМБ) 2019 оны тайлан мэдээнд 70-аас доош насанд тохиолдсон нас баралтыг шалтгаанаар авч үзэхэд хорт хавдар нь дэлхийн 183 орны 112 оронд тэргүүлэх шалтгаан болж байна гэж тэмдэглэсэн байна. 2020 онд дэлхий дахинд 19.3 сая хорт хавдрын шинэ тохиолдол илэрч 9.9 сая нас баралт бүртгэгдсэн байна.[1] Энэ тоо 2040 онд ойролцоогоор 28.4 сая хорт хавдрын шинэ тохиолдол бүртгэгдэх төлөвтэй байна. ДЭМБ-н судалгаанд нийтлэг тохиолдож буй хорт хавдруудаас цусны хорт хавдар 2020 онд 474.519 шинэ тохиолдол бүртгэгдэж 311.594 нас баралт тохиолджээ.[1] Монгол улсын хувьд 2020 онд хорт хавдрын 6438 шинэ тохиолдол илэрч 4250 нас баралт бүртгэгдсэн баримт байна. Түүнчлэн хавдрын төрлөөс цусны хорт хавдар жилд дунджаар 45 орчим шинэ тохиолдол илрэх ДЭМБ-ын тооцоолол гарсан.[1]

Цусны хорт хавдрыг дотор нь цочмог миелоид лейкеми, архаг миелоид лейкеми, цочмог лимфоид лейкеми, архаг лимфоид лейкеми гэж 4 ангилдаг. Лейкемийн шинэ тохиолдлын 15%-ийг архаг миелоид лейкеми илэрдэг нь судалгаанд өгүүлэгдсэн.[3] Өвчлөлийн тархалт бүс нутаг бүрд харилцан адилгүй бөгөөд 100,000 хүн ам тутамд тохиолдох өвчлөлийн тоо 0.4-1.75 хүртэл хэлбэлзэж байгаа нь хэд хэдэн судалгаанд гарсан байна.[4-6] Хавдар үүсэх шалтгааны

нэг нь генетикийн хүчин зүйл байдаг. Архаг миелоид лейкеми үүсгэдэг гол шалтгаан нь филадельфи хромосом (*BCR-ABL1*) болох нь судалгаагаар тогтоогдсон байна.[2] Филадельфи хромосом нь архаг миелоид лейкемийн тохиолдлын 90-ээс дээш хувьд илэрдэг.

Судлаачдын тогтоосноор Филадельфиа хромосом нь архаг миелоид лейкемийн гол шалтгаан юм.[7] Филадельфиа хромосом нь 9 дүгээр хромосомын урт мөрний 34-р байрлалд байдаг ABL ген, 22 хромосомын урт мөрний 11-р байрлалд байдаг BCR ген хооронд хромосомын транслокаци явагдаж [t(9;22)(q34;q11)] BCR-ABL1 генийг үүсгэдэг болох нь хэд хэдэн судалгаанд тогтоогдсон байна.[8] Транслокаци явагдах үед ABL гений экзоноор N хэсэг тасарч BCR гентэй холбогдсоноор тирозин киназа фосфоржиж идэвхтэй байдалд шилжсэнээр эсийн хуваагдал тасралтгүй явагдаж хавдар үүсэх үндсэн шалтгаан болдогийг дурджээ.[9] BCR гений тасрах цэгүүдийн байршил маш их хувьсдаг бөгөөд хэддүгээр экзон, интроноор тасарч ABL гентэй холбогдсоноор нь p210, p190, p230 гэж 3 ангилдаг байна.[10] Филадельфиа хромосом нь гадаад орчны хүчин зүйл, тэр дундаа химийн бодис болон цацраг туяаны нөлөөнөөс шалтгаалж үүсдэг гэж үздэг ч үндсэн шалтгаан нь бүрэн тайлагдаагүй байна. BCR-ABL1 ген нь цочмог лимфобластын лейкеми, цочмог миелойд лейкемид бага хувиар илэрдэг нь судалгаануудад хэвлэн нийтлэгдсэн байна.[11,12]

BCR-ABL1 генийг илрүүлэх хэд хэдэн шинжилгээний арга байдаг. Одоогоор дэлхий дахинд кариотип тодорхойлох, FISH, полимеразын гинжин урвал болон нуклеотидын дараалал тодорхойлох зэрэг аргуудаар уг генийг илрүүлж байна. Оношийг тодруулах, эмийн тун болон эмчилгээний үр дүнг тодорхойлох зорилгоор BCR-ABL1 генийг илрүүлэх болон тоолох шинжилгээг хийх зайлшгүй шаардлагатай байна.[13] БХ-ПГУ шинжилгээ 100,000 хүртэлх хэвийн эсээс нэг архаг миелоид лейкеми (АМЛ) эсийг илрүүлэх боломжтой гэжээ.[14]

BCR-ABL1 гений гол эмчилгээ болох Иматиниб эмийн эмнэлзүйн туршилт 1998 онд эхэлсэн бөгөөд 2001 оны 12-р сараас АНУ-д анх эмчилгээнд хэрэглэж эхэлсэн байна.[15] Эмийн хөгжил тасралтгүй явагдаж одоогоор хэд хэдэн төрлийн эм шинээр гарж эмчилгээнд хэрэглэгдэж байна. Иматиниб эмийн эмчилгээний үр дүнд 1993 оны судалгаанд өвчтөн 5 жил амьдрах магадлал 31% байсан бол 2009 онд 59%, 2016 онд 70% болж өссөн тухай дурьджээ.[16]

Монгол улсын хувьд Улсын Нэгдүгээр Төв Эмнэлгийн хяналтад байдаг архаг миелоид лейкеми оношлогдсон BCR-ABL1 гений шинжилгээ өгөх хэрэгцээтэй нийт 120 орчим хүн байдаг тухай баримт байна. Манай оронд энэ төрлийн гений шинжилгээг тогтмол хийдэггүй учир оролцогчид гадаад оронд тогтмол хугацаанд явж шинжилгээ хийлгэж эмчилгээний үр дүнгээ хянуулж байгаа нь оролцогчдод олон талаараа хүндрэл учруулж буйн энэхүү судалгааны үндэслэл болж байна.

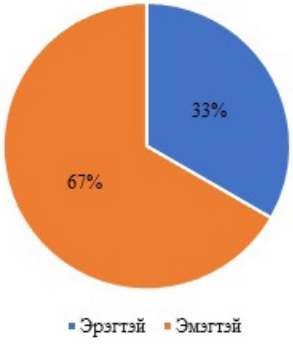
Зорилго: Бодит хугацааны полимеразын гинжин урвалын (БХ-ПГУ) шинжилгээгээр цусны хавдартай хүмүүсийн дунд Филадельфи хромосомыг илрүүлж, хувилбаруудыг тодорхойлон эмчилгээний үр дүнтэй харьцуулах.

Зорилт:

1. Цусны хавдартай хүмүүсийн дунд *BCR-ABL1* генийг илрүүлэх
2. *BCR-ABL1* гений хувилбаруудыг тодорхойлох
3. Цусны хавдрын эсрэг эмчилгээтэй, дахилттай хүмүүсийн дунд *BCR-ABL1* генийг илрүүлэх

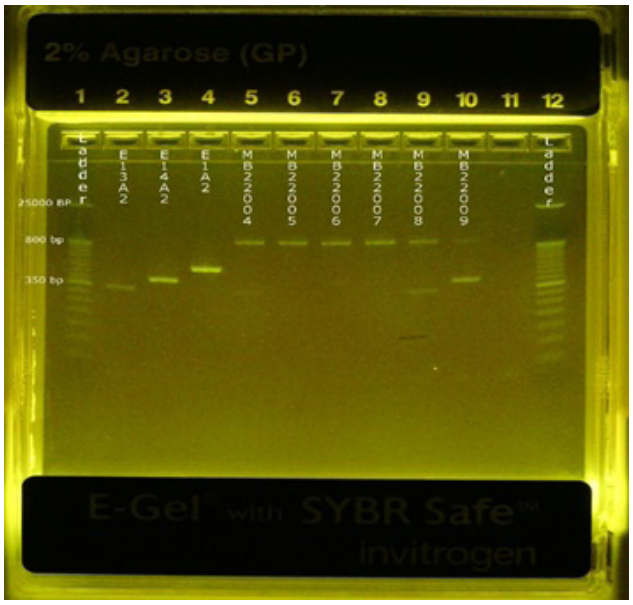
Арга, аргачлал: Энэхүү судалгааг Анагаахын Шинжлэх Ухааны Үндэсний Их Сургуулийн Судалгааны ёс зүйн хяналтын хорооноос зөвшөөрөл авч 2022 оны 8 дугаар сараас 2023 оны 1 дүгээр сарын хооронд Улаанбаатар хотод Бонавита эмнэлзүйн нэгдсэн төв лабораторид түшиглэн хийж гүйцэтгэлээ. Судалгааг лабораторид суурилсан нэг агшны загвараар хийлээ. Судалгаанд оролцогчдын захын судаснаас 5-10 мл бүхэл цус EDTA агуулсан хуруу шилэнд авч PROMEGA компанийн РНХ ялгах цомог ашиглан РНХ-ийг ялгалаа. РНХ-ийн гарцыг Thermofisher Qubit 3.0 флюрометр аппаратаар тодорхойлов. SuperScript™ IV VILO™ цомог ашиглан урвалжийн зааврын дагуу кДНХ нийлэгжүүллээ. BCR-ABL1 генийг илрүүлэх шинжилгээг *BCR-ABL1* мультиплекс ПГУ цомог ашиглан шинжилгээг хийж үр дүнг E-Gel™ 2%-ийн агароз гельд гүйлгэж хариуг баталгаажуулав. BCR-ABL1 P210 тоолох БХ-ПГУ шинжилгээг Qiagen BCR-ABL1 Mbcr IS-MMR цомог ашиглан шинжилгээг Light-cycler 480 аппаратад хийж гүйцэтгэв. Бид судалгааны үр дүнг SPSS 17.0 программыг ашиглан судалгаанд оролцогчдын нас хүйсийг шалтгаан хамраалтай холбон мөн эмийн эмчилгээ хийлгэж байгаа бүлгийг эмчилгээнд ороогүй бүлэгтэй харьцуулан үр дүнг боловсруулсан.

Үр дүн: Бидний судалгаанд 14-72 насны 15 хамрагдагсдын дундаж нас нь 42.9 жил байлаа. Мөн судалгаанд оролцогчдыг хүйсээр авч үзвэл 67% (10) нь эмэгтэй, 33% (5) нь эрэгтэйчүүд байлаа. Нас болон хүйс нь АМЛ өвчлөлийн тархалтад статистик ач холбогдолгүй байна ($p<0$). (Зураг 1).



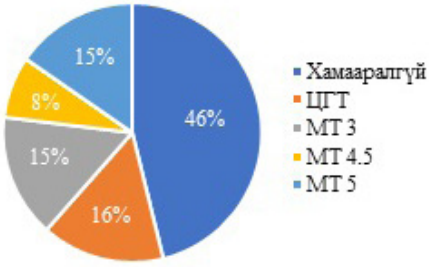
Зураг 1. Судалгаанд оролцогчдын хүйсийн харьцаа

Судалгаанд оролцсон 15 оролцогчийн сорьцод хийсэн ПГУ шинжилгээний үр дүнд 86.6% (13) оролцогчид BCR-ABL1 P210 хувилбар илэрсэн бол BCR-ABL1 P190 хувилбар илрээгүй BCR-ABL1 P210 хувилбар АМЛ өвчлөлийн үндсэн шалтгаан болж байгаа нь статистик үнэн магадлалтай байна (p=0.164). (Зураг 2).



Зураг 2. BCR-ABL1 ген илрүүлсэн үр дүн

BCR-ABL1 P210 тоолох БХ-ПГУ шинжилгээнд анх удаа BCR-ABL1 *ген* илрүүлэх шинжилгээнд сөрөг гарсан, BCR-ABL1 бай эмчилгээнд ороогүй хасах шалгууруар 2 оролцогч хасагдаж, нийт 13 оролцогчийн кДНХ дээр BCR-ABL1 P210 тоолох БХ-ПГУ шинжилгээ хийж хариуг олон улсын стандарт хэмжилзүйн түвшнээр ангилахад мутацийн хэмжээ өндөр буюу хяналтын түвшинд хамааралгүй 46.4% (6) оролцогч, цитогенетикийн түвшинд (ЦГТ) 15.3% (2), МТ 3 дугаар түвшинд 15.3% (2), МТ4.5 түвшинд 7.7% (1), МТ 5 дугаар түвшинд 15.3% (2) оролцогчид байв (Зураг 3).



Зураг 3. BCR-ABL1 P210 тоолох БХ-ПГУ шинжилгээний үр дүн

Бид судалгаанд оролцогчдыг BCR-ABL1 бай эмчилгээнд хамрагдалтаар задалж үзэхэд BCR-ABL P210 тоолох шинжилгээнд хамрагдсан 13 оролцогчдын 61.5% (8) оролцогч эмчилгээнд тогтмол хамрагдаж байсан өгүүлэмжтэй байсан бол 38.5% (5) оролцогч эмчилгээнд огт хамрагдаагүй өгүүлэмжтэй байсан. Эмчилгээнд хамрагдаж байсан 8 оролцогчийн эмчилгээний үр дүнг үнэлэхэд 87% (7) оролцогчид эмчилгээ үр дүнтэй, 13% (1) оролцогчийн эмчилгээ үр дүнгүй байсан (Зураг 4). Эмчилгээ хийлгэх нь АМЛ өвчлөлийн хүндрэлийг бууруулахад статистик ач холбогдолтой байна (p=0.738).



Зураг 4. BCR-ABL1 бай эмчилгээний үр дүн

Хэлцэмж: Mendizabal A (2013) нарын судалгаанд 2002-2010 онд дэлхий нийтэд АМЛ оношлогдсон оролцогчдыг газар зүйн байрлалаар нь ангилсан бөгөөд Ази тивд АМЛ оношлогдсон хүмүүсийн дундаж нас бусад тивүүдтэй харьцуулахад хамгийн бага буюу 47 жил байсныг тодорхойлсон бөгөөд энэ бидний судалгаанд оролцогчдын дундаж нас 42.9 жил байсантай ойролцоо байна.[17]

Rostami G (2015) болон Moore F (2013) нарын судалгаанд BCR-ABL1 ген илэрсэн өвчтөнүүдэд хромосомын мутацийн хувилбар тодорхойлох шинжилгээ хийхэд 95%-д BCR-ABL1 P210 хувилбар илэрсэн нь бидний судалгаанд хромосомын мутаци илэрсэн 13 оролцогчдод 100% (13) BCR-ABL1 P210 хувилбар илрүүлсэнтэй дүйж байна.[18,19]

Druker B (2008) нарын судалгаанд BCR-ABL1 ген илэрсэн оролцогчдод иматиниб эмийн эмчилгээ хийхэд өвчтөнүүдийн ойролцоогоор 93% нь өвчний явц намжиж хүндрэх эрсдэл багассан бөгөөд бидний судалгаагаар эмчилгээ хийлгэсэн оролцогчдын 87% (7)-д эмчилгээ үр дүн өгч хүндрэх эрсдэлгүй болсон нь мөн адил эмчилгээний үр дүн өндөр байгааг илтгэж байна.[16]

Дүгнэлт:

1. Бидний судалгаанд хамрагдсан архаг миелоид лейкеми сэжиглэгдсэн 15 оролцогчдод хромосомын мутаци илрүүлэх шинжилгээ хийхэд 86.6% (13)-д филадельфи хромосом илэрч байна.
2. Хувилбарыг тодорхойлох шинжилгээгээр *BCR-ABL1* P210 хувилбар филадельфи хромосом илэрсэн бүх өвчтөнд 100% (13)-д тодорхойлогдлоо.
3. Цусны хавдрын эмийн эмчилгээ хийлгэсэн оролцогчдын 87% (7)-д мутацийн хэмжээ хяналтын түвшинд буюу эмчилгээ үр дүнтэй байна.

Талархал: Бидний судалгааг тусалж дэмжсэн АШУҮИС, Био-АС Молекул биологи удамзүйн тэнхим, Бонавита эмнэлзүйн нэгдсэн төв лабораторийн удирдлагын хамт олонд талархал илэрхийлье.

Ном зүй:

1. *Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. CA Cancer J Clin. May*

2021;71(3):209-249. doi:10.3322/caac.21660
2. Quintas-Cardama A, Cortes JE. Chronic myeloid leukemia: diagnosis and treatment. Mayo Clin Proc. Jul 2006;81(7):973-88. doi:10.4065/81.7.973
3. Abdulmawjood B, Costa B, Roma-Rodrigues C, Baptista PV, Fernandes AR. Genetic Biomarkers in Chronic Myeloid Leukemia: What Have We Learned So Far? Int J Mol Sci. Nov 19 2021;22(22) doi:10.3390/ijms222212516
4. Hoglund M, Sandin F, Simonsson B. Epidemiology of chronic myeloid leukaemia: an update. Ann Hematol. Apr 2015;94 Suppl 2:S241-7. doi:10.1007/s00277-015-2314-2
5. Chang CS, Lee K, Yang YH, Lin MT, Hsu CN. Estimation of CML incidence: disagreement between national cancer registry and health claims data system in Taiwan. Leuk Res. May 2011;35(5):e53-4. doi:10.1016/j.leukres.2010.12.034
6. Chen Y, Wang H, Kantarjian H, Cortes J. Trends in chronic myeloid leukemia incidence and survival in the United States from 1975 to 2009. Leuk Lymphoma. Jul 2013;54(7):1411-7. doi:10.3109/10428194.2012.745525
7. Nowell PC. The minute chromosome (Phl) in chronic granulocytic leukemia. Blut. Apr 1962;8:65-6. doi:10.1007/BF01630378
8. Chasseriau J, Rivet J, Bilan F, et al. Characterization of the different BCR-ABL transcripts with a single multiplex RT-PCR. J Mol Diagn. Nov 2004;6(4):343-7. doi:10.1016/S1525-1578(10)60530-2
9. Kurzrock R, Gutterman JU, Talpaz M. The molecular genetics of Philadelphia chromosome-positive leukemias. N Engl J Med. Oct 13 1988;319(15):990-8. doi:10.1056/NEJM198810133191506
10. Kang ZJ, Liu YF, Xu LZ, et al. The Philadelphia chromosome in leukemogenesis. Chin J Cancer. May 27 2016;35:48. doi:10.1186/s40880-016-0108-0
11. Zhang LJ, Gan YM, Yu L. Occurrence of BCR/ABL fusion gene in a patient with acute promyelocytic leukemia. Med Oncol. Jan 2015;32(1):382. doi:10.1007/s12032-014-0382-0
12. Verrma SP, Dutta TK, Vinod KV, Dubashi B, Ariga KK. Philadelphia chromosome positive pre-T cell acute lymphoblastic leukemia: a rare case report and short review. Indian J Hematol Blood Transfus. Sep 2014;30(Suppl 1):177-9. doi:10.1007/s12288-013-0314-8
13. Radich JP. How I monitor residual disease in chronic myeloid leukemia. Blood. Oct 15 2009;114(16):3376-81. doi:10.1182/blood-2009-02-163485
14. Kockerols CCB, Valk PJM, Levin MD, Pallisgaard N, Cornelissen JJ, Westerweel PE. Digital PCR for BCR-ABL1 Quantification in CML: Current Applications in Clinical Practice. Hemasphere. Dec 2020;4(6):e496. doi:10.1097/HS9.0000000000000496
15. Cohen MH, Williams G, Johnson JR, et al. Approval summary for imatinib mesylate capsules in the treatment of chronic myelogenous leukemia. Clin Cancer Res. May 2002;8(5):935-42.
16. Druker BJ. Translation of the Philadelphia chromosome into therapy for CML. Blood. Dec 15 2008;112(13):4808-17. doi:10.1182/blood-2008-07-077958
17. Mendizabal AM, Garcia-Gonzalez P, Levine PH. Regional variations in age at diagnosis and overall survival among patients with chronic myeloid leukemia from low and middle income countries. Cancer Epidemiol. Jun 2013;37(3):247-54. doi:10.1016/j.canep.2013.01.002
18. Rostami G, Hamid M, Yaran M, Khani M, Karimipoor M. Incidence and clinical importance of BCR-ABL1 mutations in Iranian patients with chronic myeloid leukemia on imatinib. J Hum Genet. May 2015;60(5):253-8. doi:10.1038/jhg.2015.11
19. Moore FR, Rempfer CB, Press RD. Quantitative BCR-ABL1 RQ-PCR fusion transcript monitoring in chronic myelogenous leukemia. Methods Mol Biol. 2013;999:1-23. doi:10.1007/978-1-62703-357-2_1

Some of the results genetic analysis that detected the Philadelphia chromosome

Purevbuyan B[1,3], Batnasan B[3], Solongo E[3], Baasansuren E[3], Odgerel Ts[2], Altansukh Ts[1]

[1]MNUMS, School of Biomedicine, Department of Molecular Biology and Genetics
[2]MNUMS, School of Medicine, Department of Hematology
[3]Bona Vita Integrated Clinical Central Laboratory and Cancer
E-mail: bpurevbuyan@gmail.com, Tel:+976-99836306

Background: The Philadelphia chromosome is the main cause of chronic myeloid leukemia. The Philadelphia chromosome is conditioned by a chromosomal translocation between chromosomes 9 and 22, creating the BCR-ABL1 gene. Detection and quantification assay of the BCR-ABL1 gene is essential to determine the diagnosis of chronic myeloid leukemia, and to determine drug dosage and treatment results.
Aim: To determine identify the Philadelphia chromosome by real time polymerase chain reaction assay in individuals with leukemia, identify variants, and compare treatment outcomes.
Materials and Methods: The study was carried out between in August 2022 and December 2022, quantitatively and qualitatively assay evaluated by multiplex and real-time polymerase chain reaction analysis on a total of 15 patient samples.
Results: The average age of 15 participants aged 14-72 was 42.9 years. P210 mutation was found in 13 patients during the mutation analysis of the total study participants. the results of treatment and analysis, 13 patients were tested for mutation counting and evaluated by the international standard metrology method. In 6 patients, BCR-ABL1 mutation was highly counted, while in the remaining 7 patients, BCR-ABL1 mutation was at the control level or molecular level and Complete Cytogenetic Response.
Conclusion: BCR/ABL1 testing has high therapeutic and diagnostic value in patients with chronic myeloid leukemia.

Keywords: Translocation, BCR-ABL1, Polymerase Chain Reaction, Exon, Tyrosine kinase