

การศึกษาความผิดปกติของยีน Thiopurine methyltransferase (TPMT)
จากประสบการณ์การให้บริการทางห้องปฏิบัติการโรงพยาบาลศิริราช 18 ปี
The study of thiopurine methyltransferase (TPMT) variant
from laboratory service experience for 18 years at Siriraj hospital

กชปิณฺช จันทรสิงห์¹ ปรียานันท์ ศิริประภาภัสส์¹ และ เจษฎา บัวบุญนา^{1*}

Kochpinchon Chansing¹, Preeyanun Siraprapapat¹ and Jassada Buaboonnam^{1*}

บทคัดย่อ

Thiopurine S-methyltransferase (TPMT) เป็นเอนไซม์ย่อยสลายยาในกลุ่ม thiopurine ได้แก่ 6-mercaptopurine (6-MP), 6-thioguanine (6-TG) ซึ่งเป็นยาที่ใช้อย่างแพร่หลายในการรักษาโรคมะเร็งเม็ดเลือด อย่างไรก็ตาม ผู้ป่วยที่มีความหลากหลายของ TPMT ทำให้ระดับเอนไซม์ TPMT ลดลง ผลข้างเคียงของการรักษาด้วยยาขนาดมาตรฐานของยาในกลุ่มนี้ทำให้เกิดพิษกดการทำงานของไขกระดูก

ห้องปฏิบัติการสาขาวิชาโลหิตวิทยาและออร์โคโลยีเปิดให้บริการตรวจวิเคราะห์ Thiopurine S-methyltransferase (TPMT) variant จำนวน 5 ชนิดด้วยเทคนิค Allele-specific polymerase chain reaction (AS-PCR) ในการตรวจวิเคราะห์ TPMT*2 และเทคนิค PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) ในการตรวจวิเคราะห์ TPMT*3A, *3B, *3C และ *6 จากการให้บริการ 18 ปีที่ผ่านมาตั้งแต่ปี พ.ศ.2547–2564 มีตัวอย่างเลือดคนไทยที่ส่งตรวจวิเคราะห์ TPMT variant ทั้งหมด 1,087 ตัวอย่าง จากผลการตรวจวิเคราะห์พบ genotype 3 แบบ คือ TPMT*1/*1, TPMT*3A/*1 และ TPMT*3C/*1 ที่ร้อยละ 93.84, 0.09 และ 6.07 ตามลำดับ ซึ่งพบ variant เพียง 2 ชนิด คือ TPMT*3A และ *3C เมื่อนับจำนวน allele ทั้งหมดพบชนิดของ allele ที่ร้อยละ 0.05 และ 3.04 ตามลำดับเมื่อเทียบกับ allele ปกติ (TPMT*1) ที่ร้อยละ 96.91

จากการศึกษาพบว่าการตรวจวิเคราะห์ยีน TPMT*3C พบมากที่สุดในประชากรไทยและสูงกว่าในประชากรทั่วไปในแถบเอเชีย ซึ่งการที่แพทย์ทราบข้อมูลความผิดปกติของยีน TPMT จึงเป็นประโยชน์ต่อการวางแผนการรักษา ผู้ป่วยทำให้แพทย์สามารถปรับลดขนาดยาให้เหมาะสมกับผู้ป่วยแต่ละรายเพื่อให้เกิดผลข้างเคียงน้อยที่สุดและประสบความสำเร็จในการรักษาได้มากยิ่งขึ้น

คำสำคัญ : ยีน Thiopurine methyltransferase; ยาในกลุ่ม Thiopurine; เทคนิค AS-PCR; เทคนิค PCR-RFLP

¹ สาขาวิชาโลหิตวิทยาและออร์โคโลยี ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล

¹ Division of Hematology-Oncology, Department of Pediatrics, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University

* Corresponding Author: e-mail: onco008@yahoo.com

Abstract

Thiopurine S-methyltransferase (*TPMT*) is a cytosolic enzyme involving in degradation of thiopurine agents including 6-mercaptopurine (6-MP), 6-thioguanine (6-TG). Both 6-MP and 6-TG are widely used for treatment of several hematologic malignancies. However, Patients harboring polymorphism of *TPMT* resulting in decreased enzyme activity may develop severe myelosuppression after being treated with standard doses of such agents.

Hematology and Oncology laboratory service evaluated the use of allele-specific polymerase chain reaction (AS-PCR) for *TPMT**2, and PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) for *TPMT**3A, *3B,*3C, and *6 detections. There were 1,087 samples of Thai patients for 18 years of laboratory service, from 2004 to 2021. The percentage of genotype *TPMT**1/*1, *TPMT**3A/*1 and *TPMT**3C/*1 were 93.84, 0.09 and 6.07 respectively. The percentage of *TPMT**3A and *3C were 0.05 and 3.04 respectively, while the *TPMT**1 allele was 96.91.

In this study, *TPMT**3C is the most prevalent mutant allele in Thai populations and higher than that has been reported in other Asian populations. Identification of individual *TPMT* genotype would aid at optimizing an initial thiopurine dose for individuals to minimize risk of toxicities and succeed in treatment.

Keywords: Thiopurine methyltransferase, Thiopurine, AS-PCR, PCR-RFLP

หลักการและเหตุผล

ยีน Thiopurine S-methyltransferase (*TPMT*) อยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 6 ในตำแหน่ง 6p22.3 มีความยาวประมาณ 34 กิโลเบส ประกอบด้วย 10 exon 9 intron (Szumlanski et al., 1996) มีการถ่ายทอดแบบ autosomal dominant เป็นเอนไซม์ในเม็ดเลือดแดงมีบทบาทในการกระตุ้นปฏิกิริยา S-methylation ในสารประกอบพวก aromatic และ heterocyclic sulphhydryl compounds ซึ่งมีอยู่ในยาในกลุ่ม thiopurine เช่น 6-mercaptopurine (6-MP), 6-thioguanine (6-TG) ซึ่งเป็นยาที่ใช้รักษาโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวเฉียบพลันชนิดลิมโฟบลาสต์ (acute lymphoblastic leukemia : ALL) มะเร็งเม็ดเลือดขาวเรื้อรังชนิดมัยอีลอยด์ (chronic myeloid leukemia : CML) มะเร็งเม็ดเลือดขาว

เฉียบพลันชนิดมัยอีลอยด์ (acute myeloid leukemia : AML) และมะเร็งต่อมน้ำเหลือง (lymphoblastic lymphoma) ส่วน azathioprine (AZA) เป็นยากดภูมิคุ้มกันใช้รักษาโรคทางภูมิคุ้มกันผิดปกติหลายชนิด (Coulthard & Hogarth, 2005) ปัจจุบันพบว่ายีน *TPMT* มีความหลากหลายทางพันธุกรรมมากกว่า 30 allele โดยความหลากหลายทางพันธุกรรมส่วนใหญ่เป็นการเกิด single nucleotide polymorphism (SNP) ของยีน *TPMT* ส่งผลทำให้เอนไซม์ *TPMT* มีความสามารถในการทำงานลดลง (Appell et al., 2010; Booth et al., 2011) ในผู้ป่วยที่มีระดับเอนไซม์ *TPMT* ต่ำหรือไม่มีเลย (*TPMT* deficiency) เมื่อได้รับยาในกลุ่ม thiopurine จะมีโอกาสเกิดผลข้างเคียงสูงกว่าผู้ป่วยที่มีระดับเอนไซม์ *TPMT* ปกติ ผลข้างเคียง

ของยากลุ่มนี้อาจรุนแรงถึงขั้นทำให้เสียชีวิตโดยเฉพาะ
การเกิดพิษกดการทำงานของไขกระดูก

ปัจจุบันมีงานวิจัยรายงานความผิดปกติทางพันธุกรรม (variant) ของยีนที่ทำหน้าที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ TPMT กับระดับการทำงานของเอนไซม์ TPMT ว่ามีความสัมพันธ์กัน (Relling et al., 2011) เป็นที่ทราบกันว่าผู้ป่วยแต่ละรายจะมีการตอบสนองต่อยาชนิดเดียวกันไม่เหมือนกันทั้งในด้านผลการรักษาและผลข้างเคียง ดังนั้นถ้าผู้ป่วยได้รับการตรวจหา variant ของยีน *TPMT* ก่อนการให้ยาจะเป็นประโยชน์ต่อแพทย์ในการวางแผนการให้ยาที่เหมาะสมกับผู้ป่วยแต่ละรายตามลักษณะทางพันธุกรรมของผู้ป่วย เพื่อป้องกันและลดอาการข้างเคียงที่อาจเกิดขึ้นกับผู้ป่วย ส่งผลให้ประสบความสำเร็จในการรักษาได้มากยิ่งขึ้น

ห้องปฏิบัติการสาขาวิชาโลหิตวิทยาและอองโคโลยีเปิดให้บริการตรวจวิเคราะห์ *TPMT* variant 5 ชนิด ได้แก่ *2 (238G>C), *3A (460G>A, 719A>G), *3B (460G>A), *3C (719A>G) และ *6 (539A>T) ตรวจด้วยเทคนิค Allele-specific polymerase chain reaction (AS-PCR) ในการตรวจ *TPMT**2 และเทคนิค PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) ในการตรวจ *TPMT**3A, *3B, *3C และ *6 ซึ่งเปิดให้บริการมาตั้งแต่ปี พ.ศ.2547 การศึกษา *TPMT* variant ในประเทศไทยยังไม่แพร่หลายทำให้ยังมีข้อจำกัด การศึกษาครั้งนี้จึงเป็นการเพิ่มฐานข้อมูลของ *TPMT* variant ในประเทศไทย

วัตถุประสงค์ในการวิจัย

เพื่อศึกษาความชุกของ *TPMT* variant 5 ชนิด คือ *TPMT**2, *3A, *3B, *3C และ *6 ในตัวอย่างที่ส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการสาขาวิชาโลหิตวิทยาและอองโคโลยี ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2547 – ปี พ.ศ. 2564 เป็นเวลา 18 ปี

วิธีการศึกษา

1. ตัวอย่างสิ่งส่งตรวจ

ตัวอย่างที่ศึกษาเป็นตัวอย่างเลือดของคนไทยเก็บในสารกันเลือดแข็งชนิด EDTA ส่งตรวจตั้งแต่ปี พ.ศ. 2547-2564 จำนวน 1,087 ราย นำตัวอย่างเลือดสกัด DNA ด้วยวิธี Phenol-chloroform (Green & Sambrook, 2012) หรือวิธี Salting out (Miller et al., 1988)

2. วิธีการตรวจ

นำตัวอย่าง DNA ที่ส่งตรวจ *TPMT* variant 5 ชนิด คือ *TPMT**2, *3A, *3B, *3C และ *6 ตรวจด้วยเทคนิค AS-PCR ในการตรวจ *TPMT**2 และเทคนิค PCR-RFLP ในการตรวจ *TPMT**3A, *3B, *3C และ *6 กระบวนการทำปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วย 1X PCR BIO reaction buffer, 1 unit PCR BIO HS Taq DNA polymerase (PCR Biosystems, England) และ primer ที่จำเพาะต่อการตรวจ variant แต่ละชนิด ดังแสดงตารางที่ 1 (Kham et al., 2002; Otterness et al., 1997; Yates et al., 1997)

2.1 ขั้นตอนการตรวจหา *TPMT**2 variant

การตรวจ *TPMT**2 ใช้เทคนิค AS-PCR เตรียม primer ที่จำเพาะต่อการตรวจ *TPMT**2 รวมทั้ง primer ที่เป็น internal control ซึ่ง primer แบ่งเป็น wild type primer (WT) และ mutant primer (MT) ในการตรวจ *TPMT**2 ใช้ negative control ที่ผ่านการทำ sequencing ไม่พบ variant ของ *TPMT**2 (Treesucon et al., 2017) *TPMT**2 เป็น variant ที่ยังไม่พบในประเทศไทยจึงไม่มี positive control หากมีการตรวจพบ variant ของ *TPMT**2 ต้องตรวจสอบโดยการทำ sequencing เพื่อยืนยันผลการตรวจวิเคราะห์

เตรียมส่วนผสมและนำเข้าเครื่อง Thermal cycle เพื่อทำปฏิกิริยา PCR ตามขั้นตอนดังนี้

1) ขั้นตอน Pre denaturation ที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 2 นาที

2) ขั้นตอน Denaturation ที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 15 วินาที

3) ขั้นตอน Annealing ที่อุณหภูมิ 56°C เป็นเวลา 15 วินาที

4) ขั้นตอน Extension ที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 1 นาที

5) ขั้นตอน Final extension ที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 7 นาที

จากนั้นนำ PCR product ที่ได้มาตรวจสอบผลด้วยวิธี agarose gel electrophoresis ย้อมด้วยสาร ethidium bromide และบันทึกผลด้วยเครื่องถ่ายภาพเจล (gel documentation)

ตารางที่ 1 แสดง specific primer, restriction enzyme และขนาดของ PCR product หลังทำ agarose gel electrophoresis

TPMT variant	Primer	Primer sequence 5' to 3'	restriction enzyme	ขนาด wild type allele (bp)	ขนาด variant allele (bp)
TPMT*2	P2W	GTA TGA TTT TAT GCA GGT TTG	-	254	254
	P2C	TAA ATA GGA ACC ATC GGA CAC			
	P2M	GTA TGA TTT TAT GCA GGT TTC			
Internal control For TPMT*2	C-F	CAA CTT GCT CAA GCA TAC ACT C		493	493
	D-R	AAT AAT AGG CAT AGT GAC AAG TGC			
TPMT*3A		TPMT*3B+*3C			
TPMT*3B	F	ATA ACA GAG TGG GGA GGC TGC	MwoI	267+37	304
	R	ATG TAA TAC GAC TCA CTA TAA CCT GGA TTA ATG GCA AC			
TPMT*3C	F	CAG GCT TTA GCA TAA TTT TCA ATT CCT C	AccI	293	207+86
	R	TGT TGG GAT TAC AGG TGT GAG CCA C			
TPMT*6	F	CCC TCC TGG GAA AGA AGT TTA CGT	SnaBI	208+22	230
	R	TCC AAA CTG GAA TTA TCT CCA TGT A			

2.2 ขั้นตอนการตรวจหา TPMT*3A variant

เนื่องจาก TPMT*3A เป็น combined variant ของ TPMT*3B และ TPMT*3C วิธีการตรวจด้วย conventional PCR ไม่สามารถแยก genotype TPMT*1/*3A และ TPMT*3B/*3C ได้ ดังนั้นการตรวจ TPMT*3A ใช้การตรวจ TPMT*3B และ TPMT*3C ทำควบคู่กัน

2.3 ขั้นตอนการตรวจหา TPMT*3B, *3C และ*6 variant

การตรวจ TPMT*3B, *3C และ*6 ใช้เทคนิค PCR-RFLP เตรียม primer และส่วนผสมในกระบวนการทำปฏิกิริยา PCR นำส่วนผสมเข้าเครื่อง Thermal cycle ขั้นตอนเหมือนการตรวจ TPMT*2 นำ PCR product ที่ได้มาตรวจสอบขนาดเทียบกับ 100 bp Plus DNA Ladder ซึ่งเป็น DNA มาตรฐาน

ขนาด PCR product ของ *TPMT*3B*, **3C* และ **6* ควรมีขนาด 304, 293 และ 230 bp ตามลำดับ การตรวจ *TPMT*3B* และ **3C* ใช้ positive และ negative control ที่ผ่านการทำ sequencing มาเปรียบเทียบร่วมด้วย (Treesucon et al., 2017) *TPMT*6* เป็น variant ที่ไม่มีการตรวจพบในประเทศไทยจึงไม่มี positive control ดังนั้นจะใช้ uncut PCR product เปรียบเทียบขนาด PCR fragment ร่วมด้วยหากมีการตรวจพบ variant ของ *TPMT*6* ต้องตรวจสอบโดยการทำ sequencing เพื่อยืนยันผลการตรวจวิเคราะห์

2.4 ขั้นตอนการทำ PCR product digestion

นำ PCR product ตัดด้วย restriction enzyme *MwoI*, *AccI* และ *SnaBI* ดังแสดงตารางที่ 1 ส่วนผสมของ mixture ประกอบด้วย CutSmart buffer, restriction enzyme (New England, Biolabs), PCR product และน้ำกลั่นปลอดเชื้อ incubate ที่ 60°C overnight ในการตรวจ *TPMT*3B* และ 37°C overnight ในการตรวจ *TPMT*3C* และ **6* จากนั้นนำ digested PCR product แยกขนาดด้วยวิธี agarose gel electrophoresis ย้อมด้วยสาร

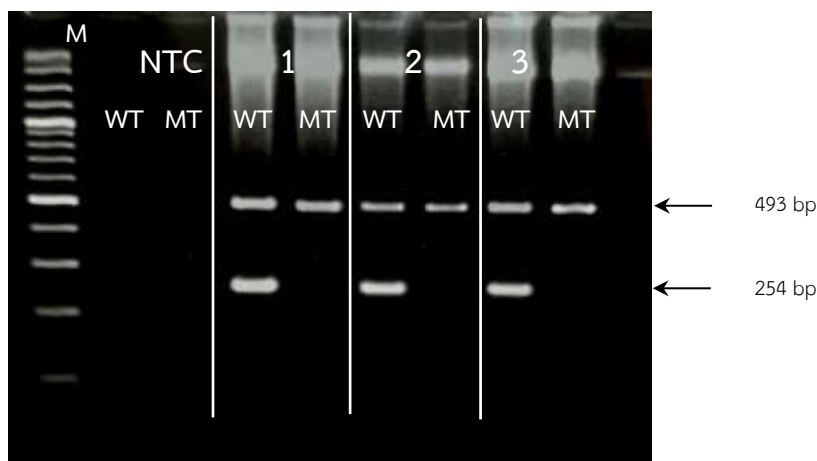
ethidium bromide และบันทึกผลด้วยเครื่องถ่ายภาพเจล (gel documentation)

จริยธรรมการวิจัย

จากการศึกษาที่ได้รับการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ จากคณะกรรมการวิจัยและจริยธรรมการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล รหัสโครงการ 1050/2563(IRB1) ลงวันที่ 24 มกราคม พ.ศ.2565

ผลและการแปลผลการศึกษา

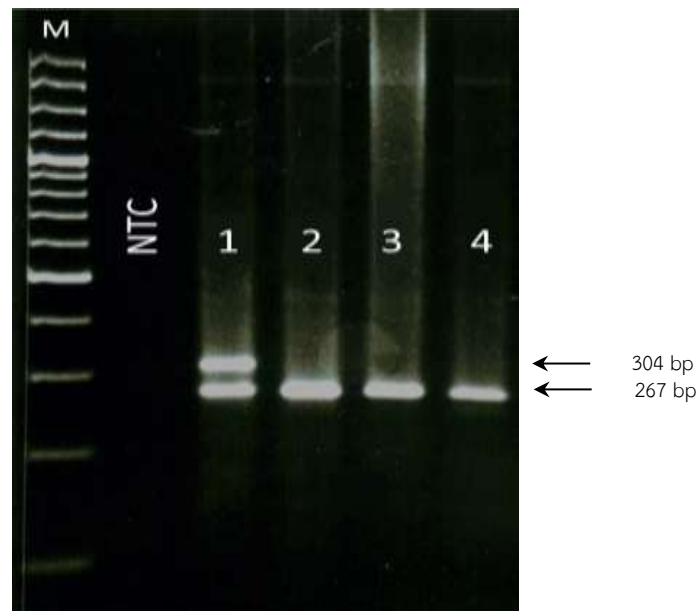
การแปลผล *TPMT*2* แปลผลช่อง wild type allele (WT) กับ variant allele (MT) จากรูปที่ 1 ช่องที่ 1 เป็น negative control ช่องที่ 2 และ 3 เป็น DNA ตัวอย่าง ปรากฏแถบ PCR product ที่ตำแหน่งของ wild type (254 bp) ในช่อง WT เท่านั้นไม่พบแถบ PCR product ที่ตำแหน่งของ variant (254 bp) ในช่อง MT ซึ่งทุกตัวอย่างปรากฏแถบ internal control product (493 bp) แสดงว่าตัวอย่างที่ 2 และ 3 ไม่มี variant ของ *TPMT*2* แปลผลเป็น *TPMT*1/*1* (wild type)



รูปที่ 1 การตรวจวิเคราะห์ *TPMT*2* ด้วยเทคนิค AS-PCR เทียบกับขนาด DNA มาตรฐาน : M = 100 bp Plus DNA Ladder, NTC = no template control, WT = wild type, MT = variant, lane 1 = negative control (*TPMT*1/*1*), lane 2-3 = DNA ตัวอย่าง

การแปลผล *TPMT*3B* ถ้า enzyme *MwoI* ตัด PCR product ไม่สมบูรณ์ ขนาดของ fragment จะมีขนาด 304 bp แสดงว่าตัวอย่างมีทั้ง 2 allele เป็น variant ของ *TPMT*3B* (homozygous *TPMT*3B*; *TPMT*3B/*3B*) กรณี enzyme *MwoI* ตัด PCR product ได้แต่ไม่สมบูรณ์ ขนาดของ fragment จะมีขนาด 304 และ 267 bp นั่นคือตัวอย่างมีหนึ่ง allele เป็น wild type (267 bp) และอีก allele เป็น variant ของ *TPMT*3B* (304 bp) แสดงว่าเป็น heterozygous *TPMT*3B* (*TPMT*3B/*1*) แต่ถ้า enzyme *MwoI* ตัด

ได้สมบูรณ์ PCR product ที่มีขนาด 304 bp จะถูกตัดออกเป็น 2 ขนาด คือ 267 และ 37 bp นั่นคือมีทั้ง 2 allele เป็น wild type (*TPMT*1/*1*) จากรูปที่ 2 lane ที่ 1 เป็น positive control lane ที่ 2 เป็น negative control และ lane ที่ 3 และ 4 เป็น DNA ตัวอย่าง enzyme *MwoI* สามารถตัด PCR product ได้ 2 ขนาด คือ 267 bp และ 37 bp แต่จะเห็น fragment ที่ขนาด 267 bp เท่านั้นเนื่องจากขนาด 37 bp สั้นมากทำให้มองไม่เห็น ดังนั้น lane ที่ 3 และ 4 จึงแปลผลได้เป็น wild type (*TPMT*1/*1*)



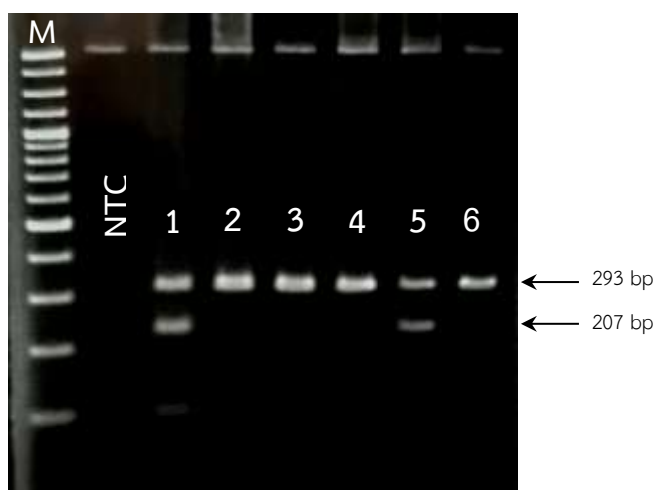
รูปที่ 2 การตรวจวิเคราะห์ *TPMT*3B* ด้วยเทคนิค PCR-RFLP เทียบกับขนาด DNA มาตรฐาน : M = 100 bp Plus DNA Ladder, NTC = no template control, lane 1 = positive control (*TPMT*3B/*1*), lane 2 = negative control (*TPMT*1/*1*), lane 3-4 = DNA ตัวอย่าง

การแปลผล *TPMT*3C* ถ้า enzyme *AccI* ตัด PCR product ไม่สมบูรณ์ ขนาดของ fragment จะมีขนาด 293 bp แสดงว่าตัวอย่างมีทั้ง 2 allele เป็น wild type กรณี enzyme *AccI* ตัด PCR product ได้แต่ไม่สมบูรณ์ขนาดของ fragment จะมีขนาด 293 และ 207 bp นั่นคือตัวอย่างมีหนึ่ง allele เป็น wild type (293 bp) และอีก allele เป็น variant ของ

*TPMT*3C* (207 bp) แสดงว่าเป็น heterozygous *TPMT*3C* (*TPMT*3C/*1*) แต่ถ้า enzyme ตัดได้สมบูรณ์ PCR product ที่มีขนาด 293 bp จะถูกตัดออกเป็น 2 ขนาด คือ 207 และ 86 bp นั่นคือมีทั้ง 2 allele เป็น variant ของ *TPMT*3C* (homozygous *TPMT*3C*; *TPMT*3C/*3C*) จากรูปที่ 3 lane ที่ 1 เป็น positive control lane ที่ 2 เป็น negative control

lane ที่ 3-6 เป็น DNA ตัวอย่าง โดย lane ที่ 3,4 และ 6 enzyme *Accl* สามารถตัด PCR product ได้ไม่สมบูรณ์ จะปรากฏแถบ PCR fragment ที่ขนาด 293 bp เท่านั้น แสดงว่าตัวอย่างเป็น wild type ทั้ง 2 allele แปลผลได้ เป็น *TPMT*1/*1* (wild type) ส่วน lane ที่ 5 ปรากฏ

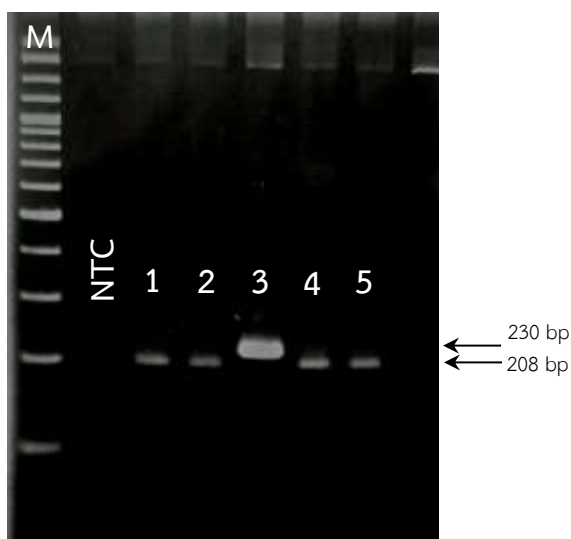
แถบ PCR fragment 2 แถบที่ขนาด 293 และ 207 bp แสดงว่ามี allele เป็น wild type (293 bp) และอีก allele เป็น *TPMT*3C* (207 bp) แปลผลได้ เป็น heterozygous *TPMT*3C* (*TPMT*3C/*1*)



รูปที่ 3 การตรวจวิเคราะห์ *TPMT*3C* ด้วยเทคนิค PCR-RFLP เทียบกับขนาด DNA มาตรฐาน : M = 100 bp Plus DNA Ladder, NTC = no template control, lane 1 = positive control (*TPMT*3C/*1*), lane 2 = negative control (*TPMT*1/*1*), lane 3-6 = DNA ตัวอย่าง

การแปลผล *TPMT*6* ถ้า enzyme *SnaBI* ตัด PCR product ไม่ได้ขนาดของ fragment จะมีขนาด 230 bp แสดงว่าตัวอย่างมีทั้ง 2 allele เป็น variant ของ *TPMT*6* (homozygous *TPMT*6*; *TPMT*6/*6*) (ตัวอย่างที่ 3 แสดง uncut PCR product) กรณี enzyme *SnaBI* ตัด PCR product ได้ไม่สมบูรณ์ขนาดของ fragment ที่ได้จะมีขนาด 230 และ 208 bp นั่นคือตัวอย่างมีหนึ่ง allele เป็น wild type (208 bp) และอีก allele เป็น variant ของ

*TPMT*6* (230 bp) แสดงว่าเป็น heterozygous *TPMT*6* (*TPMT*6/*1*) แต่ถ้า enzyme *SnaBI* ตัดได้สมบูรณ์ PCR product ที่มีขนาด 230 bp จะถูกตัดออกเป็น 2 ขนาด คือ 208 และ 22 bp นั่นคือมีทั้ง 2 allele เป็น wild type จากรูปที่ 4 lane ที่ 1 คือ negative control ตัวอย่างที่ 2,4 และ 5 มี PCR fragment ขนาด 208 bp เท่านั้นเนื่องจาก PCR fragment ขนาด 22 bp สั้นมากทำให้มองไม่เห็นได้ ดังนั้นตัวอย่างที่ 2,4 และ 5 จึงแปลผลเป็น wild type (*TPMT*1/*1*)



รูปที่ 4 การตรวจวิเคราะห์ *TPMT*6* ด้วยเทคนิค PCR-RFLP เทียบกับขนาด DNA มาตรฐาน : M = 100 bp Plus DNA Ladder, NTC = no template control, lane 1 = negative control (*TPMT*1/*1*), lane 2,4-5 = DNA ตัวอย่าง, lane 3 = uncut PCR product

ตารางที่ 2 แสดงร้อยละของ genotype และ allele ที่ตรวจพบในคนไทยจำนวน 1,087 ตัวอย่าง

ชนิดของ genotype	จำนวนตัวอย่าง (n = 1,087)	ร้อยละของ genotype
<i>*1/*1</i>	1,020	93.84
<i>*3A/*1</i>	1	0.09
<i>*3C/*1</i>	66	6.07
ชนิดของ allele	ชนิดของ allele (n = 2,174)	ร้อยละของ allele
<i>*1</i>	2,107	96.91
<i>*2</i>	0	0
<i>*3A</i>	1	0.05
<i>*3B</i>	0	0
<i>*3C</i>	66	3.04
<i>*6</i>	0	0

จากการให้บริการตรวจ *TPMT* variant ของห้องปฏิบัติการสาขาวิชาโลหิตวิทยาฯ ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ให้บริการตั้งแต่ปี พ.ศ. 2547-2564 มีตัวอย่างคนไทยที่มารับบริการจำนวน 1,087 ตัวอย่าง ได้มีการรวบรวมผลการตรวจทั้งหมดนำมาจัดกลุ่มตาม genotype แล้วคิดเป็นร้อยละของสิ่งส่งตรวจทั้งหมด จากนั้นนับจำนวน allele แต่ละชนิดโดยคำนวณจาก

จำนวน genotype แล้วคิดเป็นร้อยละของแต่ละ allele จากการศึกษาค้นพบ genotype 3 แบบ คือ *TPMT*1/*1*, *TPMT*3A/*1* และ *TPMT*3C/*1* ที่ร้อยละ 93.84, 0.09 และ 6.07 ตามลำดับ ซึ่งพบ variant เพียง 2 ชนิด คือ *TPMT*3A* และ **3C* เมื่อนับจำนวน allele ทั้งหมดพบชนิดของ allele ที่ร้อยละ 0.05 และ 3.04 ตามลำดับเมื่อเทียบกับ allele ปกติ

(*TPMT*1*) ที่ร้อยละ 96.91 ดังแสดงในตารางที่ 2 allele ปกติ (*TPMT*1*) ของการศึกษานี้ หมายถึง ตัวอย่างที่ตรวจ *TPMT*2*, **3A*, **3B*, **3C* และ **6* ซึ่งไม่นับรวมถึง *TPMT* variant ชนิดอื่น ๆ

การอภิปรายผลการศึกษา

จากการให้บริการตรวจ *TPMT* variant ในคนไทยที่ห้องปฏิบัติการโลหิตวิทยา ตรวจพบเพียง 2 genotype คือ *TPMT*3A* จำนวน 1 ราย (0.09%) และ *TPMT*3C* จำนวน 66 ราย (6.07%) ไม่พบ *TPMT*2*, **3B* และ **6* จากการศึกษานี้ยังไม่มีรายงานการตรวจพบในประชากรแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ แต่พบ *TPMT*2* และ **3B* ในประชากรแถบเอเชีย เช่น อินเดีย จากการศึกษานี้พบ *TPMT*2* และ *TPMT*3B* ในรูปแบบ heterozygous (0.61%) และพบ *TPMT*3C* ในรูปแบบ heterozygous (1.53%) (Murugesan et al., 2010) จากการศึกษานี้พบ *TPMT* variant ในประชากรแถบเอเชียพบแต่เพียง *TPMT*3C* ในรูปแบบ heterozygous เท่านั้น ได้แก่ เกาหลี (2.05%) ญี่ปุ่น (0.8%) ไต้หวัน (0.6%) และจีน (0.3%) (Chang et al., 2002; Hiratsuka et al., 2000; Kabuta & Chiba, 2001; Kim et al., 2013) มีการศึกษาในคนไทย 200 ราย พบเพียง *TPMT*3C* (9.5%) โดยพบมากในรูปแบบ heterozygous *TPMT*3C* (Srimartpirom et al., 2004) ซึ่งรายงานในคนไทยที่ผ่านมาจะพบเฉพาะ variant ของ *TPMT*3C* เท่านั้น (Hongeng et al., 2000) จากการศึกษานี้จะเห็นว่า variant ของ *TPMT*3C* เป็น variant ที่พบมากในคนไทยและเป็นการพบ *TPMT*3C* ที่สูงกว่าการศึกษาอื่น ๆ ในประชากรทั่วไปในแถบเอเชีย

สำหรับ *TPMT*3A* variant ห้องปฏิบัติการโลหิตวิทยา ตรวจพบเป็นรายแรกในประเทศไทย (Treesucon et al., 2017) ซึ่ง *TPMT*3A* เป็น combined variant ของ *TPMT*3B* และ *TPMT*3C*

หากตรวจพบ *TPMT*3B* และ *TPMT*3C* ในผู้ป่วยรายเดียวกันต้องตรวจยืนยันว่าทั้ง 2 variant อยู่บน allele ข้างเดียวกันจึงสรุปได้ว่าผู้ป่วยมี *TPMT*3A* ไม่ใช่ compound heterozygote *TPMT*3B*/**3C* ที่ *TPMT*3B* กับ *TPMT*3C* อยู่คนละ allele วิธีตรวจด้วย conventional PCR ไม่สามารถแยก genotype *TPMT*3A*/**1* และ *TPMT*3B*/**3C* ออกจากกันได้ ทางห้องปฏิบัติการโลหิตวิทยา ได้ขอตัวอย่างเลือดบิดาและมารดาของผู้ป่วยเพื่อนำมาตรวจหา *TPMT*3B* และ *TPMT*3C* ซึ่งผลการตรวจบิดาและมารดาของผู้ป่วยพบว่าบิดาเป็น heterozygote *TPMT*3B* และ homozygous *TPMT*3C* ส่วนมารดามี allele ที่ปกติทั้ง 2 ข้าง และเนื่องจาก *TPMT*3A* มี nucleotide change 2 ตำแหน่ง คือ G460A และ A719G ส่วน *TPMT*3D* มี nucleotide change 3 ตำแหน่ง คือ G292T, G460A และ A719G ดังนั้นเมื่อตรวจพบ *TPMT*3A* ควรตรวจ nucleotide change ที่ตำแหน่ง G292T เพิ่มเติมเพื่อยืนยัน variant ที่ตรวจพบ คือ *TPMT*3A* ไม่ใช่ *TPMT*3D* และได้ส่งทำ sequencing เพื่อยืนยัน variant ของยีน *TPMT*3A* ที่ตรวจพบ (Treesucon et al., 2017) จากการศึกษานี้พบ *TPMT* variant 10.1% โดยพบ *TPMT*3A* มากที่สุด ซึ่งพบ variant ของยีน *TPMT* ส่วนมากในรูปแบบ heterozygous *TPMT*3A*, *TPMT*2* (0.05%) และ *TPMT*3B* (0.3%) (Collie-Duguid et al., 1999) มีการศึกษาในกลุ่มประชากรคอเคเซียนและในผู้ป่วยเด็กมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลัน 282 ราย พบ variant ของยีน *TPMT* เป็น *TPMT*3A* (3.2%), *TPMT*2* (0.2%) และ *TPMT*3B* (0.2%) (Hon et al., 1999) แสดงให้เห็นว่าในประชากรคอเคเซียนส่วนใหญ่จะพบ *TPMT*3A* มากที่สุด ส่วน *TPMT*3C* จะพบได้น้อยมากในประชากรคอเคเซียน

การตรวจหาความผิดปกติของยีน *TPMT* ของการศึกษานี้ไม่มี positive control ในการตรวจหา *TPMT*2* และ *TPMT*6* จึงเป็นข้อจำกัดของการศึกษา

ครั้งนี้ มีเพียง negative control ที่ผ่านการทำ sequencing ไม่พบ variant ของ *TPMT*2* และ *TPMT*6* เท่านั้น ทั้ง 2 variant ไม่มี positive control เนื่องจากทั้ง *TPMT*2* และ *TPMT*6* เป็น variant ที่ยังไม่มี การตรวจพบในประเทศไทย ดังนั้นในการตรวจหา *TPMT*2* ซึ่งใช้เทคนิค AS-PCR หากพบแถบ PCR product ที่ตำแหน่งของ WT, MT (254 bp) และปรากฏแถบ internal control product (493 bp) แสดงว่าตัวอย่างมี variant ของ *TPMT*2* ต้องตรวจสอบโดยการทำ sequencing เพื่อยืนยันผลการตรวจวิเคราะห์ และหากไม่ปรากฏแถบ internal control product ขึ้นที่ตำแหน่งของ WT หรือ MT แสดงว่าการตรวจวิเคราะห์ไม่สามารถเชื่อถือได้ ซึ่งแถบ internal control product ต้องปรากฏทุกครั้งเพื่อยืนยันความถูกต้องในขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์การตรวจหา *TPMT*6* ด้วยเทคนิค PCR-RFLP ใช้ uncut PCR product (230 bp) ในการเปรียบเทียบขนาด PCR fragment การแปลผลในขั้นตอน RFLP หากปริมาณ PCR product และเอนไซม์ตัดจำเพาะมีสัดส่วนที่ไม่เหมาะสมกัน เอนไซม์ตัดจำเพาะมีประสิทธิภาพการทำงานที่ลดลงหรือเสื่อมคุณภาพการตัด PCR product อาจไม่สมบูรณ์ หรือตัดไม่ได้เลย ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อ การตรวจวิเคราะห์และทำให้แปลผลไม่ถูกต้องหรือคลาดเคลื่อนจากความเป็นจริงได้ ดังนั้นปริมาณ PCR product และเอนไซม์ตัดจำเพาะควรมีสัดส่วนที่เหมาะสมกัน เอนไซม์ตัดจำเพาะมีประสิทธิภาพไม่หมดอายุ หากมีการตรวจพบ variant ของ *TPMT*6* จะต้องตรวจสอบผลโดยการทำ sequencing เพื่อยืนยันผลการตรวจวิเคราะห์เช่นกัน และในอนาคตควรหา positive control มาใช้ในการตรวจวิเคราะห์เพื่อลดขั้นตอนในการทำ sequencing

การสรุปผลและประโยชน์ที่ได้จากการศึกษา

ผู้ป่วยที่เป็น homozygous variant ของยีน *TPMT* จะพบได้ประมาณ 1:300 และผู้ป่วยที่เป็น

heterozygous variant พบได้ประมาณร้อยละ 10 ผู้ป่วยที่มี homozygous *TPMT* จะเกิดพิษจากการทำงานของไซกระดุกรุนแรงและมีโอกาสเสียชีวิตสูงเมื่อได้รับยาในขนาดมาตรฐาน ผู้ป่วยกลุ่มนี้ต้องได้รับการลดขนาดยาในกลุ่ม thiopurine ลงเหลือร้อยละ 10-15 ของขนาดยาปกติ (Evans et al., 2001) ส่วนผู้ป่วยที่มี heterozygous variant มีแนวโน้มที่จะได้รับยาในขนาดต่ำลงเมื่อเปรียบเทียบกับคนปกติ (wild type) (Relling et al., 1999) การตรวจ *TPMT* variant จึงมีความจำเป็นต่อการรักษาผู้ป่วยที่ต้องได้รับยาในกลุ่ม thiopurine ดังนั้นการที่แพทย์ทราบข้อมูลว่าผู้ป่วยมี variant ของยีน *TPMT* จึงเป็นประโยชน์ต่อการวางแผนการรักษาผู้ป่วย ทำให้แพทย์สามารถปรับขนาดยาให้เหมาะสมกับผู้ป่วยแต่ละรายหรือเลือกให้ยาตัวอื่นที่เหมาะสมกว่า ซึ่งจะลดอาการของการเกิดผลข้างเคียงและประสบความสำเร็จในการรักษาได้มากยิ่งขึ้น เนื่องจากการศึกษา *TPMT* variant ในประเทศไทยยังไม่แพร่หลายทำให้ยังมีข้อจำกัด การศึกษาครั้งนี้จึงเป็นการเพิ่มฐานข้อมูลของ *TPMT* variant ในประเทศไทย

ข้อเสนอแนะจากการวิจัย

ผู้ป่วยที่มีอาการข้างเคียงจากการได้รับยา 6-MP ซึ่งเป็นยาในกลุ่ม thiopurine นอกจากมีสาเหตุจากการพร่องเอนไซม์ *TPMT* แล้วยังมีสาเหตุจากการขาดเอนไซม์ในเม็ดเลือดแดง inosine triphosphate pyrophosphatase (ITPase) และ Nudix hydrolase15 (*NUDT15*) ที่มีความสัมพันธ์กับการเกิดพิษของยาในกลุ่ม thiopurine โดยเฉพาะพิษจากการทำงานของไซกระดุกเช่นเดียวกับเอนไซม์ *TPMT* ทั้งนี้เพราะในประชากรแถบเอเชียมีการพบ *ITPA* และ *NUDT15* สูงกว่า *TPMT* variant ซึ่งปัจจุบันทางห้องปฏิบัติการสาขาวิชาโลหิตวิทยาฯ ได้พัฒนาและเปิดให้บริการตรวจ *ITPA* และ *NUDT15* ขึ้นมา ดังนั้น การแปลผลการตรวจ *TPMT*, *ITPA* และ *NUDT15* ไปพร้อมกันจะทำให้

แพทย์สามารถตัดสินใจปรับขนาดยาในผู้ป่วยให้เหมาะสมซึ่งจะลดอาการข้างเคียงและประสบความสำเร็จในการรักษาได้มากขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการและอาจารย์แพทย์สาขาโลหิตวิทยาและอองโคโลยีทุกท่านที่คอยสนับสนุนและผลักดันให้พัฒนางานประจำอย่างต่อเนื่อง ขอขอบพระคุณภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล ที่ให้ใช้สถานที่ อุปกรณ์ เครื่องมือ และอำนวยความสะดวกในการทำวิจัยนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

Appell, M. L., Wennerstrand, P., Peterson, C., Hertvig, E., & Martensson, L.-G. (2010). Characterization of a novel sequence variant, TPMT*28, in the human thiopurine methyltransferase gene. *Pharmacogenetics and Genomics*, 20(11), 700–707. <https://doi.org/10.1097/FPC.0b013e3283402ee4>

Booth, R. A., Ansari, M. T., Loit, E., Tricco, A. C., Weeks, L., Doucette, S., Skidmore, B., Sears, M., Sy, R., & Karsh, J. (2011). Assessment of thiopurine S-methyltransferase activity in patients prescribed thiopurines: a systematic review. *Annals of Internal Medicine*, 154(12), 814–823, W-295–298. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-154-12-201106210-00009>

Chang, J.-G., Lee, L.-S., Chen, C.-M., Shih, M.-C., Wu, M.-C., Tsai, F.-J., & Liang, D.-C. (2002). Molecular analysis of thiopurine S-methyltransferase alleles in South-east Asian populations. *Pharmacogenetics*, 12(3), 191–195. <https://doi.org/10.1097/00008571-200204000-00003>

Collie-Duguid, E. S., Pritchard, S. C., Powrie, R. H., Sludden, J., Collier, D. A., Li, T., & McLeod, H. L. (1999). The frequency and distribution of thiopurine methyltransferase alleles in Caucasian and Asian populations. *Pharmacogenetics*, 9(1), 37–42. <https://doi.org/10.1097/00008571-199902000-00006>

Coulthard, S., & Hogarth, L. (2005). The thiopurines: an update. *Investigational New Drugs*, 23(6), 523–532. <https://doi.org/10.1007/s10637-005-4020-8>

Evans, W. E., Hon, Y. Y., Bomgaars, L., Coutre, S., Holdsworth, M., Janco, R., Kalwinsky, D., Keller, F., Khatib, Z., Margolin, J., Murray, J., Quinn, J., Ravindranath, Y., Ritchey, K., Roberts, W., Rogers, Z. R., Schiff, D., Steuber, C., Tucci, F., ... Relling, M. V. (2001). Preponderance of thiopurine S-methyltransferase deficiency and heterozygosity among patients intolerant to mercaptopurine. *Journal of Clinical Oncology*, 19(8), 2293–2301. <https://doi.org/10.1200/JCO.2001.19.8.2293>

- Green, M. R., & Sambrook, J. (2012). *Molecular cloning: A laboratory manual* (4th ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Hiratsuka, M., Inoue, T., Omori, F., Agatsuma, Y., & Mizugaki, M. (2000). Genetic analysis of thiopurine methyltransferase polymorphism in a Japanese population. *Mutation Research*, 448(1), 91–95. [https://doi.org/10.1016/s0027-5107\(00\)00004-x](https://doi.org/10.1016/s0027-5107(00)00004-x)
- Hon, Y. Y., Fessing, M. Y., Pui, C. H., Relling, M. V., Krynetski, E. Y., & Evans, W. E. (1999). Polymorphism of the thiopurine S-methyltransferase gene in African-Americans. *Human Molecular Genetics*, 8(2), 371–376. <https://doi.org/10.1093/hmg/8.2.371>
- Hongeng, S., Sasanakul, W., Chuansumrit, A., Pakakasama, S., Chattananon, A., & Hathirat, P. (2000). Frequency of thiopurine S-methyltransferase genetic variation in Thai children with acute leukemia. *Medical and Pediatric Oncology*, 35(4), 410–414. [https://doi.org/10.1002/1096-911x\(20001001\)35:4<410:aid-mpo3>3.0.co;2-r](https://doi.org/10.1002/1096-911x(20001001)35:4<410:aid-mpo3>3.0.co;2-r)
- Kham, S. K. Y., Tan, P. L., Tay, A. H. N., Heng, C. K., Yeoh, A. E. J., & Quah, n a multiracial asian population and children with acute lymphoblastic leukemia. *Journal of Pediatric Hematology/Oncology*, 24(5), 353–359. <https://doi.org/10.1097/00043426-200206000-00006>
- Kim, S., Lee, H. W., Lee, W., Chun, S., & Min, W.-K. (2013). Validation of new allele-specific real-time PCR system for thiopurine methyltransferase genotyping in Korean population. *BioMed Research International*, 2013, 1-4. <https://doi.org/10.1155/2013/305704>
- Kubota, T., & Chiba, K. (2001). Frequencies of thiopurine S-methyltransferase mutant alleles (TPMT*2, *3A, *3B and *3C) in 151 healthy Japanese subjects and the inheritance of TPMT*3C in the family of a proband. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 51(5), 475–477. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2125.2001.01371.x>
- Miller, S. A., Dykes, D. D., & Polesky, H. F. (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*, 16(3), 1215. <https://doi.org/10.1093/nar/16.3.1215>
- Murugesan, R., Vahab, S. A., Patra, S., Rao, R., Rao, J., Rai, P., Gopinath, P. M., & Satyamoorthy, K. (2010). Thiopurine S-methyltransferase alleles, TPMT (*2, (*3B and (*3C, and genotype frequencies in an Indian population. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 1(1), 121–127. https://doi.org/10.3892/etm_00000021
- Otterness, D., Szumlanski, C., Lennard, L., Klemetsdal, B., Aarbakke, J., Park-Hah, J. O., Iven, H., Schmiegelow, K., Branum, E., O'Brien, J., & Weinshilboum, R. (1997). Human thiopurine methyltransferase pharmacogenetics: gene sequence

- polymorphisms. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 62(1), 60–73.
[https://doi.org/10.1016/S0009-9236\(97\)90152-1](https://doi.org/10.1016/S0009-9236(97)90152-1)
- Relling, M. V., Gardner, E. E., Sandborn, W. J., Schmiegelow, K., Pui, C.-H., Yee, S. W., Stein, C. M., Carrillo, M., Evans, W. E., Klein, T. E., & Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium. (2011). Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium guidelines for thiopurine methyltransferase genotype and thiopurine dosing. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 89(3), 387–391.
<https://doi.org/10.1038/clpt.2010.320>
- Relling, M. V., Hancock, M. L., Rivera, G. K., Sandlund, J. T., Ribeiro, R. C., Krynetski, E. Y., Pui, C. H., & Evans, W. E. (1999). Mercaptopurine therapy intolerance and heterozygosity at the thiopurine S-methyltransferase gene locus. *Journal of the National Cancer Institute*, 91(23), 2001–2008.
<https://doi.org/10.1093/jnci/91.23.2001>
- Srimartpirom, S., Tassaneeyakul, W., Kukongviriyapan, V., & Tassaneeyakul, W. (2004). Thiopurine S-methyltransferase genetic polymorphism in the Thai population. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 58(1), 66–70.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.2004.02112.x>
- Szumslanski, C., Otterness, D., Her, C., Lee, D., Brandriff, B., Kelsell, D., Spurr, N., Lennard, L., Wieben, E., & Weinshilboum, R. (1996). Thiopurine methyltransferase pharmacogenetics: human gene cloning and characterization of a common polymorphism. *DNA and Cell Biology*, 15(1), 17–30.
<https://doi.org/10.1089/dna.1996.15.17>
- Treesucon, A., Sripattanatadasakul, P., Siraprapapat, P., Vathana, N., Pongtanakul, B., Sanpakit, K., & Narkbunnam, N. (2017). Prevalence of thiopurine S-methyltransferase (TPMT) gene variants in Thai patients suffering toxicity from thioguanine-containing childhood leukemia protocols: First report of TPMT*3A in Thais. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 48(2), 173–182.
<https://www.tm.mahidol.ac.th/seameo/2017-48-suppl-2/2017-48-suppl2-173.pdf>
- Yates, C. R., Krynetski, E. Y., Loennechen, T., Fessing, M. Y., Tai, H. L., Pui, C. H., Relling, M. V., & Evans, W. E. (1997). Molecular diagnosis of thiopurine S-methyltransferase deficiency: genetic basis for azathioprine and mercaptopurine intolerance. *Annals of Internal Medicine*, 126(8), 608–614.
<https://doi.org/10.7326/0003-4819-126-8-199704150-00003>