



การประชุมวิชาการและนำเสนอผลงานวิจัยระดับชาติ ครั้งที่ 8
“ก้าวข้ามขอบเขตความรู้สู่การเปลี่ยนแปลงและพัฒนาอย่างยั่งยืน”
วันที่ 23 พฤษภาคม พ.ศ. 2568

อัตราการผลิตเพื่อการวินิจฉัยของการทดสอบระดับโมเลกุลสำหรับผู้ป่วยโรคเปลือกต่อมหมวกไตหนาแต่กำเนิดชนิดไม่คลาสสิก
Diagnostic Yield of Molecular Testing for Patients with Non-Classical Congenital Adrenal Hyperplasia

จรัสแสง สุขหลวง

นิสิตระดับปริญญาโท สาขาวิชาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
E-mail: 6670026123@student.chula.ac.th

ธินี สหกิจรุ่งเรือง

ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
E-mail: taninee.p@chula.ac.th

มนนัทธ์ พงษ์พานิช

ภาควิชาคณิตศาสตร์และวิทยาการคอมพิวเตอร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
E-mail: monnat.p@chula.ac.th

วรศักดิ์ โชติเลอศักดิ์

ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
E-mail: vorasuk.s@chula.ac.th

ภัทรา ยี่ทอง

ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
E-mail: patra.y@chula.ac.th

บทคัดย่อ

โรคเปลือกต่อมหมวกไตหนาแต่กำเนิดชนิดไม่คลาสสิก เป็นโรคที่มีสาเหตุมาจากการขาดเอนไซม์ 21-ไฮดรอกซิเลส ซึ่งเกิดจากการกลายพันธุ์ของยีน *CYP21A2* โดยเป็นโรคทางพันธุกรรมที่มีการถ่ายทอดแบบยีนด้อยบนออโตโซมที่พบได้บ่อย โดยปกติในการคัดกรองผู้ป่วยจะใช้การวัดระดับ 17-ไฮดรอกซิโพรเจสเตอโรน (17-hydroxyprogesterone: 17-OHP) แต่อย่างไรก็ตามในผู้ป่วยบางรายที่เป็นโรคเปลือกต่อมหมวกไตหนาแต่กำเนิดชนิดไม่คลาสสิก มีระดับของ 17-OHP ที่ปกติ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อระบุการกลายพันธุ์ของยีน *CYP21A2* และศึกษาอัตราการผลิตเพื่อการวินิจฉัย (diagnostic yield) ของการทดสอบระดับโมเลกุลสำหรับผู้ป่วยโรคเปลือกต่อมหมวกไตหนาแต่กำเนิดชนิดไม่คลาสสิกโดยใช้เทคนิคการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมแบบยาร่วมกับการหาลำดับนิวคลีโอไทด์แบบอ่านยาวของแอมพลิคอน ผลการศึกษาพบว่า ผู้ป่วย 93 ราย สามารถระบุการกลายพันธุ์ที่เกี่ยวข้องกับโรค ได้ 11 ราย คิดเป็น 11.83% ซึ่งจะพบทั้งการกลายพันธุ์แบบ biallelic และ monoallelic ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อการวินิจฉัยและนำไปสู่การรักษาที่ถูกต้องต่อไป



คำสำคัญ: โรคเปลือกต่อมหมวกไตหนาแต่กำเนิดชนิดไม่คลาสสิก, ยีน *CYP21A2*, การหาลำดับนิวคลีโอไทด์แบบอ่านยาวของแอมพลิคอน

Abstract

Non-classic congenital adrenal hyperplasia (non-classic CAH) is a common autosomal recessive disorder caused by 21-hydroxylase deficiency due to mutations in the *CYP21A2* gene. Screening is typically performed by measuring 17-hydroxyprogesterone (17-OHP) levels; however, some patients with non-classic CAH may have normal 17-OHP levels, making diagnosis difficult. This study aimed to identify *CYP21A2* mutations and evaluate the diagnostic yield of molecular testing in non-classic CAH using long-range PCR and amplicon long-read sequencing. The results of the study showed that, among 93 patients, mutations related to the disease could be identified in 11 patients, accounting for 11.83%. Both biallelic and monoallelic mutations were found. This is beneficial for diagnosis and leads to appropriate treatment.

Keywords: Non-classic CAH, *CYP21A2* Gene, Amplicon Long-read Sequencing

บทนำ

โรคเปลือกต่อมหมวกไตหนาแต่กำเนิดชนิดไม่คลาสสิก (Non-classic congenital adrenal hyperplasia: NCCAH) เป็นโรคที่มีรูปแบบรุนแรงน้อยและแสดงอาการช้า (late-onset) ของโรคต่อมหมวกไตหนาแต่กำเนิด (CAH) โดยเป็นโรคทางพันธุกรรมที่มีการถ่ายทอดแบบยีนด้อยบนออโตโซม (autosomal recessive disorder) ที่มีสาเหตุมาจากขาดเอนไซม์ 21-ไฮดรอกซิเลส (21-hydroxylase) โดยจะมีการทำงานของเอนไซม์ 21-ไฮดรอกซิเลส หลงเหลืออยู่ 20-50% ส่งผลให้เกิดภาวะฮอร์โมนแอนโดรเจนเกิน (hyperandrogenism) แต่ยังคงมีฮอร์โมนคอร์ติซอลเหลืออยู่เล็กน้อย และมีการขาดฮอร์โมนแอลโดสเตอโรนที่ไม่รุนแรงมากนัก (Falhammar and Nordenström, 2015) ผู้ป่วยโรคนี้จะแสดงอาการของฮอร์โมนแอนโดรเจนเกินเมื่อมีอายุมากขึ้น และจะมีลักษณะอาการทางคลินิก ได้แก่ ขนหัวหน่าวก่อนวัย (premature pubarche) สิว และกระดูกมีอายุมากขึ้น ในวัยเด็กตอนปลาย ขณะที่ผู้หญิงวัยรุ่นและวัยผู้ใหญ่จะมีลักษณะอาการทางคลินิก ได้แก่ ขนดก รอบประจำเดือนมาน้อย และสิว (Nieman and Merke, 2011) ปัจจุบันการคัดกรองโรคเปลือกต่อมหมวกไตหนาแต่กำเนิดชนิดไม่คลาสสิกจะใช้การวัดระดับ 17-ไฮดรอกซิโพรเจสเตอโรนที่มากกว่า 200 ng/dl ในตอนเช้าเป็นตัวคัดกรอง (Speiser et al., 2018) อย่างไรก็ตามจากการศึกษาก่อนหน้าพบว่า 2.1% ของผู้ป่วยที่เป็นโรคเปลือกต่อมหมวกไตหนาแต่กำเนิดชนิดไม่คลาสสิก มีระดับของ 17-ไฮดรอกซิโพรเจสเตอโรน ที่ปกติ (Livadas et al., 2015) ดังนั้นในการวินิจฉัยโรคเปลือกต่อมหมวกไตหนาแต่กำเนิดชนิดไม่คลาสสิกนั้น การตรวจทางพันธุกรรมอาจเป็นวิธีที่สามารถเพิ่มความแม่นยำในการวินิจฉัยได้ โดยสาเหตุของการขาดเอนไซม์ 21-ไฮดรอกซิเลส เกิดจากการกลายพันธุ์ของยีน *CYP21A2* (Falhammar and Nordenström, 2015)



ยีน *CYP21A2* เป็นยีนที่สร้างเอนไซม์ 21-ไฮดรอกซิเลส ตั้งอยู่บนแขนข้างสั้นของโครโมโซมที่ 6p21.33 ซึ่งห่างจาก *CYP21A1* pseudogene (*CYP21A1P*) ประมาณ 30 kb โดยยีน *CYP21A2* และ *CYP21A1P* จะมีความคล้ายคลึงกันสูงมากถึงประมาณ 98% ในเอกซอน และ 96% ในอินทรอน โดยประมาณ 70-75% ของการกลายพันธุ์ที่ทำให้เกิดโรคในยีน *CYP21A2* ถูกถ่ายโอนมาจากยีน *CYP21A1P* เรียกกระบวนการนี้ว่า gene conversion ขณะอีกส่วนหนึ่งเกิดจาก unequal crossing over ระหว่างยีน *CYP21A2* และ *CYP21A1P* ในระยะไมโอซิส ซึ่งอาจนำไปสู่การเกิด chimeric genes (Pignatelli et al., 2019)

เนื่องจากความซับซ้อนของบริเวณที่ตั้งของยีน *CYP21A2* การมี pseudogene ทำให้การตรวจทางพันธุกรรมทำได้ยากจำเป็นต้องอาศัยหลายเทคนิคเพื่อให้สามารถตรวจสอบการกลายพันธุ์ทุกแบบได้อย่างถูกต้องแม่นยำ เช่น การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมเฉพาะอัลลีล (allele-specific polymerase chain reaction: allele-specific PCR) การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอด้วยวิธีแซงเกอร์ (DNA sanger sequencing) และการหาลำดับนิวคลีโอไทด์แบบอ่านสั้น (short-read next-generation sequencing: NGS) รวมถึงการหาลำดับนิวคลีโอไทด์แบบอ่านยาว (long-read sequencing) (Tantirukdham et al., 2022) โดยในปี 2022 Tantirukdham และคณะพบว่าเทคนิคการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมแบบยาว (long-range PCR) ร่วมกับการหาลำดับนิวคลีโอไทด์แบบอ่านยาวของแอมพลิคอน (amplicon long-read sequencing) สามารถระบุการกลายพันธุ์ในยีน *CYP21A2* ในผู้ป่วยชาวไทยได้ทั้งหมด ซึ่งคิดเป็น 100% ซึ่งการหาลำดับนิวคลีโอไทด์แบบอ่านยาวนั้นเป็นเทคโนโลยีสำหรับการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สามารถอ่านลำดับเบสได้ 10 kbp ถึง หลาย Mbp ทำให้การหาลำดับนิวคลีโอไทด์แบบอ่านยาวสามารถตรวจจับความแปรผันทางพันธุกรรมที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคที่ตรวจจับได้ยากและมีความซับซ้อนได้ (Logsdon et al., 2020)

ดังนั้นในงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อระบุการกลายพันธุ์ของยีน *CYP21A2* ในผู้ป่วยที่มีอาการของโรคเปลือกต่อมหมวกไตหนาแต่กำเนิดชนิดไม่คลาสสิก โดยใช้เทคนิคการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมแบบยาว ร่วมกับการหาลำดับนิวคลีโอไทด์แบบอ่านยาวของแอมพลิคอน โดยศึกษาในผู้ป่วยที่มีอาการของโรคเปลือกต่อมหมวกไตหนาแต่กำเนิดชนิดไม่คลาสสิกจำนวน 93 ราย เพื่อเป็นประโยชน์ต่อการวินิจฉัยและนำไปสู่การรักษาที่ถูกต้องต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อระบุการกลายพันธุ์ของยีน *CYP21A2* และศึกษาอัตราการได้ผลเพื่อการวินิจฉัยของการทดสอบระดับโมเลกุลสำหรับผู้ป่วยโรคเปลือกต่อมหมวกไตหนาแต่กำเนิดชนิดไม่คลาสสิก

ขอบเขตการวิจัย

1. ขอบเขตประชากร เด็กผู้หญิงและผู้หญิงไทยอายุตั้งแต่ 7-45 ปี ที่เข้ารับการรักษาในคลินิกนรีเวชหรือคลินิกมีบุตรยาก และคลินิกต่อมไร้ท่อ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย
2. ขอบเขตตัวแปร การศึกษาที่ใช้เทคนิคการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมแบบยาวร่วมกับการหาลำดับนิวคลีโอไทด์แบบอ่านยาวของแอมพลิคอนในการหาการกลายพันธุ์ของยีน *CYP21A2*
3. ขอบเขตเวลา ผู้วิจัยได้ดำเนินการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ในช่วงระหว่างเดือนมกราคม พ.ศ. 2567 จนถึงเดือนมีนาคม พ.ศ. 2568



วิธีดำเนินการวิจัย

1. เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนสารพันธุกรรมด้วยเทคนิคการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมแบบยาว (long-range PCR) และตรวจสอบขนาดสารพันธุกรรมด้วยเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (gel electrophoresis)

ในงานวิจัยนี้ได้รับดีเอ็นเอมาเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมจากตัวอย่างเลือดในเด็กผู้หญิงและผู้หญิงไทยอายุตั้งแต่ 7-45 ปี ที่ได้รับการคัดกรองแล้วว่ามีความผิดปกติของโรคเปลือกต่อมหมวกไตหนาแต่กำเนิดชนิดไม่คลาสสิก จำนวน 93 ตัวอย่าง จากคลินิกนรีเวช หรือคลินิกมีบุตรยาก และคลินิกต่อมไร้ท่อ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย และได้รับการรับรองจากคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย รหัสอนุมติ IRB No. 0512/66 วันที่รับรอง 31 ตุลาคม พ.ศ. 2566 โดยใช้เทคนิคการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมแบบยาว ตามวิธีของ Tantirukdham และคณะ (2022) และใช้ PrimeSTAR GXL DNA polymerase (Takara, Japan) ซึ่งไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับยีน *CYP21A2* ได้แก่ forward primer CYP779 f (5'-AGGTGGGCTGTTTTCTTTCA-3') และ reverse primer Tena32F (5'-CTGTGCCTGGCTATAGCAAGC-3') สำหรับไพรเมอร์ CYP779f สามารถจับบริเวณ 5' ของยีน *CYP21A2* และ *CYP21A1P* ในขณะที่ไพรเมอร์ Tena32F จะจับบริเวณอินทรอนที่ 32 ของยีน *TNXB* เพื่อเพิ่มปริมาณของชิ้นส่วนสารพันธุกรรมขนาด 8,515 bp จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมมาตรวจสอบขนาดด้วยเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้ 1% agarose gel ใน 1X TBE และใช้แรงดันไฟฟ้า 90 โวลต์เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 20 นาที

2. หาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์แบบอ่านยาวของแอมพลิคอน (amplicon long-read sequencing)

นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมขนาด 8,515 bp มาเตรียมคลังดีเอ็นเอ (DNA library) เพื่อใช้สำหรับการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเทคโนโลยี multiplex SMRT[®] sequencing (Pacific Biosciences, Menlo Park, CA, USA) โดยใช้ PacBio[®] barcoded overhang adapters SMRTbell libraries ได้รับการ sequence บนเครื่อง PacBio Revio และ raw subreads ถูกทำให้เป็น HiFi reads ด้วย circular consensus sequencing (CCS) workflow (PacBio SMRTLink version 10.0) ใช้โปรแกรม Paraphase (<https://github.com/PacificBiosciences/paraphase>) เพื่อช่วยวิเคราะห์หาความแปรผันทางพันธุกรรม (variants) โดยโปรแกรมนี้สามารถแยกสายพันธุกรรมที่สืบทอดมาจากพ่อและแม่ในกลุ่มยีนที่คล้ายกัน

3. วิเคราะห์ข้อมูล

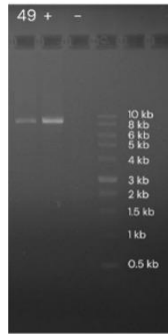
นำตำแหน่งของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความแปรผันทางพันธุกรรม ซึ่งแตกต่างจากลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิง (reference sequence) นำเข้าสู่โปรแกรม Franklin (<https://franklin.genoox.com/clinical-db/home>) ซึ่งจะให้ข้อมูลประกอบความแปรผัน (variant annotation) และกรองความแปรผัน (variant filtering) เลือกความแปรผันทางพันธุกรรมด้วยเกณฑ์ ดังต่อไปนี้ 1.) ความแปรผันทางพันธุกรรมมีความเกี่ยวข้องกับโรคเปลือกต่อมหมวกไตหนาแต่กำเนิด 2.) มีการถ่ายทอดแบบ autosomal recessive 3.) ระดับความรุนแรงความแปรผันทางพันธุกรรมอยู่ในระดับ variant of uncertain significance (vus) ขึ้นไป 4.) ความแปรผันทางพันธุกรรมต้องอยู่บริเวณที่ส่งผลกระทบต่อการทำงานของยีนหรือเอนไซม์ เช่น exon, splice



donor, splice acceptor เป็นต้น 5.) ความแปรผันทางพันธุกรรมที่มีผลกระทบที่ทำให้เกิด missense, stop gain, stop loss, start loss, start gain, frameshift

ผลการวิจัย

ผลการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนสารพันธุกรรมด้วยเทคนิคการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมแบบยาว
จากการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนสารพันธุกรรมด้วยเทคนิคการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมแบบยาว โดยใช้ดีเอ็นเอจากผู้ป่วยที่มีอาการของโรคเปลือกต่อมหมวกไตหนาแต่กำเนิดแบบไม่คลาสสิก จำนวน 93 ราย และไพรเมอร์ CYP779f และ Tena32F หลังจากนั้นตรวจสอบขนาดสารพันธุกรรมด้วยเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส จะเห็นว่าขนาดผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมเท่ากับ 8.5 kb ดังแสดงในภาพที่ 1



ภาพที่ 1 ตัวอย่างผลการทำ gel electrophoresis ของผู้ป่วยหมายเลขที่ 49 (หมายเหตุ: เครื่องหมาย + และ - หมายถึงตัวควบคุมเชิงบวก และ ตัวควบคุมเชิงลบ)

ผลการระบุการกลายพันธุ์ของยีน *CYP21A2*

เมื่อนำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมขนาด 8.5 kb ของผู้ป่วย 93 ราย มาทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ แล้วทำการวิเคราะห์ข้อมูล พบว่า สามารถระบุการกลายพันธุ์ของยีน *CYP21A2* ที่เกี่ยวข้องกับโรคได้ทั้งหมด 8 การกลายพันธุ์ ได้แก่ p.V305M, p.I173N, c.-113G>A, p.R357W, p.G111Vfs*21, p.T124I, p.V282L และ CYP21A1P/CYP21A2 chimera ชนิดที่ 1 (CYP-CH-1) ในผู้ป่วย 11 ราย โดยพบการกลายพันธุ์แบบ biallelic ในผู้ป่วย 2 ราย ซึ่งมีการกลายพันธุ์แบบ homozygous p.V305M ในยีน *CYP21A2* ในผู้ป่วย 1 ราย ขณะที่ผู้ป่วยอีก 1 ราย มีการกลายพันธุ์แบบ compound heterozygous ของ p.I173N และ c.-113G>A ในส่วนผู้ป่วยที่เหลืออีก 9 ราย มีการกลายพันธุ์แบบ monoallelic ในยีน *CYP21A2* ซึ่งทั้งหมดเป็นการกลายพันธุ์แบบ heterozygous ดังแสดงในตารางที่ 1



ตารางที่ 1 การกลายพันธุ์ในยีน *CYP21A2* ของผู้ป่วยที่มีอาการของโรคเปลือกต่อมหมวกไตหนาชนิดไม่คลาสสิก

ลำดับ	ผู้ป่วย	การกลายพันธุ์ในยีน <i>CYP21A2</i>	
		แอลลีล 1	แอลลีล 2
1	18	p.V305M	p.V305M
2	40	p.I173N	c.-113G>A
3	3	p.V305M	
4	4	CYP-CH-1	
5	19	p.R357W	
6	34	p.G111Vfs*21	
7	49	p.T124I	
8	51	p.V305M	
9	57	p.T124I	
10	67	CYP-CH-1	
11	79	p.V282L	

ผลการศึกษาอัตราการได้ผลเพื่อการวินิจฉัยของการทดสอบระดับโมเลกุลสำหรับผู้ป่วยโรคเปลือกต่อมหมวกไตหนาแต่กำเนิดชนิดไม่คลาสสิก

ในงานวิจัยนี้ พบการกลายพันธุ์ของยีน *CYP21A2* ในผู้ป่วยทั้งหมด 11 ราย จาก 93 ราย คิดเป็นอัตราการได้ผลเพื่อการวินิจฉัย (diagnostic yield) เท่ากับ 11.83% แบ่งออกเป็น biallelic จำนวน 2 ราย คิดเป็น 2.15% และ monoallelic จำนวน 9 ราย คิดเป็น 9.68% โดยตำแหน่งการกลายพันธุ์ที่พบความถี่มากที่สุด คือ p.V305M (2.15%; 4/186 alleles) รองลงมาจะเป็น CYP-CH-1 (1.08%; 2/186 alleles), p.T124I (1.08%; 2/186 alleles), p.R357W (0.54%; 1/186 alleles), p.G111Vfs*21 (0.54%; 1/186 alleles), c.-113G>A (0.54%; 1/186 alleles), p.V282L (0.54%; 1/186 alleles), p.I173N (0.54%; 1/186 alleles) ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ความถี่ของการกลายพันธุ์ในยีน *CYP21A2* ที่เกี่ยวข้องกับโรคของผู้ป่วยที่มีอาการของโรคเปลือกต่อมหมวกไตหนาแต่กำเนิดชนิดไม่คลาสสิก

ตำแหน่งการกลายพันธุ์	บริเวณ	จำนวนแอลลีล (n=186)	ความถี่ (%)
p.V305M	Exon 7	4	2.15
p.T124I	Exon 3	2	1.08
CYP-CH-1	-	2	1.08
p.V282L	Exon 7	1	0.54
p.R357W	Exon 8	1	0.54



ตำแหน่งการกลายพันธุ์	บริเวณ	จำนวนแอลลีล (n=186)	ความถี่ (%)
p.I173N	Exon 4	1	0.54
p.G111Vfs*21	Exon 3	1	0.54
c.-113G>A	Promoter	1	0.54

อภิปรายผลการวิจัย

งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาในผู้ป่วยที่มีอาการของโรคเปลือกต่อมหมวกไตหนาแต่กำเนิดชนิดไม่คลาสสิก จำนวน 93 ราย โดยใช้เทคนิคการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมแบบยาร่วมกับการหาลำดับนิวคลีโอไทด์แบบอ่านยาวของแอมพลิคอนของยีน *CYP21A2* ทำให้สามารถระบุการกลายพันธุ์ได้ทั้งหมด 8 การกลายพันธุ์ ได้แก่ p.V305M, p.I173N, c.-113G>A, p.R357W, p.G111Vfs*21, p.T124I, p.V282L และ *CYP21A1P/CYP21A2* chimera ชนิดที่ 1 (CYP-CH-1) ในผู้ป่วย 11 ราย ซึ่งการกลายพันธุ์เหล่านี้เป็นการกลายพันธุ์ที่เคยมีรายงานมาก่อนหน้านี้ทั้งหมด

โดยพบการกลายพันธุ์แบบ biallelic ในผู้ป่วย 2 ราย ในขณะที่อีก 9 ราย พบการกลายพันธุ์แบบ monoallelic หรือ heterozygous ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Osinovskaya และคณะ เมื่อปี 2024 ที่พบการกลายพันธุ์แบบ heterozygous เป็นส่วนใหญ่ในผู้ป่วยที่เป็นโรคเปลือกต่อมหมวกไตหนาแต่กำเนิดชนิดไม่คลาสสิก โดย heterozygous pathogenic variants ในยีน *CYP21A2* อาจทำให้เกิดลักษณะทางคลินิกที่เกี่ยวข้องกับฮอร์โมนแอนโดรเจนสูง โดยเป็นผลของ dominant-negative effect ของการกลายพันธุ์บางตัว เช่น p.V282L ซึ่งกรณีนี้จะทำให้การทำงานของเอนไซม์ลดลงมากกว่าที่คาดไว้และส่งผลให้มีการหลั่งของแอนโดรเจนมากขึ้นจากต่อมหมวกไตและมีอาการทางคลินิกที่เกี่ยวข้องกับโรคเปลือกต่อมหมวกไตหนาแต่กำเนิดชนิดไม่คลาสสิก ดังนั้นจึงอาจจะพบความเชื่อมโยงระหว่าง heterozygous carrier ของ pathogenic variants ในยีน *CYP21A2* และลักษณะของโรคเปลือกต่อมหมวกไตหนาแต่กำเนิดชนิดไม่คลาสสิก (Osinovskaya et al., 2024)

ซึ่งในงานวิจัยนี้พบการกลายพันธุ์ของยีน *CYP21A2* ในผู้ป่วยทั้งหมด 11 ราย จาก 93 ราย คิดเป็นอัตราการได้ผลเพื่อการวินิจฉัย (diagnostic yield) เท่ากับ 11.83% แบ่งออกเป็น biallelic จำนวน 2 ราย คิดเป็น 2.15% และ monoallelic จำนวน 9 ราย คิดเป็น 9.68% โดยตำแหน่งการกลายพันธุ์ที่พบความถี่มากที่สุดในงานวิจัยนี้ คือ p.V305M ซึ่งจากการศึกษาก่อนหน้าที่ทำการศึกษานี้ของเอนไซม์ที่มีการกลายพันธุ์ p.V305M พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ 21-ไฮดรอกซิเลส ลดลงเหลือ 46% สำหรับการเปลี่ยน 17-ไฮดรอกซิโพรเจสเตอโรน และ 26% สำหรับการเปลี่ยนโพรเจสเตอโรนเมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์ปกติ (Lajic et al., 2002)

โดยสรุปในการศึกษานี้สามารถใช้เทคโนโลยีการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมแบบยาร่วมกับการหาลำดับนิวคลีโอไทด์แบบอ่านยาวของแอมพลิคอนในยีน *CYP21A2* และสามารถพบการกลายพันธุ์ในผู้ป่วยโรคเปลือกต่อมหมวกไตหนาแต่กำเนิดชนิดไม่คลาสสิก จำนวน 11 ราย จากทั้งหมด 93 ราย คิดเป็นอัตราการได้ผลเพื่อการวินิจฉัย (diagnostic yield) 11.83%



เอกสารอ้างอิง

- Falhammar, H., & Nordenström, A. (2015). Nonclassic congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency: clinical presentation, diagnosis, treatment, and outcome. *Endocrine*. 50, 32-50.
- Lajić, S., Clauin, S., Robins, T., Vexiau, P., Blanché, H., Bellanne-Chantelot, C., & Wedell, A. (2002). Novel mutations in CYP21 detected in individuals with hyperandrogenism. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 87(6), 2824-2829.
- Livadas, S., Dracopoulou, M., Dastamani, A., Sertedaki, A., Maniati-Christidi, M., Magiakou, A. M., & Dacou-Voutetakis, C. (2015). The spectrum of clinical, hormonal and molecular findings in 280 individuals with nonclassical congenital adrenal hyperplasia caused by mutations of the CYP 21A2 gene. *Clinical endocrinology*. 82(4), 543-549.
- Logsdon, G. A., Vollger, M. R., & Eichler, E. E. (2020). Long-read human genome sequencing and its applications. *Nature Reviews Genetics*. 21(10), 597-614.
- Nieman, L. K., & Merke, D. P. (2011). Diagnosis and treatment of non classic (late-onset) congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. <http://www.uptodate.com/contents/diagnosisand-treatment-of-nonclassic-late-onset-congenital-adrenal-hyperplasia-dueto-21-hydroxylase-deficiency>. Retrieved September 24, 2024.
- Osinovskaya, N., Vashukova, E., Tarasenko, O., Danilova, M., Glavnova, O., Sultanov, I., & Glotov, A. (2024). Analysis of the CYP21A2 gene pathogenic variants in CAH patients from Surgut using next-generation sequencing (NGS). *Egyptian Journal of Medical Human Genetics*. 25(1), 32.
- Pignatelli, D., Carvalho, B. L., Palmeiro, A., Barros, A., Guerreiro, S. G., & Macut, D. (2019). The complexities in genotyping of congenital adrenal hyperplasia: 21-hydroxylase deficiency. *Frontiers in Endocrinology*. 10, 432.
- Speiser, P. W., Arlt, W., Auchus, R. J., Baskin, L. S., Conway, G. S., Merke, D. P., & White, P. C. (2018). Congenital adrenal hyperplasia due to steroid 21-hydroxylase deficiency: an endocrine society clinical practice guideline. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 103(11), 4043-4088.
- Tantirukdham, N., Sahakitrungruang, T., Chaisiwamongkol, R., Pongpanich, M., Srichomthong, C., Assawapitaksakul, A., & Shotelersuk, V. (2022). Long-read amplicon sequencing of the CYP21A2 in 48 Thai patients with steroid 21-hydroxylase deficiency. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 107(7), 1939-1947.