

การศึกษาความชุกของการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมยีนวโคซีวันตำแหน่ง – 1639 ในผู้ป่วย
ผู้ใหญ่ไทยที่รับประทานยาริวอร์ฟารินและมีระดับไอเอ็นอาร์มากกว่าสี่
และการตอบสนองต่อวิตามินเคชนิดรับประทานขนาด 1 มิลลิกรัม
ในการต้านฤทธิ์ยาริวอร์ฟาริน

นาย รวิสุต เดียววิศเรศ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาอายุรศาสตร์ ภาควิชาอายุรศาสตร์
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2551
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PREVALENCE OF VKORC1 SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM – 1639 IN THAI
ADULT PATIENTS WHO HAVE INR MORE THAN 4 FROM WARFARIN AND
RESPONSES TO ORAL 1 MG VITAMIN K FOR WARFARIN REVERSAL

Mr. Rawisut Deoisares

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Medicine

Department of Medicine

Faculty of Medicine

Chulalonghorn University

Academic year 2008

Copying of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การศึกษาความชุกของการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมยีน
วโคซีวันตำแหน่ง - 1639 ในผู้ป่วยผู้ใหญ่ไทยที่รับประทาน
ยาวอร์ฟาริน และมีระดับไอเอ็นอาร์มากกว่าสี่ และการ
ตอบสนองต่อไวตามินเคชนิดรับประทานขนาด 1 มิลลิกรัมใน
การต้านฤทธิ์ยาวอร์ฟาริน

โดย

นาย วิสูตร เดียวอิสระ

สาขาวิชา

อายุรศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ พลภัทร โรจน์นครินทร์

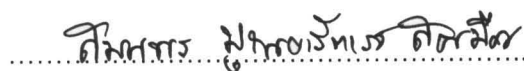
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยรับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต



คณบดีคณะแพทยศาสตร์

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ อติศร ภัทราดุลย์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์



ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ แพทย์หญิง สมนพร บุญยะรัตเวช สองเมือง)



อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ พลภัทร โรจน์นครินทร์)



กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ วิโรจน์ ศรีอุฬารพงศ์)



กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ พันธุ์เทพ อังชัยสุขศิริ)

วิสุต เดียววิศเรศ : การศึกษาความชุกของการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมยีนวีกคอซีวัน
ตำแหน่ง- 1639 ในผู้ป่วยผู้ใหญ่ไทยที่รับประทานยารวอร์ฟารินและมีระดับไอเอ็นอาร์มากกว่า
สี่ และการตอบสนองต่อไวตามินเคชนิดรับประทานขนาด 1 มิลลิกรัมในการต้านฤทธิ์ยารวอร์
ฟาริน (Prevalence of VKORC1 Single Nucleotide Polymorphism – 1639 in Thai
Patients Who have INR More Than 4 From Warfarin and Responses to 1 mg Oral
Vitamin K for Warfarin Reversal) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก รศ.นพ. พลภัทร โรจน์
นครินทร์, 72 หน้า

วัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาหาความชุกของยีนวีกคอซีวันตำแหน่ง -1639 ในผู้ป่วยที่รับประทานยารวอร์ฟาริน
เกินขนาดและดูผลของยีนวีกคอซีวันต่อการตอบสนองหลังรับประทานวิตามินเคขนาด 1 มิลลิกรัม

วิธีการวิจัย เป็นการศึกษาแบบพรรณนาไปข้างหน้าหาความชุกของยีนวีกคอซีวัน -1639 ในผู้ป่วยที่
รับประทานยารวอร์ฟารินและมีระดับ INR มากกว่าสี่และศึกษาประชากรกลุ่มย่อยที่รับประทานวิตามินเค
ขนาด 1 มิลลิกรัมแล้ววัดระดับ INR ซ้ำที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ในโรงพยาบาลจุฬา ผู้ป่วยที่ต้องได้รับ
ส่วนประกอบของเลือดและได้วิตามินเครูปแบบอื่นๆจะถูกคัดออกจากการวิจัย

ผลการศึกษา จากผู้ป่วย 44 รายตรวจพบวีกคอซีวัน -1639 ชนิด AA, AG และ GG ร้อยละ 59.1, 36.4
และ 4.5 ตามลำดับซึ่งเท่ากับความชุกในประชากรไทย และมีผู้ป่วยกลุ่มย่อยที่ได้รับวิตามินเค 31 ราย
ระดับค่าเฉลี่ย INR ก่อนรับประทานวิตามินเคเท่ากับ 6.99 ± 3.44 ในกลุ่ม AA และ 6.64 ± 2.47 ใน
กลุ่ม nonAA ($p=0.74$) ระดับการลดลงของ INR ที่ 24 ชั่วโมงกลุ่ม AA เท่ากับ 3.82 ± 2.34 ของกลุ่ม
non AA เท่ากับ 3.86 ± 2.34 , $p=0.92$ (คิดเป็นร้อยละเท่ากับ $54.4 \pm 16.4\%$ เทียบกับ $55.0 \pm 19.4\%$,
 $p=0.83$) ระดับการลดลงของ INR ที่ 48 ชั่วโมงเท่ากับ 4.18 ± 2.41 เทียบกับ 4.52 ± 2.52 , $p=0.44$
สำหรับกลุ่ม AA และ non AA ตามลำดับ(คิดเป็นร้อยละ $58.9 \pm 18.7\%$ เทียบกับ $65.6 \pm 14.1\%$,
 $p=0.42$)

สรุปผล : ยีนวีกคอซีวัน -1639 ชนิดที่ไวต่อยารวอร์ฟารินไม่สัมพันธ์กับการเกิดระดับ INR ที่มากกว่าสี่และไม่
สามารถคาดคะเนการตอบสนองต่อวิตามินเคชนิดรับประทาน

ภาควิชา...อายุรศาสตร์.....ลายมือชื่อนิสิต.....
สาขาวิชา...อายุรศาสตร์.....ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....
ปีการศึกษา...2551.....

5074818730 : MAJOR MEDICINE

KEYWORDS : Warfarin / VKORC1 / Oral vitamin K / Warfarin reversal

RAWISUT DEOISARES : PREVALENCE OF VKORC1 SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM – 1639 IN THAI PATIENTS WHO HAVE INR MORE THAN 4 FROM WARFARIN AND RESPONSES TO 1 MG ORAL VITAMIN K FOR WARFARIN REVERSAL. ADVISOR : ASSOC. PROF. PONLAPAT ROJNUKARIN;MD., 72 pp.

Objective: The aim is to study prevalence of VKORC1 single nucleotide polymorphism – 1639 in Thai adult patients who have warfarin overdosage and responses to oral vitamin K for warfarin reversal

Method: A prospective descriptive study was conducted in patients taking warfarin with INR over 4.0. They were subjected to VKORC1 -1639 genotyping. A subset of cases were included in the prospective trial using 1 mg oral vitamin K therapy to observe INR declines at 24 and 48 hrs. Patients who received blood products or other doses or routes of vitamin K were excluded from this cohort.

Result: From 44 cases, the prevalence of VKORC1 -1639 were 59.1% for AA, 36.4% for AG and 4.5% for GG similar to general Thai population. Thirty-one patients were uniformly treated solely by 1 mg oral vitamin K. The baseline INR levels were 6.99 ± 3.44 (mean ± SD) for AA and 6.64 ± 2.47 for non-AA polymorphism (p=0.74). The mean INR decreases after vitamin K administrations in AA vs non-AA groups were 3.82 ± 2.34 vs 3.86 ± 2.84, p=0.92, (54.4 ± 16.4% vs 55.5 ± 19.4%, p=0.83) at 24 hrs and 4.18 ± 2.41 vs 4.52 ± 2.52, p=0.44 (58.9 ± 18.7% vs. 65.6 ± 14.1%, p=0.42) at 48 hrs respectively.

Conclusion: Our results imply that VKORC1 -1639 polymorphism is not a strong predisposing factor for warfarin overdose. In addition, the preliminary data suggest that these genotypes probably have no clinically significant difference in responses to low dose oral vitamin K corrections of over-anticoagulation.

Department :.....Medicine..... Student's Signature..... RAWISUT DEOISARES

Field of Study :.....Medicine..... Advisor's Signature P. Rojnukarin

Academic Year :.....2551.....

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณทุกท่านที่มีรายชื่อดังต่อไปนี้ที่มีส่วนร่วมทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงสมความมุ่งหมาย

รองศาสตราจารย์นายแพทย์พลภัทร ใจจันน์ครินทร์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้ให้คำแนะนำ ความรู้ ตรวจสอบแก้ไขบทความและติดตามผลการวิจัยมาโดยตลอด

คณาจารย์หน่วยโลหิตวิทยา ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่านที่ได้ให้คำแนะนำ ความรู้ต่างๆ

นางสาว รุ่ง เศรษฐพิบูลย์ ที่ช่วยให้ความรู้ ทักษะในการสกัด DNA และ gel electrophoresis

นาง ชวนชม มวลประสิทธิ์พร ที่ช่วยให้ความรู้ ทักษะในการทำเทคนิค PCR

แพทย์ประจำบ้านภาควิชาอายุรศาสตร์ทุกท่านที่ช่วยติดต่อประสานงานหาผู้ป่วยเข้า

โครงการวิจัย

ผู้ป่วยที่เข้าร่วมโครงการวิจัยทุกท่าน

รวมทั้งบิดา, มารดา, คณาจารย์ภาควิชาอายุรศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ประสิทธิ์

ประสาทความรู้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฉ
สารบัญแผนภูมิ.....	ญ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ.....	ฎ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย (Background and rationale).....	1
1.2 คำถามการวิจัย (Research question)	3
1.3 วัตถุประสงค์การวิจัย (Objectives).....	3
1.4 สมมติฐาน (Hypothesis)	3
1.5 กรอบแนวคิดในการวิจัย (Conceptual framework).....	4
1.6 ข้อตกลงเบื้องต้น (Assumption)	4
1.7 คำสำคัญ (Keywords).....	4
1.8 การให้คำนิยามเชิงปฏิบัติที่จะใช้ในการวิจัย (Operational definitions).....	5
1.9 ข้อจำกัดในการวิจัย(Limitation).....	5
1.10 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ (Expected benefit and application).....	5
1.11 อุปสรรคที่อาจเกิดขึ้นระหว่างการวิจัยและมาตรการในการแก้ไข (Obstacles and strategies to solve the problems).....	6
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง.....	7

	หน้า
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	15
3.1 รูปแบบการวิจัย (Research design).....	15
3.2 ระเบียบวิธีการวิจัย (Research methodology).....	15
3.3 วิธีเก็บรวบรวมข้อมูล (Data collections).....	24
3.4 การวิเคราะห์ข้อมูล (Data analysis).....	24
3.5 ปัญหาทางจริยธรรม(Ethical Considerations).....	25
บทที่ 4 ผลการวิจัย.....	26
บทที่ 5 อภิปรายผลและข้อเสนอแนะ.....	45
รายการอ้างอิง.....	50
ภาคผนวก.....	54
ภาคผนวก ก แบบฟอร์มคำอธิบายประกอบหนังสือยินยอม.....	55
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	60

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 แสดงความชุกของยีน CYP2C9 ในแต่ละเชื้อชาติ.....	9
ตารางที่ 2 แสดงความชุกของยีน VKORC1 ชนิดต่างๆในแต่ละเชื้อชาติ.....	10
ตารางที่ 3 แสดงข้อมูลการใช้วอร์ฟารินรายวัน (mg/day) ตามผลของ CYP2C9 และ VKORC1.....	11
ตารางที่ 4 แสดงผลของยาที่มีผลต่อระดับยา วอร์ฟาริน.....	12
ตารางที่ 5 แสดงลำดับเบสของ primer.....	19
ตารางที่ 6 แสดงข้อมูลพื้นฐานของผู้ป่วย.....	26
ตารางที่ 7 แสดงข้อมูลพื้นฐานอายุ เพศ ระดับ INR เริ่มต้น ข้อบ่งการใช้วอร์ฟาริน และขนาดยาที่ใช้.....	30
ตารางที่ 7 แสดงข้อมูลพื้นฐาน (ต่อ) อายุ เพศ ระดับ INR เริ่มต้น ข้อบ่งการใช้วอร์ฟาริน และขนาดยาที่ใช้.....	31
ตารางที่ 8 แสดงผลตอบสนองต่อการรับประทานวิตามินเค 1 มิลลิกรัม.....	32
ตารางที่ 8 แสดงผล (ต่อ) ผลตอบสนองต่อการรับประทานวิตามินเค 1 มิลลิกรัม.....	33

สารบัญแผนภูมิ

	หน้า
รูปที่ 14 แผนภูมิแท่งแสดงจำนวนร้อยละของ genotype VKORC1 -1639.....	27
รูปที่ 15 แผนภูมิทรงกลมแสดงจำนวนร้อยละ (percent) ของผู้ป่วยจำแนกตามเพศ.....	27
รูปที่ 16 แผนภูมิแท่งแสดงร้อยละ (percent) VKORC1 -1639 ในผู้ป่วยชาย.....	28
รูปที่ 17 แผนภูมิแท่งแสดงร้อยละ (percent) VKORC1 -1639 ในผู้ป่วยหญิง.....	29
รูปที่ 19 แผนภูมิทรงกลม แสดงความชุก VKORC1 -1639 ในผู้ป่วยที่รับวิตามินเค.....	34
รูปที่ 20 แสดงค่าเฉลี่ยของ INR ก่อนรักษาด้วยวิตามินเคระหว่างกลุ่ม AAและnonAA.....	34
รูปที่ 21 แผนภูมิแท่งแสดงระดับ INR ที่ลดลงหลังรับประทานวิตามินเค 24 ชั่วโมง.....	35
รูปที่ 22 แผนภูมิแท่งแสดงร้อยละของ INR ที่ลดลงหลังรับประทานวิตามินเค 24 ชั่วโมง.....	36
รูปที่ 23 แผนภูมิแท่งแสดงระดับ INR ที่ลดลงหลังรับประทานวิตามินเค 48 ชั่วโมง.....	37
รูปที่ 24 แผนภูมิแท่งแสดงร้อยละของ INR ที่ลดลงหลังรับประทานวิตามินเค 48 ชั่วโมง.....	38
รูปที่ 25 แสดงปริมาณ INR ที่ลดลงหลังรับประทานวิตามินเค 1 mg.....	39
รูปที่ 26 แสดงปริมาณร้อยละ (percent) ที่ลดลงหลังรับประทานวิตามินเค 1 mg.....	40

สารบัญรูปภาพ

	หน้า
รูปที่ 1 แสดงกรอบแนวความคิดในการวิจัย (Conceptual frame work).....	4
รูปที่ 2 แสดงเภสัชจลศาสตร์ของยาออร์ฟาริน (Pharmacokinetic).....	7
รูปที่ 3 แสดงเภสัชพลศาสตร์ของยาออร์ฟาริน (Pharmacodynamic).....	8
รูปที่ 4 แสดงผล Meta-analysis การรักษายาออร์ฟารินเกินขนาดด้วยวิตามินเค.....	14
รูปที่ 5 แสดงขั้นตอนการวิจัย	17
รูปที่ 6 แสดงน้ำยาที่ใช้ในการสกัด DNA ด้วยชุดทดสอบ JETQUICK	18
รูปที่ 7 แสดงเครื่อง PCR.....	20
รูปที่ 8 แสดง PCR product 290 base pairs เทียบกับ molecular weight marker.....	21
รูปที่ 9 แสดงน้ำยาส่วนผสมของ 10% Acrylamide.....	22
รูปที่ 10 แสดงการทำ electrophoresis บน 10% Acrylamide gel.....	22
รูปที่ 11 แสดง PCR product allele AA ที่ตัดด้วย MspI ได้คู่เบสขนาด 290 base pairs.....	23
รูปที่ 12 แสดง PCR product allele GG ที่ตัดด้วย MspI ได้คู่เบสขนาด 122 และ 165 base pairs.....	23
รูปที่ 13 แสดง PCR product allele GG ที่ตัดด้วย MspI ได้คู่เบสขนาด 122, 165, 290 base pairs.....	24
รูปที่ 18 แสดงความสัมพันธ์ของ Haplotype VKORC1 -1639 ต่อปริมาณยาออร์ฟาริน ที่ใช้ต่อสัปดาห์.....	32
รูปที่ 27 ภาพแสดง PCR products จาก whole blood จำนวน 44 ราย.....	41
รูปที่ 27 (ต่อ) ภาพแสดง PCR products จาก whole blood จำนวน 44 ราย.....	42
รูปที่ 28 แสดง PCR products ที่ใช้เอนไซม์ MspI ตัด จำนวน 31 ราย.....	43
รูปที่ 28 (ต่อ) แสดง PCR products ที่ใช้เอนไซม์ MspI ตัด จำนวน 31 ราย.....	44

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

ACCP	American College of Chest Physicians
AF	Atrial fibrillation
bp	Base pairs
DNA	Deoxynucleic acid
DVT	Deep vein thrombosis
FFP	Fresh frozen plasma
INR	International normalized ratio
PAD	Peripheral arterial disease
PCR	Polymerase chain reaction
PT	Prothrombin time
RHD	Rheumatic heart disease
SNP	Single nucleotide polymorphism
VKORC1	Vitamin K oxide reductase complex 1

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย (Background and Rationale)

วอร์ฟารินเป็นยากลุ่มต้านการแข็งตัวของเลือดที่มีการใช้กันบ่อยในการป้องกันการเกิดลิ่มเลือดในโรคต่างๆ เช่น

- Venous thromboembolism ทั้งลิ่มเลือดในหลอดเลือดดำที่ขา (deep venous thrombosis) และ ลิ่มเลือดอุดตันในปอด (pulmonary embolism)
- หัวใจเต้นผิดจังหวะชนิด atrial fibrillation
- หลังการผ่าตัดเปลี่ยนลิ้นหัวใจชนิดโลหะ (mechanical valves) เป็นต้น [1]

วอร์ฟารินถูกดูดซึมได้ 100 % กรณีที่ไม่มีโรคประจำตัว หลังจากถูกดูดซึมแล้ว 90-98 % ของยาจะจับกับโปรตีนในเลือด โดยเฉพาะ albumin กลไกในการออกฤทธิ์คือเข้าไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ vitamin K epoxide reductase ทำให้ vitamin K ในรูป reduced form (active form) มีน้อยลง วิตามินเคเป็น cofactor ของเอนไซม์ gamma carboxylase เมื่อลดลงจึงเกิดปฏิกิริยา carboxylation ในตับลดลงทำให้ vitamin K dependent clotting factors (factor II, VII, IX, X) ไม่เปลี่ยนเป็นรูปที่ออกฤทธิ์ ดังนั้นการสร้าง thrombin และ fibrin ในกระบวนการแข็งตัวของเลือดจึงลดลง การกำจัดยา วอร์ฟารินถ้าเป็น free form (S-enantiomer) จะถูกกำจัดทางตับอาศัย enzyme cytochromeP450 CYP2C9 ถ้าเป็นรูปที่จับกับโปรตีนในพลาสมา (R-enantiomer) จะถูกกำจัดทางไตและอาศัย enzyme CYP1A1, CYP1A2, CYP3A4 [2]

การบริหารจัดการยา วอร์ฟารินยังเป็นปัญหาที่สำคัญในปัจจุบันเนื่องจากยามี therapeutic range ที่แคบ [3] ทำให้พบปัญหาเลือดออกผิดปกติเนื่องจากระดับยาที่มากเกินไปและเกิดหลอดเลือดดำอุดตันซ้ำจากระดับยาที่น้อยเกินไป จึงต้องมีการเฝ้าระวังการใช้ยาโดยการตรวจวัดระดับ prothrombin time เป็นระยะๆและรายงานเป็น International Normalized Ration INR [4] พร้อมทั้งให้คำแนะนำการดูแลปฏิบัติตัว นอกจากนี้ผู้ป่วยแต่ละรายยังมีความต้องการใช้วอร์ฟารินแตกต่างกันมากเพื่อคงระดับ INR ให้เท่าๆกัน ตั้งแต่ต่ำกว่า 1 มิลลิกรัมถึงมากกว่า 20 มิลลิกรัมต่อวัน แต่ในปัจจุบันเราสามารถนำองค์ความรู้ของ pharmacogenetic มาใช้ร่วมในการบริหารจัดการยา วอร์ฟาริน

โดยพบว่า การเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมที่สำคัญ คือ Cytochrome P450 complex (CYP2C9) และ Vitamin K epoxide reductase complex 1 (VKORC1) [5]

- CYP2C9 single nucleotide polymorphism : พบว่าการเกิด polymorphism ของ allele ชนิด *2 และ allele ชนิด *3 (CYP2C9 *2 และ *3) มีผลทำให้ต้องการการใช้วอร์ฟารินในขนาดลดลง (warfarin sensitive) เมื่อเทียบกับ wild type CYP2C9 *1/*1 [6,7]

- VKORC1 single nucleotide polymorphism : ที่พบบ่อยคือตำแหน่ง -1639G>A [8] โดยพบว่า warfarin resistant allele ที่ตำแหน่งนี้เป็นเบส guanosine (G allele) ส่วน warfarin sensitive allele เป็นเบส adenosine (A allele) ดังนั้นการใช้ วอร์ฟารินต้องลดขนาดลงในผู้ป่วยที่มี VKORC1 แบบ allele A/A, A/G, และ G/G ตามลำดับ

นอกจากนี้ปัจจัยที่มีผลต่อระดับยา วอร์ฟาริน ได้แก่ อายุ (age), ส่วนสูง (height), น้ำหนัก (weight) ตามที่มีการศึกษา multiple regression model ทำให้สามารถคาดเดาขนาดวอร์ฟารินที่จะใช้ได้มีหลายสูตร

$$\text{Warfarin dose} = [0.62 - 0.0135 \times \text{age} - 0.24 \times \text{CYP2C9}^*2 - 0.37 \times \text{CYP2C9}^*3 - 0.241 \times \text{VKORC1} + 0.0163 \times \text{height (cm)}] \quad R^2 = 0.54 \quad [9]$$

$$\text{Warfarin dose} = [1.35 - 0.008 \times \text{age} - 0.116 \times \text{sex} - 0.004 \times \text{weight} - 0.376 \times \text{VKORC1 A/A} - 0.271 \times \text{VKORC1 G/G} - 0.307 \times \text{2C9}^*2 - 0.318 \times \text{2C9}^*3] \quad R^2 = 0.61 \quad [10]$$

จากปัจจัยต่างๆดังกล่าวที่ผ่านมาสามารถเริ่มขนาดวอร์ฟารินได้อย่างเหมาะสมโดยอาศัยข้อมูลทางพันธุกรรมมาใช้ด้วย

เมื่อเกิดเลือดออกผิดปกติจากการใช้วอร์ฟารินสามารถแก้ไขภาวะเลือดไม่แข็งตัวด้วยการให้ vitamin K ได้ทั้งในแบบรับประทานหรือแบบฉีดเข้าเส้นเลือด (ซึ่งได้ผลดีกว่าการฉีดใต้ผิวหนัง) [11,12] เพื่อต้านฤทธิ์ของวอร์ฟารินโดยพบว่า 90 % ระดับ INR จะต่ำกว่า 4 ในเวลา 24 ชั่วโมงเมื่อใช้ขนาด 1 มิลลิกรัม และพบว่าประสิทธิภาพของวิตามินเคแบบชนิดรับประทาน หรือ ฉีดเข้าเส้นเลือดไม่แตกต่างกัน

ยังไม่มีรายงานถึงการศึกษ VKORC1 ว่ามีผลต่อการแก้ฤทธิ์ของวอร์ฟารินโดยใช้ วิตามินเคหรือไม่ การศึกษาวิจัยในครั้งนี้จึงต้องการศึกษาอุบัติการณ์ของการเกิด VKORC1 single nucleotide polymorphism ตำแหน่ง - 1639 ในประชากรไทยอายุมากกว่า 15 ปี ที่มี INR สูงจากวอร์ฟาริน เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมดังกล่าวทำให้ใช้ปริมาณวอร์ฟารินลดลงจึงอาจเพิ่มความเสี่ยงต่อการมี INR สูงและยังศึกษาการใช้วิตามินเครูปแบบรับประทานขนาด 1 mg ในการต้านฤทธิ์ของวอร์ฟารินในผู้ป่วยผู้ใหญ่ไทยที่เกิด VKORC1 single nucleotide polymorphism - 1639 โดย

สมมติฐานคือผู้ป่วยที่มี VKORC1 ชนิด warfarin sensitive allele อาจจะต้องการวิตามินเคในขนาดสูงในการแก้ฤทธิ์มากกว่า warfarin resistant allele ส่วนพันธุกรรมของ CYP450 2C9 ในประชากร Asian มักพบ CYP2C9 แบบ wild type *1/*1 ทำให้ไม่ค่อยเกิดความแปรผันของขนาดยาออร์ฟารินที่เกิดจาก CYP450 2C9

1.2 คำถามการวิจัย (Research Question)

คำถามหลัก (primary research question) : ความชุกของ VKORC1 single nucleotide polymorphism ชนิด AA ตำแหน่ง – 1639 ในผู้ป่วยผู้ใหญ่ไทยที่มีระดับ INR > 4 เนื่องจากการรับประทานออร์ฟารินพบได้เท่าไร

คำถามรอง (secondary research question)

- การตอบสนองของการใช้วิตามินเคในรูปรับประทานขนาด 1 mg ในการต้านฤทธิ์ออร์ฟารินในผู้ป่วยผู้ใหญ่ไทยที่มี VKORC1 single nucleotide polymorphism ตำแหน่ง – 1639 ชนิดต่างๆมีความแตกต่างกันหรือไม่

1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย (Objectives)

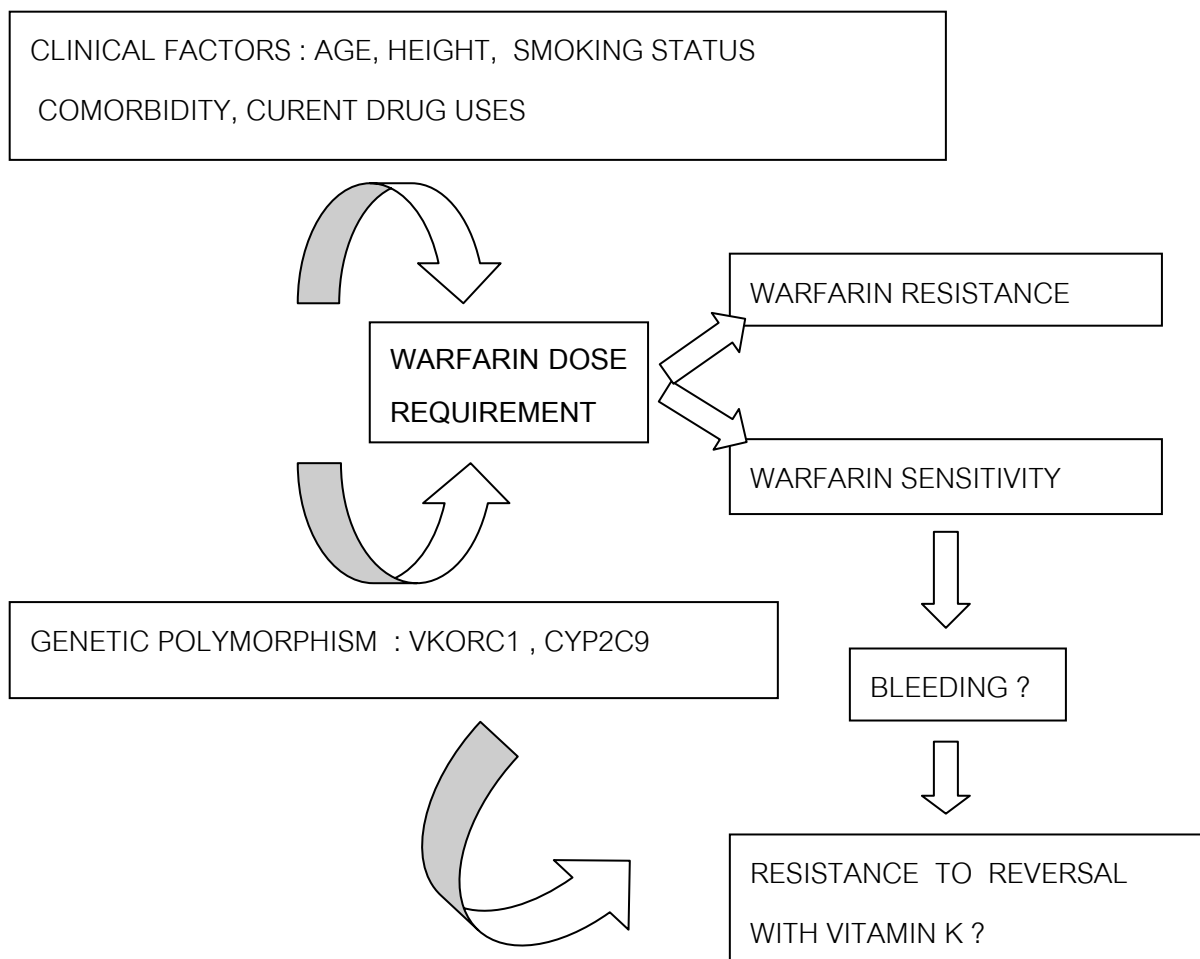
วัตถุประสงค์ทั่วไป (General objective)

- เพื่อตรวจหาความชุกของ VKORC1 single nucleotide polymorphism ตำแหน่ง - 1639 ชนิด AA ในผู้ป่วยผู้ใหญ่ไทยที่มีระดับ INR > 4 เนื่องจากการรับประทานออร์ฟาริน
- เพื่อเปรียบเทียบการตอบสนองของการใช้วิตามินเคในรูปแบบรับประทานขนาด 1 mg ในการต้านฤทธิ์ออร์ฟารินในผู้ป่วยผู้ใหญ่ไทยที่มี VKORC1 single nucleotide polymorphism ตำแหน่ง – 1639 ชนิด AA , AG , และ GG

1.4 สมมติฐานจากการวิจัย (Hypothesis)

ความชุกของ VKORC1 single nucleotide polymorphism ตำแหน่ง -1639 ชนิด AA ในผู้ป่วยออร์ฟารินเกินขนาดสูงกว่าประชากรไทยทั่วไป

1.5 กรอบแนวความคิด (Conceptual Framework)



รูปที่ 1 แสดงกรอบแนวความคิดในการวิจัย (Conceptual frame work)

1.6 ข้อตกลงเบื้องต้น (Assumption)

ผู้ป่วยที่เข้าทำการศึกษาวิจัย รับประทานวอร์ฟารินแล้วมีปริมาณ INR มากกว่า 4

ผู้ป่วยที่เข้าทำการศึกษาวิจัยบางส่วนต้องมีการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของ VKORC1

- 1639

1.7 คำสำคัญ (Key words)

Warfarin , VKORC1 , Oral vitamin K , Warfarin reversal

1.8 การให้คำนิยามเชิงปฏิบัติที่ใช้ในการวิจัย (Operation Definition)

VKORC1 single nucleotide polymorphism ในการศึกษานี้ศึกษาเฉพาะตำแหน่ง - 1639 วิตามินเคที่ใช้ในการวิจัยนำยาแบบฉีดมาบริหารจัดการในรูปรับประทานขนาด 1 มิลลิกรัม

1.9 ข้อจำกัดในการวิจัย (Limitation)

การศึกษานี้เป็นการศึกษาความชุกของ VKORC1 single nucleotide polymorphism ตำแหน่ง -1639 ตำแหน่งเดียว ซึ่งเป็นตำแหน่งที่มีการพบได้บ่อยที่สุดในแถบภูมิภาคเอเชียและพบว่ามีความสัมพันธ์กับขนาดวอร์ฟารินที่ต้องการ แต่ยังมี การเปลี่ยนแปลงของ VKORC1 อีกหลายตำแหน่งที่มีผลกับการใช้วอร์ฟาริน

นอกจากนี้การเปลี่ยนแปลงของ CYP2C9 ก็มีผลต่อการใช้วอร์ฟารินเช่นกัน ข้อมูลจากการวิจัยดังกล่าวจึงอาจเป็นข้อมูลเบื้องต้นต่อการศึกษาความสัมพันธ์ของการใช้วิตามินเคในการต้านฤทธิ์ของวอร์ฟาริน

อัตราความชุก ของการเกิด VKORC1 single nucleotide mutation ตำแหน่ง -1639 ในประเทศไทยยังมีการศึกษาไม่มาก จึงอาจมีผลต่อการคิดคำนวณประชากรที่ใช้ในการวิจัย

1.10 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ (Expected benefit and application)

1.10.1 สามารถทราบความชุกของการเกิด VKORC1 single nucleotide polymorphism ตำแหน่ง -1639 ในผู้ป่วยผู้ใหญ่ไทยที่มีภาวะวอร์ฟารินเกินขนาด

1.10.2 สามารถทราบผลการตอบสนองต่อวิตามินเคในรูปแบบรับประทานขนาด 1 mg ที่ใช้ ในการต้านฤทธิ์ของวอร์ฟารินในผู้ป่วยที่เกิด VKORC1 single nucleotide polymorphism ตำแหน่ง -1639 AA / AG / GG เพื่อประกอบการศึกษา pharmacogenomic

1.10.3 นำค่าอ้างอิงที่ได้จากการศึกษาไปใช้ในการศึกษาต่อในอนาคต เช่น การหาปริมาณวิตามินเคที่น้อยที่สุดในการใช้เพื่อต้านฤทธิ์ภาวะวอร์ฟารินเกินขนาด

1.11 อุปสรรคที่อาจเกิดขึ้นระหว่างการวิจัยและมาตรการในการแก้ไข(Obstacle)

1.11.1 จำนวนผู้ป่วยที่เข้าร่วมการวิจัยอาจไม่เพียงพอ มาตรการแก้ไข ดำเนินแผนการประชาสัมพันธ์ให้ทั่วถึงทั้งแผนกผู้ป่วยนอก และผู้ป่วยใน นอกจากนี้อาจติดต่อไปนอกแผนกอายุรศาสตร์ถ้ามีคนที่ใช้วอร์ฟารินแล้วมีระดับ INR มากกว่า 4

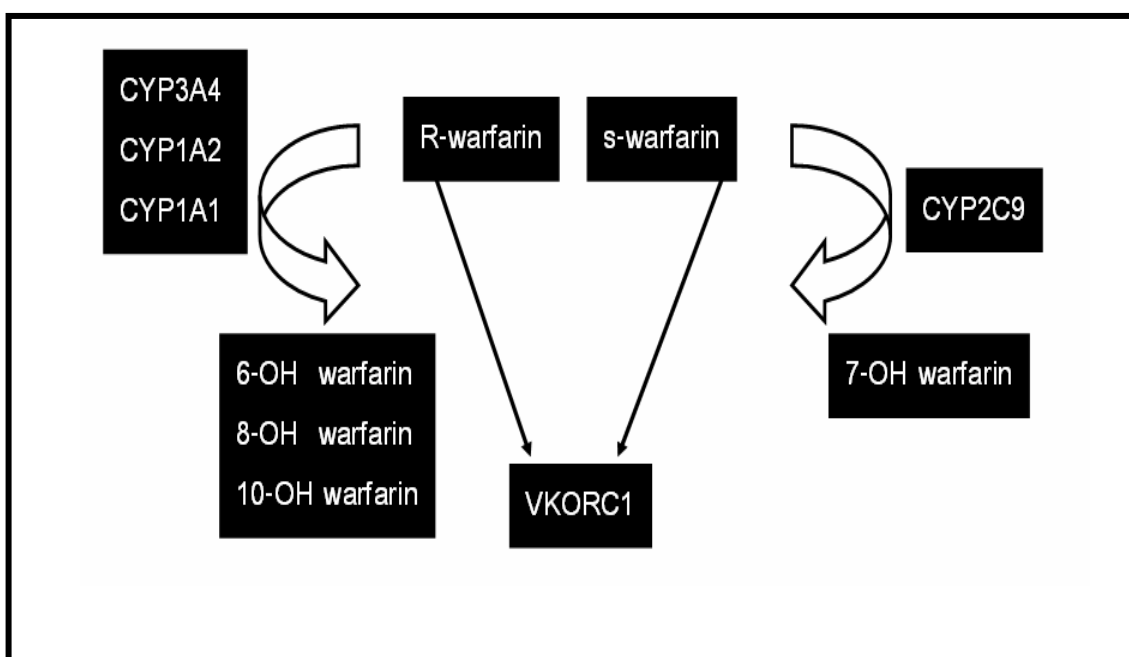
1.11.2 ผู้ป่วยอาจมาไม่ได้ตามนัด มาตรการแก้ไข ร่วมกำหนดวันที่ผู้ป่วยสะดวกในการเดินทาง ออกค่าใช้จ่ายในการเดินทาง มีเบอร์โทรศัพท์เพื่อทำการติดต่อกับผู้ป่วย

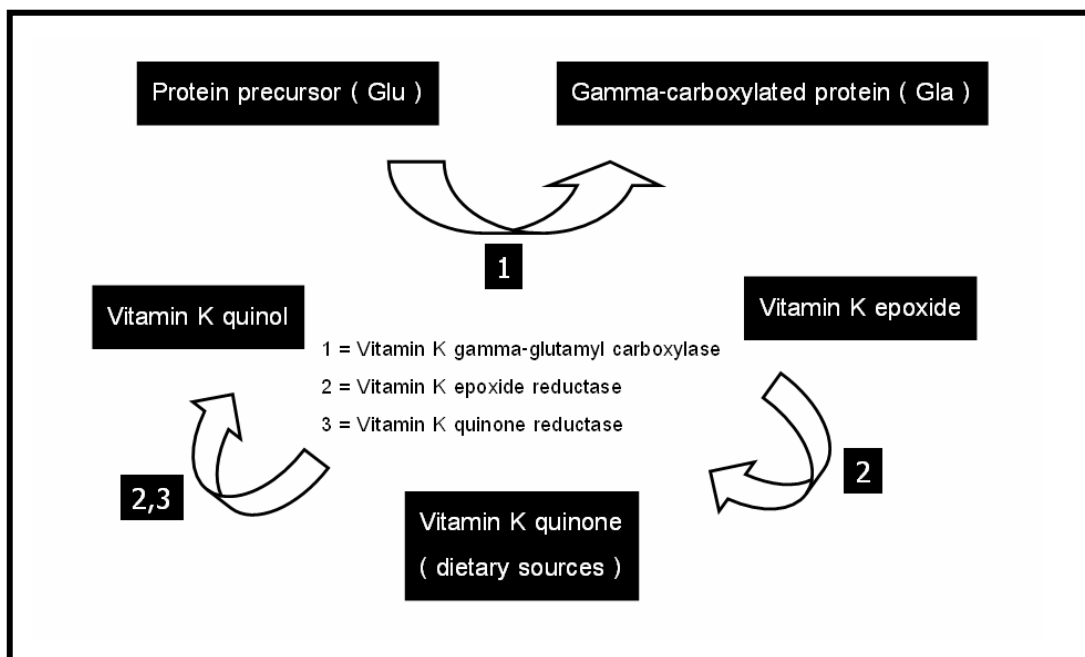
บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

วอร์ฟารินเป็นยาต้านการแข็งตัวของเลือดเริ่มสังเคราะห์ใช้ตั้งแต่ ค.ศ. 1954 และมีการใช้ต่อจนถึงปัจจุบัน กลไกการออกฤทธิ์ของยามีผลเนื่องมาจากทำให้ระดับของ reduced vitamin K ลดลงทำให้ผลิต coagulation factors ที่อาศัย reduced vitamin K (Factor II, VII, IX, X) และ natural anticoagulant protein (protein C, protein S, protein Z) ในการเกิดปฏิกิริยา gamma carboxylation ลดลง ในทางเวชปฏิบัติพบว่าเกิดปัญหาเกี่ยวกับการปรับระดับยาได้บ่อยเนื่องจากมีหลายปัจจัยที่มีผลต่อระดับยา วอร์ฟาริน จากการศึกษาทางด้านเภสัชวิทยาพบว่า ยาวอร์ฟาริน ประกอบด้วย S-warfarin และ R-warfarin เป็น mirror image กัน หลังจากกับประทานแล้วถูกดูดซึมได้ดี พบว่า S-warfarin ซึ่งอยู่ในรูปอนุโมลยาสระจะมีฤทธิ์มากกว่า R-warfarin ที่จับตัวกับ albumin กระบวนการ metabolism ของยาทั้งสองรูปแบบก็มีความต่างกันกล่าวคือ cytochrome P450 CYP2C9 มีผลต่อ S-warfarin ส่วน CYP3A4, CYP1A2, CYP1A1 มีผลต่อ R-warfarin ดังรูปที่แสดงด้านล่าง

รูปที่ 2 แสดงเภสัชจลศาสตร์ของยาวอร์ฟาริน





รูปที่ 3 แสดงเภสัชพลศาสตร์ของยาวาฟาริน

รูปที่ 3 แสดงความสำคัญของวิตามินเคต่อปฏิกิริยา gamma carboxylation โดยอาศัย reduced form (vitamin K quinol) ซึ่งเกิดจากการเปลี่ยน oxidized form ด้วยเอ็นไซม์ vitamin K epoxide reductase (2) และ vitamin K quinone reductase (3) เภสัชวิทยาดังกล่าวพบว่าระบบพันธุกรรมมีผลต่อการปรับใช้ยาวอร์ฟารินเป็นอย่างมาก ในปัจจุบันจากการศึกษาพบว่ายีนที่สำคัญและมีผลต่อยาวอร์ฟารินมากได้แก่ CYP2C9 (cytochrome P450 2C9) และ VKORC1 (vitamin K oxide reductase complex subunit 1) genes ส่งผลให้องค์การอาหารและยาของประเทศสหรัฐอเมริกา (US FDA) ระบุให้มีการเริ่มต้นยาวอร์ฟารินในขนาดที่ต่ำถ้าหากผู้ป่วยมีการแปลงทางพันธุกรรมของยีนส์ CYP2C9 และ VKORC1 นอกจากนี้ยังมียีนส์อื่นๆ เช่น CYP4F2, GGCX, APOE, PROC เป็นต้นแต่มีความสำคัญทางคลินิกน้อยกว่า [11,12]

ในปี คศ. 1999 พบว่าการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม CYP2C9 ที่มีผลต่อระดับยาวอร์ฟารินได้แก่ CYP2C9*2 (Arg144 to Cys) และ CYP2C9*3 (Ile359 to Leu) ในกลุ่มประชากรกลุ่มนี้ จะมีความต้องการยาวอร์ฟารินในขนาดต่ำเพื่อให้ระดับยาอยู่ใน steady state เพื่อชาติต่างๆ เกิดการเปลี่ยนแปลงไม่เท่ากัน มีการศึกษาความชุกของ CYP2C9*2 และ CYP2C9*3 ดังแสดงในตาราง [7]

ตารางที่ 1 แสดงความชุกของยีน CYP2C9 ในแต่ละเชื้อชาติ

Signet J.	Caucasian (%)	African (%)	Asian (%)
CYP2C9*2	10	8	4
CYP2C9*3	2	1	4
	White (%)	Black (%)	Asian (%)
CYP2C9*1	80.8	94.2	98.2
CYP2C9*2	12.7	3.4	0
CYP2C9*3	7.0	1.5	1.8

เป็นที่น่าสังเกตว่าประชากรใน Asian พบความชุกของ CYP2C9*1 (wild type) มากกว่าประชากร Caucasian และ African และพบ CYP2C9*3 มากกว่า CYP2C9*2

Aithal et al. ทำการศึกษาพบว่า CYP2C9*2 และ *3 พบว่ามีผลกับยาวอร์ฟารินในด้านปริมาณที่ต้องการในแต่ละวันใช้ปริมาณน้อยกว่า, ระยะเวลาในการถึง therapeutic range นานกว่าและเพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดเลือดออกมากกว่ากลุ่มประชากรที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมดังกล่าวโดยเฉพาะในช่วงที่บริโภคนยาตอนเริ่มต้น

มีการค้นพบ CYP2C9 polymorphism ในปัจจุบันประมาณ 37 alleles [17]
(สามารถตรวจสอบเพิ่มเติมตาม website <http://www.cypalleles.ki.se/cyp2c9.htm>)

ในปี 2004 มีการค้นพบ VKORC1 gene โดยครั้งแรกพบในผู้ป่วยที่คาดว่าจะเกิดการดื้อต่อวอร์ฟารินใน 4 ครอบครัว ตำแหน่งที่พบ polymorphism ได้แก่ VKORC1 of amino acid 29 (Val/Leu), 45 (Val/Ala), 58 (Arg/Gly), 128 (Leu/Arg) ต่อมาจึงมีการค้นพบความสัมพันธ์ของ VKORC1 กับกลุ่มประชากรที่มีความไวต่อการใช้วอร์ฟาริน (warfarin sensitive) ซึ่งพบหลาย single nucleotide polymorphism (SNP) ที่มีความสำคัญเช่น

- VKORC1 3730 G/A (rs7294)
- VKORC1 1173 C/T (rs9934438)
- VKORC1 -1639 G/A (rs9923231)
- VKORC1 2255 C/T (rs2359612)
- VKORC1 1542 G/C (rs8050894)

ตำแหน่งที่มีการศึกษามากที่สุดได้แก่ตำแหน่ง 1173 C/T และ -1639 G/A บางการศึกษากำหนด Haplotype A แทน sensitive allele และ Haplotype B แทน insensitive allele มีการศึกษาความถี่ของการเกิด VKORC1 SNP ตำแหน่ง -1639 และ 1173 ในประชากรแต่ละเชื้อชาติ ดังแสดงในตารางด้านล่าง [18]

ตารางที่ 2 แสดงความชุกของยีน VKORC1 ชนิดต่างๆในแต่ละเชื้อชาติ

	African Americans	European Americans	Hongkong Chinese
1173 C/T	10.6 %	36.5 %	87 %
-1639 G/A	10.9 %	36.1 %	87 %

การศึกษานี้ที่หาความชุกของ VKORC1 SNP ในประชากรเอเชีย ชาติอื่นได้แก่การศึกษาของ

- Liyan Miao และคณะในประเทศจีน [8] ทดสอบผลของ อายุ ส่วนสูง น้ำหนัก และ VKORC1, CYP2C9 ต่อการปรับขนาดวอร์ฟาริน พบว่าความชุกของ VKORC1 -1639 genotype AA, AG, GG เท่ากับ 83.7, 15.7, 0.3 % ตามลำดับขนาดวอร์ฟารินเฉลี่ยที่ใช้เท่ากับ 1.76 mg/day ใน genotype AA, 3.32 mg/day ใน genotype AG และ GG นอกจากนี้พบ CYP2C9*1/*1 และ *1/*3 เท่ากับ 91% และ 9% ตามลำดับ และผลต่อขนาดยาของวอร์ฟารินพบว่า ใช้ปริมาณ 2.06 และ 1.60 mg/day ตามลำดับ

- Rina Kimura และคณะ [25] ในประเทศญี่ปุ่นศึกษาปัจจัยทางพันธุกรรมของ VKORC1, CYP2C9 ชนิดต่างๆต่อผลการปรับวอร์ฟารินพบว่า VKORC1 -1639 G>A, 3730 G>A และ CYP2C9 42613 A>C, GGCX 8016 G>A มีผลต่อการปรับขนาดยาของวอร์ฟารินโดยใช้ปริมาณวอร์ฟารินน้อยลง

- Soo-Chin Lee และคณะ [2] ในประเทศสิงคโปร์ศึกษาผลของเชื้อชาติต่อปัจจัยทางพันธุกรรมของ VKORC1, CYP2C9 ชนิดต่างๆโดยอาศัยประชากรชาวจีน มาเลเซีย และอินเดียในสิงคโปร์พบว่าความชุกของ CYP2C9*2 เท่ากับ 0, 1 และ 4 % CYP2C9*3 เท่ากับ 7, 9 และ 18 % ตามลำดับ พบการเปลี่ยนแปลงใน intron ของ VKORC1 แบ่งเป็นชนิดที่ไวต่อวอร์ฟาริน (ใช้ขนาดยาน้อย) คือ H1 พบมากในประชากรจีนและมาเลเซีย และชนิดที่ไม่ไวต่อวอร์ฟาริน (ใช้ขนาดยามาก) คือ H7 พบในประชากรอินเดีย

- สุ่มลมาลย์ คล้ายขึ้น และคณะทำการศึกษาหาความชุกของ VKORC1 -1639 ในประชากรไทยในกลุ่มผู้ที่มาบริจาคเลือดและผู้ป่วยที่รับประทานวอร์ฟารินพบโดยพบความชุก VKORC1 -1639 polymorphism AA, AG และ GG เท่ากับ 61.1% / 33.6% / 5.3% ตามลำดับในประชากรปกติและเท่ากับ 63.2% / 31.1 % / 5.7 % ตามลำดับในผู้ป่วยที่รับประทานวอร์ฟารินอยู่แล้วและขนาดวอร์ฟารินเฉลี่ยที่ใช้เท่ากับ 24, 37.6, 39.5 มิลลิกรัมต่อสัปดาห์ตามลำดับ

ความสำคัญของ VKORC1 และ CYP2C9 มีผลต่อการปรับใช้ยา วอร์ฟารินทั้งในตอนเริ่มต้นและผลต่อขนาดที่ใช้ประจำเพื่อให้ขนาดยาอยู่ในระดับที่เหมาะสม Ute I Schwarz และคณะศึกษาผลของ VKORC1 และ CYP2C9 ต่อการได้ระดับของยา วอร์ฟารินที่เหมาะสมหลังการเริ่มต้นรักษาพบว่า VKORC1 มีผลมากกว่า CYP2C9 [24] และมีการศึกษาของ Nita A. Limdi หาขนาดวอร์ฟารินที่ต้องรับประทานในแต่ละวันโดยอาศัยข้อมูลของ VKORC1 และ CYP2C9 ตามตาราง [13]

ตารางที่ 3 แสดงข้อมูลการใช้วอร์ฟารินรายวัน (mg/day) ตามผลของ CYP2C9 และ VKORC1

VKORC1 haplotype	CYP2CP genotype					
	Rapid Metabolism	Intermediate Metabolism	Poor metabolism			
			*1/*3	*2/*2	*2/*3	*3/*3
	*1/*1	*1/*2				
High dose B/B	6.7	5.4	4.5	4.4	3.6	3.0
Medium dose A/B	4.8	3.9	3.2	3.2	2.6	2.2
Low dose A/A	3.5	2.8	2.3	2.3	1.9	1.6

การศึกษาของ Mark J Reider และคณะ [26] พบว่าขนาดวอร์ฟารินที่ต้องรับประทานในแต่ละวันเพื่อให้ได้ระดับยาที่เหมาะสมโดยผลของความผันแปรใน intron ของ VKORC1 (H1, H7) ในประชากร European American ใช้ปริมาณวอร์ฟาริน 2.7 มิลลิกรัมใน haplotype A/A ขนาด 4.9 มิลลิกรัมใน haplotype A/B และ 6.2 มิลลิกรัมใน haplotype B/B

จากข้อมูลส่วนดังกล่าวเบื้องต้นทำให้เกิดความแตกต่างของการปรับขนาดยา วอร์ฟารินในประชากรต่างภูมิภาคเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมที่แตกต่างกัน ปัจจัยอื่น ๆ ก็มีผลต่อการปรับขนาดยา วอร์ฟารินด้วยเช่น อายุ พื้นที่ผิวกาย ยาและสมุนไพรเสริมที่รับประทานร่วมกันด้วยโดยยา

ที่มีผลต่อระดับยารักษาโรคแบ่งเป็นกลุ่มที่เสริมฤทธิ์ยารักษาโรค และ กลุ่มที่ต้านฤทธิ์ยารักษาโรค ดังแสดงตามตาราง [23]

ตารางที่ 4 แสดงผลของยาที่มีผลต่อระดับยารักษาโรค

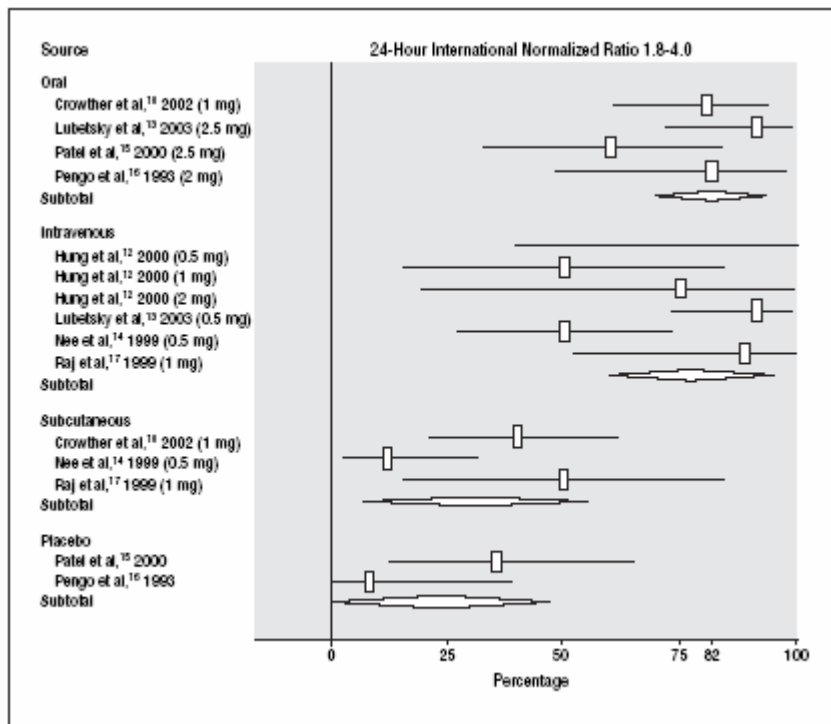
Potentiation	Amiodarone	Fish oil
	Alcohol	Mango
	Anabolic steroid	Grapefruit
	Ciprofloxacin	Propanolol
	Clofibrte	
	Cotrimoxazole	
	Diltiazem	
	Erythromycin	
	Fluconazole	
	Isoniazid	
	Metronidazole	
	Omeprazole	
	Piroxicam	
	Voriconazole	
Inhibition	Barbiturate	Ginseng
	Carbamazipime	Green tea
	Cholestyramine	Soy milk
	Dicloxacillin	
	High vitamin K content	
	Rifampicin	
	Ritonavir	
	Sucralfate	
	Sulfasalazine	
	Terbinafine	
	Telmisartan	

ในทางเวชปฏิบัติการบริหารยาออร์ฟารินมีโอกาสเกิดข้อผิดพลาดได้ง่ายเนื่องจากช่วงขนาดยาที่เหมาะสมแคบมากและผลของปัจจัยอื่นๆที่มีต่อยาโดยเฉพาะ VKORC1 และ CYP2C9 ทำให้มีโอกาสเกิดภาวะแทรกซ้อนโดยเฉพาะเลือดออกได้ง่ายเมื่อมีระดับ INR ที่มากกว่า 4 ปัจจุบันมีแนวทางปฏิบัติตาม American College of Chest Physicians guideline ในปี 2008 สำหรับผู้ป่วยออร์ฟารินเกินขนาดดังนี้

1. ระดับ INR สูงกว่าเกณฑ์ปกติแต่น้อยกว่า 5
แนวทางปฏิบัติ ลดขนาดยา หรือ หยุดรับประทานยาวันนั้นแล้วตรวจผล INR ถ้าได้ระดับรักษาให้เริ่มรับประทานใหม่และปรับขนาดยา
2. ระดับ INR 5-9
แนวทางปฏิบัติ งดรับประทานยา 1-2 วัน หรือ งดรับประทานยาแล้วรับประทานวิตามินเคขนาด 1-2.5 มิลลิกรัมแล้วตรวจสอบผล INR
3. ระดับ INR สูงกว่า 9 ไม่มีเลือดออก
แนวทางปฏิบัติ หยุดรับประทานยาและรับประทานวิตามินเคขนาด 2.5-5 มิลลิกรัม ตรวจระดับ INR และให้วิตามินเคซ้ำได้
4. มีภาวะเลือดออกรุนแรง
แนวทางปฏิบัติ หยุดรับประทานยาและให้วิตามินเคทางหลอดเลือดดำขนาด 10 มิลลิกรัม ให้ซ้ำได้ทุก 12 ชั่วโมง พิจารณาส่วนประกอบของเลือด Fresh frozen plasma หรือ Prothrombin complex concentrate หรือ recombinant factor VIIa ตามข้อบ่งชี้
5. มีภาวะเลือดออกรุนแรงถึงชีวิต
แนวทางปฏิบัติ ให้ส่วนประกอบของเลือด Fresh frozen plasma หรือ Prothrombin complex concentrate หรือ recombinant factor VIIa และวิตามินเคขนาด 10 มิลลิกรัมทางหลอดเลือดดำ
วิตามินเคที่ใช้ในการต้านฤทธิ์ออร์ฟารินเป็นชนิด vitamin K1 (phytonadione) สังเคราะห์จากพืช (นอกจากนี้ยังมี vitamin K2 ที่ได้จากการสังเคราะห์จากแบคทีเรีย และ menadione ซึ่งไม่ได้นำมาใช้ในการศึกษาทดลองต่างๆ)

เคยมีการศึกษา Meta-analysis ของการใช้วิตามินเคในการต้านฤทธิ์ออร์ฟารินในกรณีที่ INR น้อยกว่า 10 และไม่มีเลือดออกผิดปกติ โดยเปรียบเทียบการให้วิตามินเคหลายรูปแบบได้แก่ ชนิดรับประทาน ชนิดฉีดเข้าหลอดเลือดดำ และชนิดฉีดเข้าใต้ผิวหนัง [22] พบว่าการให้วิตามินเคในรูปแบบรับประทาน และแบบฉีดมีผลในการต้านฤทธิ์ออร์ฟารินได้ดีเท่ากันแต่ผลของวิตามินเคชนิดฉีดเข้าใต้ผิวหนังมีผลในการต้านฤทธิ์ออร์ฟารินไม่ดีเช่นเดียวกับกลุ่มอื่นจึงไม่แนะนำให้ใช้

รูปที่ 4 แสดงผล Meta-analysis การรักษา warfarin overdose ด้วยวิตามินเค



รูปแสดงผลของ Meta-analysis การใช้วิตามินเคชนิดต่างๆในการต้านฤทธิ์วอร์ฟาริน พบว่า วิตามินเคชนิดรับประทานสามารถทำให้ระดับ INR ลงมาอยู่ในเกณฑ์ที่เหมาะสมในช่วง 1.8-4.0 ในเวลา 24 ชั่วโมงประมาณ 82% และวิตามินชนิดฉีดทางหลอดเลือดดำ 77%

อย่างไรก็ตามยังไม่มีการศึกษาว่าวิตามินเคชนิดรับประทานขนาดใดจะสามารถต้านฤทธิ์วอร์ฟารินได้ดีกว่ากันโดยมีคำแนะนำการศึกษาใช้วิตามินเคชนิดรับประทานตั้งแต่ 1 มิลลิกรัมถึง 5 มิลลิกรัม การให้ยาวิตามินเคสูงเกินไปอาจทำให้ INR ต่ำกว่าช่วงที่รักษาและอาจเกิดลิ่มเลือดอุดตันได้

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 รูปแบบการวิจัย (Research Design)

เป็นการศึกษาสังเกตเชิงพรรณนา (Observational Study)

3.2 ระเบียบวิธีวิจัย (Research Methodology)

ประชากร (Population)

ผู้ป่วยในแผนกอายุรศาสตร์ หรือนอกแผนกอายุรศาสตร์ (Medical consultation) โรงพยาบาล
จุฬาลงกรณ์ที่รับประทานวอร์ฟารินแล้วมีระดับ INR > 4
ตั้งแต่เดือนกุมภาพันธ์ 2551 – มกราคม 2552

3.2.1 เกณฑ์ในการคัดเลือกเข้าศึกษา (Inclusion Criteria)

- ผู้ป่วยที่รับประทานวอร์ฟารินแล้วมีระดับ INR > 4
- ผู้ป่วยที่ใส่ลิ้นหัวใจเทียมชนิดโลหะ รับประทานวอร์ฟารินแล้วมีระดับ INR > 5
(ใช้ระดับ INR > 5 เฉพาะกรณีนี้เพื่อป้องกันไม่ให้เกิด over correction
หลังรับประทานไวตามินเค)

3.2.2 เกณฑ์ในการคัดแยกจากการศึกษา (Exclusion Criteria)

- ผู้ป่วยมีภาวะเลือดออกรุนแรง, เลือดออกในอวัยวะสำคัญ เช่นในสมอง และ
จำเป็นต้องใช้เลือด, ส่วนประกอบของเลือด และวิตามินเคในขนาดที่สูงกว่านี้
- กำลังตั้งครรภ์
- ไม่ยินยอมเข้าร่วมโครงการ

การคำนวณขนาดตัวอย่าง

$$n = \frac{Z^2 \alpha P(1-P)}{d^2}$$

$$n = \text{จำนวนตัวอย่างของผู้ป่วยที่ต้องรับการตรวจ VKORC1 single}$$

nucleotide polymorphism

$$Z_{\alpha} = Z_{0.05} = 1.96 \text{ (two tail) ที่ความเชื่อมั่น 95\%}$$

$$d = \text{acceptable error} = 15\%$$

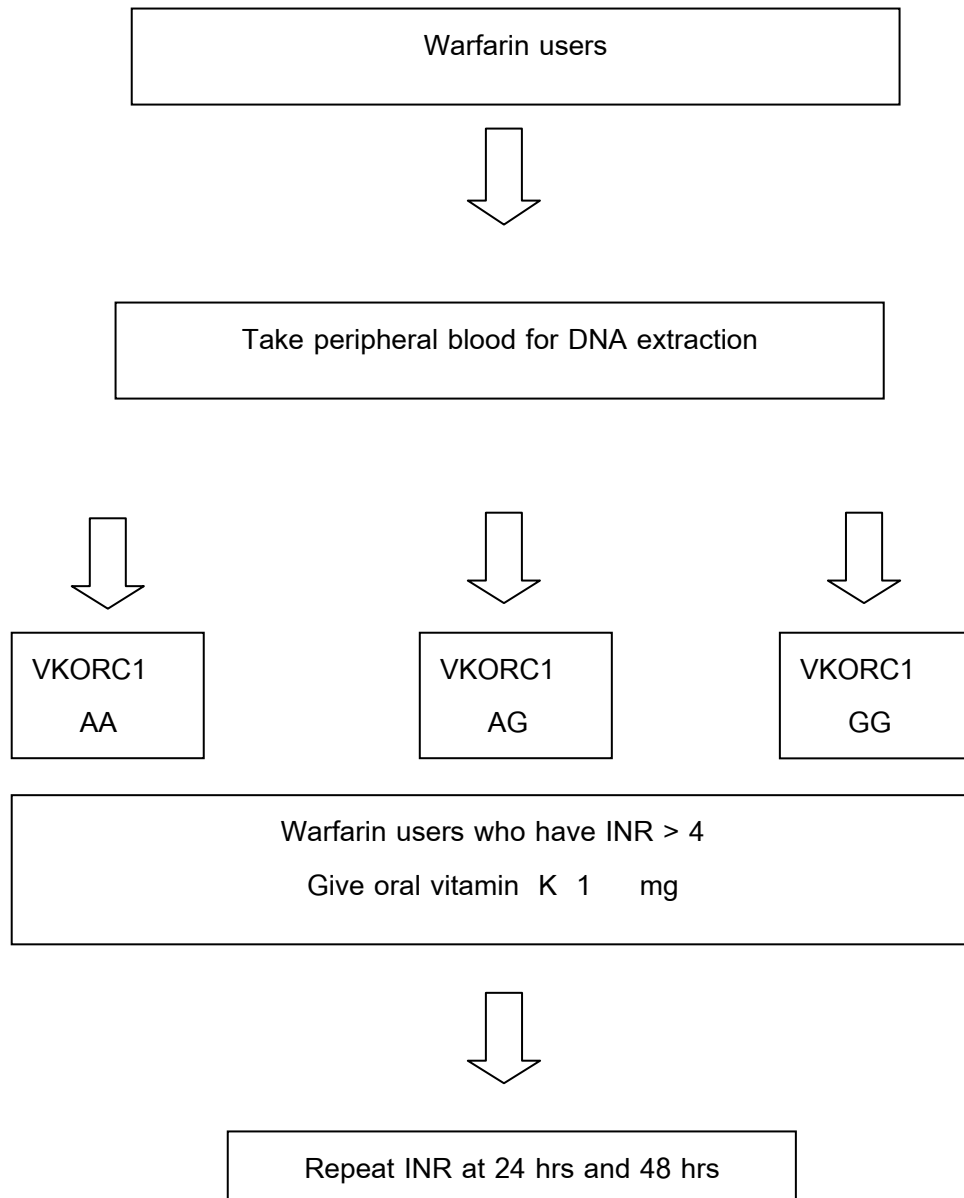
$$P = \text{อัตราความชุกการเกิด VKORC1 -1639 single nucleotide polymorphism ชนิด AA คิดเป็น 60\%}$$

$$n = \frac{(1.96)^2(0.6)(0.4)}{(0.15)^2} = 41 \text{ ราย}$$

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. ผู้ป่วยที่มีอายุมากกว่า 15 ปีที่มารับการรักษาที่แผนกอายุรศาสตร์ หรือนอกแผนกอายุรศาสตร์โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์
2. ผู้ป่วยที่รับประทาน warfarin แล้วมีระดับ INR > 4
3. ชักประวัติ ตรวจร่างกาย บันทึกข้อมูล
4. ผู้ป่วยทุกรายจะได้รับการตรวจทางห้องปฏิบัติการเก็บ EDTA blood เพื่อสกัด DNA , PT และ INR ทำที่หน่วยโลหิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
5. ให้วิตามินเคชนิดรับประทาน ปริมาณ 1 mg ในกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่มีข้อห้าม
6. วัดค่า INR ซ้ำหลังจากรับประทานวิตามินเคที่ 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง

รูปที่ 5 แสดงขั้นตอนการวิจัย



- 3.2.4 การสกัดดีเอ็นเอ (DNA extraction) ใช้ชุดทดสอบ JETQUICK Blood and Cell culture DNA Spin Kit (GENOMED GmbH, lohne, Germany) มีวิธีการดังนี้
- ใช้เลือด (whole blood) 1 ml

การสกัด DNA จากเลือดด้วยชุดทดสอบ JETQUICK Blood and cell culture DNA Spin Kit

- | | | |
|----------|---------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|
| 3.2.4.1 | ดูดเลือดปริมาณ | 1000 ul |
| 3.2.4.2 | ปั่นล้างด้วย WBC buffer (TE pH8) | 500 ul 1 รอบ |
| 3.2.4.3 | ปั่นล้างด้วย WBC buffer (TE pH8) | 1000 ul 1 รอบ |
| 3.2.4.4 | เติม GENOMED protease | 20 ul เขย่าให้เข้ากันแล้วปั่น |
| 3.2.4.5 | เติม Buffer K1 | 200 ul เขย่าให้เข้ากันแล้วปั่น |
| 3.2.4.6 | นำส่วนผสมดังกล่าวไปตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 58° celsius 10 นาที | |
| 3.2.4.7 | เติม absolute ethanol | 200 ul เขย่าให้เข้ากันแล้วปั่น |
| | ทันทีแล้วเทใส่ JETQUICK kit ที่เตรียมไว้แล้วปั่น 12,000 rpm เทsupernatant | |
| | ทิ้ง | |
| 3.2.4.8 | นำ Tris-Hcl buffer ไปตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ at 70° celsius ไว้ก่อน 5 นาที | |
| 3.2.4.9 | เติม KX Buffer | 500 ul แล้วปั่น |
| 3.2.4.10 | เติม K2 Buffer | 500 ul แล้วปั่น |
| 3.2.4.11 | ปั่นให้แห้งอีก 1 รอบ | |
| 3.2.4.12 | เติม Tris-HCL ที่อุ่นไว้แล้วมาเติม 50-100 ul จะได้ปริมาณ DNA ที่ต้องการ | |



รูปที่ 6 แสดงน้ำยาที่ใช้ในการสกัด DNA ด้วยชุดทดสอบ JETQUICK

- 3.2.5 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA) โดยวิธี polymerase chain reaction (PCR)
- เตรียม primer โดยสั่งซื้อลำดับ primer และทำตามขั้นตอนของ Elizabeth A et al. [9] PCR product ที่ต้องการมีขนาด 290 คู่เบส (Base pair)

ตารางที่ 5 แสดงลำดับเบสของ primer

Primer	Sequence
VKOR Forward	5' GCC AGC AGG AGA GGG AAA TA 3'
VKOR Reverse	5' AGT TTG GAC TAC AGG TGC CT 3'

การเตรียมสารละลาย primer สำหรับใช้ในการทำ PCR

3.2.5.1 Forward primer

5' GCC AGC AGG AGA GGG AAA TA 3'

ผสม 2.1 ul ในน้ำ 47.9 ul

คิดเป็น 5 pmol ต่อ 50 ul

3.2.5.2 Reverse primer

5' AGT TTG GAC TAC AGG TGC CT 3'

ผสม 1.8 ul ในน้ำ 48.2 ul

คิดเป็น 5 pmol ต่อ 50 ul

-นำตัวอย่าง DNA ที่สกัดได้ผสมกับ primer และน้ำยาต่างๆที่ใช้ในปฏิกิริยา (PCR Cocktail)

การเตรียม cocktail for PCR (final volume 20 ul)

- green master mix 10 ul
- forward primer 1.5 ul
- reverse primer 1.5 ul
- sterile water 4 ul
- DNA 3 ul

- นำส่วนผสมที่ได้เข้าเครื่อง PCR กำหนดอุณหภูมิ

94 องศาเซลเซียส	1	นาที (Denaturation)
57 องศาเซลเซียส	1	นาที (Annealing)
72 องศาเซลเซียส	1	นาที (Extension)

จำนวนรอบทั้งหมด 38 รอบ



รูปที่ 7 แสดงเครื่อง PCR

- นำส่วน DNA ที่ผ่านกระบวนการ PCR มาหยอดบน gel electrophoresis ซึ่งมีขั้นตอนการผสมวุ้นดังนี้

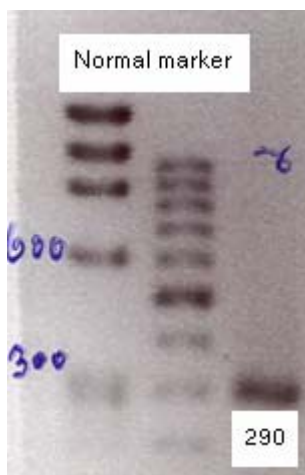
การเตรียมแผ่นวุ้นสำหรับหยอด DNA

ตวงผงวุ้น 0.45 mg

ผสมใน 1X TAE 30 ml

อุ่นในเตาอบไฟฟ้าจนได้สารละลายใส ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วเทลงในแม่พิมพ์
รอจนแผ่นวุ้นแข็งตัว

- ต้องได้ PCR product ขนาด 290 base pairs



รูปที่ 8 แสดง PCR product ขนาด 290 base pairs เทียบกับ molecular weight marker

- ใช้เอ็นไซม์ MspI เพื่อตัดคู่เบสของ PCR products

การเตรียม cocktail สำหรับ digest PCR product

PCR product	4	ul
10x buffer	2	ul
10x BSA	2	ul
Msp1	1	ul
Sterile water	5	ul

อุ่นส่วนผสมทั้งหมดไว้ค้างคืนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสตั้งทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง

- นำส่วนผสมที่ได้ใส่ลงใน 10 % Acrylamide gel electrophoresis เพื่อดู products โดยดูตามขนาดคู่เบสที่ปรากฏเทียบขนาดับชิ้น DNA ขนาดมาตรฐาน (Molecular weight marker)

การเตรียม 10% Acrylamide gel สำหรับ run digested PCR products

sterile water	1	ml
20% Acrylamide	0.5	ml
1.5 M Tris	0.5	ml
10% TBE	0.2	ml
10% APS	0.2	ml
Temed	0.002	ml

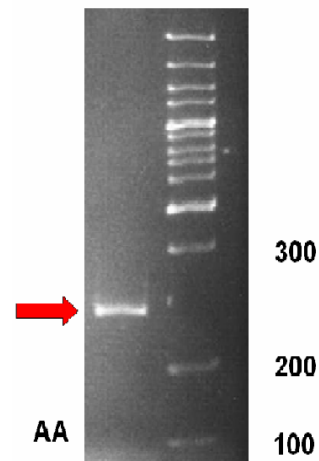


รูปที่ 9 แสดงน้ำยาส่วนผสมของ 10% Acrylamide

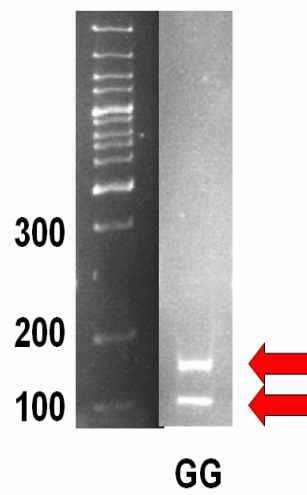


รูปที่ 10 แสดงการทำ electrophoresis บน 10% Acrylamide gel

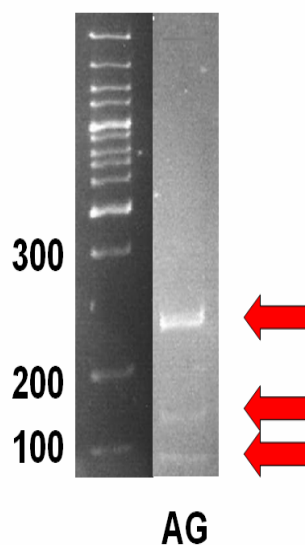
การอ่านผล PCR product หลังจากทำ electrophoresis



รูปที่ 11 แสดง PCR product allele AA ที่ไม่ถูกตัดด้วย MspI ได้คู่เบสขนาด 290 base pairs



รูปที่ 12 แสดง PCR product allele GG ที่ถูกตัดด้วย MspI ได้คู่เบสขนาด 122 และ 165 basepairs



รูปที่ 13 แสดง PCR product allele AG ที่ตัดด้วย MspI ได้คู่เบสขนาด 122, 165, 290 base pairs

3.3 วิธีเก็บรวบรวมข้อมูล(Data collection)

- 3.3.1 เก็บข้อมูลทั่วไป ได้แก่ อายุ, เพศ, ยาที่รับประทานประจำ
- 3.3.2 ข้อมูลทางห้องปฏิบัติการ ได้แก่ PT , INR , peripheral blood สกัด DNA เพื่อทำ PCR สำหรับ VKORC1 single nucleotide polymorphism

3.4 การวิเคราะห์ข้อมูล (Data analysis)

- 3.4.1 การสรุปข้อมูล (Summarization of data)
 - ข้อมูลทั่วไปของผู้ป่วยที่เข้าโครงการวิจัยเช่น อายุ, เพศ, ผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการ ยาที่รับประทาน
 - ความชุกของการเกิด VKORC1 single nucleotide polymorphism – 1639 ชนิดต่างๆในผู้ป่วยผู้ใหญ่ไทยอายุมากกว่า15 ปี
 - ผลการตอบสนองต่อการให้วิตามินเครูปแบบรับประทานขนาด 1 mg ในผู้ป่วยผู้ใหญ่ไทยอายุมากกว่า 15 ปีที่มี VKORC1 single nucleotide polymorphism – 1639 ต่างๆกัน
- 3.4.2 การนำเสนอข้อมูล(Data presentation)
 - ตารางแสดงข้อมูลทั่วไปและผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการของผู้ป่วยที่เข้าร่วมโครงการวิจัย

- แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ของการตอบสนองของวิตามินเครูปแบบรับประทานขนาด 1 mg ในผู้ป่วยผู้ใหญ่ไทยอายุมากกว่า 15 ปีที่มี VKORC1 single nucleotide polymorphism - 1639 ต่างๆกัน
- 3.4.3 การทดสอบสมมติฐาน(Hypothesis testing)
- การวัดความชุกของการเกิด VKORC1 single nucleotide polymorphism ตำแหน่ง - 1639 ในผู้ป่วยที่มีภาวะวอร์ฟารินเกินขนาด

3.5 ปัญหาทางจริยธรรม(Ethical Considerations)

การวิจัยนี้ทำการเก็บตัวอย่างเลือดจากผู้ป่วยที่รับประทานวอร์ฟารินแล้วเกิดมีระดับ INR มากกว่า 4 (เพื่อศึกษาอุบัติการณ์ของการเกิด VKORC1 single nucleotide polymorphism ตำแหน่ง -1639) ดูการตอบสนองของการใช้ วิตามินเครูปแบบรับประทานขนาด 1 mg ที่ใช้ในการต้านฤทธิ์ของวอร์ฟาริน ผู้ป่วยมีความเสี่ยงน้อยที่จะเกิดอันตรายจากการให้รับประทาน vitamin K และระดับ INR ที่มากกว่า 4 ควรที่จะต้องลดระดับ INR ลงอยู่แล้ว

บทที่ 4

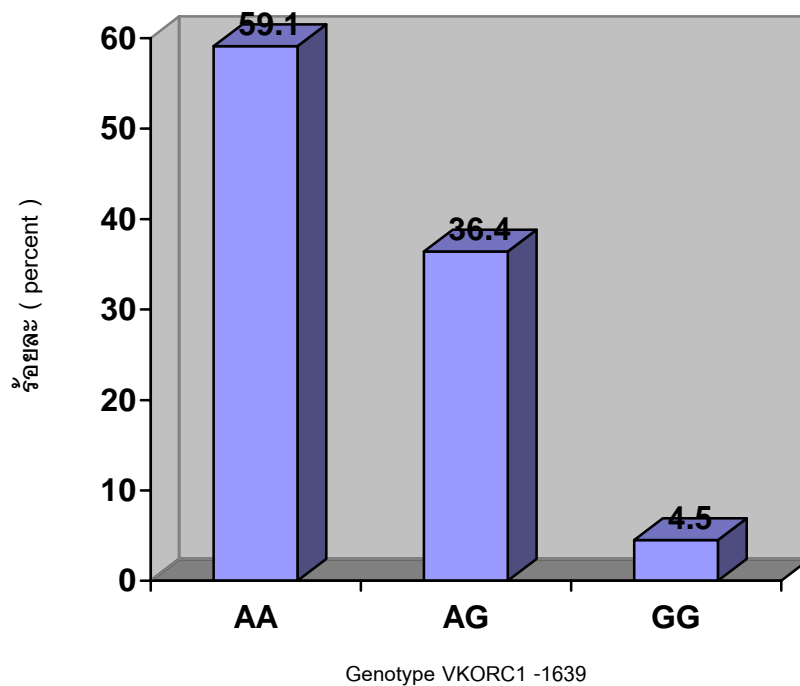
ผลการวิจัย

4.1 แสดงข้อมูลพื้นฐานของประชากรที่เข้าร่วมการศึกษา

ตารางที่ 6 แสดงข้อมูลพื้นฐานของผู้ป่วย 44 ราย

ตัวแปร (variable)	
อายุ (ปี)	66 (range 21-90 ปี)
ข้อบ่งชี้การรับประทานวอร์ฟาริน (ร้อยละ)	
- Atrial fibrillation	45.5% (20)
- Deep vein thrombosis	40.9% (18)
- Prosthetic heart valves	9.1% (4)
- Arterial occlusion	2.3 % (1)
- Venous sinus thrombosis	2.3 % (1)
ยาที่รับประทานประจำ (ร้อยละ)	
- ไม่มีผลต่อวอร์ฟาริน	84.1% (37)
- เสริมฤทธิ์วอร์ฟาริน	15.9% (7)
กลุ่มโรคประจำตัว (ร้อยละ)	
- โรคหัวใจและหลอดเลือด	65.9% (29)
- โรคมะเร็ง	18.2% (8)
- โรคระบบประสาท	4.5% (2/44)
- ไม่มีโรคประจำตัว	4.5% (2)
- โรคอื่นๆ	6.8% (3)

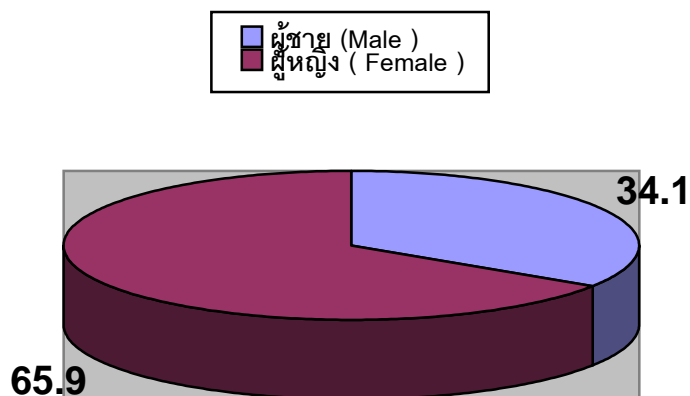
แผนภูมิแท่งจำนวนร้อยละของ genotype VKORC1 -1639



รูปที่ 14 แผนภูมิแท่งแสดงจำนวนร้อยละของ genotype VKORC1 -1639

จากการศึกษาพบความชุกของ haplotype VKORC1 -1639 ในประชากรพบว่า haplotype AA 29/44 (59.1%), AG 16/44 (36.4 %), GG 2/44 (4.5 %)

รูปแสดงจำนวนร้อยละ (percent) จำแนกตามเพศ

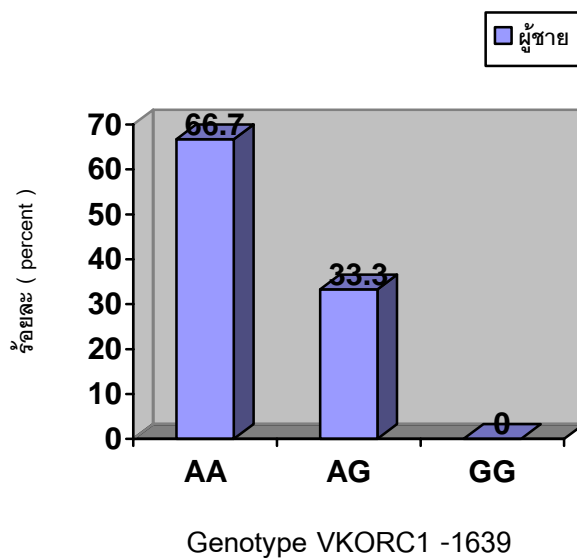


รูปที่ 15 แผนภูมิทรงกลมแสดงจำนวนร้อยละ (percent) ของผู้ป่วยจำแนกตามเพศ

ประชากรในการศึกษามีผู้ป่วยชาย 15/44 คนคิดเป็น 34.1 % ผู้ป่วยหญิง 29/44 คนคิดเป็น 65.9 %

จำแนกผู้ป่วยแยกตามเพศและVKORC1 -1639 haplotype

จำนวนร้อยละของ genotype VKORC1 -1639 ในผู้ป่วยชาย

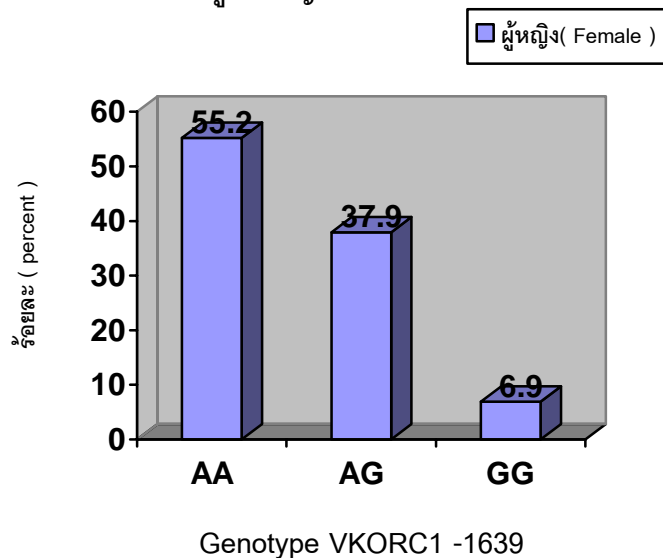


รูปที่ 16 แผนภูมิแท่งแสดงร้อยละ (percent) VKORC1 -1639 ในผู้ป่วยชาย

ผู้ป่วยชาย 15 คนมี VKORC1 -1639 haplotype AA เท่ากับ 66.7% AG 33.3%

จำนวนร้อยละของ genotype VKORC1 -1639 ใน

ผู้ป่วยหญิง



รูปที่ 17 แผนภูมิแท่งแสดงร้อยละ (percent) VKORC1 -1639 ในผู้ป่วยหญิง

ผู้ป่วยหญิง 29 คนมี VKORC1 -1639 haplotype AA เท่ากับ 55.2% AG 37.9% GG 6.9 %

จากการศึกษาพบว่าผู้ป่วย 44 รายที่เข้าร่วมการวิจัย (แสดงข้อมูลในตารางหน้าถัดไป) พบว่าข้อบ่งชี้ที่ผู้ป่วยต้องรับประทานวอร์ฟารินมากที่สุดได้แก่ Atrial fibrillation สาเหตุรองลงมาได้แก่การเกิดลิ่มเลือดอุดตันที่ขาโดยไม่มีลิ่มเลือดอุดตันที่ปอด

ข้อมูลโรคประจำตัว ส่วนใหญ่ผู้ป่วยมีโรคประจำตัวเป็นโรคหัวใจขาดเลือดไม่พบผู้ป่วยเกิดภาวะหัวใจล้มเหลว ผู้ป่วยมีโรคประจำตัวเป็นโรคมะเร็ง 8 ราย (มะเร็งปากมดลูก 2 ราย, มะเร็งเต้านม 2 ราย, มะเร็งลำไส้ 1 ราย, มะเร็งรังไข่ 1 ราย, มะเร็งต่อมไทรอยด์ 1 ราย)

ยาที่ผู้ป่วยรับประทานร่วมส่วนใหญ่ไม่มีผลเสริมฤทธิ์ของวอร์ฟารินคิดเป็น 84.1% เช่น vitamin B, enalapril, furosemide ส่วนยาที่มีผลเสริมฤทธิ์วอร์ฟารินคิดเป็น 15.9% ได้แก่ paracetamol, statin

ผู้ป่วยที่เข้าร่วมการวิจัยมีพฤติกรรมรับประทานอาหารไม่แตกต่างจากปกติส่วนใหญ่คือรับประทานอาหารครบทั้ง 5 หมู่

4.2 แสดงข้อมูลประชากรที่เข้าร่วมการวิจัย สาเหตุการรับประทานวอร์ฟารินและมีระดับ INR > 4 หลังจากรับประทานวอร์ฟาริน ดังแสดงในตาราง

ตารางที่ 7 แสดงข้อมูลพื้นฐานอายุ เพศ ระดับ INR เริ่มต้น ข้อบ่งการใช่วอร์ฟารินและขนาดยาที่ใช้

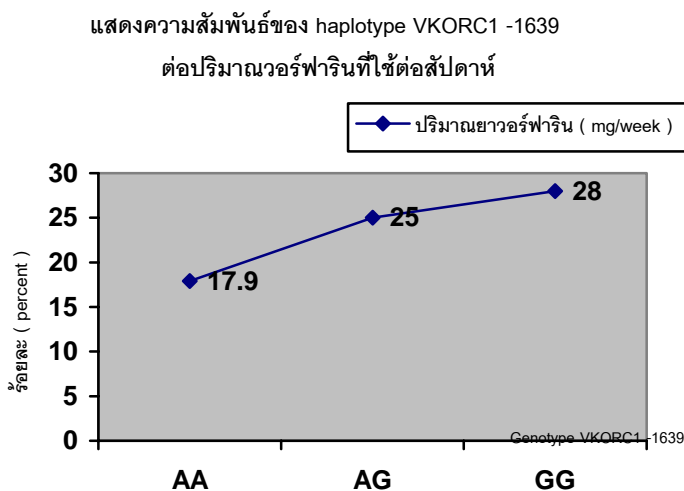
Number	Genotype	Age	Sex	Indication For warfarin	Warfarin (mg/week)
1	AA	82	Female	DVT	15.0
2	AG	37	Female	DVT	25.5
3	AG	56	Female	RHD	21.0
4	AG	29	Female	DVT	35.0
5	AA	81	Female	AF	21.0
6	AG	63	Female	DVT	31.0
7	GG	86	Female	AF	21.0
8	AA	82	Male	AF	21.0
9	AA	74	Female	AF	10.5
10	AA	68	Female	DVT	12.0
11	AG	66	Male	RHD	21.0
12	AA	85	Female	DVT	13.5
13	AA	70	Female	DVT	21.0
14	AA	83	Female	DVT	13.5
15	AG	44	Female	Venous sinus Thrombosis	13.5
16	AG	54	Female	AF	21.0
17	AA	57	Female	DVT	25.0
18	AA	74	Male	DVT	10.5

ตารางที่ 7 แสดงข้อมูลพื้นฐาน (ต่อ) อายุ เพศ ระดับINRเริ่มต้น ข้อบ่งการให้วอร์ฟารินและขนาดยาที่ใช้

	Genotype	Age	Sex	Indication For warfarin	Warfarin (mg/week)
19	AA	65	Male	DVT	21.0
20	AA	84	Male	AF	10.5
21	AG	42	Male	AF	35.0
22	AA	26	Female	DVT	15.5
23	AA	60	Female	RHD	25.0
24	AA	50	Female	AF	42.0
25	AG	61	Female	DVT	10.5
26	AG	54	Male	AF	31.5
27	AG	72	Female	AF	31.5
28	AA	76	Female	DVT	15.0
29	AA	79	Female	AF	21.0
30	AA	35	Male	DVT	21.0
31	AA	80	Male	AF	21.0
32	GG	75	Female	DVT	35.0
33	AG	21	Female	RHD	26.0
34	AG	65	Female	AF	25.0
35	AA	80	Male	AF	10.5
36	AA	77	Female	PAD	21.0
37	AA	69	Male	AF	35.0
38	AG	80	Male	DVT	27.5
39	AA	76	Male	AF	12.0
40	AG	61	Female	AF	10.5
41	AA	69	Male	DVT	10.5
42	AG	90	Male	AF	21.0
43	AA	61	Female	AF	18.5
44	AA	86	Female	AF	17.5

จากผลการศึกษาผู้ป่วย 44 รายใช้ปริมาณวอร์ฟารินเฉลี่ยต่อสัปดาห์ให้ได้ระดับ INR 2-3 (จากประวัติในเวชระเบียน) แตกต่างกันตาม genotypes ดังแสดงตามตารางด้านล่าง

รูปที่ 18 แสดงความสัมพันธ์ของ Haplotype VKORC1 -1639 ต่อปริมาณวอร์ฟาริน ที่ใช้ต่อสัปดาห์แล้ว ได้ระดับ INR 2-3



จากจำนวนผู้ป่วย 44 รายมีผู้ป่วยที่สามารถรับประทานวิตามินเคชนิดรับประทานขนาด 1 มิลลิกรัมได้จำนวน 31 รายแสดงข้อมูลได้ตามตาราง

ตารางที่ 8 แสดงผลตอบสนองต่อการรับประทานวิตามินเค 1 มิลลิกรัม

Number	initial INR	INR at 24 hrs	INR at 48 hrs
1	6.4	4.7	3.1
2	4.8	3.7	1.8
3	10.8	3.2	2.3
4	6.7	3.6	2.6
5	4.8	1.6	1.6
6	4.0	1.8	1.4
7	4.2	2.1	1.9

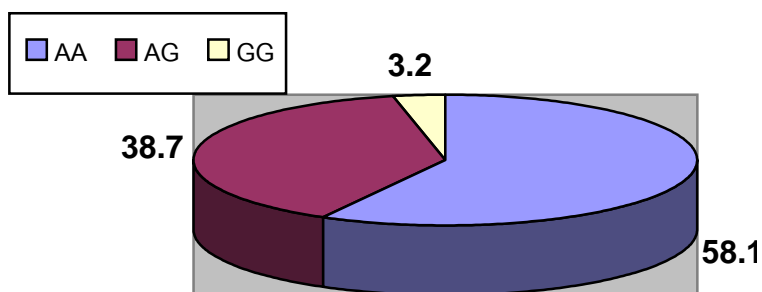
ตารางที่ 8 แสดงผล (ต่อ) ผลตอบสนองต่อการรับประทานวิตามินเค 1 มิลลิกรัม

Number	initial INR	INR at 24 hrs	INR at 48 hrs
8	6.5	2.9	1.9
9	4.5	2.3	1.8
10	11.2	3.4	1.5
11	5.3	2.4	3.7
12	17.7	8.5	8.7
13	8.8	3.7	2.9
14	10.2	2.9	2.5
15	5.5	2.1	2.5
16	4.3	1.7	1.4
17	4.8	2.8	3.7
18	6.1	1.3	1.1
19	8.1	1.6	1.3
20	4.4	3.6	2.8
21	4.7	2.4	3.0
22	11.0	1.8	1.6
23	4.1	1.7	1.4
24	5.6	1.4	1.3
25	6.3	3.8	2.1
26	10.4	8.5	6.9
27	5.6	1.4	1.3
28	4.5	2.0	1.7
29	6.4	3.6	3.5
30	6.0	2.4	1.7
31	8.4	4.3	2.6

หลังจากรับประทานวิตามินเคขนาด 1 มิลลิกรัมแล้วทำการตรวจวัด INR ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง เนื่องจากกลุ่ม Haplotype VKORC1 -1639 GG มีน้อยดังแสดงตามรูปจึงทำการรวมกลุ่มผู้ป่วยเป็น 2 กลุ่มก่อนทำการวิเคราะห์ข้อมูล ได้แก่

- กลุ่ม VKORC1 -1639 Haplotype AA
- กลุ่ม VKORC1 -1639 Haplotype non AA (AG and GG)

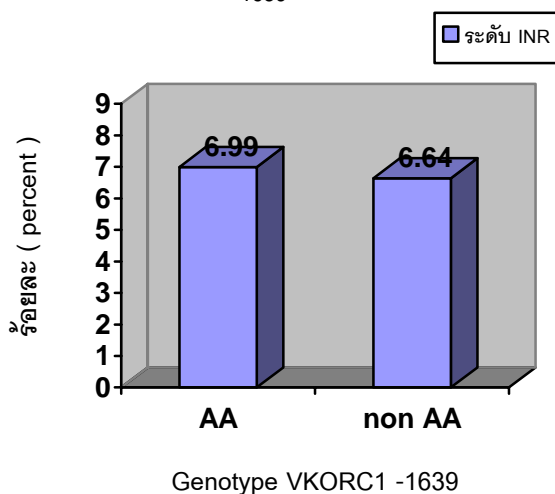
รูปแสดงจำนวนร้อยละ (percent) ของ haplotype VKORC1 -1639 ในกลุ่มผู้ป่วยที่รับประทานวิตามินเค ขนาด 1 มิลลิกรัม



รูปที่ 19 แผนภูมิทรงกลม แสดงความชุก VKORC1 -1639 ในผู้ป่วยที่รับวิตามินเค

พบระดับ INR เฉลี่ยก่อนรับประทานวิตามินเคของทั้ง 2 กลุ่มเป็นดังแสดงในรูป

ค่าเฉลี่ยระดับ INR ก่อนรักษาของ genotype VKORC1 -1639



รูปที่ 20 แสดงค่าเฉลี่ยของ INR ก่อนรักษาด้วยวิตามินเคระหว่างกลุ่ม AA และ nonAA (p=0.74)

ค่าเฉลี่ยระดับ INR ก่อนรับประทานวิตามินเค ($p=0.74$)

กลุ่ม AA haplotype เท่ากับ 6.99 ± 3.4

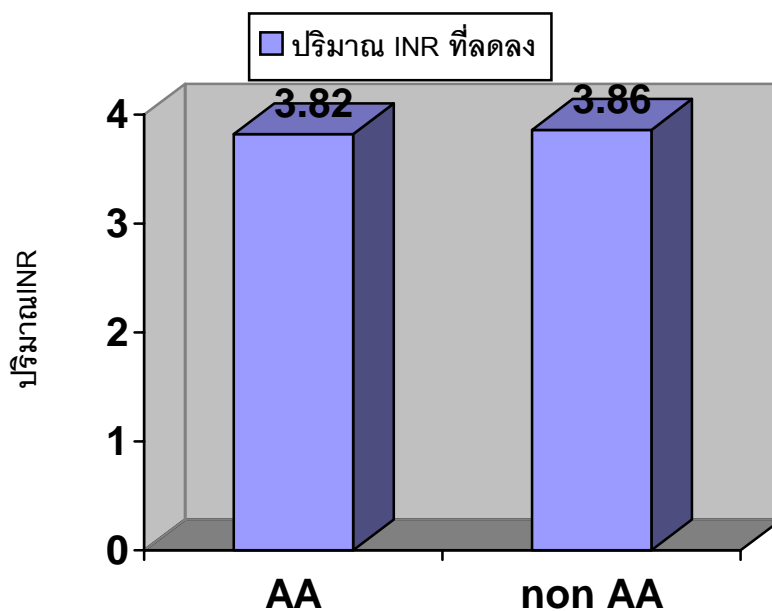
กลุ่ม non AA haplotype เท่ากับ 6.64 ± 2.5

ผลการตอบสนองต่อวิตามินเคขนาด 1 มิลลิกรัม

- ปริมาณ INR ที่ลดลง 24 ชั่วโมง

แสดงปริมาณ INR ที่ลดลงหลัง 24 ชั่วโมงแบ่งตาม

VKORC1 -1639 genotype



VKORC1 -1639 genotype

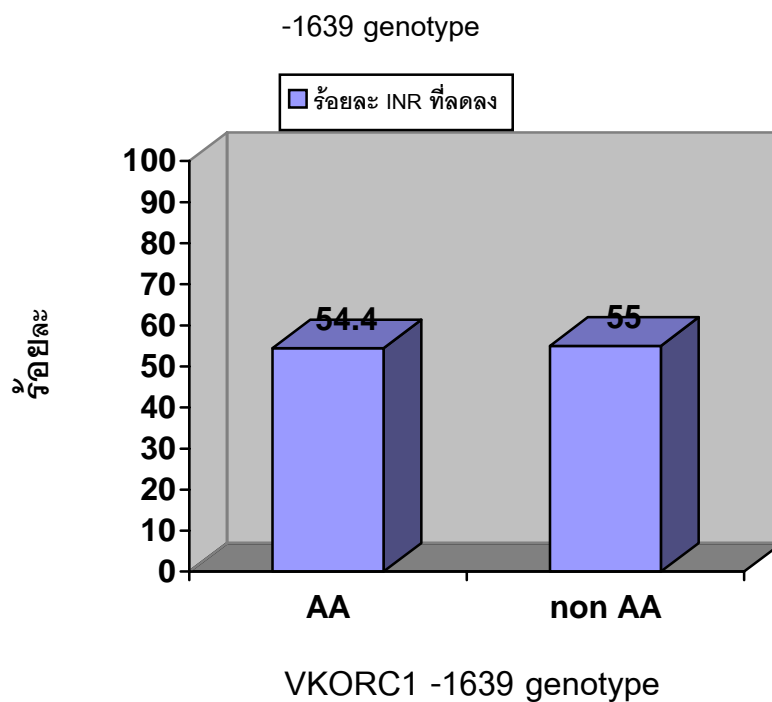
รูปที่ 21 แผนภูมิแท่งแสดงระดับ INR ที่ลดลงหลังรับประทานวิตามินเค 24 ชั่วโมง ($p=0.92$)

ในกลุ่ม haplotype AA ระดับ INR ลดลงเฉลี่ยที่เวลา 24 ชั่วโมงคิดเป็น 3.82 ± 2.3

ในกลุ่ม haplotype non AA ระดับ INR ลดลงเฉลี่ยที่เวลา 24 ชั่วโมงคิดเป็น 3.86 ± 2.8

- ระดับร้อยละของ INR ที่ลดลง 24 ชั่วโมง

ร้อยละของ INR ที่ลดลงหลัง 24 ชั่วโมงแบ่งตาม VKORC1

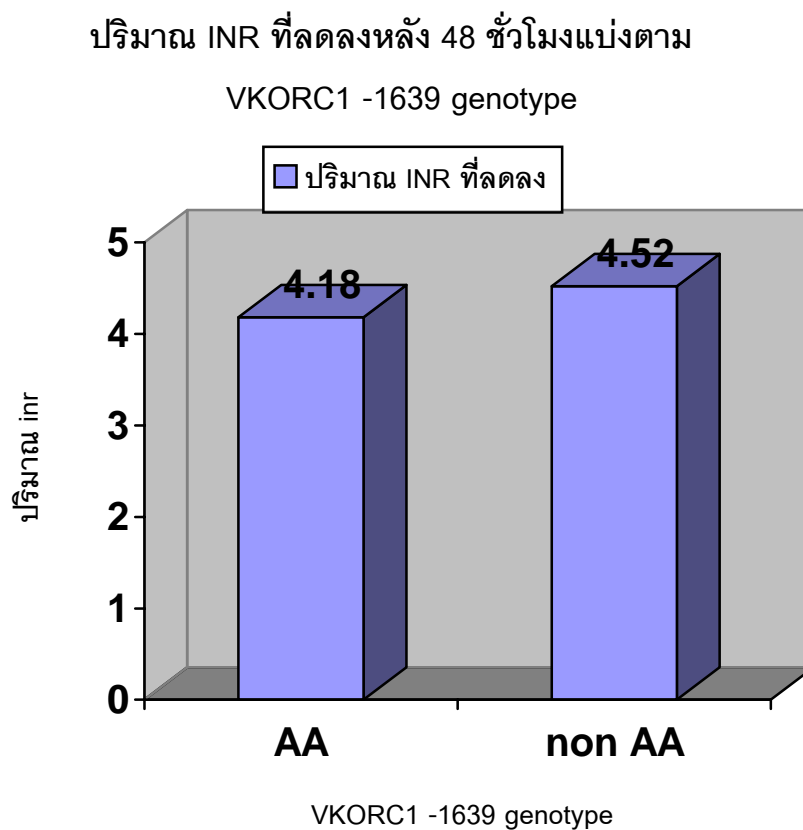


รูปที่ 22 แผนภูมิแท่งแสดงร้อยละของ INR ที่ลดลงหลังรับประทานไวตามินเค 24 ชั่วโมงเมื่อเทียบกับก่อนทานไวตามินเค ($p=0.83$)

ในกลุ่ม haplotype AA ร้อยละของ INR ที่ลดลงเวลา 24 ชั่วโมงคิดเป็น $54.4 \pm 16.4 \%$

ในกลุ่ม haplotype non AA ร้อยละของ INR ที่ลดลงเวลา 24 ชั่วโมงคิดเป็น $55.5 \pm 19.4 \%$

- ปริมาณ INR ที่ลดลง 48 ชั่วโมง



รูปที่ 23 แผนภูมิแท่งแสดงระดับ INR ที่ลดลงหลังรับประทานวิตามินเค 48 ชั่วโมง ($p=0.44$)

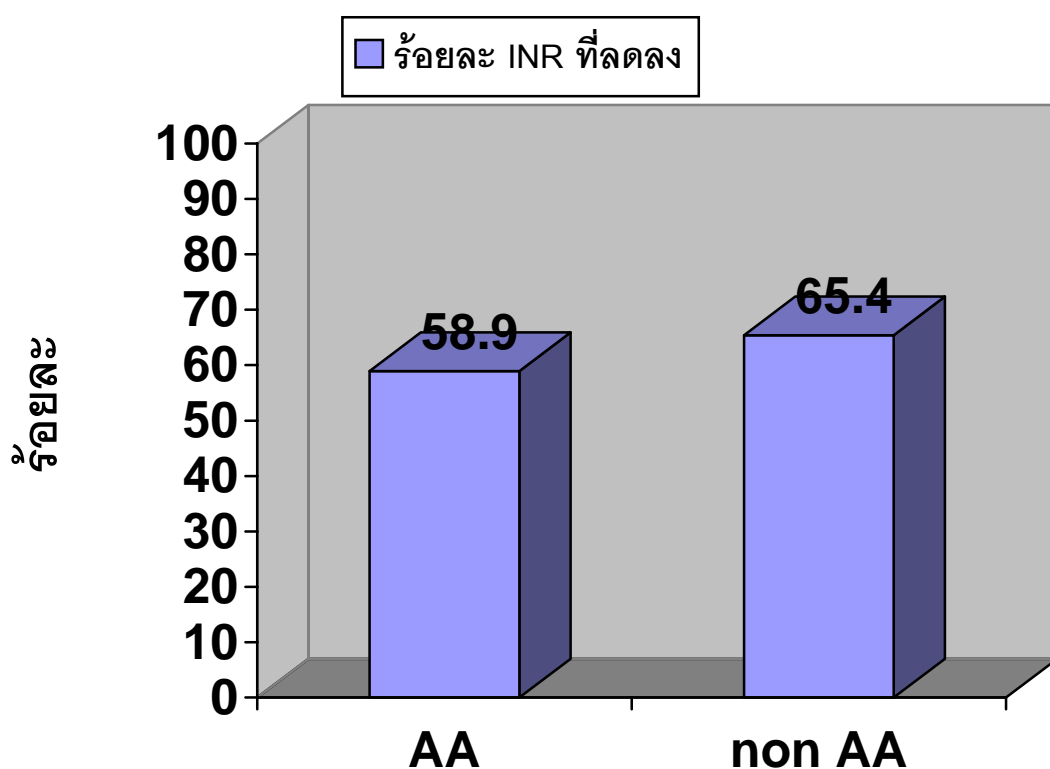
ในกลุ่ม haplotype AA ระดับ INR ลดลงเฉลี่ยที่เวลา 48 ชั่วโมงคิดเป็น 4.18 ± 2.4

ในกลุ่ม haplotype non AA ระดับ INR ลดลงเฉลี่ยที่เวลา 48 ชั่วโมงคิดเป็น 4.52 ± 2.5

- ระดับร้อยละของ INR ที่ลดลง 48 ชั่วโมง

ร้อยละของ INR ที่ลดลงหลัง 48 ชั่วโมงแบ่งตาม

VKORC1 -1639 genotype

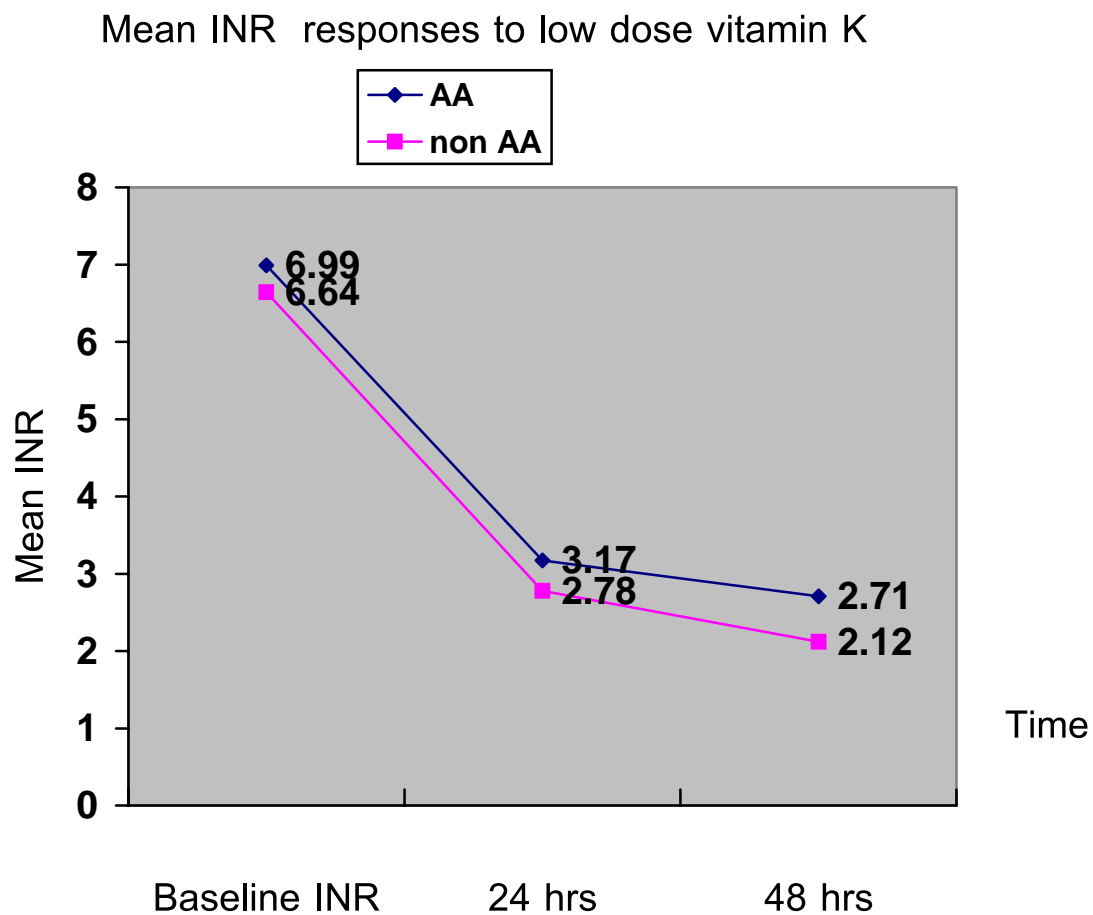


VKORC1 -1639 genotype

รูปที่ 24 แผนภูมิแท่งแสดงร้อยละของ INR ที่ลดลงหลังรับประทานไวตามินเค 48 ชั่วโมงเมื่อเทียบกับก่อนทานวิตามินเค (p=0.42)

ในกลุ่ม haplotype AA ร้อยละของ INR ที่ลดลงเฉลี่ยที่เวลา 48 ชั่วโมงคิดเป็น $58.9 \pm 18.7 \%$

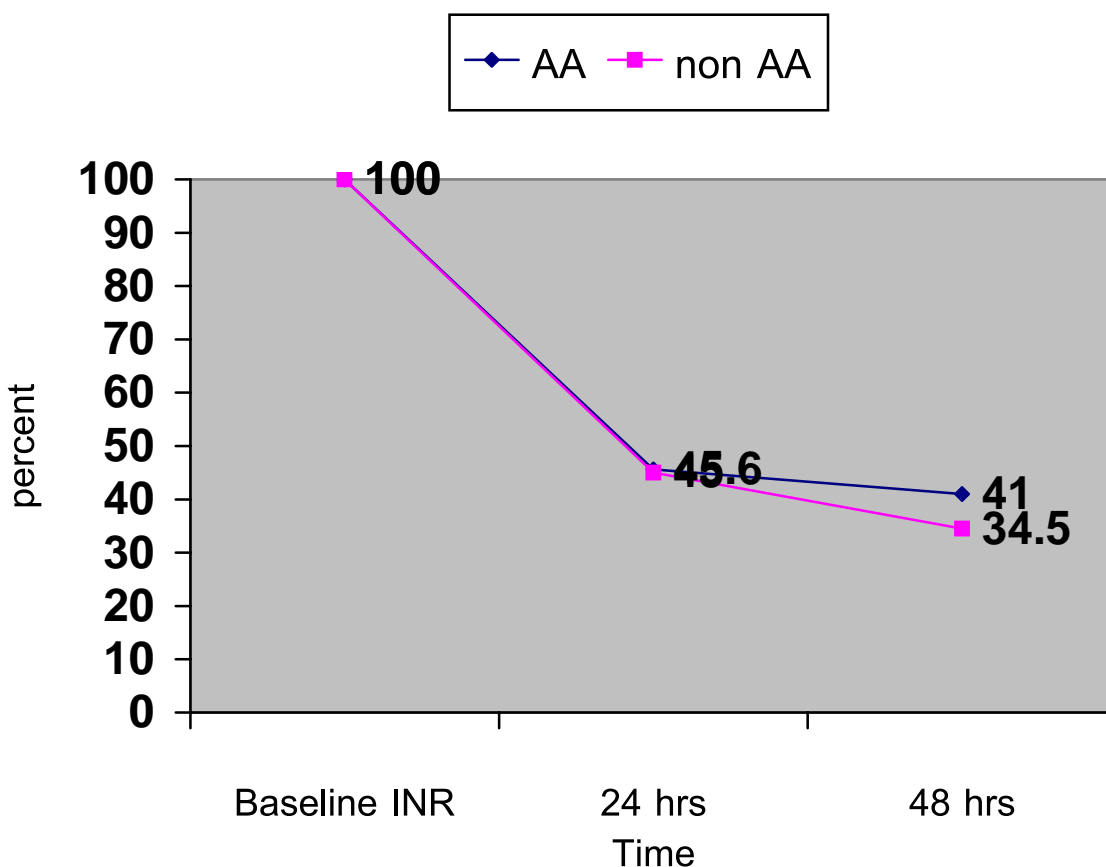
ในกลุ่ม haplotype non AA ร้อยละของ INR ที่ลดลงเฉลี่ยที่เวลา 48 ชั่วโมงคิดเป็น $65.6 \pm 14.1 \%$



รูปที่ 25 แสดงปริมาณ INR ที่ลดลงหลังรับประทานวิตามินเค 1 mg

จากรูปด้านบนพบว่าในกลุ่ม Haplotype AA และ non AA มีการลดลงของระดับ INR ในระดับที่ใกล้เคียงกัน เปรียบเทียบระดับ INR ที่ลดลงตามระยะเวลาคำนวณทางสถิติด้วยวิธี Mann whitney U test ระหว่าง 2 กลุ่มไม่มีความแตกต่างกัน (p value ที่ 24 ชั่วโมง = 0.92, p value ที่ 48 ชั่วโมง = 0.44)

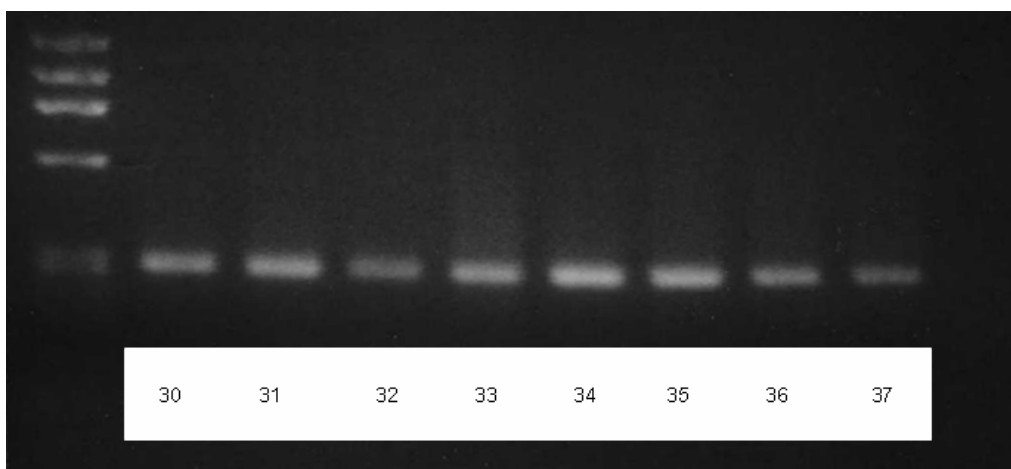
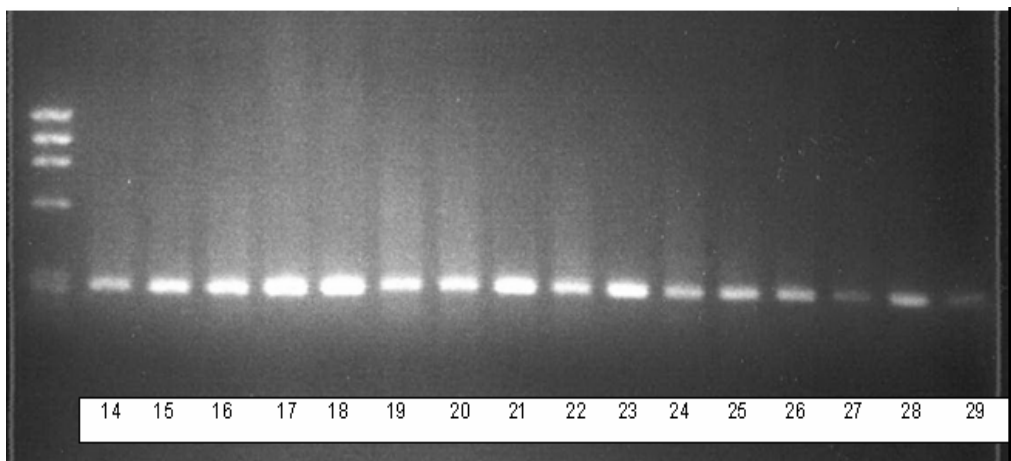
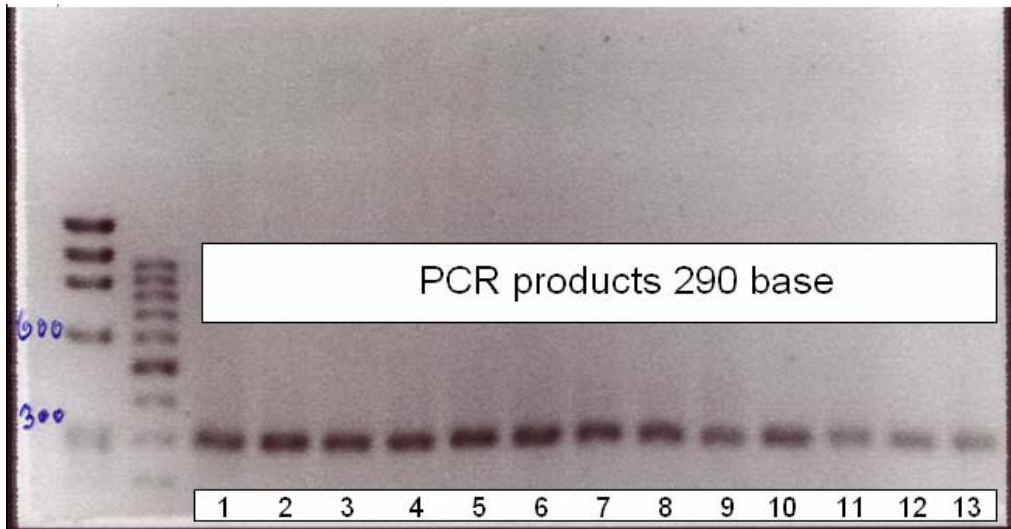
Percent INR responses to low dose vitamin K



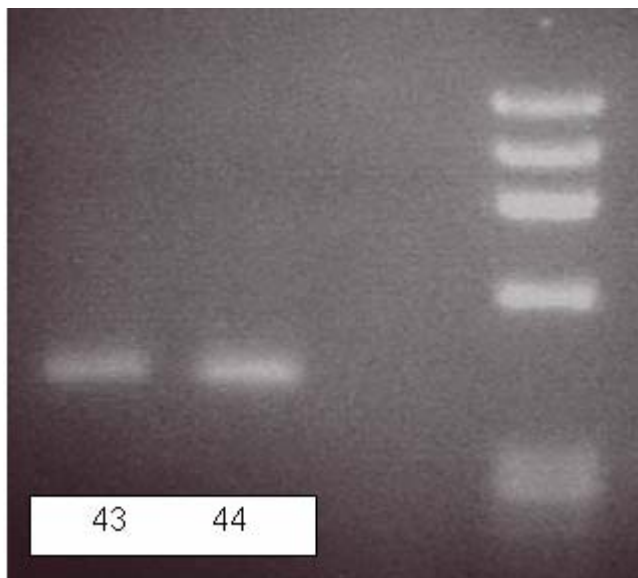
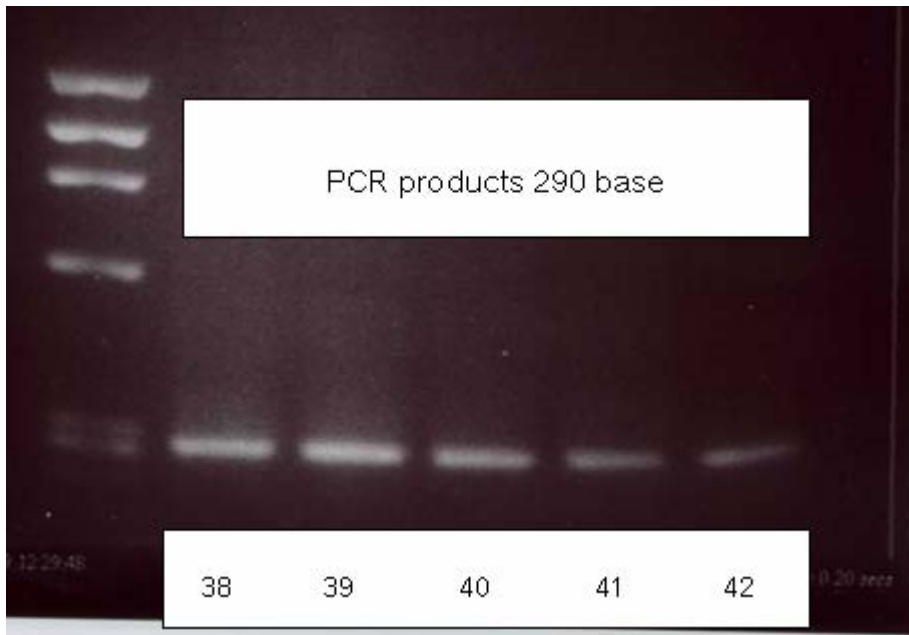
รูปที่ 26 แสดงปริมาณร้อยละ (percent) ที่ลดลงหลังรับประทานวิตามินเค 1 mg

จากรูปด้านบนพบว่าในกลุ่ม Haplotype AA และ non AA มีการลดลงของร้อยละ (percent) ในระดับที่ใกล้เคียงกัน เปรียบเทียบระดับร้อยละ (percent) ที่ลดลงตามระยะเวลาคำนวณทางสถิติด้วยวิธี Mann whitney U test ระหว่าง 2 กลุ่มไม่มีความแตกต่างกัน (p value ที่ 24 ชั่วโมง = 0.83, p value ที่ 48 ชั่วโมง = 0.42)

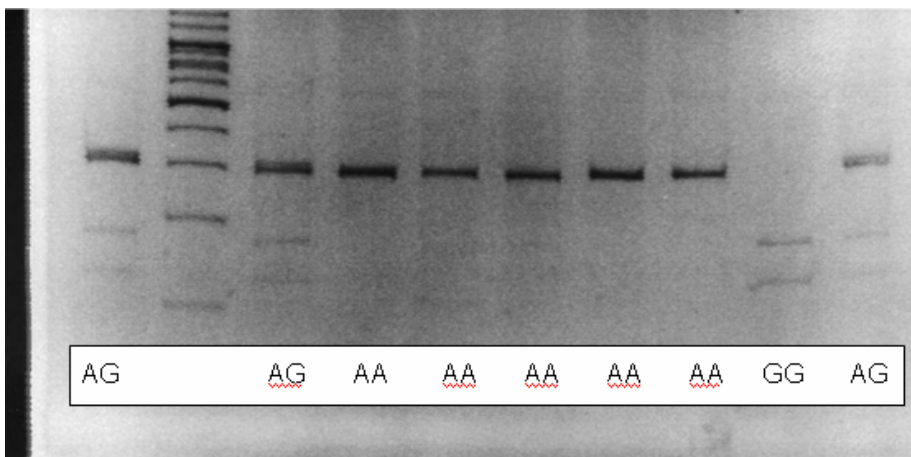
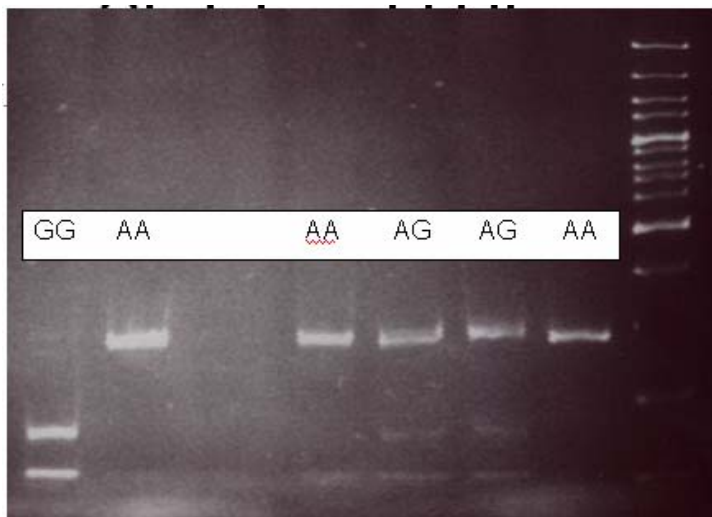
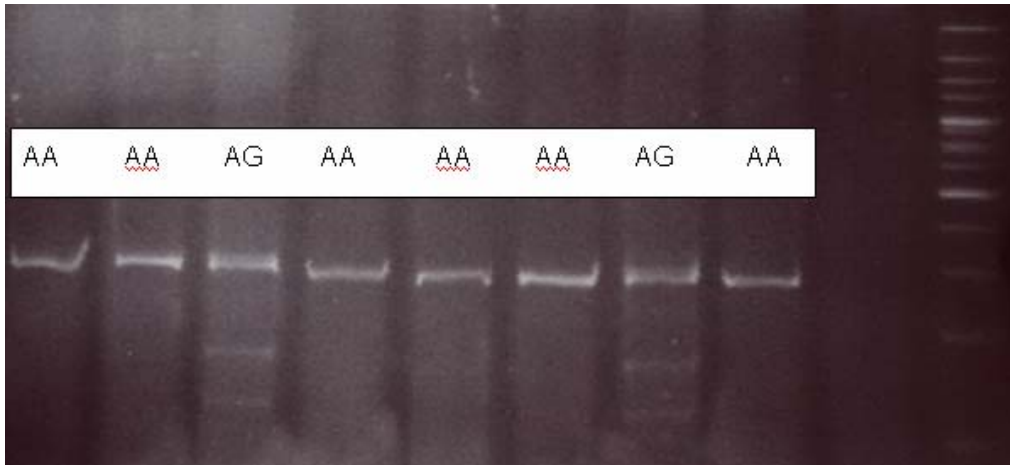
รูปที่ 27 ภาพแสดง PCR products จาก whole blood จำนวน 44 ราย



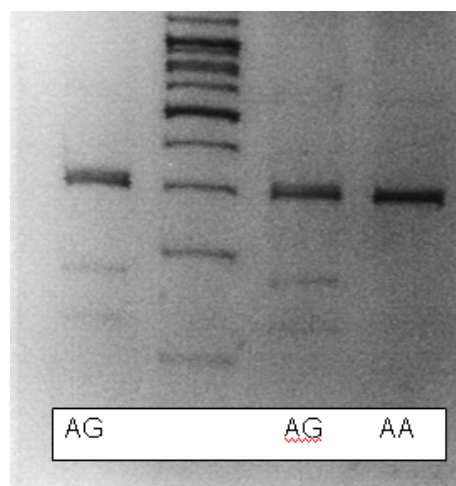
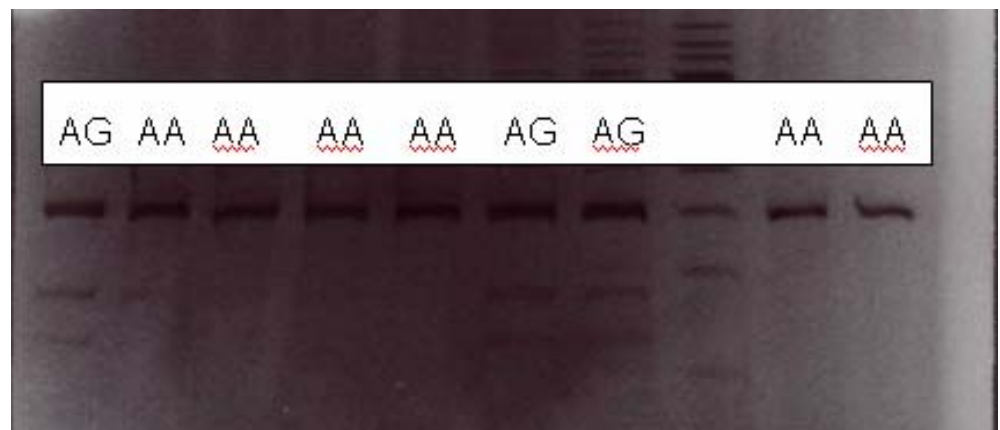
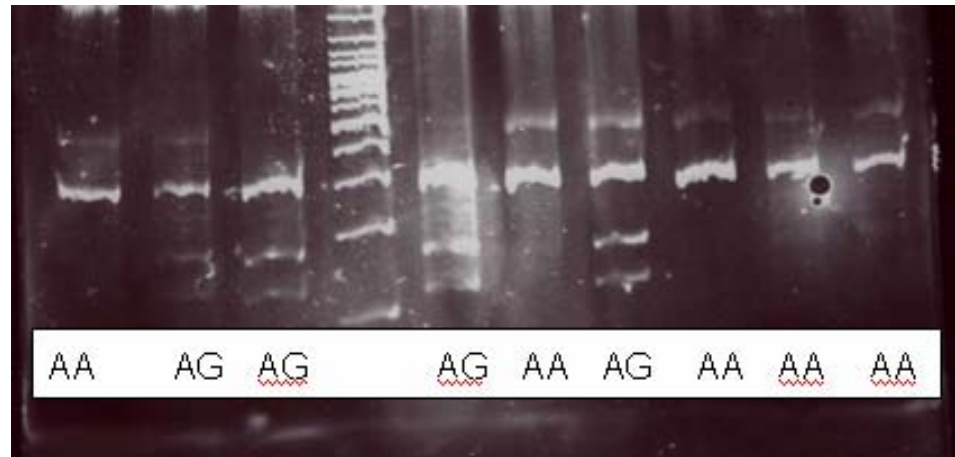
รูปที่ 27 (ต่อ) ภาพแสดง PCR products จาก whole blood จำนวน 44 ราย



รูปที่ 28 แสดง PCR products ที่ใช้เอนไซม์ MspI ตัด จำนวน 31 ราย



รูปที่ 28 (ต่อ) แสดง PCR products ที่ใช้เอนไซม์ MspI ตัด จำนวน 31 ราย



บทที่ 5

อภิปรายผลและข้อเสนอแนะ

บทบาทสำคัญของพันธุศาสตร์ต่อการเลือกปรับระดับยารักษาโรคพาร์กินสันเป็นที่ยอมรับและมีการศึกษาอย่างแพร่หลายในแต่ละภูมิภาค องค์การอาหารและยาในประเทศสหรัฐอเมริกา US Food and Drug Administration (FDA) ปี 2007 ได้แสดงข้อมูลความสำคัญของ CYP450 2C9 และ VKORC1 ต่อการใช้ยารักษาโรคพาร์กินสันโดยแนะนำให้เริ่มใช้ยาในขนาดต่ำเมื่อผู้ป่วยที่มีการเปลี่ยนแปลงของพันธุศาสตร์ดังกล่าว

บทบาทของ CYP450 2C9 polymorphism

พบการเปลี่ยนแปลงทางพันธุศาสตร์เอ็นไซม์ CYP450 2C9 ตั้งแต่ปี 1990 (บทบาทต่อเภสัชจลนศาสตร์ซึ่งมีหน้าที่สำคัญในกระบวนการกำจัดยารักษาโรคพาร์กินสัน S-form ซึ่งเป็นรูปที่ออกฤทธิ์ของยารักษาโรคพาร์กินสัน) โดยพบว่าถ้าตรวจพบ CYP450 2C9 ชนิด *2 หรือ *3 จะทำให้เอ็นไซม์ทำงานลดลงเกิดความไวต่อการใช้ยารักษาโรคพาร์กินสันเนื่องจากยาถูกกำจัดได้น้อยลง แต่หากตรวจพบ CYP450 2C9 ชนิด *1 จะไม่มีผลต่อระดับเอ็นไซม์ CYP450 2C9

CYP450 2C9 polymorphism มีผลต่อการปรับขนาดยารักษาโรคพาร์กินสันพบว่าผู้ป่วยที่มียีนส์ CYP450 2C9 ชนิด *2 และ *3 สนับสนุนข้อมูลของการใช้ยารักษาโรคพาร์กินสันในขนาดต่ำที่ต้องรับประทานในแต่ละวัน โดยข้อมูลจากการศึกษาของ Aithal และคณะ

ในการศึกษาของผู้วิจัยนี้ไม่ได้ตรวจหาความชุกของ CYP450 2C9 polymorphism เนื่องจากความชุกของชนิด *2 และ *3 พบได้น้อยในประชากรเอเชียตามข้อมูลที่แสดงเบื้องต้น การปรับปรุงการวิจัยครั้งนี้ให้ดีขึ้นควรทำการตรวจหาความชุกของยีนส์ดังกล่าวในผู้ป่วยที่ได้รับยารักษาโรคพาร์กินสันเกินขนาดด้วยเพื่อความสมบูรณ์ของข้อมูลเนื่องจาก CYP450 2C9 ชนิด *2 และ *3 เพิ่มความเสี่ยงของการเกิดระดับ INR ที่สูงเกินระดับที่ต้องการตั้งแต่ระดับ INR มากกว่า 4-8 (ระดับความเสี่ยงเพิ่มขึ้นในผู้ป่วยที่เริ่มใช้ยา อย่างไรก็ตามการศึกษานี้ส่วนใหญ่เป็นผู้ป่วยที่ได้รับยารักษาโรคพาร์กินสันมาแล้วเป็น 1.5-3.75 เท่า)

ผลของ VKORC1 -1639 single nucleotide polymorphism

มีผลต่อเภสัชพลศาสตร์ของยาออร์ฟารินโดยไปยับยั้งเอ็นไซม์ vitamin K oxide reductase จากการศึกษapolymorphism ของยีนส์นี้พบว่ามักเกิดการถ่ายทอดไปพร้อมกันได้หลายชนิด (linkage disequilibrium) การเปลี่ยนแปลงของยีนส์ที่เกิดขึ้นแล้วทำให้ใช้ปริมาณยาออร์ฟารินในขนาดที่ต่ำได้แก่การเปลี่ยนแปลงในระดับ 3' non coding promoter region ตำแหน่ง 3673 (-1639 G>A) โดยพบว่าชนิด G สามารถทำให้เพิ่มการสังเคราะห์เอ็นไซม์ VKOR ได้ 40% เมื่อเทียบกับชนิด A ดังนั้นผู้ป่วยที่มี VKORC1 -1639 ชนิด G ต้องใช้ปริมาณยาออร์ฟารินขนาดสูงกว่าผู้ป่วยที่มี VKORC1 -1639 ชนิด A

การเกิด linkage disequilibrium ของยีนส์ VKORC1 ที่พบร่วมกับตำแหน่ง -1639 ได้มาก ได้แก่ตำแหน่ง 1173 C>T (rs9934438) นอกจากนี้ยังพบร่วมกับ 2255C>T, 1542 G>C, 3730 G>A โดยมีการศึกษายืนยันในประชากร European-American กล่าวคือตรวจพบว่าการเกิด polymorphism VKORC1 1173 ชนิด CT หรือ TT เกิดร่วมกับ polymorphism VKORC1 -1639 ชนิด GA หรือ AA ส่วนในภูมิภาคเอเชียมีการศึกษาของ Kyoko Obayashi และคณะตรวจ linkage disequilibrium ของยีนส์ VKORC1 ดังแสดงในตาราง [21]

VKORC1 -1639 G>A	VKORC1 1173 C>T	VKORC1 1542 G>C	Percent
GG	CC	GG	0.8%
GA	CT	GC	15.5%
AA	TT	CC	83.7%

จากการศึกษาพบว่าในประชากรญี่ปุ่นพบยีนส์ VKORC1 -1639 ชนิด AA มากที่สุดและจะเกิดร่วมกับชนิด TT ในยีนส์ตำแหน่ง 1173 และร่วมกับชนิด CC ในยีนส์ตำแหน่ง 1542 เป็นต้นสามารถจำแนกเป็นกลุ่ม haplotype A (กลุ่มที่มีความไวต่อออร์ฟารินสูงได้แก่ allele A, T, C) และกลุ่ม haplotype non A (กลุ่มที่ดื้อต่อออร์ฟารินได้แก่ allele G, C) จากความสัมพันธ์ดังกล่าวหากเราตรวจหาความชุกของ polymorphism ยีนส์ใดที่ตำแหน่งหนึ่งก็จะสามารถทราบความชุกของอีกตำแหน่งหนึ่งได้

มีการศึกษาของสุมลมาลย์ คล้าชื่นและคณะในประเทศไทยทราบความชุกของยีนส์ VKORC1 -1639 ในกลุ่มผู้ป่วยที่ต้องรับประทานออร์ฟารินและกลุ่มประชากรปกติที่มาบริจาคโลหิตสามาถนำข้อมูลความชุกของยีนส์ VKORC1 -1639 มาใช้เป็นข้อมูลการคำนวณขนาด sample ในการศึกษาครั้งนี้ได้โดยต้องการทราบว่าความชุกของชนิด AA ในกลุ่มผู้ป่วยที่เกิดออร์ฟารินเกินขนาดจะมากกว่าความชุกของประชากรปกติหรือไม่ จากผลการศึกษาพบว่าความชุกของ VKORC1 -1639 polymorphism

AA, AG และ GG เท่ากับ 59.1%, 36.4% and 4.5 % ในกลุ่มผู้ป่วยที่มีระดับ INR มากกว่า 4 โดยพบว่าความชุกไม่แตกต่างจากการศึกษาของสุมลมมาลย์ คัลล่าซึนและคณะที่ตรวจพบความชุก VKORC1 -1639 polymorphism AA, AG และ GG เท่ากับ 61.1% / 33.6% / 5.3% ตามลำดับในประเทศไทยปกติและเท่ากับ 63.2% / 31.1% / 5.7% ตามลำดับในผู้ป่วยไทยที่รับประทานวอร์ฟารินอยู่แล้ว

จากข้อมูลพบว่าประชากรไทยมีพันธุกรรมของ VKORC1 -1639 ชนิด genotype AA ที่มีความไวต่อวอร์ฟารินสูง(ใช้ปริมาณวอร์ฟารินขนาดต่ำในการรักษาระดับ INR ที่เหมาะสม) มากที่สุด และชนิดที่ดื้อต่อวอร์ฟาริน genotype GG (ต้องใช้ปริมาณวอร์ฟารินขนาดสูง) พบน้อยที่สุดแสดงว่าประชากรไทยมีลักษณะทางพันธุกรรมที่ทำให้ต้องการวอร์ฟารินในขนาดน้อยกว่าชาวตะวันตก

อย่างไรก็ตามจากผลการศึกษาพบว่า VKORC1 -1639 polymorphism ไม่สามารถคาดคะเนการเกิดระดับ INR ที่สูงหลังทานยาเป็นระยะเวลาานแล้วได้ เพราะความชุกพบได้พอกันระหว่างกลุ่มประชากรปกติ ผู้ป่วยที่รับประทานวอร์ฟาริน และผู้ป่วยที่มีระดับ INR มากกว่า 4 ซึ่งต่างจากการศึกษาของ Schwarz Ute I และคณะที่ทำการศึกษาผลของ VKORC1 ชนิด sensitive allele และ CYP450 2C9 ในประชากรผิวขาว (89.2%) และ ประชากรผิวดำ (9.8%) 297 คน ผลการศึกษาพบว่า การเกิด VKORC1 haplotype A (กลุ่มที่ไวต่อวอร์ฟาริน) ทำให้สามารถปรับระดับ INR ให้อยู่ในระดับที่ต้องการภายในเวลา 7 วันเมื่อเทียบกับกลุ่ม haplotype non A (กลุ่มที่ดื้อต่อวอร์ฟาริน) ที่ต้องใช้เวลาในการปรับ INR 15 วัน และยังสามารถคาดคะเนการเกิดระดับ INR ที่สูงเกินระดับปกติได้โดยในกลุ่ม haplotype A เกิดระดับ INR สูงกว่า 4 เมื่อรับประทานยาแล้ว 17 วัน กลุ่ม haplotype nonA จะเกิดระดับ INR สูงกว่า 4 เมื่อรับประทานยาแล้ว 23 วันแต่การศึกษานี้เป็นการศึกษาผู้ป่วยที่เพิ่งเริ่มยาทำให้แพทย์ผู้รักษาอาจจะไม่ทราบผู้ป่วยต้องการวอร์ฟารินขนาดเท่าไร

ในปัจจุบัน VKORC1 polymorphism มีอีกหลายชนิด การศึกษานี้ตรวจเฉพาะผลของ -1639 promoter region พบว่าไม่สามารถนำมาสรุปผลของ polymorphism ต่อการคาดคะเนการเกิดวอร์ฟารินเกินขนาดได้ ตำแหน่ง polymorphism อื่นๆที่ควรทำการศึกษาร่วมด้วยเช่น ตำแหน่ง 1173 C>T ซึ่งมีการค้นพบในประเทศญี่ปุ่นและจัดเป็น polymorphism ที่มีความสำคัญต่อการปรับขนาดวอร์ฟาริน มีการศึกษาผลของยีนส์ VKORC1 1173 กับการคาดคะเนการเกิดวอร์ฟารินเกินขนาดในประชากร European-Americans และ African-Americans พบว่าความเสี่ยงในการเกิดระดับ INR มากกว่า 4 ในกลุ่มที่ไวต่อวอร์ฟารินจะเพิ่มเป็น 11.4 เท่า อย่างไรก็ตามตำแหน่งนี้มักเกิด linkage disequilibrium กับ VKORC1 -1639 ได้จึงอาจให้ผลแบบเดียวกับการศึกษานี้เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ดื้อต่อวอร์ฟาริน และในอนาคตอาจมีการค้นพบ polymorphism ชนิดอื่นๆด้วย

ในการศึกษานี้พบว่าผลของ VKORC1 -1639 ต่อปริมาณวอร์ฟารินที่รับประทานต่อสัปดาห์ เพื่อให้ได้ระดับ INR 2-3 โดยดูจากเวชระเบียนประวัติการใช้ยามาก่อนจำนวน 44 ราย

- Genotype AA 17.9 มิลลิกรัมต่อสัปดาห์
- Genotype AG 25 มิลลิกรัมต่อสัปดาห์
- Genotype GG 28 มิลลิกรัมต่อสัปดาห์

เปรียบเทียบกับการศึกษาของสุมลมาลย์ คล้ำซิ่น และคณะแสดงปริมาณวอร์ฟารินที่ต้องรับประทานต่อสัปดาห์เพื่อให้ได้ระดับ INR 2-3

- Genotype AA 24 มิลลิกรัมต่อสัปดาห์
- Genotype AG 37.6 มิลลิกรัมต่อสัปดาห์
- Genotype GG 39.5 มิลลิกรัมต่อสัปดาห์

พบว่าปริมาณวอร์ฟารินที่ต้องรับประทานต่อสัปดาห์น้อยกว่าการศึกษาของสุมลมาลย์ คล้ำซิ่น และคณะรวมถึงการศึกษาของชาติอื่นๆ ผู้วิจัยจึงตั้งสมมติฐานอาจเนื่องมาจากกลุ่มผู้ป่วยที่ร่วมทำการศึกษามีปัจจัยทางคลินิกอื่นๆ ได้แก่อายุเฉลี่ยค่อนข้างมาก น้ำหนักตัวน้อย หน้าตับหรือไตไม่ดี เป็นต้นทำให้ต้องการขนาดที่น้อยกว่าขนาดเฉลี่ยของ genotype เดียวกัน ส่วนผลกระทบจากยาอื่นๆ ที่ต้องร่วมรับประทานมีผลกระทบเล็กน้อยเนื่องจากผู้ป่วยประมาณ 84 % รับประทานยากุ่มที่ไม่เสริมฤทธิ์ของวอร์ฟารินนอกจากนี้อาจมีปัจจัยทางพันธุศาสตร์อื่นๆ เช่น CYP450 2C9 ชนิด *2 และ *3 ที่การศึกษานี้ไม่ได้ตรวจ

การศึกษากลุ่มย่อยเพื่อตอบคำถามการวิจัยเรื่องผลการตอบสนองหลังจากรับประทานวิตามินเคในผู้ป่วยวอร์ฟารินเกินขนาดโดยแบ่งตามชนิดของ VKORC1 -1639 เริ่มจากคัดเลือกผู้ป่วย 31 รายจากจำนวน 44 ราย ที่สามารถมาตรวจตามนัดเพื่อเจาะเลือดและไม่มีอุปสรรคต่อการเดินทาง และการดำเนินชีวิต ให้รับประทานวิตามินเคขนาด 1 มิลลิกรัม แล้ววัดการตอบสนองการลดระดับของค่า INR ที่ 24 และ 48 ชั่วโมง พบผู้ป่วยกลุ่มนี้มีความชุกของ VKORC1 -1639 SNP ไม่ต่างจากผู้ป่วยทั้งหมด 44 รายโดยพบ genotype AA, AG and GG เท่ากับ 58.1%, 38.7 % และ 3.2 % ตามลำดับ

ค่าเฉลี่ยของระดับ INR เริ่มต้นในแต่ละ genotype ใกล้เคียงกันในกลุ่ม AA เท่ากับ 6.99 ± 3.4 กลุ่ม non AA เท่ากับ 6.64 ± 2.5 ในช่วงก่อนที่จะรับประทานวิตามินเค หลังจากนั้นที่ระยะเวลา 24 และ 48 ชั่วโมงระดับ INR จะลดลงในระดับที่เท่าๆกันทั้ง 2 กลุ่มโดยถ้าคำนวณทางสถิติเพื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของระดับ INR ที่ลดลงด้วย Mann whitney U test แล้วพบว่าไม่มีความแตกต่างเช่นเดียวกัน แต่เนื่องจากตัวอย่างประชากรที่เข้าร่วมการทดลองมีจำนวนน้อย อาจทำให้ค่า power ของการคำนวณทางสถิติไม่มากพอในการสรุปผล

อย่างไรก็ตามจากการทบทวนวรรณกรรมพบว่ายังไม่มีการศึกษาถึงความสัมพันธ์ของ VKORC1 SNP กับผลการตอบสนองต่อยาวิตามินเคในผู้ป่วยวอร์ฟารินเกินขนาด เนื่องจากวิตามินเคที่ให้ผู้ป่วยสามารถนำไปใช้ได้เลย (active form) ไม่ต้องผ่านกระบวนการทำงานที่ต้องอาศัย vitamin K epoxide reductase แต่ยังคงอาศัย vitamin K quinone reductase อยู่ดังนั้นผลของ VKORC1 อาจไม่แสดงความแตกต่างในแต่ละ genotype หลังจากได้วิตามินเค ข้อมูลจากการศึกษานี้สามารถนำไปเป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการวิจัยต่อไปในอนาคต ข้อมูลของเราช่วยพยากรณ์การลดลงของ INR หลังรับประทานวิตามินเคในคนไทยได้ และพบว่าการใช้วิตามินเคในรูปแบบฉีดมารับประทานได้ผลดีและรวดเร็วในการลด INR ลงมาในช่วงที่ปลอดภัย ทำให้ไม่ต้องเสี่ยงต่อการเกิด anaphylactoid ที่เกิดจากการได้วิตามินเครูปแบบฉีด

ข้อเสนอแนะ

1. การศึกษาในอนาคตควรเพิ่มจำนวนผู้เข้าร่วมการวิจัยเพื่อให้มีค่า power ทางสถิติที่เพียงพอต่อการสรุปผล เนื่องจากถ้าผลของยีนมีผลต่อการแก้ไขระดับ INR ด้วยวิตามินเคแล้วจะทำให้สามารถกำหนดการใช้วิตามินเคได้อย่างเหมาะสม ไม่ใช่ปริมาณที่มากเกินไปแล้วทำให้ระดับ INR ลดลงมากกว่าปกติ (over correction) ซึ่งเป็นอันตรายต่อผู้ป่วยโดยเฉพาะผู้ป่วยที่ผ่าตัดเปลี่ยนลิ้นหัวใจ
2. พิจารณาศึกษายีนอื่น ๆ เพิ่มเติม เช่น CYP450 2C9 จากการทบทวนวรรณกรรมแล้วพบว่าในประชากรชาวเอเชียมี CYP2C9*3 ซึ่งมีผลต่อระดับวอร์ฟารินมากทำให้ใช้ปริมาณวอร์ฟารินลดลง (warfarin sensitive) ส่วน CYP2C9*2 นั้นพบได้น้อยกว่ามากแต่ก็มีความสำคัญเช่นเดียวกัน
3. ศึกษาผลของ pharmacogenomic กับภาวะดื้อวอร์ฟาริน (warfarin resistance) ในกลุ่มผู้ป่วยที่รับประทานวอร์ฟารินขนาดสูงแล้วยังไม่ได้ระดับ INR ที่เหมาะสม

รายการอ้างอิง

- [1] Carlquist JF, Horne BD, Muhlestein JB, Lappe DL, Whiting BM, Kolek MJ et al. Genotypes of the cytochrome p450 isoform, CYP2C9, and the vitamin K epoxidoreductase complex subunit 1 conjointly determine stable warfarin dose: a prospective study. *J Thromb Thrombolysis* 2006; 22(3):191-197.
- [2] Gage BF, Lesko LJ. Pharmacogenetics of warfarin: regulatory, scientific, and clinical issues. *J Thromb Thrombolysis* 2007.
- [3] Tham LS, Goh BC, Nafziger A, Guo JY, Wang LZ, Soong R et al. A warfarin-dosing model in Asians that uses single-nucleotide polymorphisms in vitamin K epoxide reductase complex and cytochrome P450 2C9. *Clin Pharmacol Ther* 2006;80(4):346-355.
- [4] Oldenburg J, Bevans CG, Fregin A, Geisen C, Muller-Reible C, Watzka M. Current pharmacogenetic developments in oral anticoagulation therapy: the influence of variant VKORC1 and CYP2C9 alleles. *Thromb Haemost* 2007; 98(3):570-578.
- [5] Bodin L, Verstuyft C, Tregouet DA, Robert A, Dubert L, Funck-Brentano C et al. Cytochrome P450 2C9 (CYP2C9) and vitamin K epoxide reductase (VKORC1) genotypes as determinants of acenocoumarol sensitivity. *Blood* 2005;106(1):135-140.
- [6] Benusiglio PR, Desmeules J, de Moerloose P, Dayer P. [Oral anticoagulation and pharmacogenetics: importance in the clinical setting]. *Rev Med Suisse* 2007; 3(124):2030, 2033-2034, 2036.
- [7] Siguret V. [Impact of pharmacogenetics on interindividual variability in the response to vitamin K antagonist therapy]. *Pathol Biol (Paris)* 2007; 55(6):295-298.

- [8] Miao L, Yang J, Huang C, Shen Z. Contribution of age, body weight, and CYP2C9 and VKORC1 genotype to the anticoagulant response to warfarin: proposal for a new dosing regimen in Chinese patients. **Eur J Clin Pharmacol** (2007); 63(12):1135-1141.
- [9] Sconce EA, Khan TI, Wynne HA, Avery P, Monkhouse L, King BP et al. The impact of CYP2C9 and VKORC1 genetic polymorphism and patient characteristics upon warfarin dose requirements: proposal for a new dosing regimen. **Blood** (2005);106(7):2329-2333.
- [10] Zhu Y, Shennan M, Reynolds KK, Johnson NA, Herrnberger MR, Valdes R, Jr. et al. Estimation of warfarin maintenance dose based on VKORC1 (-1639 G>A) and CYP2C9 genotypes. **Clin Chem** (2007); 53(7):1199-1205.
- [11] Dezee KJ, Shimeall WT, Douglas KM, Shumway NM, O'malley PG. Treatment of excessive anticoagulation with phytonadione (vitamin K): a meta-analysis. **Arch Intern Med** (2006); 166(4):391-397.
- [12] Whitling AM, Bussey HI, Lyons RM. Comparing different routes and doses of phytonadione for reversing excessive anticoagulation. **Arch Intern Med** (1998);158(19):2136-2140.
- [13] Nita A Limdi, David L Veenstra. Warfarin pharmacogenetics. **Pharmacotherapy**(2008) ;28:1084-1097
- [14] Fan J, Armitstead JA, Adams AG, Davis GA. A retrospective evaluation of vitamin K1 therapy to reverse the anticoagulant effect of warfarin. **Pharmacotherapy** (2003); 23(10):1245-1250.
- [15] Hanslik T, Prinseau J. The use of vitamin K in patients on anticoagulant therapy: a practical guide. **Am J Cardiovasc Drugs** (2004); 4(1):43-55.
- [16] Patel RJ, Witt DM, Saseen JJ, Tillman DJ, Wilkinson DS. Randomized, placebo controlled trial of oral phytonadione for excessive anticoagulation. **Pharmacotherapy** (2000); 20(10):1159-1166.
- [17] Gage BF, Fihn SD, White RH. Management and dosing of warfarin therapy. **Am J Med** (2000); 109(6):481-488.


- [18] Watson HG, Baglin T, Laidlaw SL, Makris M, Preston FE. A comparison of the efficacy and rate of response to oral and intravenous Vitamin K in reversal of over-anticoagulation with warfarin. **Br J Haematol** (2001); 115(1):145-149.
- [19] London SJ, Daly AK, Leathart JB, Navidi WC, Idle JR. Lung cancer risk in relation to CYP2C9*1/CYP2C9*2 genetic polymorphism among African-Americans and Caucasians in Los Angeles County, California. **Pharmacogenetics** (1996) 6:527-533.
- [20] Scordo M, Aklillu E, Yasar U, Dahl M, Spina E, Ingelman Sunberg M. Genetic polymorphism of cytochrome P450 2C9 in Caucasian and Black African population. **Br J Clin Pharmacol** (2001); 52:447-450.
- [21] Kyoko Obayashi, Katsunori Nakamura, Junichi Kawana, Hiroyasu Ogata, Kazuhiko Hanada, Masahiko Kurabayashi, et al. VKORC1 gene variations are the major contributors of variation in warfarin dose in Japanese patients. **Pharmacogenetics and Genomics** (2006);80(2):169-78.
- [22] Kent J. DeZee, MD, William T. Shimeall, Kevin M. Douglas, Nathan M. Shumway, Patrick G. O'Malley. Treatment of excessive anticoagulation with phytonadione (vitamin K). **Arch Intern Med** (2006);166:391-97.
- [23] Jack Ansell, Jack Hirsh, Elaine Hylek, Alan Jacobson, Mark Crowther, and Gualtiero Palareti. Pharmacology and management of the vitamin K antagonists. **CHEST**(2008);133(6):160-87s
- [24] Ute I. Schwarz, Marylyn D. Ritchie, Yuki Bradford, Chun Li, Scott M, Dudek, Amy Frye-Anderson et al. Genetic determinants of response to warfarin during initial anticoagulation. **N ENGL J MED**(2008); 358(10):999-1008.
- [25] Rina Kimura, Kotaro Miyashita, Yoshihiro Kobuko, Yasuhisa Akaiwa, Ryoichi Otsubo, Kazuyuki Nagatsuka. Genotypes of vitamin K epoxide reductase, gamma

glutamyl carboxylase, and CYP450 2C9 as determinants of daily warfarin dose in japan patients. **Thrombosis research**(2007); 120:181-186

- [26] Mark J Rieder, Alexander P Reiner, Brian F Gage, Deborah A Nickerson, Charles S Eby, Howard L Mcleod et al. Effect of VKORC1 haplotypes on transcriptional regulation and warfarin dose. **N ENGJ MED**(2005);352 :2285-90.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

 <p>คณะแพทยศาสตร์จุฬาลงกรณ์</p>	<p>AF05-10/1.0</p> <p>หนังสือแสดงความยินยอมการเข้าร่วมใน</p>
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--------------------------------------------------------------

การวิจัยเรื่อง การศึกษาความสัมพันธ์ของการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของยีนส์วีคอซีวัน ตำแหน่ง – 1639 ในประชากรไทยกับการใช้ ไวตามินเคในการต้านฤทธิ์ยาวอร์ฟาริน

วันที่ให้คำยินยอม วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

ข้าพเจ้า นาย/นาง/นางสาว.....

ได้ อ่านรายละเอียดจากเอกสารข้อมูลสำหรับผู้เข้าร่วมโครงการวิจัยวิจัยที่แนบมาฉบับวันที่

..... และข้าพเจ้ายินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัยโดยสมัครใจ

ข้าพเจ้าได้รับสำเนาใบแสดงความยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัยที่ข้าพเจ้าได้ลงนาม และ วันที่ พร้อมด้วยเอกสารข้อมูลสำหรับผู้เข้าร่วมโครงการวิจัย ทั้งนี้ ก่อนที่จะลงนามในใบยินยอมให้ทำการวิจัยนี้ ข้าพเจ้าได้รับการอธิบายจากผู้วิจัยถึงวัตถุประสงค์ของการวิจัย ระยะเวลาของการทำวิจัย วิธีการวิจัย อันตราย หรืออาการที่อาจเกิดขึ้นจากการวิจัย หรือจากยาที่ใช้รวมทั้งประโยชน์ ที่จะเกิดขึ้นจากการวิจัย และแนวทางรักษาโดยวิธีอื่นอย่างละเอียด ข้าพเจ้ามีเวลาและโอกาสเพียงพอในการซักถามข้อสงสัยจน มีความเข้าใจอย่างดีแล้ว โดยผู้วิจัยได้ตอบคำถามต่าง ๆ ด้วยความเต็มใจไม่ปิดบังซ่อนเร้น จนข้าพเจ้าพอใจ

ข้าพเจ้ารับทราบจากผู้วิจัยว่าหากเกิดอันตรายใด ๆ จากการวิจัยดังกล่าวผู้เข้าร่วมวิจัยจะได้รับ การรักษาพยาบาลโดยไม่เสียค่าใช้จ่าย

ข้าพเจ้ามีสิทธิ ที่จะบอกเลิกเข้าร่วมในโครงการวิจัยเมื่อใดก็ได้ โดยไม่จำเป็นต้องแจ้งเหตุผล และการบอกเลิกการเข้าร่วมการวิจัยนี้จะไม่ส่งผลต่อการรักษาโรคหรือสิทธิอื่น ๆ ที่ข้าพเจ้าจะพึงได้รับต่อไป

ผู้วิจัยรับรองว่าจะเก็บข้อมูลส่วนตัวของข้าพเจ้าเป็นความลับ และจะเปิดเผยได้เฉพาะเมื่อได้รับการยินยอมจากข้าพเจ้าเท่านั้น บุคคลอื่นในนามของบริษัทผู้สนับสนุนการวิจัย คณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยหรือผู้ได้รับอำนาจมอบหมายให้เข้ามาตรวจและประมวลข้อมูลของผู้เข้าร่วมวิจัย ทั้งนี้จะต้องกระทำไปเพื่อวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของข้อมูลเท่านั้น โดยการตกลงที่จะเข้าร่วมการศึกษานี้ข้าพเจ้าได้ให้คำยินยอมที่จะให้มีการตรวจสอบข้อมูลประวัติทางการแพทย์ของผู้เข้าร่วมวิจัยได้

ผู้วิจัยรับรองว่าจะไม่มีการเก็บข้อมูลใด ๆ ของผู้เข้าร่วมวิจัย เพิ่มเติม หลังจากที่ข้าพเจ้าขอยกเลิกการเข้าร่วมโครงการวิจัยและต้องการให้ทำลายเอกสารและ/หรือ ตัวอย่างที่ใช้ตรวจสอบทั้งหมดที่สามารถสืบค้นถึงตัวข้าพเจ้าได้

ข้าพเจ้าเข้าใจว่า ข้าพเจ้ามี สิทธิที่ จะตรวจสอบหรือแก้ไขข้อมูลส่วนตัวของข้าพเจ้าและสามารถเลิกการให้สิทธิในการใช้ข้อมูลส่วนตัวของข้าพเจ้าได้ โดยต้องแจ้งให้ผู้วิจัยรับทราบข้าพเจ้าได้ ระบุว่า ข้อมูลในการวิจัยรวมถึงข้อมูลทางการแพทย์ ที่ไม่มีการเปิดเผยที่ จะผ่านกระบวนการต่าง ๆ เช่น การเก็บข้อมูล การบันทึกข้อมูลในคอมพิวเตอร์ การตรวจสอบ การวิเคราะห์ และการรายงาน เพื่อวัตถุประสงค์ทางวิทยาศาสตร์ รวมทั้งการใช้ข้อมูลทางการแพทย์ในอนาคตหรือการวิจัยทางด้านเภสัชภัณฑ์ เท่านั้น

ข้าพเจ้ายินดีลงนามในใบยินยอมนี้เพื่อเข้าร่วมการวิจัยด้วยความเต็มใจ

..... ลงนามผู้ยินยอม
(.....) ชื่อผู้ยินยอมตัวบรรจง
วันที่เดือน.....พ.ศ.....

.....ลงนามผู้ปกครอง
(.....)ชื่อผู้ปกครองตัวบรรจง
วันที่เดือน.....พ.ศ.....

ข้าพเจ้าได้อธิบายถึงวัตถุประสงค์ของการวิจัย วิธีการวิจัย อันตราย หรืออาการที่อาจเกิดขึ้นจากการวิจัยหรือจากยาที่ใช้ รวมทั้งประโยชน์ที่จะเกิดขึ้นจากการวิจัยอย่างละเอียด ให้ผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัยตามนามข้างต้นได้ทราบและมีความเข้าใจดีแล้ว พร้อมลงนามลงในเอกสารแสดงความยินยอมด้วยความเต็มใจ

.....ลงนามผู้ทำวิจัย
(.....) ชื่อผู้ทำวิจัยตัวบรรจง
วันที่เดือน.....พ.ศ.....

.....ลงนามพยาน
(.....) ชื่อพยานตัวบรรจง
วันที่เดือน.....พ.ศ.....

แบบฟอร์มคำอธิบายประกอบหนังสือยินยอม

ใบยินยอมรับการรักษาและเข้าร่วมโครงการวิจัย

ชื่อโครงการ การศึกษาความชุกของการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมยีนวิตโคซีวันตำแหน่ง – 1639 ในประชากรผู้ป่วยผู้ใหญ่ไทยที่รับประทานยาริวอร์ฟารินและมีระดับไอเอ็นอาร์ มากกว่าสี่การตอบสนองต่อวิตามินเคขนาด 1 มิลลิกรัมในการต้านฤทธิ์ริวอร์ฟาริน

คำชี้แจงเกี่ยวกับโครงการศึกษาวิจัย

ยาริวอร์ฟารินเป็นยาที่ใช้บ่อยในเวชปฏิบัติ เช่น ในการรักษาภาวะหลอดเลือดดำอุดตัน การบริหารจัดการยายังเป็นปัญหาที่พบได้บ่อยกล่าวคือพบว่าระดับยาบางครั้งน้อยเกินไปทำให้การรักษาโรคไม่ได้ประสิทธิภาพ บางครั้งระดับยามากเกินไปทำให้เกิดอันตรายจากปัญหาการแข็งตัวของเลือด จากการศึกษาในปัจจุบันพบว่านอกจากปัจจัยภายนอกต่างๆ ที่มีผลกระทบต่อการใช้ยาริวอร์ฟาริน เช่น น้ำหนัก ส่วนสูง โรคประจำตัวอื่นๆ แล้ว ยังมีปัจจัยสำคัญที่มีผลกระทบคือ การเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม ซึ่งมีความหลากหลายในแต่ละเชื้อชาติ ในประเทศไทยยังขาดข้อมูลทางการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมดังกล่าว และยังไม่ทราบถึงการตอบสนองการรักษาโดยใช้ไวตามินเคในการต้านฤทธิ์ จึงเป็นปัญหาที่ควรนำมาศึกษาวิจัย

คำชี้แจงเกี่ยวกับขั้นตอน วิธีการ และผลข้างเคียงของการศึกษา

กลุ่มประชากรศึกษาที่มีระดับ INR > 4 เนื่องมาจากการรับประทานยาริวอร์ฟาริน (INR > 5 ในกลุ่มที่ใส่ลิ้นหัวใจเทียมชนิดโลหะ)

- รับประทานวิตามินเคขนาด 1 มิลลิกรัม
- เจาะเลือดจากเส้นเลือดดำเพื่อวัดระดับ INR ที่เวลา 24 , 48 ชั่วโมงหลังรับประทานวิตามินเค , เจาะเลือดเพื่อเก็บตัวอย่างไปสกัด DNA เพื่อการศึกษาทางพันธุกรรม

ผลข้างเคียงจากการศึกษาที่อาจเกิดได้ :

- ระดับ INR อาจลดลงกว่าระดับที่ต้องการในการรักษาโรค แต่จะมีการตรวจติดตามที่เวลา 24 , 48 ชั่วโมงเพื่อศึกษาผลของการต้านฤทธิ์ และเตรียมพร้อมในการแก้ไข

- อาการคลื่นไส้หลังจากรับประทานวิตามินเค

ประโยชน์ที่ผู้ป่วยจะได้รับ

ผู้ป่วยที่เข้าร่วมโครงการวิจัย ไม่ต้องเสียค่าใช้จ่ายใดๆในการเจาะเลือด และได้รับค่าตอบแทนเมื่อเข้าร่วมโครงการ หลังจากทราบข้อมูลการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมสามารถนำไปปรับใช้ในการบริหารยา วาฟาริน มีการตรวจติดตามอย่างสม่ำเสมอและพร้อมแก้ไขปัญหากที่อาจเกิดขึ้นและไม่ต้องเสียค่าใช้จ่ายใดๆ

คำชี้แจงเกี่ยวกับสิทธิของอาสาสมัคร

การเข้าร่วมการศึกษานี้เป็นไปโดยสมัครใจ โดยผู้ป่วยอาจจะปฏิเสธที่จะเข้าร่วมหรือถอนตัวจากการศึกษาได้ทุกเมื่อ ข้อมูลทั้งหลายที่ได้รับจากการศึกษาจะถูกเก็บเป็นความลับ หากผู้ป่วยมีปัญหาหรือข้อสงสัยประการใด กรุณาติดต่อผู้วิจัย นพ.วิสูตร เดียวิศเรศ หน่วยโรคโลหิต ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โทรศัพท์ 081-4432033 ได้ทุกเมื่อ

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ	นพ. วิสูตร	เดียววิศเรศ	
วันเดือนปีเกิด	23 กรกฎาคม 2520	จังหวัดกรุงเทพมหานคร	
ประวัติการศึกษาและการทำงาน			
	แพทยศาสตรบัณฑิต คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่		2538-2542
	แพทย์เพิ่มพูนทักษะ โรงพยาบาลพุทธชินราช จังหวัดพิษณุโลก		2542-2543
	แพทย์ประจำโรงพยาบาลบางกระพุ่ม จังหวัดพิษณุโลก		2544-2546
	แพทย์ประจำบ้านอายุรศาสตร์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์		2547-2549
	แพทย์ประจำบ้านต่อยอดอายุรศาสตร์โรคเลือด โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์		2550-2551
ปริญญาและประกาศนียบัตร			
	แพทยศาสตรบัณฑิต คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่		2542
	วุฒิบัตรแพทย์ผู้เชี่ยวชาญสาขาอายุรศาสตร์		2549
สมาชิกสมาคมวิชาชีพ			
	สมาชิกแพทยสภา		
	สมาชิกราชวิทยาลัยอายุรแพทย์แห่งประเทศไทย		
	สมาชิกสมาคมโลหิตวิทยาแห่งประเทศไทย		