Chula Med J Vol. 55 No. 5 September - October 2011

ความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของยีน Thiopurine S-methyltransferase ที่มีรูปแบบ *3C และการกดการทำงานของไขกระดูกจากการใช้ยา azathioprine ในผู้ป่วย systemic lupus erythematosus ในประเทศไทย

เจนจิรา คงพันธุ์วิจิตร*
ยิ่งยศ อวิหิงสานนท์** ณัฏฐิยา หิรัญกาญจน์***
สุดา วรรณประสาท**** จีรภัทร วงศ์ชินศรี*****

Kongpunvijit J, Avihingsanon Y, Hirankarn N, Vannaprasaht S, Wongchinsri J. The association between thiopurine s-methyltransferase *3C polymorphism and azathioprine induced myelosuppression in Thai patients with systemic lupus erythematosus. Chula Med J 2011 Sep - Oct; 55(5): 489 - 503

Objective : *To investigate the correlation between Thiopurine S-methyltransferase (TPMT) *3C polymorphism and azathioprine (AZA)-induced myelosuppression in Thai patients with systemic lupus erythematosus (SLE).*

Methods : *A total of 40 SLE patients taking AZA at King Chulalongkorn Memorial Hospital were included in this study. Blood samples from volunteers were collected in 3 ml EDTA tubes. TPMT*3C genotype was determined using PCR-RFLP assay and erythrocyte TPMT activity using HPLC method. Biochemical and clinical data were retrospectively evaluated after initiation of AZA therapy.*

*นิสิตปริญญาโท สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
**ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
***ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
****ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
*****ภาควิชาอายุรศาสตร์ โรงพยาบาลนพรัตน์ราชธานี

Results : *Gene frequency of heterozygous TPMT*1/*3C was 10% (4/40) and *3C allele frequency was 5.0%. TPMT*1/*3C polymorphism was statistically significantly different (P = 0.005) and odd ratio of 45.0 folds (95%CI 3.092 – 654.900; p < 0.001), a higher risk for AZA-induced leucopenia than wild type. Furthermore polymorphism of TPMT*1/*3C gene was significantly associated with neutropenia (P = 0.027) and with an odd ratio of 31.0 folds (95%CI 1.896 – 506.771; p < 0.001). The enzyme activity in 18 patients was 39.29 ± 13.29 (SD) nmol 6-MTG/gHb/hr which was associated with TPMT genotype (p = 0.026).*

Conclusion : *TPMT genotyping and activity was significantly correlated with the risk of AZA-induced myelosuppressive in Thai SLE patients. The TPMT polymorphism may predict AZA-induced toxicity.*

Keywords : *Thiopurine S-methyltransferase, myelosuppression, azathioprine, systemic lupus erythematosus.*

Reprint request: Kongpunvijit J. Graduated Student Program in Medical Science, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand.

Received for publication. April 8, 2010.

เจนจิรา คงพันธุ์วิจิตร, ยิ่งยศ อวิหิงสานนท์, ณัฏฐิยา หิรัญกาญจน์, สุดา วรรณประสาท, จีรภัทร วงศ์ชินศรี. ความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของยีน Thiopurine S-methyltransferase ที่มีรูปแบบ *3C และการกดการทำงานของไขกระดูกจากการใช้ยา azathioprine ในผู้ป่วย systemic lupus erythematosus ในประเทศไทย. จุฬาลงกรณ์เวชสาร 2554 ก.ย. – ต.ค.; 55(5): 489 – 503

วัตถุประสงค์ : *เพื่อศึกษาหาความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะทางพันธุกรรมของยีน TPMT*3C และการกระตุ้นการกดการทำงานของไขกระดูกจากการใช้ยา AZA ในผู้ป่วย SLE ในประเทศไทย*

วิธีการศึกษา : *คนไข้โรค SLE ที่ได้รับการรักษาด้วยยา AZA ที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ จำนวน 40 ราย ทำการเก็บตัวอย่างเลือดปริมาณ 3 มล. ด้วยหลอดที่เคลือบสารกันเลือดแข็งตัว EDTA ทำการวัดลักษณะทางพันธุกรรมด้วยวิธี PCR-RFLP และวัดการทำงานของเอ็นไซม์ TPMT ในเซลล์เม็ดเลือดแดงด้วยวิธี HPLC และเก็บข้อมูลทางคลินิกของคนไข้หลังจาก ที่ได้รับการรักษาด้วยยา AZA*

ผลการศึกษา : *พบลักษณะทางพันธุกรรมแบบ TPMT*1/*3C เท่ากับ 10% (4/40) และมีความถี่ของ อัลลิล*3C เท่ากับ 5% ซึ่งพบว่าลักษณะทางพันธุกรรมของยีน TPMT*1/*3C มีความ เสี่ยงในการเกิดอุบัติการณ์เม็ดเลือดขาวต่ำ (leucopenia) มากกว่าลักษณะทางพันธุกรรมปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P = 0.005) และมีความเสี่ยงสัมพัทธ์ (OR) เท่ากับ 45 เท่า (95%CI 3.092 – 654.900, p = 0.000) เมื่อเปรียบเทียบลักษณะทางพันธุกรรม TPMT*1/*3C กับอุบัติการณ์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิลต่ำ พบว่ามีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P = 0.027) และมีความเสี่ยงสัมพัทธ์ (OR) เท่ากับ 31 เท่า (95%CI 1.896 – 506.771, p = 0.000) นอกจากนี้ยังพบว่าการทำงานของเอ็นไซม์ในคนไข้จำนวน 18 ราย ซึ่งมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 39 ± 13.29 (SD) nmol 6-MTG/gHb/hr มีความสัมพันธ์กับลักษณะทางพันธุกรรมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P = 0.026)*

สรุป : *ลักษณะทางพันธุกรรมและความสามารถในการทำงานของยีน TPMT มีความสัมพันธ์กับความเสี่ยงในการกดการทำงานของไขกระดูกจากการใช้ยา AZA ในผู้ป่วย SLE ในประเทศไทยอย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นลักษณะทางพันธุกรรมของยีน TPMT สามารถ ใช้ในการทำนายพิษที่เกิดขึ้นจากการใช้ยา AZA ได้*

คำสำคัญ : *เอ็นไซม์ Thiopurine S-methyltransferase, การกดการทำงานของไขกระดูก, azathioprine, โรคภูมิคุ้มกันตนเองบกพร่อง.*

Systemic lupus erythematosus (SLE) เป็นโรคออโตอิมมูนที่มักจะมีความผิดปกติของอวัยวะได้หลายระบบพร้อม ๆ กัน ที่พบมากที่สุดคือ ข้อ, ผิวหนัง, ไต, สมอง และปอด พบในผู้หญิงมากกว่าผู้ชายประมาณ 10 เท่า โดยกลไกการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันที่ก่อให้เกิดพยาธิสภาพพบได้หลายแบบ ร่างกายของผู้ป่วยโรคเอลแอลอี จะสร้างแอนติบอดีต่อเนื้อเยื่อตนเอง เรียกว่าเป็นแอนติบอดีชนิดออโตแอนติบอดี (autoantibody) ซึ่งจะรวมกับแอนติเจนเนื้อเยื่อร่างกาย เกิดเป็นอิมมูนคอมเพล็กซ์ และเป็นตัวการที่ก่อให้เกิดการอักเสบและทำลายเนื้อเยื่อตัวเอง บางครั้งการทำลายเนื้อเยื่อตัวเองเกิดจากแอนติบอดีโดยตรง เช่น ทำลายเม็ดเลือดแดง, ทำลายเกล็ดเลือด การเกิดสารประกอบเชิงซ้อนทางอิมมูนไปติดอยู่ตามเนื้อเยื่อต่าง ๆ นำไปสู่การเกิดพยาธิสภาพที่บริเวณนั้น ๆ ได้แก่ การเกิด glomerulonephritis, vasculitis และ polyarthritis ซึ่งสารประกอบเชิงซ้อนทางอิมมูนเกิดขึ้นจากออโตแอนติเจนและออโตแอนติบอดี้ โดยภาวะไตอักเสบในผู้ป่วย SLE (lupus nephritis) เป็นภาวะที่พบได้บ่อยเกือบร้อยละ 60 ของผู้ป่วย SLE และสัมพันธ์กับอัตราการบาดเจ็บและเสียชีวิตของผู้ป่วย (morbidity and mortality)

Azathioprine เป็น pro-drug เมื่อเข้าสู่ร่างกายแล้วเกิดการ metabolized จะส่งผลให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxic) ใช้สำหรับการรักษา neoplasia และ autoimmune disease เช่นเดียวกับ leukemia และการปลูกถ่ายอวัยวะ thiopurine drug มีความสัมพันธ์กับการเกิด myelosuppression ในบุคคลที่มีอัตราการ metabolism ต่ำ และพบว่า azathioprine ถูกนำมาใช้ในปี 1963 เมื่อถูกพบว่าสามารถยืดอายุ renal allograft [1] เมื่อเข้าสู่ร่างกายจะถูกเปลี่ยนเป็น 6-MP และ imidazone group ซึ่งเป็น active metabolite ของ azathioprine และเป็นสารตั้งต้นสำหรับเอ็นไซม์ TPMT ทั้ง 6-MP และ 6-TG จะผ่านขบวนการ metabolism ก่อนที่จะเกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxic) ซึ่งตามมาด้วยการรวมกับดีเอ็นเอ เช่น thioguanine nucleotides (TGNs) [2] ส่งผลให้เกิด DNA-protein cross-links และ sister chromatid exchange [3] ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจะถูกตรวจสอบโดยระบบ mismatch repair และมีความสัมพันธ์กับความต้านทานต่อ 6-TG [4]

Azathioprine เมื่อให้เข้าไปในร่างกายจะถูกเปลี่ยนแปลงโดยอาศัยเอนไซม์หลัก ได้แก่ hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase (HGPRT), thiopurine S-methyltransfease (TPMT) และ xanthine oxidase โดยเอนไซม์ HGPRT จะทำหน้าที่เปลี่ยน thiopurine ให้อยู่ในรูป thioguanine nucleotide (TGN) ซึ่งเป็นเมแทบอไลต์ที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาโดยจะออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญและการแบ่งเซลล์ รวมทั้งกระตุ้นให้เกิดการตายของเซลล์ ในทางตรงกันข้ามเอนไซม์ TPMT และเอนไซม์ xanthine oxidase จะทำหน้าที่เปลี่ยน thiopurine ให้อยู่ในรูปเมแทบอไลต์ที่ไม่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา เป็นที่น่าสังเกตว่าเนื้อเยื่อที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเม็ดเลือด (hematopietic tissues) จะไม่มีเอนไซม์ xanthine oxidase ดังนั้นเอนไซม์ TPMT จึงเป็นเอนไซม์หลักเพียงเอนไซม์เดียวที่ทำหน้าที่กำจัดยาเหล่านี้ออกจากร่างกาย ผู้ที่มีความสามารถการทำงานของเอนไซม์ TPMT ต่ำ จึงมีโอกาสได้รับพิษจากการกดทำงานของไขกระดูกของยากลุ่มนี้สูงกว่าปกติ [5-8]

Thiopurine S-methyltransferase (TPMT) เป็น cytosolic enzyme โดยเร่งปฏิกิริยาการเติมหมู่เมทิลที่ซัลเฟอร์ (S-methylation) ของ aromatic และ heterocyclic sulfhydryl compounds เช่น thiopurine drugs ซึ่ง S-methylation มีความสำคัญใน catabolic pathway ของยาชนิดนี้ โดย TPMT จะทำงานแข่งขันกับการเกิด 6-TGNs ซึ่งเป็นผลผลิตที่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ พบว่าการทำงานของเอ็นไซม์ (enzyme activity) TPMT ได้จากจากการแตกตัวของเม็ดเลือดแดง และจะมีการทำงานที่แตกต่างกันในแต่ละบุคคล การทำงานของเอ็นไซม์ TPMT จะถูกควบคุมโดย genetic polymorphism ซึ่งผลจากการศึกษาในประชากรและวิเคราะห์ผลจากหลายครอบครัวพบว่ายีนที่ควบคุมการทำงานของเอ็นไซม์

มี 2 alleles ที่ตำแหน่งเดียวคือ $TPMT^{L}$ สำหรับ low activity และ $TPMT^{H}$ สำหรับ high activity โดยทำการศึกษาใน human RBC TPMT activity [9]

ยีน TPMT อยู่บนโครโมโซมที่ 6 ตำแหน่ง 6p22.3 มีความยาว 34 Kb ประกอบด้วย 10 exon และ 9 intron ถอดรหัสเป็นโปรตีนที่มีความยาว 245 กรดอะมิโน (amino acid) มวลโมเลกุล 35 kD พบส่วนที่เป็น pseudogene มีความเหมือนกันกับ TPMT gene ถึง 96% มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมที่ 18q21.1 [10] ในส่วน 5' promoter มี GC อยู่ 71% (จาก -873 ถึง +736) [11, 12] และไม่มีส่วน consensus sequence คือ TATA box หรือ CCAAT แต่มีตำแหน่งของ transcription factors ได้แก่ Sp1, NF-κ, AP-2 and KROX-24 [12] และมีความแตกต่างของจำนวน tandem repeats (VNTRs) ใช้แสดงส่วนที่เป็น 5'UTR [11]

ความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ถูกควบคุมด้วยลักษณะพันธุกรรมของยีน TPMT โดย TPMT*1 เป็น wild type ที่ควบคุมการสร้างสังเคราะห์เอนไซม์ให้มีการทำงานเป็นปกติ ในขณะที่ TPMT*3A เป็น mutant allele ที่พบมากที่สุดในกลุ่มประชากร Caucasian ซึ่งมีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง 460G>A และที่ตำแหน่ง 719A>G ซึ่งทำให้มีการเปลี่ยนกรดอะมิโนลำดับที่ 154 จาก Alanine เป็น Threonine และมีการเปลี่ยนกรดอะมิโนลำดับที่ 240 จาก tyrosine เป็น cysteine เป็นผลให้มีความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ลดลง [8, 13, 14] ส่วน TMPT*3C เป็น mutant allele ที่พบมากที่สุดในกลุ่มประชากร Asia และ African มีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง 719A>G ซึ่งทำให้มีการเปลี่ยนกรดอะมิโนลำดับที่ 240 จาก tyrosine เป็น cysteine เป็นผลให้มีความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ลดลง นอกจากนั้นยังได้มีการศึกษาความหลากหลายของเอนไซม์ TPMT [8, 13, 14] ในกลุ่มผู้ป่วย SLE ที่ได้รับยา Azathioprine ในผู้ป่วยชาว American พบว่าคนไข้ที่มี homozygous TPMT*3A มีการทำงานของเอ็นไซม์ต่ำมีความสัมพันธ์กับการเกิด severe marrow suppression แต่ไม่สามารถทำนายการเกิด myelosuppressive และยังไม่สามารถใช้แทนการทดสอบการทำงานของเอ็นไซม์จากเลือดโดยตรงได้ [15] ต่อมาได้มีการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเกิดการกลายพันธุ์กับผลข้างเคียงในผู้ป่วย SLE ที่ได้รับยา Azathioprine ในผู้ป่วยชาวเกาหลีพบการกลายพันธุ์แบบ heterozygous ของ TPMT*3C และ TPMT*6 โดยพบว่าผู้ป่วยที่มีการกลายพันธุ์แบบ TPMT*3C พบอาการ severe nausea และผู้ป่วยที่มีการกลายพันธุ์แบบ TPMT*6 พบอาการของ severe bone marrow toxicity และมีผู้ทำการศึกษาความสัมพันธ์ของ genotype และ phenotype ในคนไข้ SLE ประเทศญี่ปุ่น โดยพบว่าการกลายพันธุ์แบบ TPMT*3C มี การทำงานของเอ็นไซม์ TPMT ต่ำกว่าในคนไข้ wild type และคนไข้ที่มีการกลายพันธุ์และได้รับยา Azathioprine พบการแสดงอาการ leucopenia [16]

ในประชากรไทยได้มีการศึกษาในปี 2000 พบว่าในกลุ่มผู้ป่วยโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์แบบเฉียบพลัน (ALL) จำนวน 75 รายมีลักษณะทางพันธุกรรมแบบ TPMT*1/*3C ถึง 10.67% โดยมีความถี่ของ TPMT*3C (allele frequency) เท่ากับ 5.3% [17] ต่อมาในปี 2004 มีการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน TPMT ในประชากรไทยอีสาน พบว่ามีความถี่ TPMT*3C (allele frequency) ถึง 5% ซึ่งเป็นรูปแบบการกลายพันธุ์ที่พบมากที่สุดในแถบเอเชีย ซึ่งพบในประชากรไทยมากกว่าประชากรในเอเชียชาติอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ [18] หลังจากนั้นในปี 2009 มีผู้มีการศึกษายีน TPMT ในกลุ่มผู้ป่วยที่ทำการเปลี่ยนไต พบว่ามี TPMT*1/*3C 6.34 % และพบว่ามีความสัมพันธ์กับการเกิดพิษจากการใช้ยา azathioprine [19]

จากการศึกษาที่ผ่านมาข้างต้นทำให้คณะผู้วิจัยมีความสนใจศึกษาความสัมพันธ์ของการทำงานของเอ็นไซม์ TPMT กับลักษณะทางพันธุกรรมและผลข้างเคียงที่เกิดขึ้นในผู้ป่วย SLE ในประเทศไทย ที่ได้รับการรักษาด้วยยา azathioprine โดยการวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ในการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรม (genotype) ที่มีรูปแบบ TPMT*3C เพื่อหาความสัมพันธ์กับการทำงานของเอ็นไซม์

TPMT ในเม็ดเลือดแดงและการเกิดพิษจากการใช้ยาในผู้ป่วย systemic lupus erythematosus ที่ได้รับการรักษาด้วยยา azathioprine ในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

วิธีดำเนินการวิจัย

การศึกษาครั้งนี้มีรูปแบบการศึกษาแบบย้อนหลัง (retrospective study) เพื่อวิเคราะห์ถึงความสัมพันธ์ระหว่างความผิดแผกทางพันธุกรรมของยีน TPMT (Thiopurine S-methyltransferase) ที่มีรูปแบบ TPMT*3C ต่อความเสี่ยงต่อการเกิดการกดไขกระดูกจากการใช้ยา AZA (azathioprine) ในผู้ป่วย SLE (systemic lupus erythematosus) ที่เข้ามารักษาในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

คุณสมบัติของอาสาสมัครที่ถูกคัดแยกออกจากการวิจัย (exclusion criteria)

1. ผู้ป่วย SLE ที่ได้รับยา allopurinol ซึ่งสามารถเกิดอันตรกิริยา (drug interaction) ร่วมกับยา AZA ได้ โดย allopurinol มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์ xanthine oxidase ซึ่งเป็นเอ็นไซม์ที่สำคัญอีกชนิดหนึ่งภายในตับ ทำหน้าที่เปลี่ยนแปลงยา AZA ให้อยู่ในรูปที่ไม่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา ดังนั้นเมื่อผู้ป่วยได้รับยาร่วมกันจะทำให้ระดับเมแทบอไลท์ที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา (6-TGNs) ในกระแสเลือดเพิ่มสูงขึ้นส่งผลให้เกิดพิษกดไขกระดูกจากการใช้ยาได้ [20]

2. ผู้ป่วยที่เป็นโรคทางระบบเลือด เช่น talassemia

3. ผู้ป่วยที่ไม่ยินยอมเข้าโครงการวิจัย

เกณฑ์การเกิดการกดไขกระดูกจากการใช้ยา AZA

1. ปริมาณเม็ดเลือดขาว (WBC) ≤ 3,000 เซลล์/ลบ.มม. (Leucopenia) หรือ

2. ปริมาณเม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิล (Neutrophils) ≤ 1,500 เซลล์/ลบ.มม. (Neutropenia) หรือ

3. ปริมาณเกร็ดเลือด (Platelets) ≤ 100,000 / ลบ.มม. (Thombocytopenia)

การวัดการทำงานของเอ็นไซม์ Thiopurine S-methyl-transferase

1. ตัวอย่างเลือดที่เก็บด้วยหลอดที่เคลือบด้วยสารกับเลือดแข็งตัว EDTA และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°C ปริมาณ 3 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 1400 x g เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C

2. แยกส่วน serum และ buffy coat ออก และเติม physiological saline ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร เพื่อใช้ในการล้างเซลล์เม็ดเลือดแดง mix ตัวอย่างด้วย vortex เป็นเวลา 5 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 1400 x g เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C และดูดส่วน saline ที่ใช้ล้างเซลล์ออก

3. นำเม็ดเลือดแดงที่ล้างด้วย saline (washed erythrocytes) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เติมด้วย 0.02 mM phosphate buffer (pH 7.4) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร และ mix ด้วย vortex เป็นเวลา 30 วินาที เพื่อทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงแตก (RBC lysate)

4. เก็บรักษา RBC lysate ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ -20 °C เพื่อใช้ในการวัดค่า Hb และเก็บรักษา RBC lysate ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ -80 °C เพื่อใช้ในการวัดค่าการทำงานของเอ็นไซม์

หมายเหตุ การเก็บรักษา RBC lysate ที่อุณหภูมิ -80° C สามารถเก็บรักษาได้เป็นระยะเวลาไม่เกิน 45 วัน

การวัดระดับการทำงานของเอ็นไซม์ด้วยเทคนิค HPLC

1. RBC lysate ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เติมด้วยส่วนผสมระหว่าง 6-TG และ SAM ปริมาตร 500 ไมโครลิตร mix ด้วย vortex และแช่ตัวอย่างลงในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (incubate) ด้วย shaking water bath 37°C 1 ชั่วโมงพอดี (เป็นระยะที่เอ็นไซม์ TPMT ทำปฏิกิริยากับ substrate)

2. แช่ตัวอย่างลงในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (incubate) ที่ 85°C เป็นเวลา 10 นาที เพื่อหยุดการทำงานของเอ็นไซม์ TPMT และแช่ตัวอย่างลงในน้ำแข็ง หลังจากนั้นปั่นเหวี่ยงตัวอย่างที่ความเร็วรอบ 1400 x g เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C

3. ใช้ส่วนใสด้านบน (supernatant) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ในการตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

การเตรียมตัวอย่าง Standard และ Blank

ค่า Standard curve เป็นค่าที่แสดงความเข้มข้นของ 6-MTG มีลักษณะเป็นเส้นตรงที่อยู่ในช่วง 0 – 3.3 nmol/ml โดยเตรียม 6-MTG ที่ความเข้มข้น 1 mg/ml ใน 0.1 M NaOH เป็น stock solution และ dilute เป็นความเข้มข้นต่าง ๆ เพื่อใช้เป็น working standard

การเตรียม Standard blank โดยใช้ NaCl ความเข้มข้น 0.9 g/l

การศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของยีน Thiopurine S-Methyltransferase

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า ลักษณะความหลากหลายทางพันธุกรรมที่พบมากในกลุ่มประชากรเอเชียเป็นแบบ TPMT*3C มีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง 719A>G ซึ่งทำให้มีการเปลี่ยนกรดอะมิโนลำดับที่ 240 จาก tyrosine เป็น cysteine และมีการศึกษาพบว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน TPMT ในประชากรไทย มีเพียง mutant allele แบบ TPMT*3C เท่านั้น มีความชุกประมาณ 10% ของประชากรทั้งหมด ในครั้งนี้จึงทำการศึกษาลักษณะความหลากหลายทางพันธุกรรมแบบ TPMT*3C โดยใช้เทคนิค PCR-RFLP ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

1. สกัดดีเอ็นเอจากส่วนของ buffy coat ด้วยเทคนิค salting-out [21]

2. เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้ primer ที่มีความจำเพาะต่อการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมแบบ TPMT*3C

Forward primer คือ 5'-CAGGCTTTAGCATA ATTTTCAATTCCTC-3'

Reverse primer คือ 5'-TGTTGGGATTACAG GTGTGAGCCAC-3'

3. ใช้เอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Acc*I เพื่อศึกษาความแตกต่างระหว่างยีน TPMT ที่เป็นปกติกับยีน TPMT ที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมแบบ TPMT*3C

4. ตรวจสอบผลของ PCR ที่ตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis และย้อยด้วย Ethidium bromide และดูผลภายใต้แสง UV (ultraviolet)

การวิเคราะห์ข้อมูล

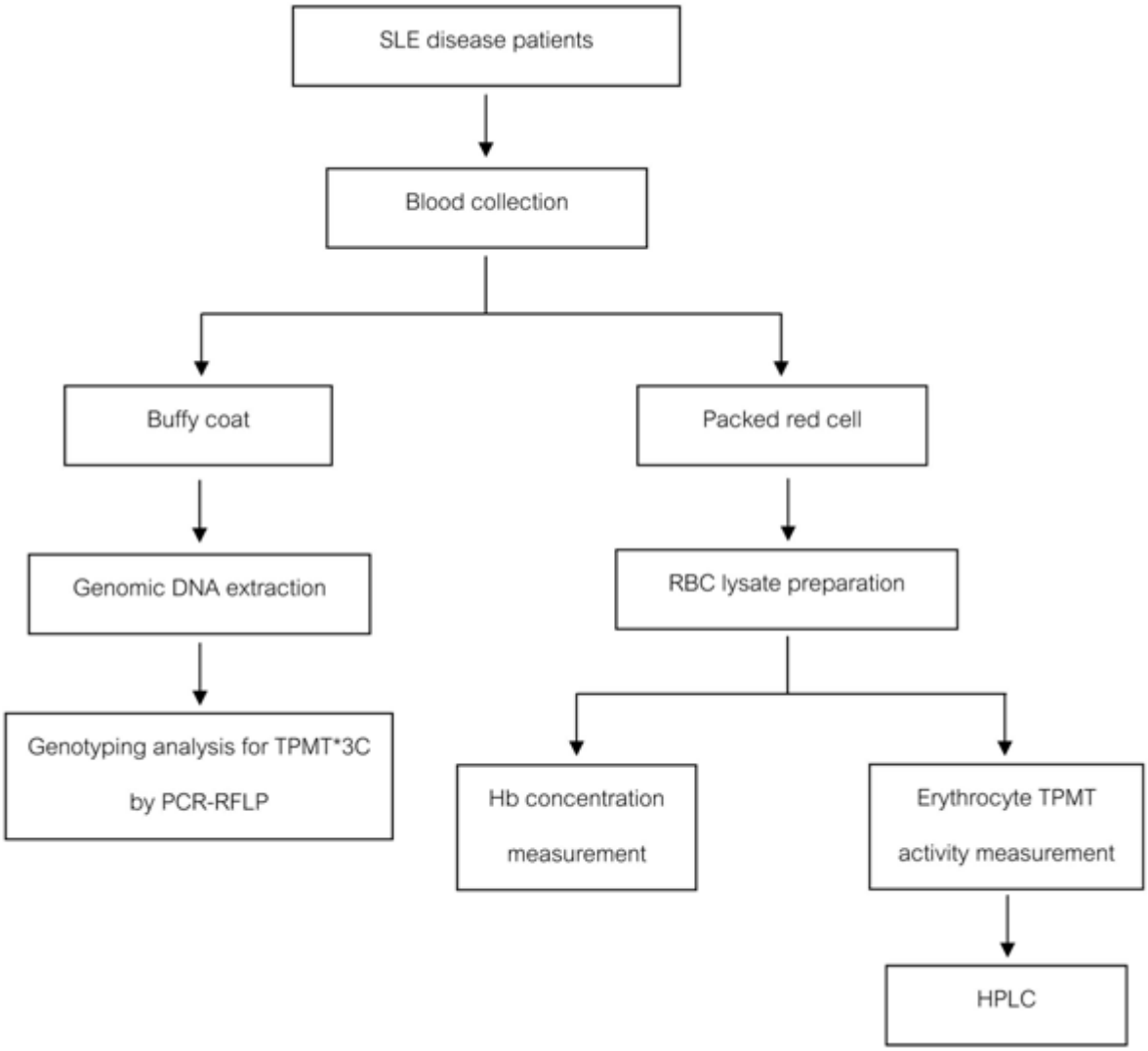
วิเคราะห์ความสัมพันธ์ในการเกิดการกดการทำงานของไขกระดูกจากการใช้ยา azathioprine ในการรักษาผู้ป่วย SLE ที่มีรูปแบบของยีน TPMT เป็นแบบ wild type และ *3C mutant ด้วย Fisher's exact test และแสดงผลในรูปของค่าความเสี่ยงสัมพัทธ์ (odd ratio; OR) โดยมีค่าความเชื่อมั่นที่ 95% ในการวิเคราะห์ การเปรียบเทียบความสามารถในการทำงานของเอ็นไซม์ TPMT ภายในเม็ดเลือดแดงของผู้ป่วยที่มีลักษณะทางพันธุกรรมที่แตกต่างกัน โดยข้อมูลมีการกระจายตัวเป็นแบบปกติใช่สถิติ t-test ข้อมูลทั้งหมดวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ SPSS เวอร์ชัน 15.0 กำหนดระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ $P < 0.05$

ผลการวิจัย

การศึกษานี้เป็นการศึกษาในผู้ป่วยโรคภูมิคุ้มกันตนเองบกพร่อง (Systemic Lupus Erythematosus; SLE) ที่ทำการรักษาในโรงพยาบาลจุฬาลงการณ์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จำนวน 40 ราย ได้รับการรักษาด้วยยา azathioprine โดยมีอายุเฉลี่ยอยู่ที่ 34.41 ± 10.96 ปี น้ำหนักเฉลี่ย 55.59 ± 9.09 กิโลกรัม และมีปริมาณยาที่ได้รับในระหว่างการรักษาอยู่ที่ 1.47 ± 0.46 มก./กก./วัน และมีค่ามัธยฐานเท่ากับ 1.53 มก./กก./วัน

ผลการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของยีน thiopurine S-methyltransferase (TPMT)

จากการตรวจวิเคราะห์ความผิดแผกทางพันธุกรรมของยีน TPMT ที่มีรูปแบบ *3C โดยอาศัยเทคนิค



รูปที่ 1. แผนผังของการเก็บตัวอย่างเลือดและการตรวจวิเคราะห์เอ็นไซม์ TPMT

PCR-RFLP พบว่าเป็นผู้ที่มีลักษณะทางพันธุกรรมแบบปกติ (wild type) TPMT*1/*1 จำนวน 36 ราย คิดเป็น 90% และลักษณะทางพันธุกรรมแบบ TPMT*1/*3C จำนวน 4 ราย คิดเป็น 10% โดยไม่พบผู้ป่วยที่มีลักษณะทางพันธุกรรมแบบ TPMT*3C/*3C ในการศึกษาครั้งนี้

อุบัติการณ์ของการกดการทำงานของไขกระดูกจากการใช้ยา AZA ในกลุ่มผู้ป่วย SLE ที่มีลักษณะทางพันธุกรรมของยีน TPMT ที่แตกต่างกัน

เกณฑ์ในการเกิดการกดการทำงานของไขกระดูกจากการใช้ยาAZA ได้แก่ ระดับเม็ดเลือดขาวต่ำหรือระดับเม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิลต่ำ หรือเกล็ดเลือดต่ำ อย่างใดอย่างหนึ่งหรือมากกว่า รวมจำนวนทั้งสิ้น 5 รายจากทั้งสิ้น 36 รายที่มีข้อมูลทางคลินิก คิดเป็น 13.89% โดยกลุ่มผู้ป่วยที่มีลักษณะทางพันธุกรรมแบบ TPMT*1/*3C จำนวน 4 ราย โดย 3 ราย เกิดการกดการทำงานของไขกระดูก คิดเป็น 75% และกลุ่มผู้ป่วยที่มีลักษณะทางพันธุกรรมแบบ TPMT*1/*1 จำนวน 32 ราย มี 2 ราย เกิดการกดการทำงานของไขกระดูก จำนวน 6.3% เมื่อทดสอบทางสถิติด้วย Fisher's exact test พบว่าผู้ป่วยที่มีลักษณะทางพันธุกรรมของยีน TPMT แตกต่างกัน พบว่าเกิดอุบัติการณ์ของการเกิดการกด

การทำงานของไขกระดูกจากการใช้ยา AZA ในกลุ่มผู้ป่วยที่มีลักษณะทางพันธุกรรมแบบ TPMT*1/*3C มากกว่าในกลุ่มผู้ป่วยที่มีลักษณะทางพันธุกรรมแบบปกติ (TPMT*1/*1) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p = 0.005) โดยพบว่ามีความเสี่ยงสัมพัทธ์ (OR) เท่ากับ 45 เท่า (95%CI 3.092 – 654.900, p = 0.000) เมื่อแยกออกเป็นผู้ป่วยที่มีระดับเม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิลต่ำพบว่า กลุ่มผู้ป่วยที่มีลักษณะทางพันธุกรรมแบบ TPMT*1/*3C มี 2 ราย จากทั้งหมด 4 ราย ที่มีระดับเม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิลต่ำ คิดเป็น 50% และกลุ่มผู้ป่วยที่มีลักษณะทางพันธุกรรมแบบ TPMT*1/*1 จำนวน 32 ราย มีเพียง 1 ราย ที่มีระดับเม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิลต่ำคิดเป็น 3.1% เมื่อทดสอบทางสถิติด้วย Fisher's exact test พบว่าผู้ป่วยที่มีลักษณะทางพันธุกรรมของยีน TPMT แตกต่างกัน มีอุบัติการณ์ของระดับเม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิลต่ำจากการใช้ยา AZA ในกลุ่มผู้ป่วยที่มีลักษณะทางพันธุกรรมแบบ TPMT*1/*3C มากกว่าในกลุ่มผู้ป่วยที่มีลักษณะทางพันธุกรรมแบบปกติ (TPMT*1/*1) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p = 0.027) โดยพบว่ามีความเสี่ยงสัมพัทธ์ (OR) เท่ากับ 31 เท่า (95%CI 1.896 – 506.771, p = 0.000) ซึ่งผู้ป่วยที่เข้าร่วมวิจัยในครั้งนี้ไม่พบว่ามีระดับเกร็ดเลือดต่ำจากการใช้ยา AZA (ดังตารางที่ 2)

ตารางที่ 1. ความถี่ของยีน TPMT ที่พบในกลุ่มผู้ป่วย SLE ที่ได้รับการรักษาด้วยยา azathioprine

Frequency		N	% observed frequency
Genotype	TPMT*1/*1 (A/A)	36	90.00
	TPMT*1/*3C (A/G)	4	10.00
	TPMT*3C/*3C (G/G)	0	0.00
	Total	40	100.00
Allele	Allele A	76	95.00
	Allele G	4	5.00
	Total allele	80	100.00

ตารางที่ 2. อุบัติการณ์ในการเกิดการกดการทำงานของไขกระดูก (myelosuppression) เมื่อเปรียบเทียบกลุ่มคนไข้ที่มีลักษณะทางพันธุกรรมแตกต่างกัน

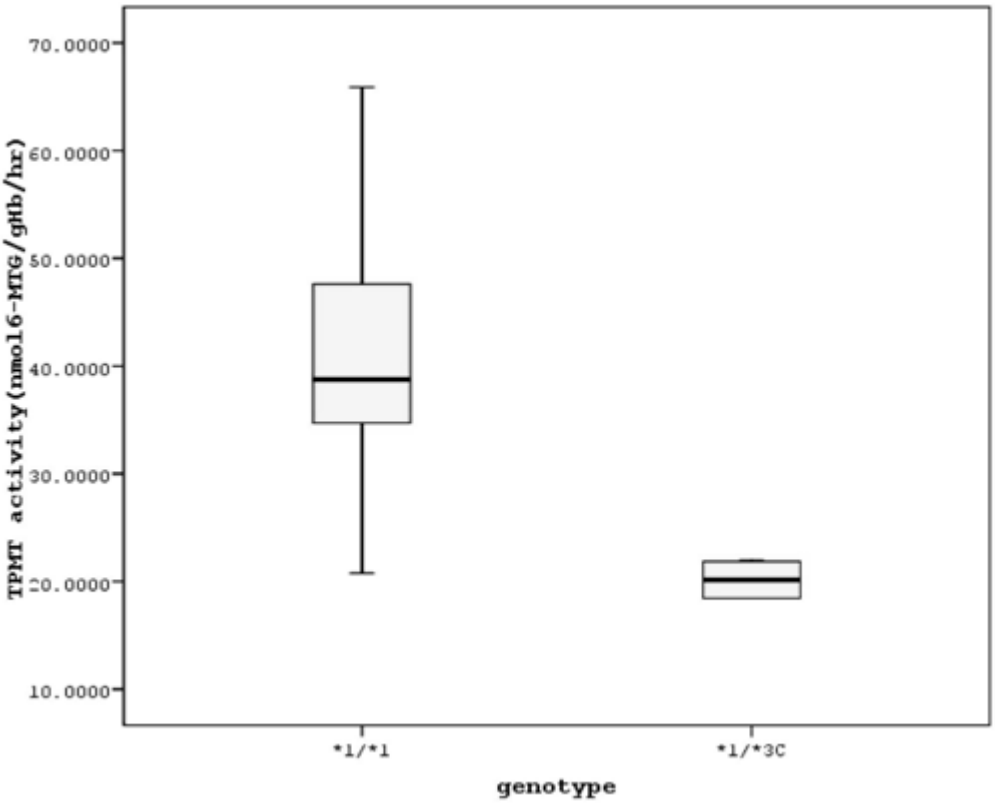
TPMT genotype	AZA-induced myelosuppression in SLE patients			
	Leucopenia	Neutropenia	Missing	Total
*1/*1 (wild type)(N)	2 (6.30%)	1 (3.1%)	4 (11.11%)	36
*1/*3C (N)	3 (75.0%)	2 (50.0%)	0 (0.00%)	4
Total	5 (13.89%)	3 (8.33%)	4 (10.0%)	40
p-value	0.005	0.027		
Odd ratio	45 เท่า	31 เท่า		
	(95%CI 3.092 – 654.900, p = 0.000)	(95%CI 1.896 – 506.771, p = 0.000)		

ผลการศึกษาการทำงานของเอ็นไซม์ TPMT ในเม็ดเลือดแดงของผู้ป่วย SLE

ผู้ป่วยจำนวน 18 รายที่สามารถตรวจวัดการทำงานในเม็ดเลือดแดง พบว่าข้อมูลดังกล่าวมีการกระจายตัวปกติ (p = 0.621) มีค่าอยู่ระหว่าง 18.446 ถึง 65.886 nmol 6-MTG/gHb/hr มีค่าเฉลี่ย (mean) เท่ากับ 39.29 ± 13.29 (SD) ค่ามัธยฐาน (median) เท่ากับ 38.224 nmol 6-MTG/gHb/hr ซึ่งเป็นผู้ป่วยที่มีลักษณะทางพันธุกรรมแบบ TPMT*1/*1 จำนวน 16 ราย มีค่าเฉลี่ย (mean) เท่ากับ 41.68 ± 12.04 (SD) และ TPMT*1/*3C จำนวน 2 ราย มีค่าเฉลี่ย (mean) เท่ากับ 20.17 ± 2.43 (SD) เมื่อเปรียบเทียบการทำงานของเอ็นไซม์ในคนไข้ทั้งสองกลุ่มโดยใช้สถิติ t-test พบว่าผู้ป่วยที่มีลักษณะพันธุกรรมแบบ TPMT*1/*3C มีความสามารถในการทำงานของเอ็นไซม์ TPMT ในเม็ดเลือดแดงต่ำกว่าในผู้ป่วยที่มีลักษณะทางพันธุกรรมแบบปกติ (wild type) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p = 0.026), ดังรูปที่ 2

ขนาดของยา AZA ในกลุ่มผู้ป่วยจำแนกตามอุบัติการณ์การกดการทำงานของไขกระดูก

เมื่อเปรียบเทียบขนาดยา AZA ที่ให้กับผู้ป่วยในกลุ่มที่เกิดการกดการทำงานของไขกระดูกและกลุ่มที่ไม่เกิดพิษพบว่าทั้งสองกลุ่มได้รับยาไม่แตกต่างกัน (ค่ามัธยฐานเท่ากับ 2.00 และ 1.53 มก./กก./วัน, p = 0.091)



รูปที่ 2. การทำงานของเอ็นไซม์ TPMT ภายในเม็ดเลือดแดงของผู้ป่วย SLE จำแนกตามลักษณะทางพันธุกรรมของยีน TPMT

การอภิปรายผล

ในการศึกษาครั้งนี้พบผู้ป่วย SLE ที่มีความผิดแผกทางพันธุกรรมแบบ heterozygous TPMT*1/*3C มีความถี่ของยีนเท่ากับ 10% และมีความถี่ของ allele เท่ากับ 5% พบว่ามีความถี่เท่ากับการศึกษาในกลุ่มประชากรสุขภาพดีเชื้อสายไทยอีสาน [18] การศึกษาครั้งนี้พบว่ามีความสัมพันธ์กับการทำงานของเอ็นไซม์ TPMT ภายในเม็ดเลือดแดงที่ต่ำกว่าปกติและพบว่าอุบัติการณ์ของการเกิดภาวะเม็ดเลือดขาวต่ำจากการใช้ยา AZA มากกว่าผู้ป่วย SLE ที่มีลักษณะทางพันธุกรรมแบบ TPMT*1/*1 (wild type) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีความเสี่ยงสัมพัทธ์ (OR) เท่ากับ 45 เท่า ($p<0.001$) และภาวะเม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิลต่ำมากกว่าผู้ป่วย SLE ที่มีลักษณะทางพันธุกรรมแบบ TPMT*1/*1 (wild type) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเช่นกัน ($p = 0.027$) ซึ่งมีความเสี่ยงสัมพัทธ์เท่ากับ 31 เท่า ($p<0.001$) จากผลการศึกษาดังกล่าวพบว่าแตกต่างจากการศึกษาผู้ป่วย SLE ในประเทศสหรัฐอเมริกาในปีค.ศ. 1999 [22] และปีค.ศ. 2005 ในประเทศญี่ปุ่น [16] ที่สรุปว่าความผิดแผกทางพันธุกรรมของยีน TPMT ไม่สามารถใช้ในการทำนายการเกิดพิษจากการใช้ยา AZA ในผู้ป่วยได้

การศึกษาในครั้งนี้ยังมีข้อจำกัดเนื่องจากเป็นการศึกษาแบบ retrospective ทำให้ไม่สามารถ วัดการทำงานของเอ็นไซม์ในผู้ป่วยได้ทุกราย มีเพียง 18 รายเท่านั้นที่สามารถวัดการทำงานของเอ็นไซม์ได้ และเมื่อนำมาหาความสัมพันธ์กับลักษณะทางพันธุกรรมพบว่าลักษณะทางพันธุกรรมแบบ TPMT*1/*3C มีการทำงานของเอ็นไซม์ TPMT ในเม็ดเลือดแดงต่ำกว่าในผู้ป่วยที่มีลักษณะทางพันธุกรรมแบบปกติ (wild type) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.026$)

ถึงอย่างไรก็ตามยังมีผู้ป่วยที่พบว่ามีลักษณะทางพันธุกรรมเป็นแบบ TPMT*1/*1 แต่มีการทำงานของเอ็นไซม์อยู่ในระดับเดียวกับลักษณะทางพันธุกรรมแบบ TPMT*1/*3C จำนวน 1 ราย แต่ไม่พบว่าเกิดการกดการทำงานของไขกระดูกอาจเกิดจากแพทย์สั่งหยุดการใช้ยา AZA ก่อนที่จะเกิดเหตุการณ์เนื่องจากคนไข้มีอาการของโรคกำเริบและเหตุที่มีการทำงานของเอ็นไซม์ต่ำแต่ไม่พบว่ามีลักษณะทางพันธุกรรมปกติอาจเนื่องมาจากการทดสอบครั้งนี้เป็นการทดสอบเพียง TPMT*3C เท่านั้น ปัจจุบันพบว่ามีลักษณะทางพันธุกรรมที่ผิดแผกไปในส่วนของยีนมากถึง 27 รูปแบบ ในปี ค.ศ. 2009 พบผู้ป่วยเปลี่ยนไตในประเทศไทยมีลักษณะพันธุกรรมแบบ TPMT*27 ซึ่งยังไม่เคยพบมาก่อนและพบว่ามีการทำงานของเอ็นไซม์ต่ำกว่า wild type [19] นอกจากนี้ยังมี TPMT*6 มีอุบัติการณ์ต่ำในกลุ่มประเทศเกาหลี (Korean) และ ญี่ปุ่น (Japanese) [23, 24] ซึ่งไม่ได้ทำการศึกษาในครั้งนี้ นอกจากนี้ยังมีผลจากความผิดแผกทางพันธุกรรมในส่วนของ promoter ของยีน TPMT (variable number of tandem repeats; VNTR) จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าจำนวนชุดของ tandem repeats ส่งผลกระทบต่อการถอดรหัสทางพันธุกรรม (transcription) ส่งผลต่อการทำงานของเอ็นไซม์ [25] นอกจากนี้ยังพบว่าผู้ป่วยที่มีลักษณะทางพันธุกรรมแบบ TPMT*1/*1 และมีการทำงานของเอ็นไซม์ปกติแต่เกิดการกดการทำงานของไขกระดูกจำนวน 1 ราย อาจเกิดจากการทำงานของเอ็นไซม์อื่นที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเปลี่ยนแปลงยา AZA ในร่างกายมีความผิดปกติ ได้แก่ การศึกษาในกลุ่มผู้ป่วย IBD และ rheumatoid arthritis พบว่ายีน ITPA ที่มีรูปแบบ ITPA94C>A ส่งผลให้การทำงานของเอ็นไซม์ ITPA ต่ำ ส่งผลให้ 6-TITP สูงขึ้น ทำให้เกิดพิษจากการใช้ยาเพิ่มมากขึ้น [26] และยังพบว่าในผู้ป่วย IBD ที่มีลักษณะทางพันธุกรรมของยีน GST เป็นแบบ GST-M1 อาจทำให้มี 6-MP ในเซลล์สูงขึ้น จึงเสี่ยงต่อภาวะการณ์เกิดเม็ดเลือดขาวต่ำมากขึ้น [27] นอกจากนี้ยังมีการศึกษาในประชากรชาวคอเคเซียนและชาวญี่ปุ่นพบว่าประมาณ 20% และ 11% มีการทำงานของเอ็นไซม์ XO ต่ำ [28] ในปัจจุบันยังไม่มีการศึกษายีนที่เกี่ยวข้องเหล่านี้ในประชากรไทย นอกจากการทำงานของยีนที่มีความเกี่ยวข้องกันแล้วยังมีปัจจัยแวดล้อมอื่นเช่น การให้เลือดกับคนไข้ทำให้ค่าการทำงานที่วัดได้ไม่ตรงกับความเป็นจริง การใช้ยาร่วมมีรายงานพบว่ามียาหลายชนิดทำให้

ตารางที่ 3. เปรียบเทียบความถี่ของอัลลีล TPMT*3C ในกลุ่มประชากรต่างเชื้อชาติ

Population	N	Allele frequency		References
		*1	*3C	
Thai	400	0.950	0.050	Srimarpirom S, et.al, 2004
Chinese	384	0.977	0.023	Collie-Duguid ES, et.al, 1999
Japanese	1044	0.984	0.016	Kumagai K, et.al, 2001
Taiwanese	498	0.994	0.006	Chang JG, et.al, 2002
South-east Asians	198	0.990	0.010	Chang JG, et.al, 2002
American Caucasians	564	0.964	0.002	Hon YY, et.al, 1999
British Caucasians	398	0.947	0.003	Ameyaw MM, et.al, 1999

N represents number of alleles detected. Data in parentheses represent 95% CI

การทำงานของเอ็นไซม์ TPMT ต่ำลง เช่น salphasalazine, olalazine, mesalamine, balsazide [15, 29-31], furosemide, bendoflumethiozide, trichlomethiozide [32] เป็นต้น ซึ่งการศึกษาครั้งนี้ไม่ได้ทำการเก็บข้อมูลในส่วนนี้ และยังอาจเกิดจากการกำเริบของโรค, การติดเชื้อไวรัสและการใช้ชีวิตประจำวันของคนไข้ (ตารางที่ 3)

นอกจากนี้ยังมีคนไข้ที่มีลักษณะทางพันธุกรรมแบบ TPMT*1/*3C ที่ไม่เกิดพิษจากการใช้ยาจำนวน 1 ราย และไม่มีข้อมูลการทำงานของเอ็นไซม์ไม่สามารถติดตามคนไข้มารับการตรวจวิเคราะห์ได้และเหตุที่ไม่เกิดพิษจากการใช้ยาอาจเป็นเพราะคนไข้ไม่ได้ใช้ยาตามแพทย์สั่งหรือได้รับยาในปริมาณที่ต่ำ

ความสามารถในการทำงานของเอ็นไซม์ TPMT ในแต่ละคนมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญตามลักษณะของพันธุกรรมที่ปรากฏ ทั้งนี้การตรวจระดับเม็ดเลือดในกระแสเลือดของผู้ป่วยเพียงอย่างเดียวอาจไม่เพียงพอที่จะป้องกันพิษที่เกิดจากการใช้ยา AZA ได้เนื่องจากเราไม่สามารถวัดระดับเม็ดเลือดของผู้ป่วยได้ตลอดเวลา จึงต้องทำการวิเคราะห์ลักษณะทางพันธุกรรมก่อนการใช้ยาเพื่อใช้เป็นเครื่องมือประกอบการตัดสินใจของแพทย์ในการปรับขนาดยาหรือเลือกใช้ยาให้เหมาะสมกับคนไข้ เพื่อให้ได้รับผลการรักษาสูงสุดทั้งในด้านประสิทธิภาพและความปลอดภัย

ข้อสรุป

จากการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมรูปแบบ TPMT*3C และความสามารถในการทำงานของเอ็นไซม์ TPMT พบว่าผู้ป่วย SLE ที่มีพันธุกรรมรูปแบบ TPMT*1/*3C มีการทำงานของเอ็นไซม์ของเอ็นไซม์ TPMT ที่ต่ำกว่าผู้ป่วยที่มีพันธุกรรมปกติและมีความเสี่ยงในการเกิดการกดไขกระดูกจากการใช้ยา AZA อย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นลักษณะทางพันธุกรรมของยีน TPMT สามารถใช้ในการทำนายพิษที่เกิดขึ้นจาก การใช้ยา AZA ได้

ข้อเสนอแนะ

การศึกษาวิจัยครั้งนี้อาจมีขนาดของตัวอย่างน้อยเกินไปจึงควรเพิ่มขนาดตัวอย่างเพื่อให้การวิเคราะห์น่าเชื่อถือมากขึ้น และควรเก็บข้อมูลของคนไข้ที่มีความความเกี่ยวข้องให้ครบถ้วนเพื่อให้ง่ายต่อการสรุปผลการวิจัย

อ้างอิง

1. Coulthard S, Hogarth L. The thiopurines: an update. Invest New Drugs 2005 Dec; 23(6): 523-32
2. Bertino JR. Improving the curability of acute leukemia: pharmacologic approaches. Semin

Hematol 1991 Jul; 28(3 Suppl 4): 9-11

3. Pan BF, Nelson JA. Characterization of the DNA damage in 6-thioguanine-treated cells. Biochem Pharmacol 1990 Sep 1; 40(5): 1063-9
4. Karran P. Mechanisms of tolerance to DNA damaging therapeutic drugs. Carcinogenesis 2001 Dec; 22(12): 1931-7
5. McLeod HL, Siva C. The thiopurine S-methyltransferase gene locus-implications for clinical pharmacogenomics. Pharmacogenomics 2002 Jan; 3(1): 89-98
6. Evans WE. Pharmacogenetics of thiopurine S-methyltransferase and thiopurine therapy. Ther Drug Monit 2004 Apr; 26(2):186-91
7. Weinshilboum R. Thiopurine pharmacogenetics: clinical and molecular studies of thiopurine methyltransferase. Drug Metab Dispos 2001 Apr; 29(4 Pt 2): 601-5
8. Corominas H, Baiget M. Clinical utility of thiopurine S-methyltransferase genotyping. Am J Pharmacogenomics2004; 4(1): 1-8
9. Weinshilboum RM, Sladek SL. Mercaptopurine pharmacogenetics: monogenic inheritance of erythrocyte thiopurine methyltransferase activity. Am J Hum Genet1980 Sep; 32(5): 651-62
10. Szumlanski C, Otterness D, Her C, Lee D, Brandriff B, Kelsell D, Spurr N, Lennard L, Wieben E, Weinshilboum R. Thiopurine methyltransferase pharmacogenetics: human gene cloning and characterization of a common polymorphism. DNA Cell Biol1996 Jan;15(1):17-30
11. Krynetski EY, Fessing MY, Yates CR, Sun D, Schuetz JD, Evans WE. Promoter and intronic sequences of the human thiopurine S-methyltransferase (TPMT) gene isolated from a human PAC1 genomic library. Pharm Res 1997 Dec; 14(12): 1672-8
12. Fessing MY, Krynetski EY, Zambetti GP, Evans WE. Functional characterization of the human thiopurine S-methyltransferase (TPMT) gene promoter. Eur J Biochem 1998 Sep 15; 256(3): 510-7
13. Aarbakke J, Janka-Schaub G, Elion GB. Thiopurine biology and pharmacology. Trends Pharmacol Sci 1997 Jan; 18(1): 3-7
14. Kurzawski M, Gawronska-Szklarz B, Drozdzik M. Frequency distribution of thiopurine S-methyltransferase alleles in a polish population. Ther Drug Monit 2004 Oct; 26(5): 541-5
15. Lowry PW, Franklin CL, Weaver AL, Szumlanski CL, Mays DC, Loftus EV, Tremaine WJ, Lipsky JJ, Weinshilboum RM, Sandborn WJ. Leucopenia resulting from a drug interaction between azathioprine or 6-mercaptopurine and mesalamine, sulphasalazine, or balsalazide. Gut 2001 Nov; 49(5): 656-64
16. Okada Y, Nakamura K, Kodama T, Ueki K, Tsukada Y, Maezawa A, Tsukamoto N, Nojima Y, Ishizaki T, Horiuchi R, et al. Thiopurine methyltransferase genotype and phenotype status in Japanese patients with systemic lupus erythematosus. Biol Pharm Bull 2005 Nov; 28(11): 2117-9
17. Hongeng S, Sasanakul W, Chuansumrit A, Pakakasama S, Chattananon A, Hathirat P. Frequency of thiopurine S-methyltransferase

genetic variation in Thai children with acute leukemia. Med Pediatr Oncol 2000 Oct; 35(4): 410-4

18. Srimartpirom S, Tassaneeyakul W, Kukongviriyapan V, Tassaneeyakul W. Thiopurine S-methyltransferase genetic polymorphism in the Thai population. Br J Clin Pharmacol 2004 Jul; 58(1): 66-70
19. Feng Q, Vannaprasaht S, Peng Y, Angsuthum S, Avihingsanon Y, Yee VC, Tassaneeyakul W, Weinshilboum RM. Thiopurine S-methyltransferase pharmacogenetics: functional characterization of a novel rapidly degraded variant allozyme. Biochem Pharmacol Apr 1; 79(7): 1053-61
20. Wong DR, Derijks LJ, den Dulk MO, Gemmeke EH, Hooymans PM. The role of xanthine oxidase in thiopurine metabolism: a case report. Ther Drug Monit 2007 Dec; 29(6): 845-8
21. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Res 1988 Feb 11;16(3):1215
22. Naughton MA, Battaglia E, O'Brien S, Walport MJ, Botto M. Identification of thiopurine methyltransferase (TPMT) polymorphisms cannot predict myelosuppression in systemic lupus erythematosus patients taking azathioprine. Rheumatology (Oxford) 1999 Jul;38(7):640-4
23. Ando M, Ando Y, Hasegawa Y, Sekido Y, Shimokata K, Horibe K. Genetic polymorphisms of thiopurine S-methyltransferase and 6-mercaptopurine toxicity in Japanese children with acute lymphoblastic leukaemia. Pharmacogenetics 2001 Apr;11(3):269-73
24. Kham SK, Tan PL, Tay AH, Heng CK, Yeoh AE, Quah TC. Thiopurine methyltransferase polymorphisms in a multiracial asian population and children with acute lymphoblastic leukemia. J Pediatr Hematol Oncol 2002 Jun-Jul;24(5):353-9
25. Yan L, Zhang S, Eiff B, Szumlanski CL, Powers M, O'Brien JF, Weinshilboum RM. Thiopurine methyltransferase polymorphic tandem repeat: genotype-phenotype correlation analysis. Clin Pharmacol Ther2000 Aug; 68(2):210-9
26. Sumi S, Marinaki AM, Arenas M, Fairbanks L, Shobowale-Bakre M, Rees DC, Thein SL, Ansari A, Sanderson J, De Abreu RA, et al. Genetic basis of inosine triphosphate pyrophosphohydrolase deficiency. Hum Genet 2002 Oct;111(4-5):360-7
27. Stocco G, Martelossi S, Barabino A, Decorti G, Bartoli F, Montico M, Gotti A, Ventura A. Glutathione-S-transferase genotypes and the adverse effects of azathioprine in young patients with inflammatory bowel disease. Inflamm Bowel Dis 2007 Jan;13(1):57-64
28. Kudo M, Moteki T, Sasaki T, Konno Y, Ujiie S, Onose A, Mizugaki M, Ishikawa M, Hiratsuka M. Functional characterization of human xanthine oxidase allelic variants. Pharmacogenet Genomics 2008 Mar;18(3): 243-51
29. Woodson LC, Weinshilboum RM. Human kidney thiopurine methyltransferase. Purification and biochemical properties. Biochem

Pharmacol 1983 Mar 1;32(5):819-26

30. Szumlanski CL, Weinshilboum RM. Sulphasalazine inhibition of thiopurine methyltransferase: possible mechanism for interaction with 6-mercaptopurine and azathioprine. Br J Clin Pharmacol 1995 Apr;39(4):456-9

31. Lewis LD, Benin A, Szumlanski CL, Otterness DM, Lennard L, Weinshilboum RM, Nierenberg DW. Olsalazine and 6-mercaptopurine-related bone marrow suppression: a possible drug-drug interaction. Clin Pharmacol Ther 1997 Oct;62(4):464-75

32. Lysaa RA, Giverhaug T, Wold HL, Aarbakke J. Inhibition of human thiopurine methyltransferase by furosemide, bendroflumethiazide and trichlormethiazide. Eur J Clin Pharmacol1996;49(5):393-6