

การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความผันแปรทางพันธุกรรมในยีน *CYP2C9*, *CYP2C19* และ *ABCB1* ร่วมกับความผันแปรที่ไม่ใช่พันธุกรรมกับขนาดยาและระดับยาเฟนิทอยน์ในเลือดของผู้ป่วยโรคลมชักชาวไทย

นางสาว มาลา อินสระโร

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเภสัชวิทยา ภาควิชาเภสัชวิทยาและสรีรวิทยา

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2553

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ASSOCIATION STUDY OF *CYP2C9*, *CYP2C19* AND *ABCB1* GENETIC VARIANTS AND
NON- GENETIC VARIANTS WITH PHENYTOIN DOSES AND BLOOD LEVELS IN THAI
EPILEPTIC PATIENTS

Miss Mala Insaro

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

Department of Pharmacology and Physiology

Faculty of Pharmaceutical Sciences

Chulalongkorn University

Academic Year 2010

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความผันแปรทางพันธุกรรมในยีน CYP2C9, CYP2C19 และ ABCB1 ร่วมกับความผันแปรที่ไม่ใช่พันธุกรรมกับขนาดยาและระดับยาเฟนิโทอินในเลือดของผู้ป่วยโรคลมชักชาวไทย
โดย	นางสาว มาลา อินสระโ
สาขาวิชา	เภสัชวิทยา
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ เกสัชกรหญิง ดร. มยุรี ตันตติระ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	พันเอก นายแพทย์ ดร. โยธิน ชินวลัญช์

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีคณะเภสัชศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ เกสัชกรหญิง ดร. พิณทิพย์ พงษ์เพชร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ เกสัชกรหญิง พันตำรวจโทหญิง ดร. สมทรง ลาวัญญ์ประเสริฐ)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ เกสัชกรหญิง ดร. มยุรี ตันตติระ)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(พันเอก นายแพทย์ ดร. โยธิน ชินวลัญช์)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เกสัชกรหญิง ดร. สุรีย์ เจียรณมงคล)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เกสัชกร ดร. เจริญ ตริศศักดิ์)

มาลา อินสระ : การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความผันแปรทางพันธุกรรมในยีน *CYP2C9*, *CYP2C19* และ *ABCB1* ร่วมกับความผันแปรที่ไม่ใช่พันธุกรรมกับขนาดยาและระดับยาเฟนิทอยน์ในเลือดของผู้ป่วยโรคลมชักชาวไทย. (ASSOCIATION STUDY OF *CYP2C9*, *CYP2C19* AND *ABCB1* GENETIC VARIANTS AND NON- GENETIC VARIANTS WITH PHENYTOIN DOSES AND BLOOD LEVELS IN THAI EPILEPTIC PATIENTS) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : รศ. ภญ. ดร.มยุรี ตันติสิระ, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : พ.อ. นพ. ดร.โยธิน ชินวลัญช์, 95 หน้า.

ยาเฟนิทอยน์เป็นยากันชักที่มีประสิทธิภาพดีและมีราคาถูก แต่เนื่องจากยาเฟนิทอยน์มีช่วงของการรักษาแคบ จึงทำให้มีโอกาสเกิดอาการไม่พึงประสงค์ได้เมื่อระดับยาในเลือดสูงเกินช่วงของการรักษา หรือทำให้การรักษาไม่ได้ผลเมื่อระดับยาในเลือดต่ำกว่าช่วงของการรักษา และขนาดยาที่เหมาะสมในการควบคุมอาการชักในผู้ป่วยแต่ละรายก็มีความแตกต่างกัน ดังนั้นการศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความผันแปรทางพันธุกรรมในยีน *CYP2C9*, *CYP2C19* และ *ABCB1* ร่วมกับปัจจัยที่ไม่ใช่พันธุกรรมกับความผันแปรของขนาดยาที่ใช้และระดับยาเฟนิทอยน์ในเลือดในผู้ป่วยโรคลมชักชาวไทย โดยผู้ป่วยโรคลมชักจำนวน 108 คนได้ถูกคัดเลือกเข้าสู่งานวิจัย โดยการเก็บข้อมูลทางคลินิกและตัวอย่างเลือดเพื่อวัดระดับยาเฟนิทอยน์และตรวจลักษณะจีโนไทป์ของพหุสัณฐาน *CYP2C9*3*, *CYP2C19*2*, *CYP2C19*3* และ *ABCB1 C3435T* จากนั้นวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างขนาดยาที่ใช้และระดับยาเฟนิทอยน์ในเลือดกับปัจจัยทั้งที่เกี่ยวข้องและไม่เกี่ยวข้องกันกับพันธุกรรมโดยใช้สถิติ Stepwise multiple linear regression ผลจากการศึกษาพบว่า ความถี่อัลลีลของ *CYP2C9*3* *CYP2C19*2* *CYP2C19*3* และ *ABCB1 3435T* ในผู้ป่วยโรคลมชักชาวไทยมีค่าเท่ากับ 2.5% 26.7% 0.4% และ 43.8% ตามลำดับ และผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ด้วยสถิติ Stepwise multiple linear regression พบว่าปัจจัยทางพันธุกรรม ได้แก่ การมีจีโนไทป์แบบ *CYP2C19*2*2* และ *ABCB1 TT* ร่วมกับปัจจัยที่ไม่ใช่พันธุกรรม ได้แก่ เพศ และการได้รับยาคาร์บามาซีพีนร่วมด้วย เป็นตัวแปรที่มีนัยสำคัญในการอธิบายความผันแปรของขนาดยาเฟนิทอยน์ที่ใช้ โดยตัวแปรดังกล่าวสามารถอธิบายความผันแปรของขนาดยาเฟนิทอยน์ที่ใช้ได้ร้อยละ 20 ($R^2=0.200$, $p=0.029$) ในส่วนของระดับยาเฟนิทอยน์ในเลือดนั้นพบว่าปัจจัยทางพันธุกรรม ได้แก่ การมีจีโนไทป์ *CYP2C9*1*3* และ heterozygous variant ของยีน *CYP2C19* (*1*2 หรือ *1*3) ร่วมกับปัจจัยที่ไม่ใช่พันธุกรรม ได้แก่ เพศและน้ำหนักตัว เป็นตัวแปรที่มีนัยสำคัญในการอธิบายความผันแปรของระดับยาเฟนิทอยน์ในเลือดต่อขนาดยา โดยตัวแปรดังกล่าวสามารถอธิบายความผันแปรของระดับยาในเลือดต่อขนาดยาได้ร้อยละ 26.1 ($R^2=0.261$, $p=0.027$) ดังนั้นจากการศึกษานี้ได้แสดงให้เห็นว่าความผันแปรทางพันธุกรรมของยีน *CYP2C9* *CYP2C19* และ *ABCB1* ร่วมกับ ปัจจัยที่ไม่ใช่พันธุกรรม ได้แก่ เพศ น้ำหนักตัวของผู้ป่วย และการได้รับยาอื่นร่วมด้วยนั้น มีอิทธิพลต่อความผันแปรของขนาดยาที่ใช้และระดับยาเฟนิทอยน์ในเลือดในผู้ป่วยโรคลมชักชาวไทย ซึ่งผลที่ได้จากการศึกษานี้อาจสามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานเพื่อช่วยให้การรักษาผู้ป่วยโรคลมชักมีประสิทธิภาพมากขึ้นต่อไป

ภาควิชาเภสัชวิทยาและสรีรวิทยาลายมือชื่อ.....
 สาขาวิชาเภสัชวิทยา..... ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....
 ปีการศึกษา 2553..... ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

5176580733 : MAJOR PHARMACOLOGY

KEYWORDS : *CYP2C9* / *CYP2C19* / *ABCB1* / PHENYTOIN DOSES / PHENYTOIN BLOOD LEVELS / NON-GENETIC VARIANT / EPILEPSY

MALA INSARO : ASSOCIATION STUDY OF *CYP2C9*, *CYP2C19* AND *ABCB1* GENETIC VARIANTS AND NON-GENETIC VARIANTS WITH PHENYTOIN DOSES AND BLOOD LEVELS IN THAI EPILEPTIC PATIENTS. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF.MAYUREE H. TANTISIRA, Ph.D., THESIS CO-ADVISOR : COL. YOTIN CHINVARUN M.D., Ph.D., 95 pp.

Phenytoin is an effective and inexpensive first-line antiepileptic drug. Because of its narrow therapeutic window, high phenytoin blood concentrations have been shown to be associated with several adverse drug reactions. Whereas, low blood concentrations might, in part, give rise to an ineffective treatment. In addition, interindividual variation in required dosage was found. Therefore, this study aims to investigate the association of genetic variants in *CYP2C9*, *CYP2C19* and *ABCB1* genes along with non-genetic variants with phenytoin doses and blood levels in Thai patients with epilepsy and to quantify the association by using stepwise multiple linear regression models. One hundred and eight epileptic patients were enrolled in this study. In addition to clinical data, blood samples were collected and measured for phenytoin blood levels and genotyped for four candidate SNPs including, *CYP2C9**3, *CYP2C19**2, *CYP2C19**3 and *ABCB1* C3435T. Multiple linear regression analysis was used to identify the association. The minor allele frequencies of the studied variants in Thai epileptic patients were as follows: *CYP2C9**3=2.5%, *CYP2C19**2=26.7%, *CYP2C19**3=0.4%, and *ABCB1* 3435T=43.8%. All genotype frequencies were consistent with Hardy-Weinberg equilibrium ($p > 0.05$). A multiple linear regression model revealed significant association of phenytoin doses with *CYP2C19* *2/*2 and *ABCB1* TT genotypes, gender and co-medication with carbamazepine. The model explain 20% of the variability in phenytoin doses ($R^2=0.200$, $p=0.029$). Furthermore, a stepwise multiple linear regression model revealed significant association of phenytoin blood levels with *CYP2C9**1/*3 and *CYP2C19**1/*2 or *CYP2C19**1/*3 genotypes, gender and body weight. The model explain 26.1% of the variability in phenytoin blood levels per dose ($R^2=0.261$, $p=0.027$). This study suggests that genetic variants in *CYP2C9*, *CYP2C19* and *ABCB1* and non-genetic variants including gender, body weight and co-medication influence variability in phenytoin doses and blood levels in Thai patients with epilepsy. This finding could be to use to determine the efficacy of phenytoin in the treatment of epileptic patients.

Department : Pharmacology and Physiology Student's Signature

Field of Study : Pharmacology Advisor's Signature

Academic Year : 2010 Co-Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ ผศ. ภูมิ.พรพิมล กิจสนาโยธิน อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่ได้ให้คำปรึกษา คำแนะนำ และให้ความช่วยเหลือในการค้นคว้าและดำเนินการวิจัยเป็นอย่างดีมาโดยตลอด พร้อมทั้งให้โอกาสที่ดีๆในการได้เรียนรู้ และเก็บเกี่ยวประสบการณ์ในการนำเสนอและเข้าร่วมประชุมวิชาการในต่างประเทศ และขอขอบพระคุณ นายแพทย์ ดร.บุญชัย กิจสนาโยธิน ที่ได้ให้ความช่วยเหลือและให้คำแนะนำที่ดีจนกระทั่งการทำวิทยานิพนธ์สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ รศ. ภูมิ. ดร.มยุรี ตันติสิระ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้ให้คำปรึกษา คำแนะนำ และความช่วยเหลือต่างๆ จนกระทั่งการทำวิทยานิพนธ์สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ พ.อ. นพ. ดร.โยธิน ชินวลัญช์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วมที่ได้ให้ความช่วยเหลือในการดำเนินการคัดเลือกกลุ่มตัวอย่างจากแผนกประสาทวิทยา โรงพยาบาลพระมงกุฎเกล้า เข้าสู่งานวิจัย พร้อมทั้งให้คำปรึกษา คำแนะนำต่างๆเป็นอย่างดีจนกระทั่งการดำเนินการวิจัยลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ นพ.ประพันธ์ ยอดนพเกล้า และ พ.ต.อ. นพ.ตามพันธ์ นิลายน ที่ได้ให้ให้ความช่วยเหลือในการดำเนินการคัดเลือกกลุ่มตัวอย่างจากแผนกประสาทวิทยา โรงพยาบาลสุรินทร์ และโรงพยาบาลตำรวจ เข้าสู่งานวิจัย พร้อมทั้งให้คำปรึกษา คำแนะนำต่างๆจนกระทั่งการดำเนินการวิจัยลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่แผนกประสาทวิทยาและเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ โรงพยาบาลพระมงกุฎเกล้า โรงพยาบาลสุรินทร์ และโรงพยาบาลตำรวจทุกท่าน ที่ได้อำนวยความสะดวกเป็นอย่างดีมาโดยตลอดในเวลาที่ได้ดำเนินการเก็บข้อมูลและเก็บตัวอย่างเลือด

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยอาสาสมัครทุกท่านที่ได้สละเวลาและให้ความร่วมมือเป็นอย่างดีในการเก็บข้อมูลและเก็บตัวอย่างเลือดจนกระทั่งงานวิจัยสามารถดำเนินการไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านทั้งในภาคและนอกภาควิชาเภสัชวิทยาและสัตววิทยาที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้มาโดยตลอดในการศึกษาระดับมหาบัณฑิต

และท้ายที่สุด ขอกราบขอบพระคุณบิดามารดาและครอบครัวของผู้วิจัยที่ได้ให้การสนับสนุนด้านการศึกษาและให้ความไว้วางใจในทุกๆการตัดสินใจของผู้วิจัย และขอบคุณเพื่อนๆร่วมห้องวิจัยทุกคน รวมทั้งผู้ที่มีส่วนเกี่ยวข้องในความสำเร็จของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ทุกท่าน และขอขอบคุณผู้ที่เป็นกำลังใจและแรงผลักดันจนทำให้การเรียนระดับมหาบัณฑิตและการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฌ
สารบัญภาพ.....	ฎ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ.....	ฏ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	4
1.3 สมมติฐาน.....	4
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	4
1.5 คำสำคัญ.....	5
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	6
2.1 โรคลมชัก (Epilepsy).....	6
2.2 ยาเฟนิทอยน์ (Phenytoin).....	7
2.3 ปัจจัยที่มีความเกี่ยวข้องกับขนาดยาและระดับยาเฟนิทอยน์ในเลือด.....	10
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	20
3.1 ลักษณะตัวอย่างหรือประชากรที่ทำการศึกษา.....	20
3.2 วิธีการดำเนินการวิจัย.....	22
3.3 การวิเคราะห์ข้อมูล.....	27

บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล.....	29
4.1 ข้อมูลทั่วไปของผู้ป่วย.....	29
4.2 ความถี่ของ SNPs ในยีน <i>CYP2C9</i> <i>CYP2C19</i> และ <i>ABCB1</i>	37
4.3 ความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยที่ไม่ใช่พันธุกรรมกับขนาดยาเฟนิทอยน์ที่ผู้ป่วยได้รับ.....	41
4.4 ความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะทางพันธุกรรมของยีน <i>CYP2C9</i> <i>CYP2C19</i> และ <i>ABCB1</i> กับขนาดยาเฟนิทอยน์ที่ผู้ป่วยได้รับ.....	43
4.5 ความสัมพันธ์ของปัจจัยทางพันธุกรรมร่วมกับปัจจัยที่ไม่ใช่พันธุกรรมกับขนาดยาเฟนิทอยน์.....	45
4.6 ความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยที่ไม่ใช่พันธุกรรมกับระดับยาเฟนิทอยน์ในเลือด.....	47
4.7 ความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะทางพันธุกรรมของยีน <i>CYP2C9</i> <i>CYP2C19</i> และ <i>ABCB1</i> กับระดับยาเฟนิทอยน์ในเลือด.....	51
4.8 ความสัมพันธ์ของปัจจัยทางพันธุกรรมร่วมกับปัจจัยที่ไม่ใช่พันธุกรรมกับระดับยาเฟนิทอยน์ในเลือด.....	56
บทที่ 5 อภิปรายผล สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ.....	59
รายการอ้างอิง.....	68
ภาคผนวก ก เอกสารรับรองจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์.....	82
ภาคผนวก ข สารเคมีและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย.....	86
ภาคผนวก ค ระดับนัยสำคัญทางคลินิกของการเกิดอันตรกิริยาระหว่างยา (Significance).	89
ภาคผนวก ง ผลการทดสอบสมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก (Hardy-Weinberg equilibrium).....	93
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	95

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แสดงความถี่ของการเกิด <i>CYP2C9</i> variant ในประชากรเชื้อชาติต่างๆ.....	11
2	แสดงความถี่ของการเกิด <i>CYP2C19</i> variant ในประชากรเชื้อชาติต่างๆ.....	13
3	แสดงตัวอย่างยาที่สามารถเกิดอันตรกิริยากับยาเฟนิโทอินได้ รวมทั้งกลไกการเกิดอันตรกิริยาและระดับความมีนัยสำคัญทางคลินิก.....	17
4	แสดงส่วนประกอบในปฏิกิริยา PCR การตรวจลักษณะ genotype ของยีน.....	25
5	แสดงปริมาณของแต่ละส่วนประกอบในแต่ละ reaction mixture.....	26
6	แสดงค่าอุณหภูมิและระยะเวลาของแต่ละขั้นตอนในการทำ PCR.....	27
7	แสดงข้อมูลทั่วไปและข้อมูลทางคลินิกของผู้ป่วย.....	30
8	ข้อมูลทั่วไปและข้อมูลทางคลินิกของผู้ป่วยระหว่างเพศชายและเพศหญิง	32
9	แสดงรายการยาอื่นๆที่ผู้ป่วยได้รับร่วมกับยาเฟนิโทอินและระดับนัยสำคัญทางคลินิกของการเกิดอันตรกิริยาระหว่างยา.....	34
10	แสดงรายการโรคร่วมอื่นๆของผู้ป่วย.....	36
11	แสดงความถี่อัลลีลของcandidate SNPs ในยีน <i>CYP2C9</i> <i>CYP2C19</i> และ <i>ABCB1</i>	37
12	แสดงความถี่ของ genotype ของ candidate SNPs ในยีน <i>CYP2C9</i> <i>CYP2C19</i> และ <i>ABCB1</i>	38
13	แสดงการเปรียบเทียบความถี่ของอัลลีล <i>CYP2C9</i> *2 และ <i>CYP2C9</i> *3 ระหว่างประชากรเชื้อชาติต่างๆในเอเชีย.....	39
14	แสดงการเปรียบเทียบความถี่ของอัลลีล <i>CYP2C19</i> *2 และ <i>CYP2C19</i> *3 ระหว่างประชากรเชื้อชาติต่างๆในเอเชีย.....	40
15	แสดงขนาดยาเฟนิโทอินที่ใช้ในผู้ป่วยที่ได้รับยาร่วมกลุ่มต่างๆ	42
16	แสดงขนาดยาเฟนิโทอินที่ผู้ป่วยได้รับในแต่ละกลุ่ม genotype ของยีน <i>CYP2C9</i> <i>CYP2C19</i> และ <i>ABCB1</i>	43
17	แสดงขนาดยาเฟนิโทอินที่ผู้ป่วยได้รับในแต่ละกลุ่ม genotype ของยีน <i>CYP2C9</i> และ <i>CYP2C19</i>	45

ตารางที่		หน้า
18	แสดงโมเดลความสัมพันธ์ระหว่างขนาดยาเฟนิทอยน์ที่ผู้ป่วยได้รับกับตัวแปรต่างๆ.....	46
19	แสดงค่าสัมประสิทธิ์ความถดถอยของตัวแปรต่างๆในโมเดลที่สามารถอธิบายความผันแปรของขนาดยาเฟนิทอยน์ที่ผู้ป่วยได้รับ.....	47
20	แสดงระดับยาเฟนิทอยน์ในเลือดในผู้ป่วยที่ได้รับยาพร้อมกลุ่มต่างๆ	50
21	แสดงระดับยาเฟนิทอยน์ในเลือดในแต่ละกลุ่ม genotype ของยีน <i>CYP2C9</i> <i>CYP2C19</i> และ <i>ABCB1</i>	52
22	แสดงระดับยาเฟนิทอยน์ในเลือดต่อขนาดยาต่อน้ำหนักตัวในแต่ละกลุ่ม genotype ของยีน <i>CYP2C9</i> และ <i>CYP2C19</i>	53
23	แสดงโมเดลความสัมพันธ์ระหว่างลอการิทึมของระดับยาในเลือดต่อขนาดยากับตัวแปรต่างๆ.....	57
24	แสดงค่าสัมประสิทธิ์ความถดถอยของตัวแปรต่างๆในโมเดลที่สามารถอธิบายความผันแปรของลอการิทึมของระดับยาในเลือด.....	58
25	แสดงระดับนัยสำคัญทางคลินิกของการเกิดอันตรกิริยาระหว่างยา.....	90
26	แสดงความถี่ของ genotype (genotype frequencies) ของ candidate SNPs ในยีน <i>CYP2C9</i> <i>CYP2C19</i> และ <i>ABCB1</i> และการทดสอบสมมติฐานฮาร์ดี-ไวน์เบิร์กด้วย Chi-square test.....	94

สารบัญญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	สูตรโครงสร้างของเฟนิโทอิน.....	7
2	แสดงกลไกการออกฤทธิ์ของยาเฟนิโทอินและยากันชักอื่นๆ ที่ออกฤทธิ์โดยการจับกับ Na ⁺ channel.....	8
3	แสดงกระบวนการเมแทบอลิซึมของยาเฟนิโทอิน.....	9
4	แสดงตำแหน่งของยีน CYP2C9 และ CYP2C19 บนโครโมโซมคู่ที่ 10 และแสดง polymorphisms ที่สำคัญที่ส่งผลต่อการทำงานของเอนไซม์.....	10
5	แผนภาพแสดงขั้นตอนการดำเนินงานในการทำวิจัย.....	22
6	Scatter plot แสดงความสัมพันธ์ระหว่างขนาดยาเฟนิโทอินที่ได้รับและอายุของผู้ป่วย.....	41
7	Boxplot แสดงการกระจายขนาดยาเฟนิโทอินที่ผู้ป่วยได้รับระหว่างเพศชายและเพศหญิง.....	42
8	Scatter plot แสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับยาเฟนิโทอินในเลือดและขนาดยาที่ได้รับ.....	48
9	Scatter plot แสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับยาเฟนิโทอินในเลือดและน้ำหนักตัว.....	48
10	Scatter plot แสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับยาเฟนิโทอินในเลือดต่อขนาดยาต่อน้ำหนักตัวและอายุของผู้ป่วย.....	49
11	Boxplot แสดงการกระจายของระดับยาเฟนิโทอินในเลือดต่อขนาดยาต่อน้ำหนักตัวระหว่างเพศชายและเพศหญิง.....	49
12	Boxplot แสดงการกระจายของระดับยาเฟนิโทอินในเลือดต่อขนาดยาต่อน้ำหนักตัวในแต่ละกลุ่ม genotype ของ SNPs ในยีน CYP2C9.....	54
13	Boxplot แสดงการกระจายของระดับยาเฟนิโทอินในเลือดต่อขนาดยาต่อน้ำหนักตัวในแต่ละกลุ่ม genotype ของ SNPs ในยีน CYP2C19.....	54
14	Boxplot แสดงการกระจายของระดับยาเฟนิโทอินในเลือดต่อขนาดยาต่อน้ำหนักตัวในแต่ละกลุ่ม genotype ของ SNPs ในยีน CYP2C9 และ CYP2C19.....	55

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

มคก./มล.	ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
CYP2C9	Cytochrome P450 2C9
CYP2C19	Cytochrome P450 2C19
ABCB1	ATP-binding cassette subfamily B member 1
SNPs	Single-nucleotide polymorphisms
MDR-1	multidrug-resistance-1
มก.	มิลลิกรัม
กก.	กิโลกรัม
มก./กก./วัน	มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมต่อวัน
นก./มคค.	นาโนกรัมต่อไมโครลิตร
mean ± SD.	ค่าเฉลี่ยบวกลบส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน
มคก./มล./มก./กก.	ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรต่อมิลลิกรัมต่อกิโลกรัม
มก./วัน	มิลลิกรัมต่อวัน
χ^2	ไคสแควร์
d.f.	Degree of freedom

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา

โรคลมชัก (Epilepsy) เป็นโรคทางระบบประสาทที่พบได้บ่อยมาก โดยองค์การอนามัยโลกได้ประมาณการว่าทั่วโลกมีผู้ป่วยโรคลมชักประมาณ 50 ล้านคน (World Health Organization, 2011) ในประเทศไทยพบความชุกของโรคลมชักในอัตรา 5.9-7.2 ต่อประชากร 1,000 คน (Asawavichienjinda et al., 2002; สมาคมโรคลมชักแห่งประเทศไทย และ สถาบันประสาทวิทยา กรมการแพทย์, 2552) เนื่องจากการเกิดอาการชักในโรคลมชักนั้นส่งผลเสียทั้งต่อสมองและต่อร่างกาย รวมถึงยังทำให้ผู้ป่วยเกิดความพิการทางด้านจิตใจและสังคม ดังนั้นผู้ป่วยที่เป็นโรคนี้อาจควรได้รับการดูแลและรักษาเป็นอย่างดี

ปัจจุบันวิธีการหลักในการรักษาโรคลมชักคือการรักษาโดยใช้ยากันชัก แต่พบว่าผู้ป่วยจะมีการตอบสนองต่อยาแตกต่างกันมาก โดยผู้ป่วยประมาณร้อยละ 70 สามารถควบคุมอาการชักได้ด้วยยากันชัก แต่มีความต้องการขนาดยาที่แตกต่างกัน ส่วนผู้ป่วยอีกประมาณร้อยละ 30 ไม่สามารถควบคุมอาการชักได้ ทั้งๆที่ได้รับยาที่ถูกต้องและเหมาะสมแล้ว (Brodie, 2005) นอกจากนี้ยังมีผู้ป่วยอีกส่วนหนึ่งที่เกิดอาการไม่เพียงประสงค์จากการใช้ยากันชัก ดังนั้นจะเห็นได้ว่าการรักษาโรคลมชักในผู้ป่วยแต่ละรายนั้นมีลักษณะที่ไม่สามารถทำนายได้ถึงประสิทธิภาพของการรักษาและการเกิดอาการไม่เพียงประสงค์จากการใช้ยา รวมถึงขนาดยาที่เหมาะสมในผู้ป่วยแต่ละราย

มีปัจจัยหลายอย่างที่ทำให้ผู้ป่วยแต่ละรายมีการตอบสนองต่อการรักษาด้วยยาที่แตกต่างกัน โดยสามารถแบ่งออกได้เป็นปัจจัยที่ไม่เกี่ยวข้องกับลักษณะทางพันธุกรรม (non-genetic factors) ซึ่งได้แก่ เพศ อายุ น้ำหนักตัว การเกิดอันตรกิริยาจากยาอื่นๆ ที่ใช้ร่วมกัน (drug interaction) เป็นต้น และปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับลักษณะทางพันธุกรรม (genetic factors) ที่ส่งผลต่อกระบวนการทางเภสัชจลนศาสตร์ และเภสัชพลศาสตร์ของยาในร่างกาย ตั้งแต่กระบวนการดูดซึมยา (absorption) การกระจายยา (distribution) การเมแทบอลิซึม (metabolism) การออกฤทธิ์ที่ตำแหน่งเป้าหมายของยา (target) ตลอดจนการกำจัดยาออกจากร่างกาย (elimination) (Balant et al., 1989)

ยาเฟนิทอยน์ (Phenytoin; PHT) เป็นยากันชักที่ใช้มานานตั้งแต่ค้นพบในปี พ.ศ. 2481 และในปัจจุบันยังคงมีการใช้กันอย่างกว้างขวาง เนื่องจากเป็นยากันชักที่มีประสิทธิภาพดีและมีราคาถูกลง (Delorenzo and Sun, 2002) แต่ยาเฟนิทอยน์มีคุณสมบัติทางเภสัชจลนศาสตร์ที่ค่อนข้างซับซ้อน กล่าวคือ การกำจัดยาไม่พหุติกรรมไม่เป็นเส้นตรง (nonlinear pharmacokinetic) นั่นคือ มีการกำจัดยาแบบ Michaelis-Menten kinetic ซึ่งมีสถานะอิ่มตัวในการแปรสภาพยา (saturable metabolism) ทำให้การกำจัดยาในขนาดสูงไม่แปรผันตามความเข้มข้นของระดับยาในเลือด (Gidal and Garnet, 2005) นอกจากนี้ยาเฟนิทอยน์ยังมี therapeutic range แคบ โดยระดับความเข้มข้นของยาเฟนิทอยน์ที่ให้ผลในการรักษาอยู่ในช่วง 10-20 มก./มล. (Kastrup, 2008) เนื่องจากคุณสมบัติดังกล่าวของยาเฟนิทอยน์ทำให้การควบคุมและรักษาโรคลมชักโดยใช้ยาเฟนิทอยน์นั้นทำได้ค่อนข้างยาก และใช้เวลานานกว่าจะได้ขนาดยาที่เหมาะสมที่สามารถควบคุมอาการชักได้โดยไม่เกิดอาการไม่พึงประสงค์จากยา และขนาดยาที่เหมาะสมในผู้ป่วยแต่ละรายค่อนข้างแตกต่างกันมาก (Tate et al., 2005)

กระบวนการเมแทบอลิซึมและกระบวนการดูดซึมยานั้นเป็นกระบวนการสำคัญที่มีผลต่อระดับความเข้มข้นของยาในเลือด มีหลายปัจจัยที่มีผลต่อกระบวนการดังกล่าว ทั้งปัจจัยด้านพันธุกรรมและปัจจัยที่ไม่ใช่พันธุกรรม ดังนั้นการเกิดความผันแปรของลักษณะทางพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการทั้งสองจึงสามารถส่งผลกระทบต่อระดับความเข้มข้นของยาในเลือดได้

ยาเฟนิทอยน์ถูกเปลี่ยนแปลงในร่างกายได้โดยเอนไซม์ CYP2C9 เป็นหลัก (ประมาณ 90%) และอีกส่วนหนึ่งสามารถถูกเปลี่ยนแปลงได้โดยเอนไซม์ CYP2C19 (ประมาณ 10%) (Bajpai et al., 1996) ทั้ง CYP2C9 และ CYP2C19 เป็นเอนไซม์ที่มีรายงานการเกิดความผิดแผกทางพันธุกรรมของยีน (genetic polymorphism) ซึ่งส่งผลให้ได้เอนไซม์ที่มีประสิทธิภาพในการเปลี่ยนแปลงยาแตกต่างกันออกไป โดย CYP2C9*2 และ CYP2C9*3 ทำให้ได้เอนไซม์ที่มีประสิทธิภาพในการเปลี่ยนแปลงยาลดลง 29% และ 93-95% ตามลำดับ (Rettie et al., 1999; Takanashi et al., 2000) ส่วน CYP2C19*2 และ CYP2C19*3 ทำให้ได้เอนไซม์ที่ไม่มีประสิทธิภาพในการเปลี่ยนแปลงยา (inactive enzyme) (De Morais et al., 1994a; De Morais et al., 1994b) นอกจากนี้ยาเฟนิทอยน์ยังเป็น substrate ตัวหนึ่งของตัวขนส่งยา P-glycoprotein (P-gp) ซึ่งพบมีการแสดงออกอยู่บริเวณทางเดินอาหาร และมีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการดูดซึมยา โดยทำหน้าที่ขยับยาออกสู่ทางเดินอาหารส่งผลให้ยาถูกดูดซึมได้ลดลง (Fromm, 2004) ตัวขนส่งยา P-gp เป็นโปรตีนที่ถูกควบคุมโดยยีน ATP-binding cassette subfamily B member 1

(*ABCB1*) หรือ multidrug-resistance-1 (*MDR-1*) ซึ่งพบมีรายงานการเกิด polymorphisms มากกว่า 50 SNPs (single nucleotide polymorphisms) (www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/GeneGt.cgi?geneID=5243) โดยพบว่า *ABCB1* C3435T เป็น SNPs ที่สำคัญที่มีรายงานว่ามีความสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกและการทำหน้าที่ของ P-gp ในลำไส้ของมนุษย์ (Hoffmeyer et al., 2000)

นอกจากนี้ การได้รับยาอื่น ๆ ร่วมกับยาคอคูไปกับยาเฟนิทอยน์นั้นพบได้บ่อยมากในผู้ป่วยโรคลมชัก และเนื่องจากกระบวนการเมแทบอลิซึมของยาเฟนิทอยน์นั้นเกิดผ่านระบบเอนไซม์ CYP450 ดังนั้นการได้รับยาที่มีการเมแทบอลิซึมผ่านระบบเอนไซม์เดียวกันกับยาเฟนิทอยน์จึงมีโอกาสทำให้เกิดอันตรกิริยาต่อกันได้ รวมทั้งคุณสมบัติของยาเฟนิทอยน์ที่จับกับโปรตีนในพลาสมาได้สูงมากคือ ประมาณร้อยละ 90 (Gidal and Garnet, 2005) จึงเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ทำให้ยาเฟนิทอยน์สามารถเกิดอันตรกิริยากับยาอื่น ๆ ได้ง่าย แล้วส่งผลต่อระดับยาเฟนิทอยน์ในเลือดได้ เพราะฉะนั้นขนาดยาเฟนิทอยน์ที่เท่ากัน เมื่อให้ในผู้ป่วยแต่ละรายที่มีลักษณะทางพันธุกรรมของเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เปลี่ยนแปลงยา และลักษณะทางพันธุกรรมของตัวขนส่งยาที่แตกต่างกัน รวมทั้งการได้รับยาอื่นที่เกิดอันตรกิริยาต่อกันควบคู่กันไป จึงอาจส่งผลให้มีระดับยาในเลือดที่แตกต่างกัน แล้วส่งผลให้ประสิทธิภาพในการรักษาแตกต่างกันไปได้ ตั้งแต่ได้ผลดีในการรักษา ไม่ได้ผลในการรักษา หรือเกิดพิษจากยา เป็นต้น

ดังนั้นการปรับขนาดยาเฟนิทอยน์เพื่อให้ได้ขนาดยาที่เหมาะสมที่สามารถควบคุมอาการชักได้โดยไม่เกิดอาการไม่พึงประสงค์ในผู้ป่วยแต่ละรายนั้น จำเป็นต้องพิจารณาทั้งปัจจัยทางด้านพันธุกรรม และปัจจัยที่ไม่ใช่พันธุกรรมร่วมด้วย เพื่อที่จะสามารถปรับขนาดยาให้ได้ขนาดที่เหมาะสมอย่างรวดเร็ว ซึ่งจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษา ทำให้คนไข้สามารถควบคุมอาการชักได้เร็วขึ้น การพยากรณ์โรคดีขึ้น และยังช่วยลดโอกาสที่จะเกิดพิษจากยาอันเนื่องมาจากระดับยาในเลือดสูงเกินช่วงของการรักษา ในการศึกษาครั้งนี้ ผู้วิจัยจึงต้องการที่จะศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความผันแปรทางพันธุกรรมของยีน *CYP2C9* *CYP2C19* และ *ABCB1* ร่วมกับอิทธิพลของปัจจัยที่ไม่ใช่พันธุกรรม ซึ่งได้แก่ การเกิดอันตรกิริยาระหว่างยา และรวมถึงลักษณะทั่วไปของผู้ป่วย ต่อขนาดยาที่ใช้และระดับยาเฟนิทอยน์ในเลือดในผู้ป่วยโรคลมชักชาวไทย ซึ่งยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน และหาแบบจำลองเพื่ออธิบายความผันแปรของขนาดยาเฟนิทอยน์ที่ใช้และระดับยาเฟนิทอยน์ในเลือดในผู้ป่วยโรคลมชักชาวไทย ซึ่งอาจช่วยในการทำนายขนาดยาเฟนิทอยน์ที่เหมาะสมในผู้ป่วยแต่ละรายก่อนได้รับยา

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยความผันแปรทางพันธุกรรมของยีนที่ถ่ายทอดเอนไซม์ CYP2C9 และ CYP2C19 และ ตัวขนส่งยา (drug transporter) P-glycoprotein (P-gp) (ยีน CYP2C9, CYP2C19 และ ABCB1 ตามลำดับ) และปัจจัยที่ไม่ใช่พันธุกรรม กับขนาดยาที่ผู้ป่วยได้รับและระดับยาเฟนิทอยน์ในเลือดในผู้ป่วยโรคลมชักชาวไทย

1.2.2 เพื่อหาแบบจำลอง (model) ที่ใช้ปัจจัยทางพันธุกรรมร่วมกับปัจจัยที่ไม่ใช่พันธุกรรมในการอธิบายความผันแปรของขนาดยาเฟนิทอยน์ที่ผู้ป่วยได้รับและระดับยาเฟนิทอยน์ในเลือดในผู้ป่วยโรคลมชักชาวไทย

1.2.3 เพื่อหาความถี่ของการเกิด functional single nucleotide polymorphisms (SNPs) ที่พบบ่อยในยีน CYP2C9, CYP2C19 และ ABCB1 ในผู้ป่วยโรคลมชักชาวไทย

1.3 สมมติฐาน

ความผันแปรทางพันธุกรรมของยีนที่ถ่ายทอดเอนไซม์ CYP2C9 และ CYP2C19 และ drug transporter P-glycoprotein (P-gp) ร่วมกับปัจจัยที่ไม่ใช่พันธุกรรม มีความสัมพันธ์กับความผันแปรของขนาดยาเฟนิทอยน์ที่ผู้ป่วยได้รับและระดับยาเฟนิทอยน์ในเลือดของผู้ป่วยโรคลมชักชาวไทยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ทราบความสัมพันธ์ระหว่าง SNPs ในยีน CYP2C9, CYP2C19, ABCB1 และปัจจัยอื่นๆ กับความผันแปรของขนาดยาเฟนิทอยน์ที่ผู้ป่วยได้รับและระดับยาเฟนิทอยน์ในเลือดในผู้ป่วยโรคลมชักชาวไทย ซึ่งอาจสามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการพิจารณาปรับขนาดยาที่เหมาะสมในผู้ป่วยแต่ละราย

1.4.2 ได้แบบจำลองที่ใช้ปัจจัยทางพันธุกรรมร่วมกับปัจจัยที่ไม่ใช่พันธุกรรมในการอธิบายความผันแปรของขนาดยาเฟนิทอยน์ที่ผู้ป่วยได้รับและระดับยาเฟนิทอยน์ในเลือดในผู้ป่วยโรคลมชักชาวไทย ซึ่งจะมีประโยชน์ในการนำไปประยุกต์ใช้ในทางคลินิกต่อไป

1.4.3 ทราบความถี่ของ functional SNPs ที่พบบ่อยของยีน *CYP2C9*, *CYP2C19* และ *ABCB1* ในผู้ป่วยโรคลมชักชาวไทย

1.5 คำสำคัญ

CYP2C9

CYP2C19

ABCB1

PHENYTOIN DOSES

PHENYTOIN BLOOD LEVELS

NON-GENETIC VARIANT

EPILEPSY

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 โรคลมชัก (Epilepsy)

โรคลมชัก (Epilepsy) คือ โรคที่เกิดจากภาวะผิดปกติของสมอง ซึ่งมีอาการแสดงออกคือ ผู้ป่วยมีอาการชักซ้ำโดยที่ไม่มีปัจจัยกระตุ้น (precipitating factor) ชัดเจน อาจจะพบพยาธิสภาพในสมองหรือไม่ก็ได้ (Lowenstein, 2005) จัดเป็นโรคที่มีความผิดปกติทางระบบประสาทที่พบได้บ่อยมาก ในประเทศไทยพบความชุกของโรคลมชักในอัตรา 5.9-7.2 ต่อประชากร 1,000 คน (Asawavichienjinda et al., 2002; สมาคมโรคลมชักแห่งประเทศไทย และ สถาบันประสาทวิทยา กรมการแพทย์, 2549) การเกิดอาการชักในโรคลมชักนั้นนอกจากจะเกิดผลเสียต่อสมองและร่างกายของผู้ป่วยแล้ว ยังทำให้เกิดความพิการทางด้านจิตใจและสังคม ส่งผลให้ผู้ป่วยมีคุณภาพชีวิตที่ไม่ดี

หลักการรักษาโรคลมชักมีหลายประการด้วยกันได้แก่ การให้ยากันชักเพื่อควบคุมอาการชัก การรักษาที่สาเหตุของการชักในรายที่เป็น symptomatic epilepsy การหลีกเลี่ยงและควบคุมสิ่งกระตุ้น การดูแลรักษาและฟื้นฟูสมรรถภาพทางด้านจิตใจและสังคม และการพิจารณารักษาโดยการผ่าตัด (epilepsy surgery) ในรายที่ไม่ตอบสนองต่อการรักษาด้วยยากันชัก (Lowenstein, 2005) ซึ่งเป้าหมายสูงสุดของการรักษาโรคลมชัก คือ การที่ผู้ป่วยไม่มีอาการชักอีกเลย (seizure free) และไม่มีอาการข้างเคียงจากยา โดยมุ่งหวังให้ผู้ป่วยมีคุณภาพชีวิตที่ดีที่สุด (Gidal and Garnet, 2005; Hirsch and Pedly, 2008; Vickrey et al., 1994)

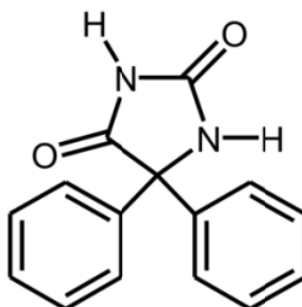
ในปัจจุบัน วิธีการหลักในการรักษาโรคลมชักคือการรักษาโดยการให้ยากันชัก ซึ่งพบว่าผู้ป่วยกว่าร้อยละ 70 สามารถควบคุมอาการชักได้ด้วยยากันชัก แต่พบว่าผู้ป่วยอีกประมาณร้อยละ 30 ไม่สามารถควบคุมอาการได้ ทั้งที่ได้รับการรักษาด้วยยากันชักที่เหมาะสมแล้วก็ตาม นอกจากนี้ยังมีผู้ป่วยอีกส่วนหนึ่งที่เกิดอาการไม่พึงประสงค์จากการใช้ยา ดังนั้นจะเห็นได้ว่าการรักษาผู้ป่วยโรคลมชักนั้นมีความผันแปรสูงในประสิทธิภาพของการรักษา การเกิดอาการไม่พึงประสงค์จากการใช้ยา ตลอดจนขนาดยาที่เหมาะสมในผู้ป่วยแต่ละราย (Löscher et al., 2009)

ทั้งนี้ปัจจัยหลายอย่างที่ทำให้ผู้ป่วยแต่ละรายมีการตอบสนองต่อการรักษาด้วยยาที่แตกต่างกัน โดยสามารถแบ่งออกได้เป็นปัจจัยที่ไม่เกี่ยวข้องกับลักษณะทางพันธุกรรม

(non-genetic factors) ซึ่งได้แก่ เพศ อายุ น้ำหนักตัว การเกิดอันตรกิริยาจากยาอื่นๆที่ใช้ร่วมกัน (drug interaction) เป็นต้น และปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับลักษณะทางพันธุกรรม (genetic factors) ที่ส่งผลต่อกระบวนการทางเภสัชจลนศาสตร์ และเภสัชพลศาสตร์ของยาในร่างกาย ตั้งแต่กระบวนการดูดซึมยา (absorption) การกระจายยา (distribution) การเมแทบอลิซึม (metabolism) การออกฤทธิ์ที่ตำแหน่งเป้าหมายของยา (target) ตลอดจนการกำจัดยาออกจากร่างกาย (elimination) (Balant et al., 1989)

2.2 ยาเฟนิทอยน์ (Phenytoin; PHT)

ยาเฟนิทอยน์ (Diphenylhydantoin) มีสูตรโครงสร้างทางเคมีเป็น 5,5-diphenyl-2,4-imidazolidinedione ดังแสดงในรูปที่ 1 ยาเฟนิทอยน์ถูกสังเคราะห์ขึ้นเป็นครั้งแรกในปี ค.ศ. 1908 โดย Biltz (Delorenzo and Sun, 2002) และถูกนำมาใช้เป็นยารักษาโรคลมชักในปี ค.ศ. 1938 (Merritt and Putnam, 1908) จัดเป็นยากันชักที่มีประสิทธิภาพดีและมีราคาถูก จึงมีการใช้กันอย่างกว้างขวางทั่วโลก และโดยเฉพาะในประเทศไทย

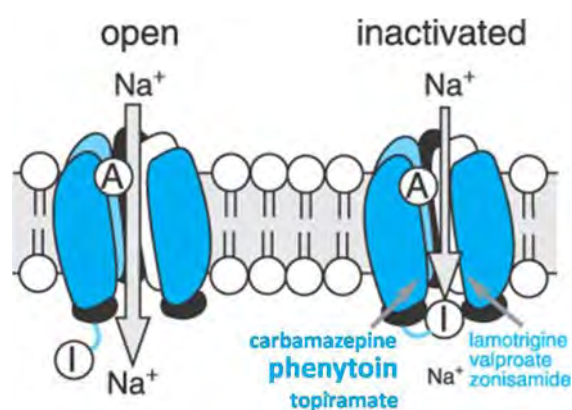


รูปที่ 1 สูตรโครงสร้างของเฟนิทอยน์

ยาเฟนิทอยน์จัดเป็น first line drug สำหรับการรักษาโรคลมชักที่มีอาการชักชนิด generalized tonic-clonic seizure และ complex partial seizure นอกจากนี้ยังใช้ในการป้องกันและรักษาอาการชักที่เกิดในระหว่างหรือหลังการผ่าตัดสมอง (neurosurgery) (Kastrup, 2008; McEvoy et al., 2008)

คุณสมบัติทางเภสัชวิทยาและกลไกการออกฤทธิ์ของยาเฟนิทอยน์

ยาเฟนิทอยน์ออกฤทธิ์ต้านอาการชักโดยการจับกับผิวด้านนอกของ sodium channel (Kuo, 1998) ซึ่งในขนาดยาที่ใช้เพื่อการรักษานั้น ยาเฟนิทอยน์จะมีผลต่อ voltage-activated Na^+ channel ทำให้มีการปิดอยู่ในช่วง inactivation นานขึ้น (รูปที่ 2) ทำให้เกิดการเกิด depolarization ของเซลล์ประสาทที่มีความถี่ในการส่งกระแสประสาทมาก ส่วนเซลล์ที่มีความถี่ในการส่งกระแสประสาทน้อยจะได้รับผลจากยาน้อย (use dependent activity) (Macdonald, 1999)



รูปที่ 2 แสดงกลไกการออกฤทธิ์ของยาเฟนิทอยน์และยากันชักอื่นๆ ที่ออกฤทธิ์โดยการจับกับ Na^+ channel

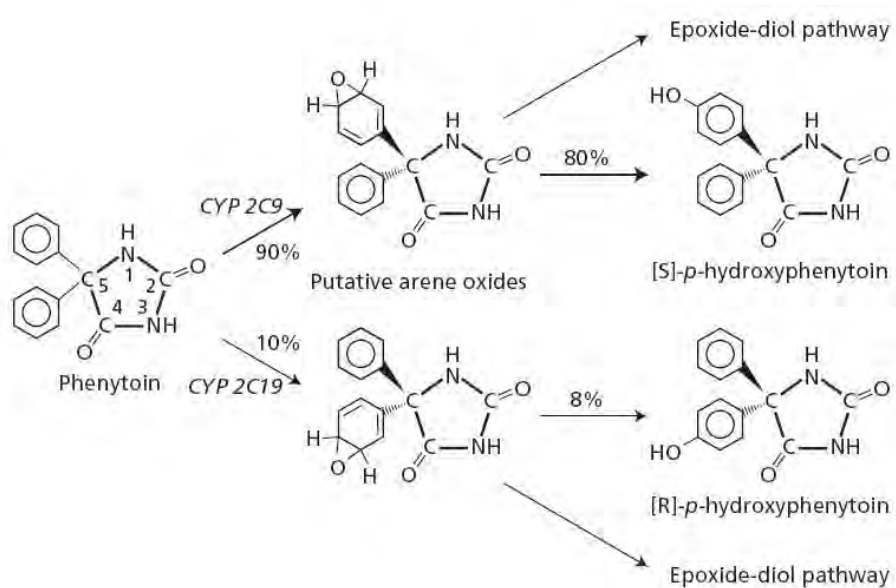
(I) = inactivation gate (A) = activation gate (ที่มา; Mcnamara, 2006)

คุณสมบัติทางเภสัชจลนศาสตร์ของยาเฟนิทอยน์

ยาเฟนิทอยน์ถูกดูดซึมจากทางเดินอาหารได้ช้า แต่ดูดซึมได้เกือบสมบูรณ์ (bioavailability = 95%) โดยการดูดซึมจะขึ้นกับรูปแบบและสูตรตำรับของยาเป็นอย่างมาก ดังนั้นยาที่ผลิตจากคนละบริษัทอาจมีผลให้ระดับยาในเลือดเปลี่ยนแปลงได้ และมีผลต่อประสิทธิภาพในการควบคุมอาการชักของผู้ป่วย (Browne and Leduc, 2002; Winter and Tozer, 2006)

นอกจากนี้ยาเฟนิทอยน์ยังสามารถจับกับโปรตีน ได้มากกว่าร้อยละ 90 โดยส่วนใหญ่จะจับกับโปรตีนอัลบูมิน (Winter and Tozer, 2006) ดังนั้นในกรณีที่มีการใช้ยาเฟนิทอยน์ร่วมกับยาอื่นที่สามารถจับกับอัลบูมินได้สูงเช่นกัน ก็อาจทำให้เฟนิทอยน์มีระดับยาอิสระในเลือดสูงเกินไปจนทำให้เกิดอาการไม่พึงประสงค์ได้

ยาเฟนิทอยน์ถูกเปลี่ยนแปลงในร่างกายได้โดยเอนไซม์ CYP2C9 เป็นหลัก (ประมาณร้อยละ 90) และอีกส่วนหนึ่งสามารถถูกเปลี่ยนแปลงได้โดยเอนไซม์ CYP2C19 (ประมาณร้อยละ 10) (Bajpai et al., 1996) ดังแสดงในรูปที่ 3 โดยผ่านกระบวนการ parahydroxylation ได้เมแทบอลิท์ตัวหลัก คือ 5-(4-hydroxyphenyl)-5-phenylhydantoin (p-HPPH) ที่ไม่มีฤทธิ์ในการรักษา (Brown, 1994; Butler, 1957) นอกจากนี้ ยาเฟนิทอยน์ยังเป็น substrate ตัวหนึ่งของตัวขนส่งยา P-glycoprotein (P-gp) (Potschka and Löscher, 2001)



รูปที่ 3 แสดงกระบวนการเมแทบอลิซึมของยาเฟนิทอยน์ (ทีมา; Eadie, 2009)

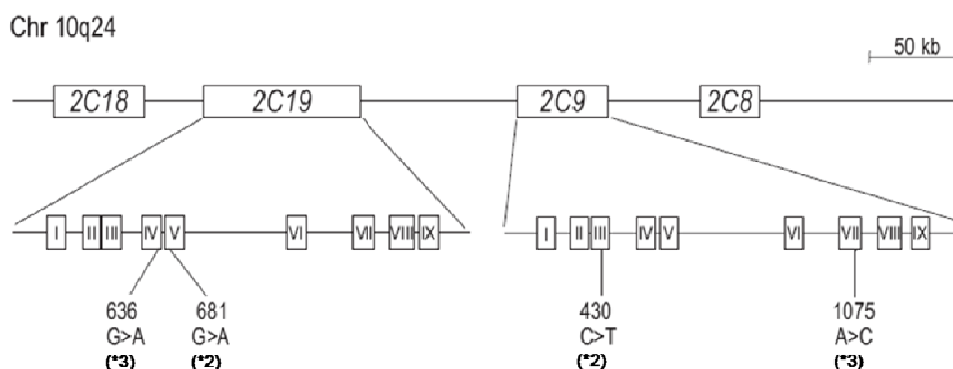
ยาเฟนิทอยน์มีคุณสมบัติทางเภสัชจลนศาสตร์ที่ค่อนข้างซับซ้อน กล่าวคือ มีการกำจัดยาแบบ Michaelis-Menten kinetic ซึ่งมีสภาวะอิ่มตัวในการแปรสภาพยา (saturable metabolism) ทำให้การกำจัดยาในขนาดสูงไม่แปรผันตามความเข้มข้นของระดับยาในเลือด (Gidal and Garnet, 2005) นอกจากนี้ยาเฟนิทอยน์ยังมี therapeutic range แคบ โดยระดับความเข้มข้นของยาที่ให้ผลในการรักษาอยู่ในช่วง 10-20 มคก./มล. (Kastrup, 2008) เนื่องด้วยคุณสมบัติดังกล่าวของยาเฟนิทอยน์ทำให้การควบคุมและรักษาโรคลมชักโดยใช้ยาเฟนิทอยน์นั้นทำได้ค่อนข้างยาก และใช้ระยะเวลาานานกว่าจะได้ขนาดยาที่เหมาะสมที่สามารถควบคุมอาการชักได้ โดยไม่เกิดอาการไม่พึงประสงค์จากยา และขนาดยาที่เหมาะสมในผู้ป่วยแต่ละรายค่อนข้างแตกต่างกันมาก (Tate et al., 2005)

2.3 ปัจจัยที่มีความเกี่ยวข้องกับขนาดยาและระดับยาเฟนิทอยน์ในเลือด

มีปัจจัยหลายอย่างที่ส่งผลให้ผู้ป่วยแต่ละรายได้รับยาในขนาดที่แตกต่างกันเพื่อใช้ในการควบคุมอาการชัก รวมทั้งมีระดับยาในเลือดที่แตกต่างกันออกไป ซึ่งมีทั้งปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับพันธุกรรมของเอนไซม์ที่เป็นตัวทำลายยา (CYP2C9 และ CYP2C19) และตัวขนส่งยา (P-gp) และปัจจัยที่ไม่ใช่พันธุกรรม อาทิเช่น อายุ น้ำหนักตัว เพศ และการเกิดอันตรกิริยาระหว่างยาที่ใช้ร่วมกัน

2.3.1 การเกิด polymorphisms ของยีน CYP2C9

CYP2C9 เป็นยีนที่ควบคุมการแสดงออกของเอนไซม์ CYP2C9 โดยเป็นส่วนหนึ่งของยีนกลุ่ม CYP2C ซึ่งอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 10 ร่วมกับยีนกลุ่ม CYP2C อื่นๆ ได้แก่ CYP2C8, CYP2C18 และ CYP2C19 ดังแสดงในรูปที่ 4 โดย CYP2C9 จะอยู่ที่ตำแหน่ง 10q24 (Gray et al., 1995)



รูปที่ 4 แสดงตำแหน่งของยีน CYP2C9 และ CYP2C19 บนโครโมโซมคู่ที่ 10 และแสดง polymorphisms ที่สำคัญที่ส่งผลต่อการทำงานของเอนไซม์

มีรายงานการเกิด polymorphisms ของยีน CYP2C9 มากมาย โดยเฉพาะการเกิด single nucleotide polymorphisms หรือ SNPs ซึ่งเกิดจากความแตกต่างของนิวคลีโอไทด์เพียงตำแหน่งเดียว และส่งผลให้ได้เอนไซม์ที่มีประสิทธิภาพในการเปลี่ยนแปลงยาที่แตกต่างกันออกไป โดยในปัจจุบันนี้พบ SNPs ของยีน CYP2C9 กว่า 30 อัลลีล (www.cypalleles.ki.se/cyp2c9.htm) ซึ่งมีทั้งในบริเวณ regulatory region และ coding region ของยีน โดย SNPs ของยีน CYP2C9 ที่เป็นที่รู้จักกันดีและพบได้บ่อยในประชากรมีอยู่ 2 SNPs คือ CYP2C9*2 และ CYP2C9*3 (Xie et al., 2002a) โดย CYP2C9*2 นั้นเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์บน

exon ที่ 3 ในตำแหน่งที่ 430 จาก cytosine (C) เป็น thymine (T) (C430T) ส่งผลให้มีการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนในตำแหน่งที่ 144 จาก Arginine เป็น Cysteine (Arg144Cys) ส่งผลให้ได้เอนไซม์ที่มีประสิทธิภาพในการเปลี่ยนแปลงยาลดลง 29% (Rettie et al., 1999) ส่วน CYP2C9*3 นั้นเกิดจากการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์บน exon ที่ 7 ในตำแหน่งที่ 1075 จาก adenine (A) เป็น cytosine (C) (A1075C) ส่งผลให้มีการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนในตำแหน่งที่ 359 จาก Isoleucine เป็น Leucine (Ile359Leu) ส่งผลให้ได้เอนไซม์ที่มีประสิทธิภาพในการเปลี่ยนแปลงยาลดลงอย่างมากถึง 93-95% (Rettie et al., 1999; Takanashi et al., 2000)

ความถี่ในการเกิด variant allele ของ CYP2C9 ในประชากรเชื้อชาติต่างๆนั้นจะมีความแตกต่างกันออกไปดังแสดงในตารางที่ 1 โดยพบว่าในประชากรชาวไทยและชาวเอเชียอื่นๆ เช่น จีน ญี่ปุ่น และเกาหลีนั้น จะไม่พบ CYP2C9*2 ส่วนในชาวคอเคเซียนนั้นจะพบ CYP2C9*2 ในความถี่ที่ค่อนข้างแตกต่างกันอย่างมากในแต่ละเชื้อชาติ ในส่วนของ CYP2C9*3 นั้นพบว่าในชาวเอเชีย และชาวผิวดำนั้นมีความถี่ที่ใกล้เคียงกัน แต่จะค่อนข้างต่ำกว่าชาวคอเคเซียน

ตารางที่ 1 แสดงความถี่ของการเกิด CYP2C9 variant ในประชากรเชื้อชาติต่างๆ

Ethnicity		n	CYP2C9*2	n	CYP2C9*3	เอกสารอ้างอิง
Asians	Chinese	1016	0%	896	3.3%	review โดย Xie et al., 2002a
	Japanese	1512	0%	1402	2.2%	review โดย Xie et al., 2002a
	Korean	1148	0%	1148	1.1%	Yoon et al., 2001
	Thai	484	0%	484	2.5%	Kuanprasert et al., 2009
Blacks	American	1098	2.9%	450	2%	review โดย Xie et al., 2002a
	Ethiopian	300	4.3%	300	2.3%	Scordo et al., 2001
White	American	650	14.9%	650	7.1%	Gaedigk et al., 2001
	British	1122	10.6%	1122	5.3%	Taube et al., 2000
	German	988	11.3%	734	7.8%	review โดย Xie et al., 2002a; Ackermann et al., 1997
	Turkish	998	10.6%	998	10%	Aynacioglu et al., 1999

n = จำนวนอัลลีล

คุณสมบัติทางเภสัชจลนศาสตร์ของยาเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อระดับความเข้มข้นของยาในเลือด ดังนั้นการเกิดความผันแปรของลักษณะทางพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการทางเภสัชจลนศาสตร์ของยาจึงสามารถส่งผลกระทบต่อความเข้มข้นของยาในเลือดได้ ซึ่งจากการศึกษาของ Aynacioglu และคณะ (1999) ได้ทำการวัดความเข้มข้นของ phenytoin และ HPPH ซึ่งเป็นเมแทบอไลต์ ในอาสาสมัครชาวตุรกีจำนวน 101 คน หลังจากได้รับยาเฟนิทอยน์ในขนาด 300 มิลลิกรัมไป 12 ชั่วโมง ก็พบว่ากลุ่มที่มี variant genotype ของ CYP2C9 (*CYP2C9*1/*2* หรือ *CYP2C9*1/*3*) จะมีระดับยาเฟนิทอยน์ในเลือดสูงกว่ากลุ่ม wild type (*CYP2C9*1/*1*) ถึง 40% และจากการศึกษานี้ผู้วิจัยพบว่า genotype ของ CYP2C9 สามารถอธิบายความผันแปรของระดับยาเฟนิทอยน์ในเลือดได้ประมาณร้อยละ 31

นอกจากนี้ในการศึกษาของ Hung และคณะ (2004) พบว่าการเกิด polymorphisms ของยีนที่ควบคุมการแสดงออกของเอนไซม์ CYP2C9 และ CYP2C19 นั้นส่งผลกระทบต่อกระบวนการทางเภสัชจลนศาสตร์ของยาเฟนิทอยน์อย่างชัดเจน กล่าวคือ ในกลุ่มที่มี variants ของ CYP2C9 และ CYP2C19 จะมีค่า maximum velocity (V_{max}), และค่า intrinsic clearance (CL_{int}) ต่ำกว่ากลุ่ม wild type อย่างมีนัยสำคัญ โดยเมื่อพิจารณาขนาดยาเฟนิทอยน์ตามค่า pharmacokinetic parameters ของประชากรจีนที่คำนวณได้จากกรศึกษาครั้งนี้ คณะผู้วิจัยพบว่าในผู้ป่วยที่มี variants ของ CYP2C9 และ CYP2C19 จะต้องมีการลดขนาดยาเฟนิทอยน์ลงจากขนาด 5-7 มก./กก./วัน ในคนปกติ เป็น 2-4 มก./กก./วัน นอกจากนี้ยังมีการศึกษาของ Tate และคณะ (2005) พบว่าขนาดยาเฟนิทอยน์ที่ใช้ในการรักษาผู้ป่วยมีความแตกต่างกันไปตามลักษณะ genotype ของยีน CYP2C9 โดยพบว่าจำนวน CYP2C9*3 allele มีความสัมพันธ์กับขนาดยาที่ใช้ในการรักษาผู้ป่วย โดยผู้ป่วยที่มี CYP2C9*3 allele อยู่ 1 อัลลีล จะใช้ขนาดยาต่ำกว่า wild type อยู่ร้อยละ 13 และในการศึกษานี้ผู้วิจัยพบว่าลักษณะ genotype ของ CYP2C9 สามารถอธิบายความผันแปรของขนาดยาเฟนิทอยน์ที่ใช้เพื่อการรักษาได้ประมาณร้อยละ 6.5

2.3.2 การเกิด polymorphisms ของยีน CYP2C19

CYP2C19 เป็นยีนที่ควบคุมการแสดงออกของเอนไซม์ CYP2C19 ซึ่งเป็นโปรตีนที่ประกอบไปด้วยกรดอะมิโนจำนวน 490 ตัว โดยยีน CYP2C19 เป็นส่วนหนึ่งของยีนกลุ่ม CYP2C ซึ่งอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 10 เช่นเดียวกับยีน CYP2C9 ดังแสดงในรูปที่ 4 โดย CYP2C19 จะอยู่ที่ตำแหน่ง 10q24.1-10q24.3 (Zaphiropoulos, 1999)

ในปัจจุบันนี้มีรายงานการเกิด polymorphisms ของยีน *CYP2C19* ถึง 35 SNPs (www.cypalleles.ki.se/cyp2c19.htm) โดย SNPs ของยีน *CYP2C19* ที่เป็นที่รู้จักกันและพบได้บ่อยในประชากรมีอยู่ 2 SNPs คือ *CYP2C19*2* และ *CYP2C19*3* โดย *CYP2C19*2* นั้นเกิดจากการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์บน exon ที่ 5 ในตำแหน่งที่ 681 จาก guanine (G) เป็น adenine (A) (G681A) ส่งผลให้เกิดความบกพร่องในการเชื่อมต่อนของ exon (splicing defect) มีผลทำให้ได้เอนไซม์ที่ไม่มีประสิทธิภาพในการเปลี่ยนแปลงยา (de Morais et al., 1994a) ส่วน *CYP2C19*3* นั้นเกิดจากการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์บน exon ที่ 4 ในตำแหน่งที่ 636 จาก guanine (G) เป็น adenine (A) (G636A) ส่งผลให้เกิดเป็น premature stop codon มีผลทำให้ได้เอนไซม์ที่ไม่มีประสิทธิภาพในการเปลี่ยนแปลงยาเช่นเดียวกับ *CYP2C19*2* (de Morais et al., 1994b)

จากการศึกษาที่ผ่านมาในประชากรหลายเชื้อชาติพบว่าความถี่ของ *CYP2C19*2* และ *CYP2C19*3* จะแตกต่างกันออกไป ดังแสดงในตารางที่ 2 โดยในชาวไทยและชาวเอเชียอื่นๆ นั้นจะมีความถี่ของทั้ง *CYP2C19*2* และ *CYP2C19*3* สูงกว่าชาวผิวดำและชาวผิวขาว

ตารางที่ 2 แสดงความถี่ของการเกิด *CYP2C19 variant* ในประชากรเชื้อชาติต่างๆ

Ethnicity	n	<i>CYP2C19*2</i>	<i>CYP2C19*3</i>	เอกสารอ้างอิง	
Asians	Chinese	1146	30.0%	5.1%	Xie, 2000
	Korean	206	21.0%	12.0%	Roh et al., 1996
	Thai	1548	29.0%	3.0%	Tassaneeyakul et al., 2006
	Burmese	254	30.0%	4.0%	Tassaneeyakul et al., 2006
	Japanese	192	27.1%	15.6%	Yamada et al., 2001
	Vietnamese	180	24.0%	14.0%	Yamada et al., 2001
Blacks	African-American	1034	18.6%	0.1%	Xie et al., 1999
	Ethiopian	228	14.0%	2.0%	Persson et al., 1996
	White	Italian	720	11.1%	0.0%
Turkish	808	12.0%	0.4%	Aynacioglu et al., 1999	
Dutch	1530	13.3%	0.2%	Tamminga et al., 2001	

n = จำนวนอัลลีล

ถึงแม้ว่าเอนไซม์ CYP2C19 จะมีบทบาทรองในการแปรสภาพยาเฟนิโทยน์ แต่เนื่องจากลักษณะทางเภสัชจลนศาสตร์ของยาเฟนิโทยน์ที่มีการอิ่มตัวของการแปรสภาพยา ดังนั้นเมื่อมีการใช้ยาในขนาดที่สูงขึ้น เอนไซม์ CYP2C9 จะเกิดการอิ่มตัว ทำให้ CYP2C19 มีบทบาทเพิ่มมากขึ้น (Bajpai et al., 1996; Yukawa and Mamiya, 2006) ดังนั้นในความเข้มข้นขนาดสูงของเฟนิโทยน์ หากผู้ป่วยมี functional variants ของ CYP2C19 ก็จะมีผลกระทบต่อ การแปรสภาพยาได้อย่างมาก เนื่องจากเอนไซม์ที่เกิดจาก variants ดังกล่าวนั้นเป็นเอนไซม์ที่ไม่มีประสิทธิภาพในการเปลี่ยนแปลงยา ทำให้มีโอกาสที่ระดับยาในเลือดสูงเกินช่วงของการรักษา และเกิดพิษจากยาขึ้นมาได้

Watanabe และคณะ (1999) ได้ทำการศึกษาในผู้ป่วยโรคลมชักชาวญี่ปุ่นจำนวน 16 คน เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะ genotype ของ CYP2C19 และค่าพารามิเตอร์ทางเภสัชจลนศาสตร์ของยาเฟนิโทยน์ ซึ่งผู้วิจัยพบว่าในผู้ป่วยที่มีอัลลีล CYP2C19*3 จะมีค่า V_{max} ต่ำกว่าผู้ป่วยที่ไม่มีอัลลีลดังกล่าวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จึงอาจเป็นไปได้ว่าอัลลีล CYP2C19*3 อาจจะเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลทำให้มีการเปลี่ยนแปลงยาเฟนิโทยน์ได้ช้าลง

2.3.3 การเกิด polymorphisms ของยีน ABCB1

กระบวนการดูดซึมยาจากทางเดินอาหาร เป็นอีกกระบวนการหนึ่งที่มีผลต่อระดับยาในเลือด ซึ่งนอกจากคุณสมบัติทางเคมีฟิสิกส์ของยาจะเป็นปัจจัยที่สำคัญที่มีผลต่อการดูดซึมยาเข้าสู่กระแสเลือดแล้ว ยังพบว่า มี drug efflux transporter ในบริเวณทางเดินอาหารที่เป็นตัวจำกัดการดูดซึมของยา โดยผ่านกระบวนการขับยากลับออกไปสู่ทางเดินอาหาร ส่งผลให้ยาถูกดูดซึมได้ลดลง โดยปกติในร่างกายจะมี drug efflux transporter หลายชนิดที่มีการแสดงออกอยู่ที่เซลล์เยื่อทางเดินอาหาร โดยพบว่าตัวหนึ่งที่สำคัญและมีความเกี่ยวข้องกับการดื้อยาหลายชนิดคือ P-glycoprotein (P-gp) (Fromm, 2004) โปรตีนชนิดนี้ถูกควบคุมโดยยีน ATP-binding cassette subfamily B member 1 (ABCB1) หรือ multidrug-resistance-1 gene (MDR-1) ซึ่งพบมีการแสดงออกที่เนื้อเยื่อของอวัยวะต่างๆที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับการขับออก ได้แก่ ลำไส้เล็ก ตับ ไต และเนื้อเยื่อบริเวณที่เป็น blood-tissue barriers ได้แก่ blood-brain barrier, blood-testis barrier และ placenta (Fromm, 2004; Gottesman et al., 1995) ABCB1 เป็นยีนที่มีรายงานการเกิด polymorphisms มากมายกว่า 50 SNPs (www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/GeneGt.cgi?geneID=5243) โดยพบว่า ABCB1 C3435T เป็น variant ตัวแรกที่มีรายงานว่ามีความสัมพันธ์กับการ

เปลี่ยนแปลงการแสดงออกและการทำหน้าที่ของ P-gp ในลำไส้ของมนุษย์ (Hoffmeyer et al., 2000) โดยในการศึกษาของ Hoffmeyer และคณะ (2000) พบว่าในกลุ่มที่มีลักษณะ genotype เป็น *ABCB1* 3435CC จะมีการแสดงออกของ P-gp ในลำไส้ส่วน duodenum สูงกว่ากลุ่มที่มีลักษณะ genotype เป็น *ABCB1* 3435TT ถึง 2 เท่า ซึ่งสอดคล้องกับการลดลงของความเข้มข้นของยา digoxin ซึ่งเป็น substrate ของ P-gp

เนื่องจากยาเฟนิทอยน์เป็น substrate ตัวหนึ่งของ P-gp (Fromm, 2004) จึงได้มีการศึกษาถึงความสัมพันธ์ของ variant ของยีน *ABCB1* กับระดับยาเฟนิทอยน์ในเลือดหลายการศึกษา เช่น ในการศึกษาของ Kerb และคณะ (2001) พบว่าในกลุ่มอาสาสมัครชาวตุรกีที่มีระดับยาเฟนิทอยน์ในเลือดต่ำจะสัมพันธ์กับ CC genotype ของยีน *ABCB1* *C3435T* ($p \leq 0.001$, Chi-square test) โดยมีการยืนยันในการศึกษาต่อมาของ Ebid และคณะ (2007) ซึ่งพบว่ากลุ่มผู้ป่วยโรคลมชักชาวอียิปต์ที่มี CC genotype ของ *ABCB1* *C3435T* จะมีระดับยาเฟนิทอยน์ในเลือดต่ำกว่ากลุ่มที่มี TT genotype แต่อย่างไรก็ตามการศึกษาเกี่ยวกับยีน *ABCB1* ในหลายการศึกษาที่ผ่านมาพบว่ามีผลการศึกษาที่ต่างกันจะแสดงผลการศึกษาที่ต่างกัน เช่น ในชาวคอเคเซียน (Siddiqui et al., 2003; Soranzo et al., 2004) กับชาวเอเชีย (Kwan et al., 2007) นั้นจะได้ผลในทางตรงข้ามกัน ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องทำการศึกษาในกลุ่มเชื้อชาติต่างๆ เพื่อหาปัจจัยที่อาจอธิบายถึงความแตกต่างดังกล่าว

2.3.4 ความแตกต่างของผู้ป่วยแต่ละรายในด้านอายุ เพศ และน้ำหนักตัว

- อายุ

อายุที่มากขึ้นมีความสัมพันธ์กับปัจจัยหลายอย่าง เช่น การทำงานที่ผิดปกติไปของระบบทางเดินอาหาร การลดลงของระดับอัลบูมินในเลือด และความสามารถในการทำงานของตับก็ลดลง ซึ่งปัจจัยต่างๆ เหล่านี้สามารถที่จะส่งผลกระทบต่อกระบวนการทางเภสัชจลนศาสตร์ของยาได้ (Bachmann et al., 1999; Cusack, 2004) แต่อย่างไรก็ตามการศึกษาเกี่ยวกับความสัมพันธ์ของอายุกับระดับยาเฟนิทอยน์ในเลือดนั้นพบผลการศึกษาที่ขัดแย้งกันอยู่ โดยจากการศึกษาของ Houton และคณะ (1975) พบว่า อายุที่เพิ่มขึ้นมีความสัมพันธ์กับระดับยาเฟนิทอยน์ในเลือดที่เพิ่มขึ้น ในขณะที่ Ahn และคณะ (2008) พบว่าผู้ป่วยในกลุ่มสูงอายุ (อายุมากกว่า 65 ปี) มีระดับยาในเลือดต่ำกว่าผู้ป่วยกลุ่มอายุ 18-65 ปี อยู่

ร้อยละ 17 และใช้ขนาดยาที่ต่ำกว่าอยู่ร้อยละ 22 แต่ไม่พบความแตกต่างของค่าพารามิเตอร์ทางเภสัชจลนศาสตร์ ซึ่งได้แก่ clearance, volume of distribution (Vd) และ ค่า elimination half life ระหว่างสองกลุ่มอายุดังกล่าว

- น้ำหนักตัว

เนื่องจากน้ำหนักตัวมีความสัมพันธ์โดยตรงกับปริมาตรการกระจายยา (Vd) ดังนั้นระดับความเข้มข้นของยาในเลือดจึงมีความสัมพันธ์ในทิศทางตรงกันข้ามกับน้ำหนักตัวของผู้ป่วย โดยจากการศึกษาของ Houton และคณะ (1975) พบว่าระดับยาเฟนิทอยน์ในเลือดนั้นจะลดลงเมื่อน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้น แต่ทั้งนี้ในบางการศึกษา (Lascelles et al., 1970; Lund, 1973 อ้างถึงใน Houton et al., 1975) พบว่าแม้จะมีการปรับขนาดยาด้วยน้ำหนักตัวแล้ว ก็ยังคงพบว่าระดับยาเฟนิทอยน์ในเลือดยังมีความแตกต่างกันอย่างมาก ซึ่งแสดงให้เห็นว่ายังมีปัจจัยอื่นๆอีกมากมายที่มีผลต่อระดับยาเฟนิทอยน์ในเลือด

- เพศ

มีรายงานเกี่ยวกับความแตกต่างของกระบวนการเมแทบอลิซึมระหว่างหนูทดลองเพศผู้และเพศเมียในหลายการศึกษา (Axelrod, 1956; Kuntzman et al., 1966; Quinn et al., 1958) โดยพบว่าในหนูทดลองเพศผู้จะมีอัตราการเมแทบอลิซึมเร็วกว่าเพศเมีย ส่วนการศึกษาในมนุษย์เกี่ยวกับการเมแทบอลิซึมระหว่างเพศชายและเพศหญิงนั้น ได้มีรายงานการศึกษาในยา antipyrine พบว่าเพศชายจะมีค่าครึ่งชีวิตของยายาวนานกว่าเพศหญิง (O'Malley et al., 1971)

Travers และคณะ (1972) ได้ทำการศึกษาในผู้ป่วยที่ได้รับยาเฟนิทอยน์ในขนาดเดียวกัน พบว่าผู้ป่วยหญิงจะมีระดับยาในเลือดต่ำกว่าผู้ป่วยชาย เช่นเดียวกับการศึกษาของ Houghton และคณะ (1975) ที่พบว่าในผู้ป่วยที่ได้รับยาเฟนิทอยน์ในขนาดเดียวกันนั้น ผู้ป่วยหญิงจะมีระดับยาในเลือดต่ำกว่าผู้ป่วยชาย และเมื่อมีการปรับด้วยน้ำหนักและส่วนสูงที่แตกต่างกันระหว่างสองเพศแล้วก็ยังคงพบว่า ผู้ป่วยหญิงยังคงมีระดับยาในเลือดต่ำกว่าผู้ป่วยชาย แต่ในบางการศึกษากลับไม่พบความแตกต่างดังกล่าว (Eadie et al., 1973) ซึ่งอาจแสดงให้เห็นว่าความแตกต่างเรื่องเพศอย่างเดียวไม่เพียงพอที่จะอธิบายถึงความแตกต่างของระดับยาในเลือดและขนาดยาที่เหมาะสมในผู้ป่วยแต่ละรายได้

2.3.5 การเกิดอันตรกิริยาระหว่างยา

โรคลมชักเป็นโรคที่มีความผิดปกติของระบบประสาทอย่างหนึ่งที่ต้องได้รับการรักษาด้วยยาเป็นระยะเวลานาน และผู้ป่วยบางส่วนที่ไม่สามารถควบคุมอาการชักได้ด้วยยากันชักเพียงตัวเดียว ก็มีความจำเป็นที่จะต้องได้รับยากันชักตัวอื่น ๆ ร่วมด้วย นอกจากนี้ผู้ป่วยส่วนหนึ่งมักมีโรคประจำตัวอื่น ๆ ที่มีความจำเป็นที่ต้องได้รับยาเพื่อรักษาโรคอื่น ๆ ร่วมด้วย ดังนั้นจากการที่ผู้ป่วยได้รับยาในการรักษา มากกว่าหนึ่งตัว จึงทำให้มีโอกาสที่จะเกิดอันตรกิริยาระหว่างยาดังกล่าวได้ และอาจส่งผลให้เกิดอาการไม่พึงประสงค์จากยา หรือทำให้การรักษาไม่ได้ผล

เนื่องจากกลไกการเกิดอันตรกิริยาสามารถเกิดได้ 2 กลไกหลัก คือ อันตรกิริยาทางเภสัชจลนศาสตร์และเภสัชพลศาสตร์ ซึ่งผลจากการเกิดอันตรกิริยาทางเภสัชจลนศาสตร์นั้น อาจทำให้มีการเปลี่ยนแปลงระดับความเข้มข้นของยาในเลือดได้ (Díaz et al., 2008) และจากคุณสมบัติของยาเฟนิทอยน์ที่มีการอิมิตัวในการแปรสภาพยา ดังนั้นการใช้ยาอื่น ๆ ที่ถูกเปลี่ยนแปลงได้โดยเอนไซม์ CYP2C9 และ CYP2C19 เช่นเดียวกับยาเฟนิทอยน์ ก็สามารถส่งผลยับยั้งการเมแทบอลิซึมของยาเฟนิทอยน์ แล้วส่งผลให้ระดับยาในเลือดสูงขึ้นได้ นอกจากนี้การใช้ยาเฟนิทอยน์ร่วมกับยาอื่น ๆ ที่สามารถเหนี่ยวนำ หรือยับยั้งเอนไซม์ CYP2C9 และ CYP2C19 ได้ ก็สามารถส่งผลต่อระดับยาเฟนิทอยน์ในเลือดได้อีกเช่นเดียวกัน (McNamara, 2006)

ตารางที่ 3 แสดงตัวอย่างยาที่สามารถเกิดอันตรกิริยากับยา phenytoin ได้ รวมทั้งกลไกการเกิดอันตรกิริยา และระดับความมีนัยสำคัญทางคลินิก[#]

3.1 ยาที่ส่งผลเพิ่มฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของยาเฟนิทอยน์			
Mechanisms			
Inhibit metabolism		Displace anticonvulsant	Unknown
Allopurinol [4]	Metronidazole [4]	Salicylates [5]	Chlorpheniramine [4]
Amiodarone [2]	Miconazole [4]	Tricyclic antidepressants [4]	Ibuprofen [4]
Benzodiazepines [2]	Omeprazole [4]	Valproic acid [2]	Phenothiazines [4]
Chloramphenicol [2]	Phenacemide [2]		
Cimetidine [2]	Succinimides [4]		
Ethanol(acute)	Sulfonamides [2]		
Fluconazole [2]	Trimethoprim [2]		
Isoniazid [2]	Valproic acid [2]		

3.2 ยาที่ส่งผลลดฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของยาเฟนิทอยน์

Mechanisms		
Increase metabolism	Decrease absorption	Unknown
Barbiturates [5]	Antacids [5]	Antineoplastics [2]
Carbamazepine* [2]	Charcoal	Folic acid [2]
Diazoxide [2]	Sucralfate [2]	Loxapine [4]
Ethanol (chronic)		Nitrofurantoin [4]
Rifampin [2]		Pyridoxine [4]
Theophylline [2]		

ความหมายและการกำหนดระดับนัยสำคัญทางคลินิกได้แสดงไว้ในภาคผนวก ค

* ผลของยา carbamazepine ที่มีต่อระดับยาเฟนิทอยน์ในเลือดนั้นค่อนข้างหลากหลาย โดยพบได้ทั้ง เพิ่ม หรือ ลด หรือ ไม่มีผลต่อระดับยา (Tatro, 2010)

ถึงแม้ว่าโดยทั่วไปแล้วผู้ป่วยโรคลมชักที่รักษาด้วยยาเฟนิทอยน์มักจะได้รับยาอื่น ๆ ร่วมด้วยเสมอ ซึ่งอาจเป็นยาที่สามารถเกิดอันตรกิริยากับยาเฟนิทอยน์ได้ แล้วส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพในการรักษาผู้ป่วย แต่ในหลายการศึกษาที่ผ่านมาไม่ได้นำเอาอิทธิพลของการเกิดอันตรกิริยาระหว่างยาเข้ามาร่วมในการศึกษาด้วย จนกระทั่ง Lee และคณะ (2007) ได้ทำการศึกษาความสัมพันธ์ของลักษณะทางพันธุกรรมของเอนไซม์ CYP2C9 และ CYP2C19 และการเกิดอันตรกิริยาระหว่างยา กับระดับยาเฟนิทอยน์ในเลือดของผู้ป่วยโรคลมชักชาวเกาหลี พบว่าลักษณะทางพันธุกรรมของเอนไซม์ CYP2C9 และ CYP2C19 และขนาดยาเฟนิทอยน์ที่ผู้ป่วยได้รับเป็นตัวแปรที่มีนัยสำคัญในการอธิบายความผันแปรของระดับยาในเลือด โดยสามารถอธิบายได้ร้อยละ 39.6 ของความผันแปรของระดับยาในเลือดทั้งหมด และพบว่ากลุ่มผู้ป่วยที่ได้รับยาอื่น ๆ ร่วมไปกับยาเฟนิทอยน์นั้น จะมีความแปรปรวนของค่า V_{max} ทั้งภายในกลุ่ม genotype เดียวกัน และระหว่างกลุ่มที่มี genotype ต่างกัน ซึ่งอิทธิพลจากการได้รับยาอื่น ๆ ร่วมด้วยนั้นอาจจะไปบดบังอิทธิพลของ genetic polymorphisms ของ CYP2C19 ได้ โดยเมื่อวิเคราะห์ในกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่ได้รับยาอื่น ๆ ร่วมด้วย (monotherapy) ก็ยังสามารถเห็นอิทธิพลของ CYP2C19 ที่มีต่อเภสัชจลนศาสตร์ของยาเฟนิทอยน์ได้ โดยพบว่ากลุ่ม poor metabolizer ของ CYP2C19 มีค่า V_{max} ต่ำกว่ากลุ่ม extensive metabolizer ของ CYP2C19 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

จะเห็นได้ว่ามีปัจจัยหลายอย่างที่มีความเกี่ยวข้องกับขนาดยาที่ใช้ และระดับยาเฟนิทอยน์ในเลือด ดังนั้นการปรับขนาดยาเฟนิทอยน์เพื่อให้ได้ขนาดยาที่เหมาะสมในผู้ป่วยแต่ละรายนั้นจึงจำเป็นต้องพิจารณาทั้งปัจจัยทางด้านพันธุกรรม และปัจจัยที่ไม่ใช่พันธุกรรมร่วมด้วย เพื่อที่จะสามารถปรับขนาดยาให้ได้ขนาดที่เหมาะสมอย่างรวดเร็ว ซึ่งจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษา ทำให้คนไข้สามารถควบคุมอาการชักได้เร็วขึ้น การพยากรณ์โรคดีขึ้น และยังช่วยลดโอกาสที่จะเกิดพิษจากยาอันเนื่องมาจากระดับยาในเลือดสูงเกินช่วงของการรักษา แต่จากการศึกษาที่ผ่านมาแล้วยังไม่ได้มีการศึกษาร่วมกันระหว่างปัจจัยทางพันธุกรรมของยีน *CYP2C9*, *CYP2C19* และ *ABCB1* กับปัจจัยที่ไม่ใช่พันธุกรรม ซึ่งได้แก่ การเกิดอันตรกิริยาระหว่างยาเฟนิทอยน์กับยาอื่นที่ผู้ป่วยได้รับร่วมกัน และเนื่องจากเชื้อชาติที่แตกต่างกันก็จะมี การแสดงออกของลักษณะทางพันธุกรรมของยีน *CYP2C9*, *CYP2C19* และ *ABCB1* ที่แตกต่างกันไป ดังนั้นในการศึกษานี้ ผู้วิจัยจึงต้องการที่จะศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความผันแปรทางพันธุกรรมของยีน *CYP2C9*, *CYP2C19* และ *ABCB1* ร่วมกับอิทธิพลของปัจจัยที่ไม่ใช่พันธุกรรม ซึ่งได้แก่ การเกิดอันตรกิริยาระหว่างยา รวมถึงลักษณะทั่วไปของผู้ป่วยได้แก่ เพศ อายุ และน้ำหนักตัว ต่อขนาดยาที่ใช้และระดับยาเฟนิทอยน์ในเลือดในผู้ป่วยโรคลมชักชาวไทย ซึ่งยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน และหาแบบจำลองเพื่ออธิบายความผันแปรของขนาดยาเฟนิทอยน์ที่ใช้และระดับยาเฟนิทอยน์ในเลือดในผู้ป่วยโรคลมชักชาวไทย ซึ่งอาจช่วยในการทำนายขนาดยาเฟนิทอยน์ที่เหมาะสมในผู้ป่วยแต่ละรายก่อนได้รับยา

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 ลักษณะตัวอย่างหรือประชากรที่ทำการศึกษา

3.1.1 ประชากรเป้าหมาย คือ ผู้ป่วยโรคลมชักเพศชายและเพศหญิงชาวไทยที่เข้ารับการรักษาที่แผนกผู้ป่วยนอก คลินิกประสาทวิทยา ในโรงพยาบาล 3 แห่ง ได้แก่ โรงพยาบาลพระมงกุฎเกล้า ถนนราชวิถี เขตราชเทวี กรุงเทพฯ โรงพยาบาลตำรวจ ถนนพระราม 1 เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ และโรงพยาบาลสุรินทร์ จังหวัดสุรินทร์

3.1.2 การเลือกตัวอย่าง

คัดเลือกตัวอย่างผู้ป่วยเข้าร่วมงานวิจัยตามเกณฑ์การคัดเลือกผู้ป่วยเข้า (Inclusion criteria) ดังนี้คือ

- เป็นผู้ป่วยที่มีอายุตั้งแต่ 15 ปีขึ้นไป
- เป็นผู้ป่วยที่ได้รับยาเฟนิทอยน์ในขนาดเดิมติดต่อกันเป็นระยะเวลาอย่างน้อย 2 เดือนก่อนเข้าสู่การวิจัย และหากผู้ป่วยมีการใช้ยาอื่น ๆ ร่วมด้วยจะต้องมีชนิดของยา และขนาดของยาอื่น ๆ ที่ใช้ร่วมนั้นคงที่ภายในระยะเวลา 2 เดือนก่อนเข้าสู่การวิจัย

ผู้ป่วยจะถูกคัดออกจากการวิจัยหากมีลักษณะเข้าตามเกณฑ์การคัดเลือกรุ่นตัวอย่างออก (Exclusion criteria) ดังนี้คือ

- เป็นผู้ป่วยที่มีภาวะชักโดยมีปัจจัยชักนำจากแอลกอฮอล์ (alcohol induced seizure)
- ผู้ป่วยที่ไม่ให้ความร่วมมือในการรับประทานยา (non compliance)
- ผู้ป่วยที่มีความผิดปกติในการทำหน้าที่ของตับและไต และมีระดับอัลบูมินในเลือดผิดปกติ
- ผู้ป่วยที่อยู่ระหว่างการตั้งครรภ์หรือให้นมบุตร

ประเมินความร่วมมือในการรับประทานยา (compliance) โดยการให้ผู้ป่วยหรือญาติบันทึกประวัติการรับประทานยาลงในปฏิทินบันทึกการรับประทานยา ร่วมกับการสัมภาษณ์ผู้ป่วยหรือญาติผู้ดูแล

การพิจารณาว่าผู้ป่วยให้ความร่วมมือในการรับประทานยาดี คือ ผู้ป่วยไม่มีการ ลืมทานยาเลยภายในระยะเวลา 1 เดือนก่อนนัดมาเจาะเลือดเพื่อตรวจวัดระดับยา

การพิจารณาว่าผู้ป่วยไม่ให้ความร่วมมือในการรับประทานยา คือ มีการลืมทาน ยาตั้งแต่ 1 ครั้งขึ้นไปภายในระยะเวลา 1 เดือนก่อนนัดมาเจาะเลือดเพื่อตรวจวัดระดับยา หรือเมื่อ ตรวจวัดระดับยาแล้วไม่พบยาเฟนิโทยในกระแสเลือด

3.1.3 ขนาดตัวอย่าง

การคำนวณขนาดตัวอย่างที่ใช้สำหรับการวิเคราะห์ข้อมูลแบบ Multiple Linear Regression จะใช้หลักเกณฑ์ Rule of Thumb (Tabachnic and Fidell, 2007) โดยมีข้อตกลง เบื้องต้นว่า ตัวแปรอิสระและตัวแปรตามมีความสัมพันธ์กันในระดับปานกลาง ($\alpha=0.05$ และ $\beta=0.20$)

กำหนดให้ m คือ จำนวนตัวแปรอิสระในการศึกษา จะได้ว่า

1. ขนาดตัวอย่างบนพื้นฐานการทดสอบสมมติฐาน เพื่อทดสอบว่ามีความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรอิสระแต่ละตัวกับตัวแปรตาม จะใช้จำนวนตัวอย่างมากกว่าหรือเท่ากับ $104 + m$ ($N \geq 104+m$)

2. ขนาดตัวอย่างบนพื้นฐานการประมาณค่า เพื่อต้องการหาสมการในการทำนายตัวแปรตาม จะใช้จำนวนตัวอย่างมากกว่าหรือเท่ากับ $50 + 8m$ ($N \geq 50+8m$)

ในการศึกษาครั้งนี้มีตัวแปรอิสระที่สนใจจะศึกษาจำนวน 3 ตัวแปร ได้แก่ ลักษณะทางพันธุกรรมของยีน *CYP2C9* *CYP2C19* และ *ABCB1* และตัวแปรอิสระอื่นๆจำนวน 4 ตัวแปร ได้แก่ อายุ เพศ น้ำหนักตัว และยาอื่นๆที่ใช้ร่วม รวมตัวแปรอิสระที่จะนำเข้าสู่สมการทั้งหมดเท่ากับ 7 ตัวแปร

ดังนั้นขนาดตัวอย่างที่ต้องใช้ในการศึกษาเป็นดังนี้คือ

1. ขนาดตัวอย่างบนพื้นฐานการทดสอบสมมติฐาน เพื่อทดสอบว่ามีความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรอิสระแต่ละตัวกับและตัวแปรตาม จะใช้จำนวนตัวอย่างมากกว่าหรือเท่ากับ $104 + 7 = 111$ คน

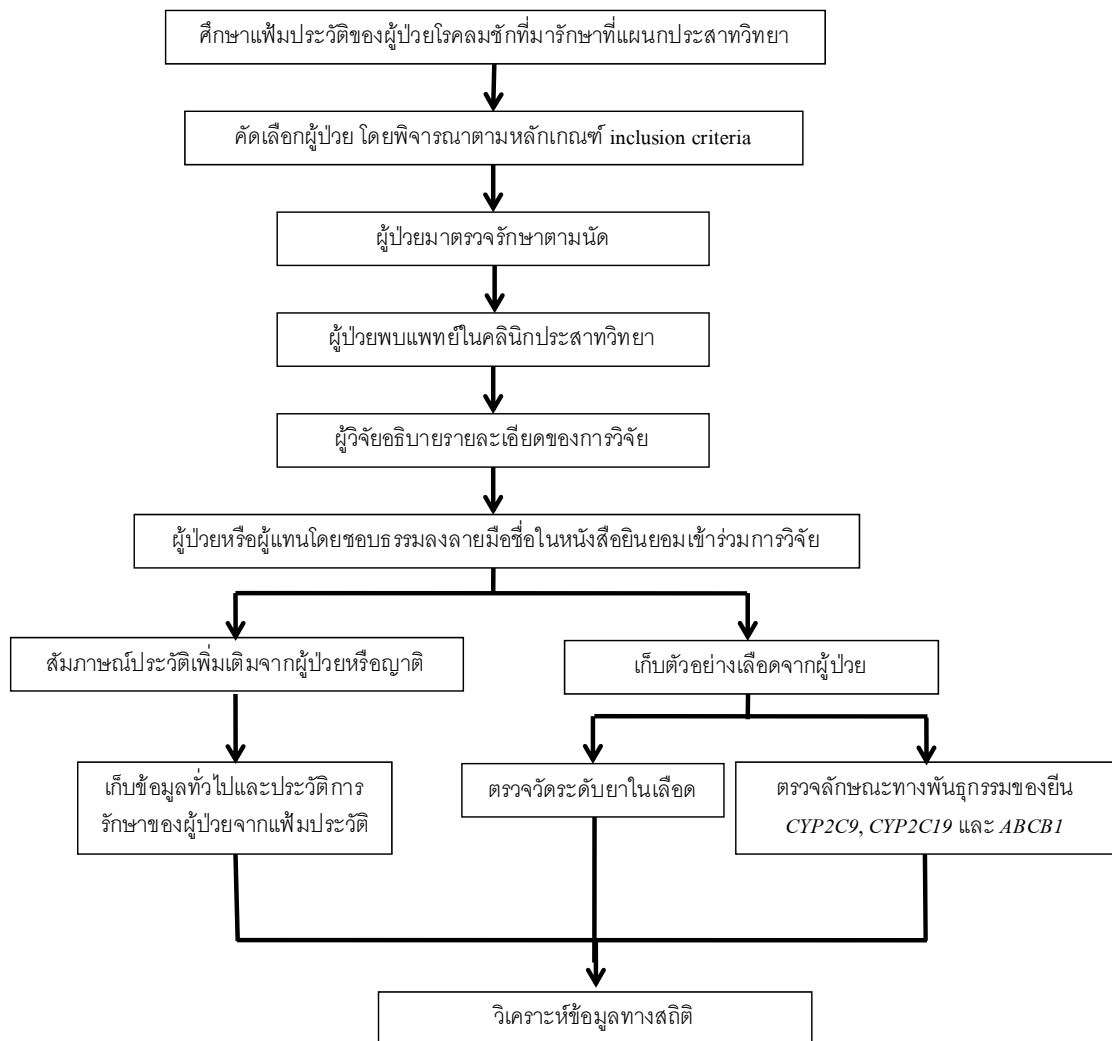
2. ขนาดตัวอย่างบนพื้นฐานการประมาณค่า เพื่อต้องการหาสมการในการทำนายตัวแปรตาม จะใช้จำนวนตัวอย่างมากกว่าหรือเท่ากับ $50 + 8*7 = 50 + 56 = 106$ คน

ดังนั้นในการศึกษานี้จะใช้จำนวนตัวอย่างอย่างน้อย 110 คน

3.2 วิธีการดำเนินการวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นรูปแบบการวิจัยโดยการสังเกต (Observational research) แบบภาคตัดขวาง (cross-sectional study)

3.2.1 แผนภูมิการดำเนินงาน



รูปที่ 5 แผนภาพแสดงขั้นตอนการดำเนินงานในการทำวิจัย

3.2.2 การดำเนินการวิจัย

1. การเก็บข้อมูลทั่วไปของผู้ป่วย

ข้อมูลทั่วไปของผู้ป่วย ได้แก่ อายุ เพศ น้ำหนักตัว ประวัติการใช้ยา การวินิจฉัยโรค และประวัติอื่นๆ จะเก็บจากแฟ้มประวัติผู้ป่วยนอก (OPD card) ร่วมกับการสัมภาษณ์เพิ่มเติมจากผู้ป่วยหรือญาติ

2. การเก็บตัวอย่างเลือด

หลังจากผู้ป่วยหรือผู้แทนโดยชอบธรรมลงลายมือชื่อยินยอมเข้าร่วมการวิจัย จะทำการเก็บตัวอย่างเลือดจากเส้นเลือดดำบริเวณแขนของผู้ป่วยแต่ละราย โดยแบ่งเก็บเป็น 2 ส่วน ส่วนหนึ่งใส่ลงใน serum tube ประมาณ 10 มิลลิลิตรเพื่อใช้ในการส่งตรวจระดับยาเพนิทอยน์ในเลือดที่ห้องปฏิบัติการ โรงพยาบาลพระมงกุฎเกล้า และตรวจการทำงานของตับและไต และอีกส่วนหนึ่งประมาณ 10 มิลลิลิตรใส่ใน EDTA tube เพื่อนำใช้ในการสกัด DNA

3. การเตรียมตัวอย่าง DNA

3.1 การแยก Buffy coat

นำตัวอย่างเลือดที่อยู่ใน EDTA tube มาปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ที่ควบคุมอุณหภูมิได้ ความเร็วรอบ 2500 rpm เวลา 15 นาที อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส แล้วดูดูเอาชั้น Buffy coat ซึ่งจะเห็นลักษณะเป็นชั้นบางๆ สีขาวตรงรอยต่อระหว่างพลาสมาและเซลล์เม็ดเลือดแดง จากนั้นนำตัวอย่างชั้น Buffy coat ที่ดูได้ไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งเพื่อแยกชั้นพลาสมาที่ปะปนมาออก แล้วเก็บเฉพาะชั้น Buffy coat ไว้ โดยเก็บตัวอย่าง Buffy coat ที่ได้ไว้ในตู้แช่ -20 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำไปสกัด DNA

3.2 การแยกเอาเม็ดเลือดแดงออกจากชั้น Buffy coat

ใช้ Erythrocyte lysis buffer (QIAGEN, German) ล้างเอาเม็ดเลือดแดงออกก่อนที่จะนำไปสกัด DNA โดยมีขั้นตอนดังนี้คือ ผสม Erythrocyte lysis buffer เข้ากับ Buffy coat ที่แยกได้ทั้งหมด แล้วนำไปแช่ในน้ำแข็ง (4 องศาเซลเซียส) จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ที่ควบคุมอุณหภูมิได้ ความเร็วรอบ 400 g เวลา 10 นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วเทส่วนน้ำด้านบนทิ้ง เหลือส่วนตะกอนไว้ จากนั้นจึงเติม Erythrocyte lysis buffer ลงไปผสมให้เข้ากันอีกครั้ง จากนั้นนำไปแช่ในน้ำแข็ง (4 องศาเซลเซียส) ไว้เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปปั่น

เหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 400 g เวลา 10 นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วเทส่วนน้ำออก แล้วล้างตะกอน Buffy coat ที่เหลือด้วยสารละลาย PBS จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง ดูดเอาส่วนน้ำทิ้งไป แล้วจึงเก็บส่วน Buffy coat ที่ได้ไว้ในตู้แช่ -20 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำไปสกัด DNA

3.3 การสกัด DNA จาก buffy coat

ทำการสกัด DNA โดยใช้ชุดสกัด QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN, German) ซึ่งมีวิธีการดังต่อไปนี้คือ เติมตัวอย่าง buffy coat ที่ผสมกับ PBS 200 ไมโครลิตร ลงใน QIAGEN protease 20 ไมโครลิตร ตามด้วยการเติม Buffer AL (lysis buffer) 200 ไมโครลิตร ลงในตัวอย่าง แล้วผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำตัวอย่างไป incubate ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วเติม absolute ethanol 200 ไมโครลิตร ลงในตัวอย่าง ผสมให้เข้ากัน แล้วดูดตัวอย่างทั้งหมดใส่ลงใน spin column จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที ทิ้ง filtrate ไป จากนั้นเติม Buffer AW1 500 ไมโครลิตรลงใน column แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที ทิ้ง filtrate ไป จากนั้นเติม Buffer AW2 500 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm เป็นเวลา 3 นาที ทิ้ง filtrate ไป แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นทำการชะ DNA ออกมาโดยการเติม Buffer AE 100 ไมโครลิตร แล้ว incubate ไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที จะได้ filtrate คือ DNA ที่ต้องการ จากนั้นนำ DNA ที่ได้ไปวัดความเข้มข้นโดยใช้เครื่อง Nanodrop แล้วเก็บ DNA ที่สกัดได้ไว้ในตู้แช่ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาตรวจลักษณะ genotype ต่อไป

4. การตรวจลักษณะ Genotype ของ SNPs ในยีน *CYP2C9* *CYP2C19* และ *ABCB1*

ทำการตรวจลักษณะ genotype ของ SNPs ในยีน *CYP2C9*, *CYP2C19* และ *ABCB1* โดยใช้ชุดทดสอบ TaqMan[®] Drug Metabolism Genotyping (Applied Biosystem, USA) ซึ่งมีวิธีการดังนี้คือ

4.1 การเตรียมตัวอย่าง DNA

ทำการเจือจางตัวอย่าง DNA ด้วย DNase free water ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายประมาณ 10 นก./มคล.

4.2 การเตรียม reaction mixture

เตรียม reaction mixtures ให้มีปริมาตรต่อหนึ่งปฏิกิริยาเท่ากับ 10 ไมโครลิตร โดยมีส่วนประกอบดังแสดงในตารางที่ 4 และใช้ DNase free water เป็น negative control

ตารางที่ 4 แสดงส่วนประกอบในปฏิกิริยา PCR การตรวจลักษณะ genotype ของยีน

ส่วนประกอบในปฏิกิริยา	ปริมาตรต่อหนึ่งปฏิกิริยา (มคล.)
2X TaqMan Genotyping Master Mix	5
20X Taqman Drug Metabolism Genotyping Assay	0.5
DNase free Water	2.5
ตัวอย่าง DNA (10 นาโนกรัม/ไมโครลิตร)	2
ปริมาตรรวมต่อหนึ่งปฏิกิริยา	10

จำนวน SNPs ที่ต้องการตรวจมีทั้งหมด 4 SNPs คือ *CYP2C9*3* (rs1057910), *CYP2C19*2* (rs4244285), *CYP2C19*3* (rs4986893) และ *ABCB1 C3435T* (rs1045642)

ทำการเตรียม reaction mixture ของแต่ละ SNPs โดยคำนวณปริมาตรรวมที่ต้องใช้ของ 2X TaqMan Genotyping Master Mix, 20X Taqman Drug Metabolism Genotyping Assay และ DNase free Water ในแต่ละ reaction mixture โดยเตรียมเกินไว้ 5 ปฏิกิริยา ตัวอย่างเช่น มีตัวอย่าง DNA ที่ต้องการตรวจ 120 ตัวอย่าง รวมกับ negative control อีก 1 ตัวอย่าง ดังนั้นในการเตรียม reaction mixture ของแต่ละ SNPs ควรเตรียมเป็น 126 ปฏิกิริยา เป็นต้น ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 แสดงปริมาณของแต่ละส่วนประกอบในแต่ละ reaction mixture

ส่วนประกอบในปฏิกิริยา	ปริมาตรต่อหนึ่ง ปฏิกิริยา (มคล.)	X ปฏิกิริยา (มคล.)	126 ปฏิกิริยา (มคล.)
2X TaqMan Genotyping Master Mix	5	5X	630
20X Taqman Drug Metabolism Genotyping Assay	0.5	0.5X	63
DNase free Water	2.5	2.5X	315
ปริมาตรรวมต่อหนึ่งปฏิกิริยา	8	8X	1008

ทำการเตรียม reaction mixture ของแต่ละ SNPs โดยการเปิด 2X TaqMan Genotyping Master Mix, 20X Taqman Drug Metabolism Genotyping Assay และ DNase free Water ตามปริมาตรที่ได้คำนวณไว้ดังแสดงในตารางที่ 5 ใส่ลงใน microcentrifuge tube แล้วนำไปผสมให้เข้ากัน โดยเตรียมที่ละ SNPs จนครบทั้ง 4 SNPs เก็บ reaction mixture ที่เตรียมเสร็จแล้วไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสตลอดเวลา

4.3 การเตรียม reaction plate

เติม reaction mixture ของแต่ละ SNPs ปริมาตร 8 ไมโครลิตรใส่ลงในแต่ละช่องของ PCR plate ให้ครบตามจำนวนตัวอย่าง DNA ที่ต้องการตรวจ และ อีก 1 ช่องสำหรับ negative control จากนั้นเติมตัวอย่าง DNA จำนวน 2 ไมโครลิตร ใส่ลงในแต่ละช่องของ reaction plate ที่ได้เติม reaction mixture ไว้แล้วจนครบทุกตัวอย่าง และเติม DNase free Water ในช่อง negative control ของแต่ละ SNPs โดยทำแบบเดียวกันทั้ง 4 SNPs จากนั้นนำแผ่นฟิล์มมาปิด reaction plate ให้สนิท แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง จากนั้นจึงนำ reaction plate ที่เตรียมเสร็จแล้วไป run PCR ต่อไป

4.4 การ run PCR

ทำการ run PCR โดยใช้เครื่อง ABI 7500 Real-Time PCR (Applied Biosystems, USA) โดยทำการตั้งค่าอุณหภูมิและระยะเวลาของแต่ละขั้นตอนในการทำ PCR ไว้ดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 แสดงการตั้งค่าอุณหภูมิและระยะเวลาของแต่ละขั้นตอนในการทำ PCR

ระยะเวลาและอุณหภูมิ		
Initial Steps	Denature	Anneal/Extension
HOLD	50 Cycles	
10 นาที 95 องศาเซลเซียส	15 วินาที 92 องศาเซลเซียส	90 วินาที 60 องศาเซลเซียส

หลังจากการ run PCR เสร็จสมบูรณ์แล้ว ลักษณะ genotype ของ SNPs ในยีน *CYP2C9*, *CYP2C19* และ *ABCB1* จะถูกวิเคราะห์ต่อด้วยโปรแกรม ABI 7500 software เวอร์ชัน 2.0.4

5. การตรวจวัดระดับยาเฟนิทอยน์ในเลือด

ระดับยาเฟนิทอยน์ในเลือดจะถูกตรวจวิเคราะห์โดยหลักการ Fluorescence Polarization Immunoassay (FPIA) โดยใช้เครื่องมือ AxSYM System (Abbott, USA) ที่ห้องปฏิบัติการ หน่วยพยาธิวิทยา โรงพยาบาลพระมงกุฎเกล้า

3.3 การวิเคราะห์ข้อมูล

3.3.1 ข้อมูลทั่วไปของผู้ป่วย

- เพศ ยาอื่น ๆ ที่ใช้ร่วม อาการไม่พึงประสงค์ และโรคร่วมอื่นๆ แสดงในรูปความถี่ และร้อยละ

- อายุ น้ำหนักตัว ขนาดยาเฟนิทอยน์ที่ใช้ และระดับยาเฟนิทอยน์ในเลือด แสดงในรูปค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean \pm SD)

3.3.2 ความถี่ของ SNPs ในยีน *CYP2C9* *CYP2C19* และ *ABCB1* (allele frequencies และ genotype frequencies) แสดงในรูปร้อยละ (ช่วงความเชื่อมั่น 95%) และทดสอบ Hardy - Weinberg Equilibrium โดยใช้ Chi-square test

3.3.3 เปรียบเทียบความถี่อัลลีลของแต่ละ SNPs ที่ได้จากการศึกษานี้กับการศึกษาอื่นๆ รวมถึงในประชากรชาวเอเชียเชื้อชาติอื่นๆ โดยใช้ Z-test

3.3.4 หาความสัมพันธ์ของปัจจัยต่างๆแต่ละปัจจัย กับขนาดยาหรือระดับยาเฟนิทอยน์ในเลือด (bivariate correlation) โดยใช้ Pearson's correlation หรือ non parametric Spearman-rank correlation

3.3.5 เปรียบเทียบความแตกต่างของขนาดยาหรือระดับยาเฟนิทอยน์ในเลือดระหว่างแต่ละกลุ่มย่อย โดยใช้ Student's t-test หรือ one-way ANOVA เมื่อข้อมูลมีการแจกแจงปกติ หรือใช้ Mann-Whitney Test หรือ Kruskal-Wallis test เมื่อข้อมูลมีการแจกแจงไม่ปกติ

3.3.6 หาความสัมพันธ์ของปัจจัยทางพันธุกรรม ร่วมกับปัจจัยที่ไม่ใช่พันธุกรรมกับขนาดยาเฟนิทอยน์และระดับยาในเลือดโดยใช้ Stepwise Multiple Linear Regression analysis

ข้อมูลทั้งหมดจะถูกวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม SPSS เวอร์ชัน 17 ซึ่งจะพิจารณาค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$)

บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

4.1 ข้อมูลทั่วไปของผู้ป่วย

ในการศึกษานี้มีผู้ป่วยอาสาสมัครได้รับคัดเลือกเข้าร่วมงานวิจัยและเซ็นยินยอมเข้าร่วมงานวิจัยทั้งสิ้น 120 คน แต่มีผู้ป่วยอาสาสมัครถูกคัดออกจากการงานวิจัยทั้งสิ้น 12 คน เนื่องจาก ไม่ให้ความร่วมมือในการรับประทานยา (non compliance) จำนวน 7 คน มีประวัติการใช้ยาไม่ชัดเจน จำนวน 1 คน และปฏิเสธการเข้าร่วมงานวิจัยในภายหลังด้วยเหตุผลส่วนตัว 4 คน จึงเหลือผู้ป่วยอาสาสมัครที่เข้าสู่งานวิจัยและการวิเคราะห์ข้อมูลทั้งสิ้น 108 คน

ข้อมูลเกี่ยวกับลักษณะทั่วไปและข้อมูลทางคลินิกของผู้ป่วยได้แสดงไว้ในตารางที่ 7 โดยผู้ป่วยอาสาสมัคร 108 คนเป็นผู้ป่วยที่มีอายุอยู่ในช่วง 19 – 77 ปี และมีน้ำหนักตัวเฉลี่ยประมาณ 60 กิโลกรัม ผู้ป่วยทุกรายไม่มีความบกพร่องในการทำงานของตับและไต

อายุเฉลี่ยที่ผู้ป่วยเริ่มมีอาการชักคือ ประมาณ 25 ปี โดยผู้ป่วยส่วนใหญ่ประมาณร้อยละ 90 เป็นโรคลมชักชนิด focal epilepsy ขนาดยาเฟนิทอยน์เฉลี่ยที่ผู้ป่วยได้รับเท่ากับ 5.04 ± 1.17 มก./วัน/กก. และมีระดับยาเฟนิทอยน์ในเลือดโดยเฉลี่ยเท่ากับ 14.31 ± 0.20 มคก./มล. โดยผู้ป่วยประมาณร้อยละ 34 มีระดับยาในเลือดต่ำกว่าช่วง therapeutic range และอีกประมาณร้อยละ 21 มีระดับยาในเลือดสูงกว่าช่วง therapeutic range แต่ที่น้ำตาลต่ำสุดของผู้ป่วยแต่ละรายนั้นไม่พบอาการไม่พึงประสงค์ที่สัมพันธ์กับระดับยาในเลือด ส่วนอาการไม่พึงประสงค์ที่พบขณะผู้ป่วยมาตรวจรักษาที่น้ำตาลต่ำสุดคือ ภาวะเหงือกหนาตัวผิดปกติ (gum hypertrophy) ในผู้ป่วย 9 ราย ผู้ป่วยร้อยละ 16 เคยมีประวัติการเกิดอาการไม่พึงประสงค์จากยาเฟนิทอยน์ ซึ่งอาการที่เกิดขึ้นได้แก่ ภาวะเหงือกหนาตัวผิดปกติ (gum hypertrophy) เดินเซ (ataxia) อาเจียน วิงเวียน และภาวะตับอักเสบ

ในการศึกษานี้มีผู้ป่วยประมาณร้อยละ 57 ได้รับยาอื่นๆควบคู่ไปกับยาเฟนิทอยน์ด้วย และเมื่อพิจารณาถึงลักษณะการได้รับยากันชัก พบว่าผู้ป่วยประมาณร้อยละ 65 ได้รับยาเฟนิทอยน์เพื่อควบคุมอาการชักเพียงตัวเดียว (monotherapy) และอีกประมาณร้อยละ 35 ได้รับยากันชักร่วมกันตั้งแต่สองชนิดขึ้นไป (polytherapy)

ตารางที่ 7 แสดงข้อมูลทั่วไปและข้อมูลทางคลินิกของผู้ป่วย

ลักษณะผู้ป่วย/ข้อมูลทางคลินิก	ความถี่, (ค่าเฉลี่ย \pm ส่วน เบี่ยงเบนมาตรฐาน)	ร้อยละ, (พิสัย)
จำนวนผู้ป่วยทั้งหมด (คน)	108	
เพศ		
เพศชาย	63	58.30
เพศหญิง	45	41.70
อายุ (ปี)	(43.55 \pm 14.57)	(19 - 77)
ช่วงอายุ		
<20 ปี	4	3.70
20-29 ปี	18	16.67
30-39 ปี	24	22.22
40-49 ปี	23	21.30
50-59 ปี	21	19.44
60-69 ปี	14	12.96
\geq 70 ปี	4	3.70
น้ำหนักตัว (กก.)	(60.43 \pm 11.47)	(40 - 94)
อายุที่เริ่มมีอาการชัก (ปี), N=103	(24.899 \pm 17.500)	(0.25 - 71)
ชนิดของโรคลมชัก		
Focal epilepsy	97	89.81
Generalized epilepsy	4	3.70
Secondary generalized epilepsy	2	1.85
Unspecified	5	4.63
ลักษณะการได้รับยารักษาโรคลมชัก		
ใช้ยากันชักตัวเดียว (Monotherapy)	70	64.81
ใช้ยากันชักร่วมกันหลายตัว (Polytherapy)	38	35.19

ลักษณะผู้ป่วย/ข้อมูลทางคลินิก	ความถี่, (ค่าเฉลี่ย \pm ส่วน เบี่ยงเบนมาตรฐาน)	ร้อยละ, (พิสัย)
จำนวนรายการยาทั้งหมดที่ผู้ป่วยได้รับ		
ได้รับยา 1 ตัว	46	42.59
ได้รับยา 2 ตัว	28	25.93
ได้รับยา 3 ตัว	12	11.11
ได้รับยา 4 ตัว	8	7.41
ได้รับยา 5 ตัว	6	5.56
ได้รับยามากกว่า 5 ตัว	8	7.41
ขนาดยาเฟนิทอยน์ที่ได้รับต่อวัน (มก./วัน)	(295.14 \pm 47.42)	(100 - 400)
ขนาดยาเฟนิทอยน์ที่ได้รับต่อวันต่อน้ำหนักตัว (มก./วัน/กก.)	(5.037 \pm 1.174)	(1.67 - 7.50)
ระดับยาเฟนิทอยน์ในเลือด (มคก./มล.)	(14.312 \pm 8.199)	(1.23 - 46.28)
ระดับยาเฟนิทอยน์ในเลือดต่อขนาดยาต่อน้ำหนัก (มคก./มล./มก./กก.)	(2.768 \pm 1.321)	(0.253-6.942)
ช่วงของระดับยาเฟนิทอยน์ในเลือด		
<10 มคก./มล.	37	34.26
10 - 20 มคก./มล.	48	44.44
>20 มคก./มล.	23	21.30
ประวัติการเกิดอาการไม่พึงประสงค์		
ไม่เคย	91	84.26
Ataxia	5	4.63
Gum hypertrophy	8	7.41
Gum hypertrophy และ Ataxia	1	0.93
Vomitting with high blood level	1	0.93
Dizziness	1	0.93
Hepatitis	1	0.93

ลักษณะผู้ป่วย/ข้อมูลทางคลินิก	ความถี่, (ค่าเฉลี่ย ± ส่วน เบี่ยงเบนมาตรฐาน)	ร้อยละ, (พิสัย)
การเกิดอาการไม่พึงประสงค์ (ที่นับล่าสุด)		
ไม่มี	99	91.67
Gum hypertrophy	9	8.33
ประวัติการมีโรคร่วมอื่นๆ		
ไม่มี	85	78.70
มี	23	21.30

ตารางที่ 8 ได้แสดงข้อมูลทั่วไปและข้อมูลทางคลินิกของผู้ป่วยโดยแยกระหว่างเพศชายและเพศหญิง ซึ่งในการศึกษานี้มีผู้ป่วยเพศชายร้อยละ 58 และเพศหญิงร้อยละ 42 เพศชายมีน้ำหนักตัวมากกว่าเพศหญิงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) โดยอายุเฉลี่ยที่เริ่มมีอาการชักในเพศชายและเพศหญิงนั้นมีค่าใกล้เคียงกัน คือประมาณ 25 ปีในเพศชาย และประมาณ 23 ปีในเพศหญิง และเมื่อพิจารณาขนาดยาเฟนิทอยน์ที่ผู้ป่วยได้รับต่อน้ำหนักตัวพบว่าในเพศหญิงมีขนาดสูงกว่าเพศชายอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) ในทำนองเดียวกันนี้ระดับยาเฟนิทอยน์ในเลือด ระดับยาต่อขนาดยา และระดับยาต่อขนาดยาต่อน้ำหนักตัวในเพศหญิงมีค่าสูงกว่าเพศชายอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$, $p < 0.001$ และ $p = 0.015$ ตามลำดับ) เช่นเดียวกัน

ตารางที่ 8 ข้อมูลทั่วไปและข้อมูลทางคลินิกของผู้ป่วยระหว่างเพศชายและเพศหญิง แสดงข้อมูลในรูปของค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน [พิสัย]

ข้อมูลทั่วไป/ข้อมูลทางคลินิก	เพศชาย	เพศหญิง
จำนวนผู้ป่วย (ราย [%])	63 [58%]	45 [42%]
อายุ (ปี)	43.63±14.54 [19-72]	43.42±14.79 [19-77]
น้ำหนักตัว (กก.)	64.74±11.24 [43-94]	54.50±8.82 [†] [40-72]
อายุที่เริ่มมีอาการชัก (ปี), N=103	25.874±18.022 [0.67-66], (n=60)	23.536±16.861 [0.25-71], (n=43)
ขนาดยาเฟนิทอยน์ที่ได้รับต่อวัน (มก./วัน)	296.43±44.42 [100-400]	293.33±51.79 [100-400]

ข้อมูลทั่วไป/ข้อมูลทางคลินิก	เพศชาย	เพศหญิง
ขนาดยาเฟนิทอยน์ที่ได้รับต่อวัน	4.707±1.051	5.499±1.193 [†]
ต่อน้ำหนักตัว (มก./วัน/กก.)	[1.67-6.98]	[1.98-7.5]
ระดับยาเฟนิทอยน์ในเลือด (มคก./มล.)	12.056±7.370	17.471±8.332 [#]
ระดับยาเฟนิทอยน์ในเลือดต่อ ขนาดยา (มคก./มล./มก.)	[0.0046-0.1527]	[0.0138-0.1368]
ระดับยาเฟนิทอยน์ในเลือดต่อ ขนาดยาต่อน้ำหนักตัว (มคก./มล./มก./กก.)	2.491±1.194	3.157±1.403 ^{##}
	[0.253-6.942]	[0.697-6.705]

[†] มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างเพศชายกับเพศหญิง $p < 0.001$, Student's t-test

[#] มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างเพศชายกับเพศหญิง $p < 0.001$, Mann-Whitney test

^{##} มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างเพศชายกับเพศหญิง $p = 0.015$, Mann-Whitney test

ตารางที่ 9 ได้แสดงรายการยาอื่นๆที่ผู้ป่วยได้รับร่วมกับยาเฟนิทอยน์ โดยชนิดยาที่มีการใช้ร่วมกับเฟนิทอยน์มากที่สุดคือ folic acid (12.5%) ส่วนกลุ่มยาที่มีการใช้ร่วมกับเฟนิทอยน์มากที่สุดคือ ยาในกลุ่มยากันชัก และชนิดยากันชักที่มีการใช้ร่วมกับเฟนิทอยน์มากที่สุดคือ sodium valproate (9.56%) รองลงมาคือ carbamazepine (7.35%)

เมื่อพิจารณาถึงระดับนัยสำคัญของการเกิดอันตรกิริยาระหว่างเฟนิทอยน์และยาอื่นๆที่ได้รับร่วมด้วย พบว่า sodium valproate, carbamazepine, clobazam และ folic acid เป็นยาร่วมที่มีระดับนัยสำคัญของการเกิดอันตรกิริยากับเฟนิทอยน์ในระดับ 2 (sig.2) คือมีระดับความรุนแรงของการเกิดอันตรกิริยาในระดับปานกลาง (moderate) ซึ่งผลที่เกิดขึ้นทำให้ผู้ป่วยมีอาการเลวลง ต้องการการรักษาเพิ่มขึ้น ต้องนอนพักรักษาตัวในโรงพยาบาลหรืออยู่ในโรงพยาบาลนานขึ้น (Tatro, 2010) ดังนั้นในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของขนาดยาและระดับยาเฟนิทอยน์ในเลือดกับปัจจัยทางพันธุกรรมร่วมกับปัจจัยที่ไม่ใช่พันธุกรรมนั้น จะเลือกพิจารณาเฉพาะยาทั้ง 4 ตัวดังกล่าวนี้

ตารางที่ 9 แสดงร้อยละของรายการยาอื่นๆที่ผู้ป่วยได้รับร่วมกับยาเฟนิทอยน์และระดับนัยสำคัญทางคลินิกของการเกิดอันตรกิริยาระหว่างยา[#]

รายการยาที่ใช้ร่วม	จำนวนผู้ป่วย	ร้อยละ
กลุ่มยากันชัก (antiepileptic drugs)	57	41.91
Sodium valproate [sig.2]	13	9.56
Carbamazepine [sig.2]	10	7.35
Clobazam [sig.2]	3	2.21
Topiramate [sig.4]	6	4.41
Phenobarbital [sig.5]	12	8.82
Clonazepam [sig.4]	6	4.41
Levetiracetam	3	2.21
Gabapentin [sig.4]	1	0.74
Pregabalin	2	1.47
Oxcarbazepine	1	0.74
กลุ่มวิตามิน (Vitamins)	23	16.91
Folic acid [sig.2]	17	12.50
B1-6-12	3	2.21
Multivitamin	1	0.74
FBC	1	0.74
Vitamin E	1	0.74
กลุ่มยาลดไขมันในเลือด (Lipid lowering agent)	12	8.82
Simvastatin	8	5.88
Rosuvastatin	2	1.47
Atorvastatin	2	1.47
กลุ่มยาลดความดันโลหิต (Antihypertensive agent)	18	13.24
Nifedipine	1	0.74
Amlodipine	3	2.21
Felodipine	2	1.47
Manidipine	1	0.74
Nicardipine	1	0.74

รายการยาที่ใช้ร่วม	จำนวนผู้ป่วย	ร้อยละ
กลุ่มยาลดความดันโลหิต (Antihypertensive agent)		
Propranolol	1	0.74
Atenolol	4	2.94
Metoprolol	1	0.74
Valsartan	1	0.74
Losartan	1	0.74
Doxazocin	1	0.74
Tamzulocin HCl	1	0.74
กลุ่มยาขับปัสสาวะ (Diuretic drug)		
HCTZ	2	1.47
Spironolactone	1	0.74
กลุ่มยารักษาโรคเบาหวาน (Antidiabetic drug)		
Glimepiride	1	0.74
Metformin	1	0.74
กลุ่มยาคลายเครียด และยารักษาจิตเวช		
Nortryptyliline [sig.4]	3	2.21
Amitryptyliline [sig.4]	1	0.74
Perphenazine	1	0.74
Trihexyphenidyl	1	0.74
Haloperidol	1	0.74
Chlorazepate dipotassium	1	0.74
Tianeptine	1	0.74

รายการยาที่ใช้ร่วม	จำนวนผู้ป่วย	ร้อยละ
ยาอื่นๆ	12	8.82
Aspirin [sig.5]	6	4.41
Isosorbide dinitrate	1	0.74
Piracetam	1	0.74
Rivastigmin	1	0.74
Thyroxine Sodium	1	0.74
Levothyroxine	1	0.74
Bethanechol	1	0.74
รวม	136	100.00

ความหมายและการกำหนดระดับนัยสำคัญทางคลินิกได้แสดงไว้ในภาคผนวก ค

ในการศึกษานี้พบว่า ผู้ป่วยโรคลมชักร้อยละ 21 มีโรคอื่น ๆ ร่วมด้วย โดยโรคร่วมที่พบส่วนใหญ่จะเกี่ยวข้องกับระบบหัวใจและหลอดเลือด ซึ่งโรคร่วมที่พบมากที่สุดของผู้ป่วยคือโรคความดันโลหิตสูง (36.36%) รองลงมาคือ ภาวะไขมันในเลือดสูง (21.21%) นอกจากนี้ยังมีโรคอื่น ๆ อีกซึ่งได้แสดงไว้ในตารางที่ 10

ตารางที่ 10 แสดงรายการโรคร่วมอื่นๆของผู้ป่วย*

โรคร่วม	จำนวน	ร้อยละ	โรคร่วม (ต่อ)	จำนวน	ร้อยละ
Hypertension	12	36.36	Diabetes mellitus	1	3.03
Dyslipidemia	7	21.21	Acoustic neuroma	1	3.03
Old CVA	3	9.09	Psychosis	1	3.03
Stroke	2	6.06	Post-TB meningitis	1	3.03
CVD	2	6.06	Thyrotoxicosis	1	3.03
Migraine	2	6.06	รวม	33	100

*ผู้ป่วยบางรายมีโรคร่วมมากกว่า 1 ชนิด

4.2 ความถี่ของ SNPs ในยีน *CYP2C9* *CYP2C19* และ *ABCB1* (allele frequencies และ genotype frequencies)

ผลการตรวจ candidate SNPs ในยีน *CYP2C9* *CYP2C19* และ *ABCB1* จากตัวอย่าง DNA ของผู้ป่วยอาสาสมัครจำนวน 120 ราย ได้แสดงไว้ในตารางที่ 11 โดยพบว่า minor allele frequencies ของยีน *CYP2C9**3 *CYP2C19**2 *CYP2C19**3 และ *ABCB1*(3435C>T) ในผู้ป่วยโรคลมชักชาวไทย มีค่าเท่ากับ 2.5% 26.7% 0.4% และ 43.8% ตามลำดับ

ตารางที่ 11 แสดงความถี่อัลลีล (allele frequencies) ของ candidate SNPs ในยีน *CYP2C9* *CYP2C19* และ *ABCB1*

SNPs	จำนวนอัลลีล	% Allele frequency (95%CI)
<i>CYP2C9</i>*3 (1075A>C)		
A allele	234	97.5 (95.5-99.5)
C allele	6	2.5 (0.5-4.5)
รวม	240	
<i>CYP2C19</i>*2 (681 G>A)		
G allele	176	73.3 (67.7- 78.9)
A allele	64	26.7 (21.1-32.3)
รวม	240	
<i>CYP2C19</i>*3 (636 G>A)		
G allele	239	99.6 (98.8-100.2)
A allele	1	0.4 (-0.4-1.2)
รวม	240	
<i>ABCB1</i> (3435C>T)		
C allele	135	56.3 (50.0-62.5)
T allele	105	43.8 (37.5-50.0)
รวม	240	

ผลการตรวจลักษณะ genotype และความถี่ของแต่ละ genotype ของ SNPs ใน ยีน *CYP2C9* *CYP2C19* และ *ABCB1* ได้แสดงไว้ในตารางที่ 12 โดยไม่พบ homozygous genotype คือ *CYP2C9**3/*3 และ *CYP2C19**3/*3 ในกลุ่มผู้ป่วยโรคลมชักชาวไทยที่ศึกษา และพบว่าทุก genotype ของยีน *CYP2C9**3 *CYP2C19**2 *CYP2C19**3 และ *ABCB1* C3435T นั้น อยู่ในสมดุลของฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก (Hardy-Weinberg equilibrium) ($p > 0.05$, Chi-Square Test) (การทดสอบสมดุลของฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก แสดงไว้ในภาคผนวก ง)

ตารางที่ 12 แสดงความถี่ของจีโนไทป์ (genotype frequencies) ของ candidate SNPs ในยีน *CYP2C9* *CYP2C19* และ *ABCB1*

SNPs	Genotypes	จำนวน	% genotype frequency
<i>CYP2C9</i> *3 (c.1075A>C)	AA (*1/*1)	114	95.00
	AC (*1/*3)	6	5.00
	CC (*3/*3)	0	0.00
	รวม	120	
<i>CYP2C19</i> *2 (c.681 G>A)	GG (*1/*1)	62	51.67
	GA (*1/*2)	52	43.33
	AA (*2/*2)	6	5.00
	รวม	120	
<i>CYP2C19</i> *3 (c.636 G>A)	GG (*1/*1)	119	99.17
	GA (*1/*3)	1	0.83
	AA (*3/*3)	0	0.00
	รวม	120	
<i>ABCB1</i> (3435C>T)	CC	39	32.50
	CT	57	47.50
	TT	24	20.00
	รวม	120	

สำหรับการตรวจหา polymorphisms ของยีน *CYP2C9* ในการศึกษาคั้งนี้ผู้วิจัย ไม่ได้เลือก *CYP2C9**2 ซึ่งเป็น common SNPs ตัวหนึ่งของยีน *CYP2C9* มาเป็น candidate SNPs เนื่องจากการศึกษาก่อนหน้านี้ในชาวไทย (Kuanprasert et al., 2009; Sangviroon, 2007)

และชาวเอเชียเชื้อสายอื่นๆ นั้นไม่พบอัลลีล CYP2C9*2 ยกเว้นในชาวอินเดียที่อาศัยอยู่ในประเทศมาเลเซีย (Seng et al., 2003) ดังนั้นในการศึกษานี้จึงตรวจหาเฉพาะอัลลีล CYP2C9*3 ซึ่งจากผลการศึกษาเมื่อเปรียบเทียบความถี่อัลลีลของ CYP2C9*3 ที่ได้จากกลุ่มตัวอย่างคนไข้โรคลมชักในครั้งนี้นี้ พบว่ามีความถี่ไม่แตกต่างจากการศึกษาอื่นๆ ก่อนหน้านี้ในคนไทย (Sangviroon, 2007; Kuanprasert et al., 2009) รวมถึงชาวเอเชียอื่นๆ ได้แก่ ชาวจีน ชาวญี่ปุ่น ชาวเวียดนาม ชาวมาเลเซีย และชาวเกาหลี แต่มีความแตกต่างจากชาวอินเดียที่อาศัยอยู่ในประเทศมาเลเซีย (Seng et al., 2003) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังแสดงในตารางที่ 13

ตารางที่ 13 แสดงการเปรียบเทียบความถี่อัลลีลของ CYP2C9*2 และ CYP2C9*3 ระหว่างประชากรเชื้อชาติต่างๆ ในเอเชีย

Ethnicity	n	CYP2C9*2	n	CYP2C9*3	เอกสารอ้างอิง
Thai	-	-	240	6 (2.5%)	การศึกษานี้
Thai	484	0%	484	12 (2.5%)	Kuanprasert et al., 2009
Thai	254	0%	254	5 (2.0%)	Sangviroon, 2007
Chinese	2174	0%	2174	79 (3.6%)	Hong et al., 2005
Chinese	1008	0%	1008	33 (3.3%)	Yu et al., 2004
Chinese	196	0%	196	5 (2.6%)	Sullivan-Klose et al., 1996
Chinese	270	0%	230	4 (1.7%)	Wang et al., 1995
Chinese	246	0%	266	11 (4.1%)	Xie et al., 2002b
Chinese	204	0%	204	10 (4.9%)	Gaedigk et al., 2001
Chinese*	254	0%	254	6 (2.4%)	Seng et al., 2003
Japanese	436	0%	436	9 (2.1%)	Nasu et al., 1997
Japanese	172	0%	172	3 (1.7%)	Takahashi et al., 1998
Japanese	280	0%	280	5 (1.8%)	Kimura et al., 1998
Japanese	268	0%	268	3 (1.1%)	Mamiya et al., 1998
Vietnamese Kinh	514	0%	514	7 (2.2%)	Lee et al., 2005
Malaysian	236	0%	236	14 (5.9%)	Seng et al., 2003
Korean	1148	0%	1148	13 (1.1%)	Yoon et al., 2001
Indian*	184	8 (4.35%)	184	15 (8.2%) [†]	Seng et al., 2003

n= จำนวนอัลลีล, * เป็นประชากรที่อาศัยอยู่ในประเทศมาเลเซีย

[†] แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากประชากรไทยในการศึกษานี้ ($p < 0.05$, Z-test)

เมื่อเปรียบเทียบความถี่อัลลีลของ *CYP2C19*2* และ *CYP2C19*3* ที่ได้จากกลุ่มตัวอย่างคนไข้โรคลมชักในการศึกษาคั้งนี้ กับประชากรเชื้อชาติต่างๆในเอเชียดังแสดงในตารางที่ 14 พบว่าความถี่อัลลีลของ *CYP2C19*2* และ *CYP2C19*3* ค่อนข้างมีความหลากหลายในแต่ละเชื้อชาติ โดยพบความถี่ของอัลลีล *CYP2C19*2* มีตั้งแต่ร้อยละ 21 (Roh et al., 1996) ในชาวเกาหลีไปจนถึงร้อยละ 45.4 ในชาวจีน (Yamada et al., 2001) ส่วนความถี่ของอัลลีล *CYP2C19*3* พบได้ตั้งแต่ ร้อยละ 0.4 (ในการศึกษาคั้งนี้) ไปจนถึงร้อยละ 15.6 ในชาวญี่ปุ่น (Yamada et al., 2001) ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบความถี่อัลลีลของ *CYP2C19*2* ระหว่างกลุ่มคนไทยที่ได้จากกลุ่มตัวอย่างคนไข้โรคลมชักในการศึกษาคั้งนี้กับการศึกษาอื่นในคนไทย พบว่าไม่มีความแตกต่างจากการศึกษาของ Tassaneeyakul และคณะ (2006) แต่มีความแตกต่างจากการศึกษาของ Yamada และคณะ (2001) และเมื่อเปรียบเทียบกับชาวเอเชียอื่นๆพบว่า มีความแตกต่างจาก ชาวจีน (Yamada et al., 2001) ชาวจีนฮั่น (Xiao et al., 1997) ชาวญี่ปุ่น (Goldstein et al., 1997) และชาวฟิลิปปินส์ (Goldstein et al., 1997) ส่วนความถี่ของอัลลีล *CYP2C19*3* ที่ได้จากกลุ่มตัวอย่างคนไข้โรคลมชักในการศึกษาคั้งนี้มีความแตกต่างจากกลุ่มคนไทยในการศึกษาอื่นๆ และชาวเอเชียเชื้อสายอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังแสดงในตารางที่ 14

ตารางที่ 14 แสดงการเปรียบเทียบความถี่ของอัลลีล *CYP2C19*2* และ *CYP2C19*3* ระหว่างประชากรเชื้อชาติต่างๆในเอเชีย

Ethnicity	n	<i>CYP2C19*2</i>	<i>CYP2C19*3</i>	เอกสารอ้างอิง
Thai	240	64 (26.7%)	1 (0.4%)	การศึกษานี้
Thai	1548	449 (29.0%)	46 (3.0%) [†]	Tassaneeyakul et al., 2006
Thai	242	85 (35.1%) [†]	12 (5.0%) [†]	Yamada et al., 2001
Chinese	242	110 (45.4%) [†]	11 (4.5%) [†]	Yamada et al., 2001
Chinese Han	202	75 (37.1%) [†]	15 (7.4%) [†]	Xiao et al., 1997
Chinese Bai	404	104 (25.7%)	21 (5.2%) [†]	Xiao et al., 1997
Chinese Dai	386	117 (30.3%)	12 (3.1%) [†]	He et al., 2002
Chinese-Taiwanese	236	76 (32.0%)	13 (5.5%) [†]	Goldstein et al., 1997
Hong Kong Chinese	238	73 (30.7%)	9 (3.8%) [†]	Garcia-Barceló et al., 1999
Japanese	192	52 (27.1%)	30 (15.6%) [†]	Yamada et al., 2001
Japanese	280	98 (35.0%) [†]	31 (11.0%) [†]	Goldstein et al., 1997
Filipinos	104	41 (39.0%) [†]	8 (8.0%) [†]	Goldstein et al., 1997

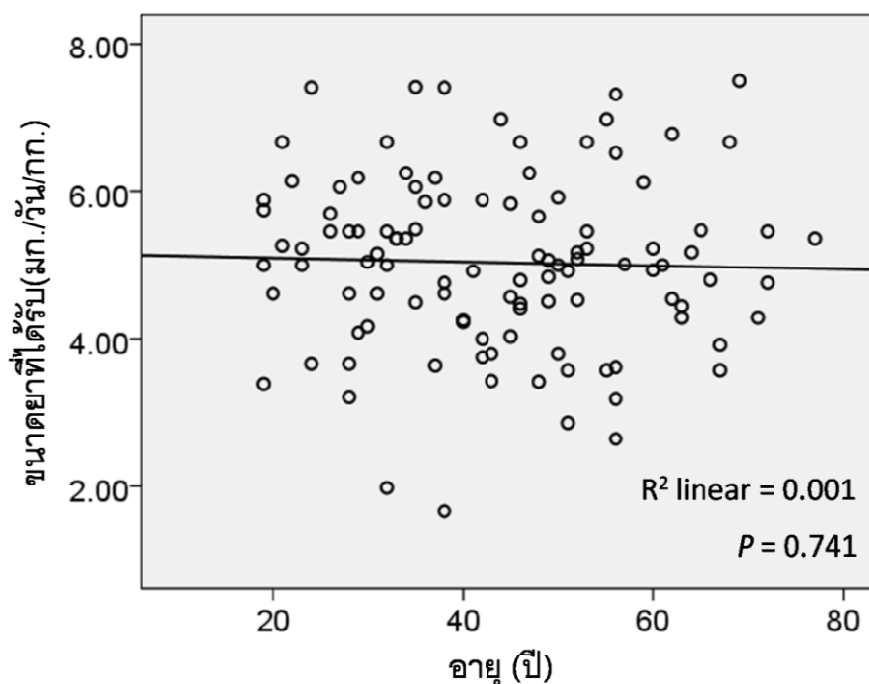
Ethnicity	n	CYP2C19*2	CYP2C19*3	เอกสารอ้างอิง
Korean	206	43 (21.0%)	24 (12.0%) [‡]	Roh et al., 1996
Burmese	254	76 (30.0%)	10 (4.0%) [‡]	Tassaneeyakul et al., 2006
Vietnamese	180	50 (23.6%)	25 (13.9%) [‡]	Yamada et al., 2001

n=จำนวนอัลลีล

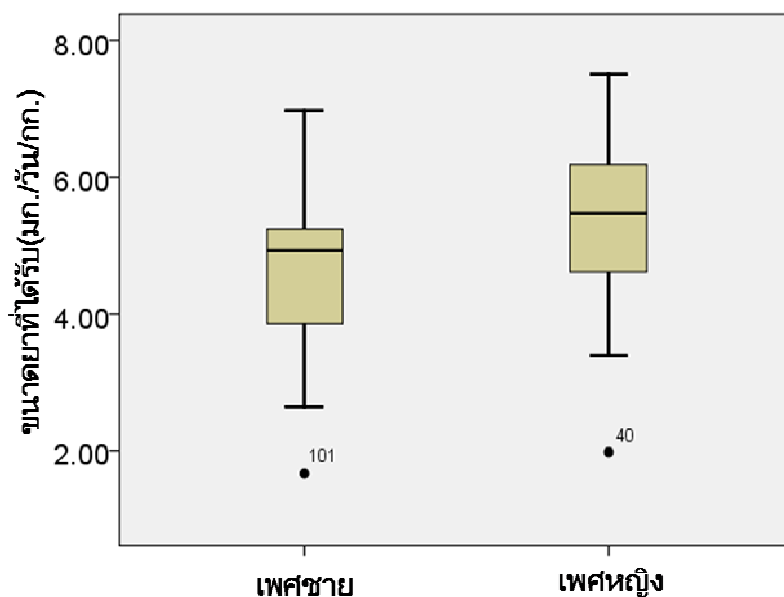
[‡] แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากประชากรไทยในการศึกษานี้ ($p < 0.05$, Z-test)

4.3 ความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยที่ไม่ใช่พันธุกรรมกับขนาดยาเฟนิทอยน์ที่ผู้ป่วยได้รับ

จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างขนาดยาเฟนิทอยน์ที่ผู้ป่วยได้รับกับปัจจัยที่ไม่ใช่พันธุกรรมได้แก่ อายุ และ เพศ พบว่า ขนาดยาเฟนิทอยน์ที่ผู้ป่วยได้รับไม่มีความสัมพันธ์กับอายุ ($r = -0.032$, $p = 0.741$, Pearson's correlation) ดังแสดงในรูปที่ 6 และเมื่อพิจารณาปัจจัยด้านเพศ พบว่า เพศหญิงได้รับขนาดยาเฟนิทอยน์เฉลี่ยต่อน้ำหนักตัวสูงกว่าเพศชายอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$, Student's t-test) โดยเพศหญิงได้รับขนาดยาเฟนิทอยน์เฉลี่ยเท่ากับ 5.499 ± 1.193 มก./วัน/กก. และเพศชายได้รับขนาดยาเฟนิทอยน์เฉลี่ยเท่ากับ 4.707 ± 1.051 มก./วัน/กก. โดยได้แสดงการกระจายของขนาดยาไว้ในรูปที่ 7



รูปที่ 6 Scatter plot แสดงความสัมพันธ์ระหว่างขนาดยาเฟนิทอยน์ที่ได้รับและอายุของผู้ป่วย



รูปที่ 7 Boxplot แสดงการกระจายของขนาดยาเฟนิทอยน์ที่ผู้ป่วยได้รับ
ระหว่างเพศชายและเพศหญิง

เมื่อพิจารณาขนาดยาเฟนิทอยน์ที่ผู้ป่วยได้รับ โดยแยกตามกลุ่มยาที่ได้รับร่วมด้วย ซึ่งในที่นี้จะพิจารณาเฉพาะยาที่มีระดับนัยสำคัญทางคลินิกของการเกิดอันตรกริยากับยาเฟนิทอยน์ในระดับ 2 ได้แก่ folic acid, sodium valproate (VPA), carbamazepine (CBZ) และ clobazam จะสามารถแบ่งผู้ป่วยออกได้เป็น 9 กลุ่มดังแสดงในตารางที่ 15 โดยเมื่อทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบขนาดยาเฉลี่ยที่ผู้ป่วยได้รับในแต่ละกลุ่ม พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.534$, One-way ANOVA)

ตารางที่ 15 แสดงขนาดยาเฟนิทอยน์ที่ใช้ในผู้ป่วยที่ได้รับยาร่วมกลุ่มต่างๆ (แสดงข้อมูลในรูปแบบของค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน [พิสัย])

กลุ่มยาที่ได้รับร่วมด้วย	จำนวน (ราย)	ขนาดยาเฟนิทอยน์ที่ใช้ (มก./วัน/กก.)	p-value
ไม่ได้รับยาร่วม	72	5.128 \pm 1.113 [2.86 - 7.50]	0.534 [#]
Folic acid	14	5.032 \pm 0.990 [3.61 - 7.42]	
Sodium Valproate (VPA)	10	4.965 \pm 1.414 [1.67 - 6.78]	
Carbamazepine (CBZ)	4	4.717 \pm 1.810 [3.64 - 7.41]	
Clobazam	2	5.071 \pm 0.216 [4.92 - 5.22]	

กลุ่มยาที่ได้รับร่วมด้วย	จำนวน (ราย)	ขนาดยาเฟนิทอยน์ที่ใช้ (มก./วัน/กก.)	p-value
VPA และ CBZ	2	4.500 ± 0.591 [4.08 - 4.92]	
CBZ และ Clobazam	1	2.64	
Folic และ CBZ	2	4.082 ± 2.974 [1.98 - 6.19]	
Folic และ VPA และ CBZ	1	5.83	

วิเคราะห์โดย One-way ANOVA

4.4 ความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะทางพันธุกรรมของยีน CYP2C9 CYP2C19 และ ABCB1 กับขนาดยาเฟนิทอยน์ที่ผู้ป่วยได้รับ

เมื่อทำการเปรียบเทียบขนาดยาที่ผู้ป่วยได้รับโดยแบ่งตามลักษณะ genotype ของแต่ละ SNPs ในยีน พบว่าขนาดยาเฉลี่ยระหว่างแต่ละ genotype ของ SNPs ในยีน CYP2C9 CYP2C19 และ ABCB1 ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 16

ตารางที่ 16 แสดงขนาดยาเฟนิทอยน์ที่ผู้ป่วยได้รับในแต่ละกลุ่ม genotype ของยีน CYP2C9 CYP2C19 และ ABCB1 (แสดงข้อมูลในรูปของค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน [พิสัย])

Genotypes	จำนวน (ราย)	ขนาดยาที่ได้รับ (มก./วัน/กก.)	p-value
CYP2C9 *1/*1	103	5.033 ± 1.178 [1.67 - 7.50]	0.873 [#]
*1/*3	5	5.119 ± 1.223 [3.39 - 6.67]	
CYP2C19 *1/*1	53	5.086 ± 1.230 [1.67 - 7.41]	0.607 [†]
*1/*2	48	5.065 ± 1.085 [3.18 - 7.50]	
*1/*3	1	4.84	
*2/*2	6	4.409 ± 1.473 [1.98 - 6.14]	
CYP2C19 homozygous wild type (*1/*1)	53	5.086 ± 1.230 [1.67 - 7.41]	0.405 [†]
heterozygous variant (*1/*2, *1/*3)	49	5.061 ± 1.075 [3.185 - 7.500]	
homozygous variant (*2/*2)	6	4.409 ± 1.473 [1.98 - 6.14]	

Genotypes		จำนวน (ราย)	ขนาดยาที่ได้รับ (มก./วัน/กก.)	p-value
CYP2C19	wild type group (*1/*1)	53	5.086 ± 1.230 [1.67 - 7.42]	0.673 [#]
	variant group (*1/*2, *1/*3, *2/*2)	55	4.990 ± 1.127 [1.98 - 7.50]	
ABCB1	CC	32	5.072 ± 1.279 [1.98 - 7.40]	0.176 [¶]
	CT	53	5.187 ± 1.090 [3.18 - 7.50]	
	TT	23	4.642 ± 1.174 [1.67 - 6.67]	

[#] วิเคราะห์โดย Student's t-test

[¶] วิเคราะห์โดย One-way ANOVA

เมื่อทำการแบ่งกลุ่มผู้ป่วยตามลักษณะ genotype ของ SNPs ในยีน CYP2C9 ควบคู่ไปกับลักษณะ genotype ของ SNPs ในยีน CYP2C19 ซึ่งเป็นการพิจารณาตามความสามารถของเอนไซม์ในการเมแทบอลิทยา (Odani et al., 1997) สามารถแบ่งออกได้เป็น 4 กลุ่ม ดังแสดงในตารางที่ 17 ซึ่งได้แก่

G1 ซึ่งเป็นกลุ่ม extensive metabolizer ของ CYP2C9 (*1/*1) และ CYP2C19 (*1/*1)

G2 เป็นกลุ่ม extensive metabolizer ของ CYP2C9 (*1/*1) และเป็น intermediate metabolizer ของ CYP2C19 (*1/*2 และ *1/*3)

G3 เป็นกลุ่ม extensive metabolizer ของ CYP2C9 (*1/*1) และเป็น poor metabolizer ของ CYP2C19 (*2/*2)

G4 เป็นกลุ่ม intermediate metabolizer ของ CYP2C9 (*1/*3) และ CYP2C19 (*1/*1 และ *1/*2)

เมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างของขนาดยาเฉลี่ยที่ผู้ป่วยได้รับในแต่ละกลุ่ม พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.604$, One-way ANOVA)

ตารางที่ 17 แสดงขนาดยาเฟนิทอยน์ที่ผู้ป่วยได้รับในแต่ละกลุ่ม genotype ของยีน CYP2C9 และ CYP2C19 (แสดงข้อมูลในรูปของค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน [พิสัย])

Group	CYP2C9	CYP2C19	จำนวน (ราย)	ขนาดยาที่ได้รับ (มก./วัน/กก.)	p-value
G1	*1/*1	*1/*1	50	5.097 \pm 1.221 [1.67 - 7.42]	$p=0.604^{\#}$
G2	*1/*1	*1/*2	46	5.044 \pm 1.094 [3.18 - 7.50]	
		*1/*3	1		
G3	*1/*1	*2/*2	6	4.408 \pm 1.473 [1.98 - 6.14]	
G4	*1/*3	*1/*1	3	5.119 \pm 1.223 [3.39 - 6.67]	
		*1/*2	2		

[#] วิเคราะห์โดย One-way ANOVA

4.5 ความสัมพันธ์ของปัจจัยทางพันธุกรรมร่วมกับปัจจัยที่ไม่ใช่พันธุกรรมกับขนาดยาเฟนิทอยน์

จากการวิเคราะห์โดย Stepwise Multiple Linear Regression ได้โมเดลแสดงความสัมพันธ์ที่มีนัยสำคัญระหว่างขนาดยาเฟนิทอยน์ที่ผู้ป่วยได้รับกับตัวแปรต่างๆ ดังแสดงไว้ในตารางที่ 18 โดยในการศึกษานี้พบว่าปัจจัยทางพันธุกรรม ได้แก่ การมี genotype ABCB1 3435TT และ CYP2C19*2/*2 ร่วมกับปัจจัยที่ไม่ใช่พันธุกรรมคือ เพศ และการได้รับยา carbamazepine ร่วมด้วย ดังแสดงในโมเดลที่ 4 เป็นตัวแปรที่สามารถอธิบายความผันแปรของขนาดยาเฟนิทอยน์ที่ผู้ป่วยได้รับได้ดีที่สุด คือ สามารถอธิบายได้ร้อยละ 20 ($R^2=0.200$, $p=0.029$) โดยตัวแปรที่สัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของขนาดยาเฟนิทอยน์ คือเพศหญิง ซึ่งมีสัมประสิทธิ์ความถดถอยของตัวแปรเท่ากับ 0.940 และตัวแปรที่สัมพันธ์กับการลดลงของขนาดยาเฟนิทอยน์ คือ ปัจจัยของการได้รับยา carbamazepine ร่วมด้วย รวมถึงการมี genotype ABCB1 3435TT และ CYP2C19*2/*2 โดยมีสัมประสิทธิ์ความถดถอยของตัวแปรเท่ากับ -0.796, -0.651 และ -0.998 ตามลำดับ ทั้งนี้ค่าสัมประสิทธิ์ความถดถอยและนัยสำคัญของตัวแปรดังกล่าวได้แสดงไว้ในตารางที่ 19

ตารางที่ 18 แสดงโมเดลความสัมพันธ์ระหว่างขนาดยาเฟนิทอยน์ที่ผู้ป่วยได้รับกับตัวแปรต่างๆ

โมเดล	ตัวแปร	โมเดลความสัมพันธ์ระหว่างขนาดยาเฟนิทอยน์กับตัวแปร (มก./วัน/กก.)	R ²	p-value
1	Constant Gender (female)	Dose = 4.707 + (0.792 x Gender)	0.103	<0.001
2	Constant Gender (female) CBZ co-med	Dose = 4.758 + (0.849 x Gender) - (0.817 x CBZ co-med)	0.136	0.027
3	Constant Gender (female) CBZ co-med ABCB1 TT	Dose = 4.869 + (0.881 x Gender) - (0.832 x CBZ co-med) - (0.576 x ABCB1 TT)	0.169	0.024
4	Constant Gender (female) CBZ co-med ABCB1 TT CYP2C19*2/*2	Dose = 4.913 + (0.94 x Gender) - (0.796 x CBZ co-med) - (0.651 x ABCB1 TT) - (0.998 x CYP2C19*2/*2)	0.200	0.029

การแทนค่าในโมเดล; Gender: เมื่อเป็นเพศหญิงให้แทนค่าด้วย 1 เพศชายแทนค่าด้วย 0, CBZ co-med: เมื่อมีการใช้ยา carbamazepine ร่วมด้วยให้แทนค่าด้วย 1 ถ้าไม่มีการใช้ยา carbamazepine ร่วมด้วยให้แทนค่าด้วย 0, ABCB1 TT: เมื่อมีลักษณะ genotype ของ ABCB1 เป็น TT ให้แทนค่าด้วย 1 ถ้าเป็น CC หรือ CT ให้แทนค่าด้วย 0, CYP2C19*2/*2: เมื่อมีลักษณะ genotype ของ CYP2C19*2 เป็น *2/*2 ให้แทนค่าด้วย 1 ถ้าเป็น *1/*1 หรือ *1/*2 ให้แทนค่าด้วย 0

ตารางที่ 19 แสดงค่าสัมประสิทธิ์ความถดถอยของตัวแปรต่างๆในโมเดลที่สามารถอธิบายความผันแปรของขนาดยาเฟนิทอยนที่ผู้ป่วยได้รับได้ดีที่สุด

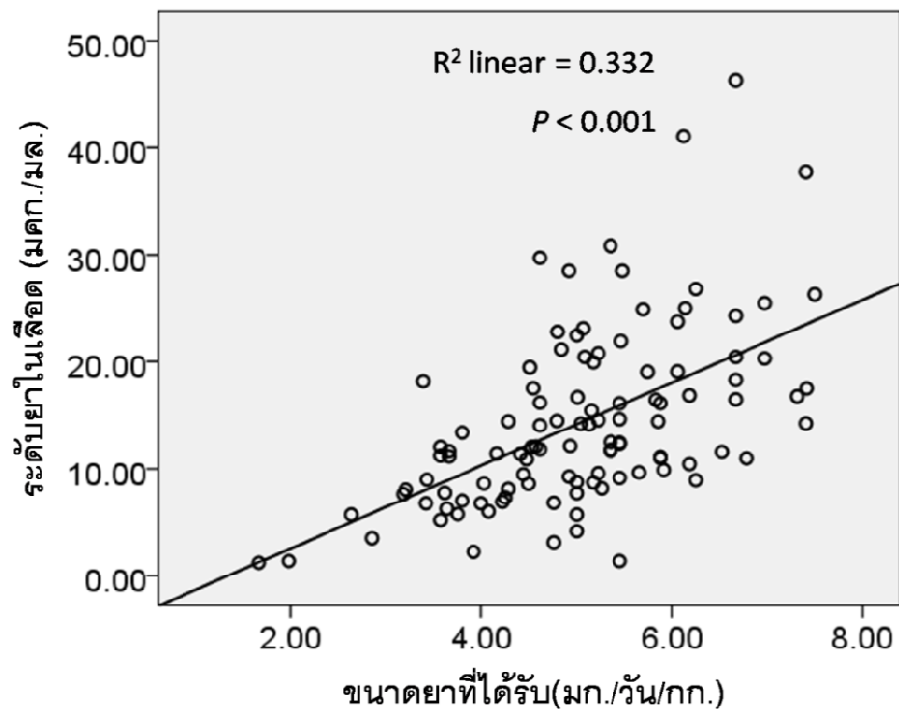
ตัวแปร	p-value	Unstandardized Coefficients (B)	Standardized Coefficients (Beta)	95% CI for B
(Constant)	<0.001	4.913		4.628 ~ 5.198
Gender (female)	<0.001	0.940	0.397	0.526 ~ 1.354
CBZ co-med	0.026	-0.796	-0.197	-1.493 ~ -0.098
ABCB1 TT	0.011	-0.651	-0.228	-1.146 ~ -0.155
CYP2C19 *2/*2	0.029	-0.998	-0.196	-1.889 ~ -0.107

4.6 ความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยที่ไม่ใช่พันธุกรรมกับระดับยาเฟนิทอยนในเลือด

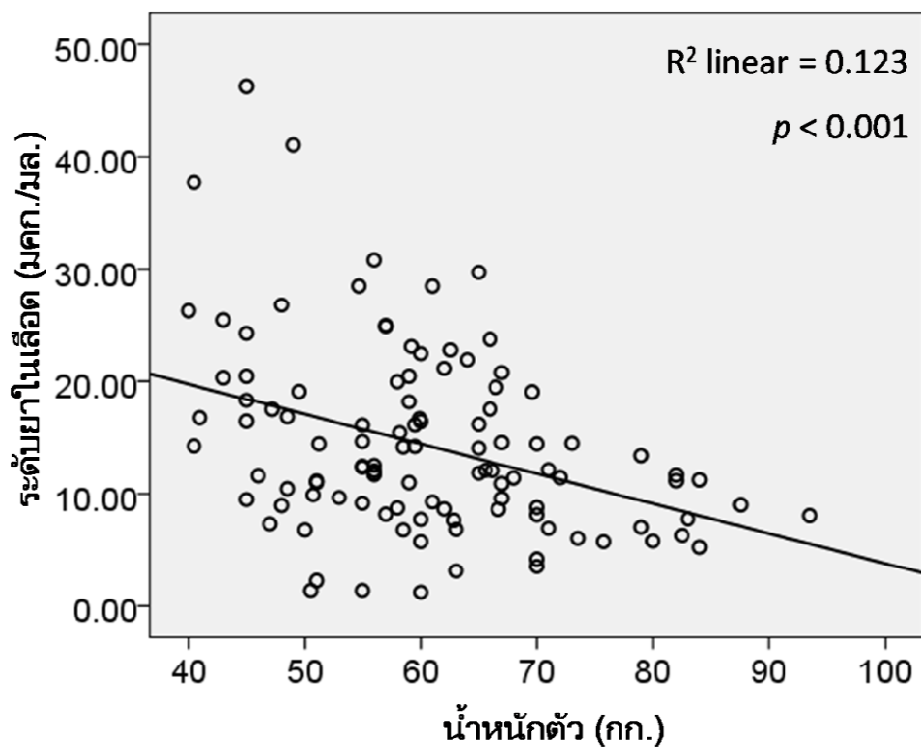
จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างระดับยาเฟนิทอยนในเลือดกับปัจจัยที่ไม่ใช่พันธุกรรม พบว่าระดับยาเฟนิทอยนในเลือดมีความสัมพันธ์ในเชิงบวกกับขนาดยาที่ได้รับ ($r = 0.576, p < 0.001$) ดังแสดงในรูปที่ 8 และมีความสัมพันธ์ในเชิงลบกับน้ำหนักตัวผู้ป่วย ($r = -0.351, p < 0.001$) ดังแสดงในรูปที่ 9 ดังนั้นในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างสองตัวแปร (bivariate correlation) เกี่ยวกับระดับยาเฟนิทอยนในเลือด จะใช้ระดับยาในเลือดที่มีการปรับด้วยขนาดยาที่ผู้ป่วยได้รับและน้ำหนักตัวของผู้ป่วย (ระดับยาเฟนิทอยนในเลือดต่อขนาดยาต่อ น้ำหนักตัว; PHT level/dose/weight)

เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของระดับยาเฟนิทอยนในเลือดต่อขนาดยาต่อน้ำหนักตัวกับปัจจัยที่ไม่ใช่พันธุกรรม ได้แก่ อายุ และ เพศ พบว่า ระดับยาเฟนิทอยนในเลือดต่อขนาดยาต่อน้ำหนักตัวไม่มีความสัมพันธ์กับอายุของผู้ป่วย ($r = 0.044, p = 0.652$) ดังแสดงในรูปที่ 10

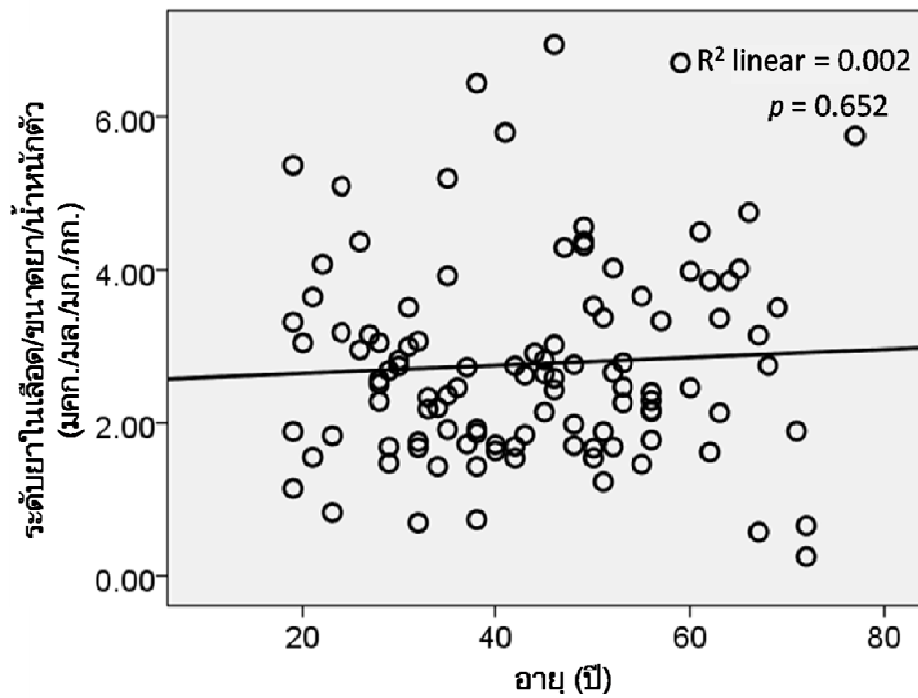
เมื่อพิจารณาปัจจัยด้านเพศพบว่า เพศหญิงมีระดับยาเฟนิทอยนในเลือดต่อขนาดยาต่อน้ำหนักตัวสูงกว่าเพศชายอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.015$, Mann-Whitney test) โดยเพศหญิงและเพศชายมีระดับยาเฟนิทอยนในเลือดต่อขนาดยาต่อน้ำหนักตัวเฉลี่ยเท่ากับ 3.157 ± 1.403 และ 2.491 ± 1.194 มคก./มล./กก. ตามลำดับ ในรูปที่ 11 แสดงการกระจายของระดับยาเฟนิทอยนในเลือดต่อขนาดยาต่อน้ำหนักตัวระหว่างเพศหญิงและเพศชาย



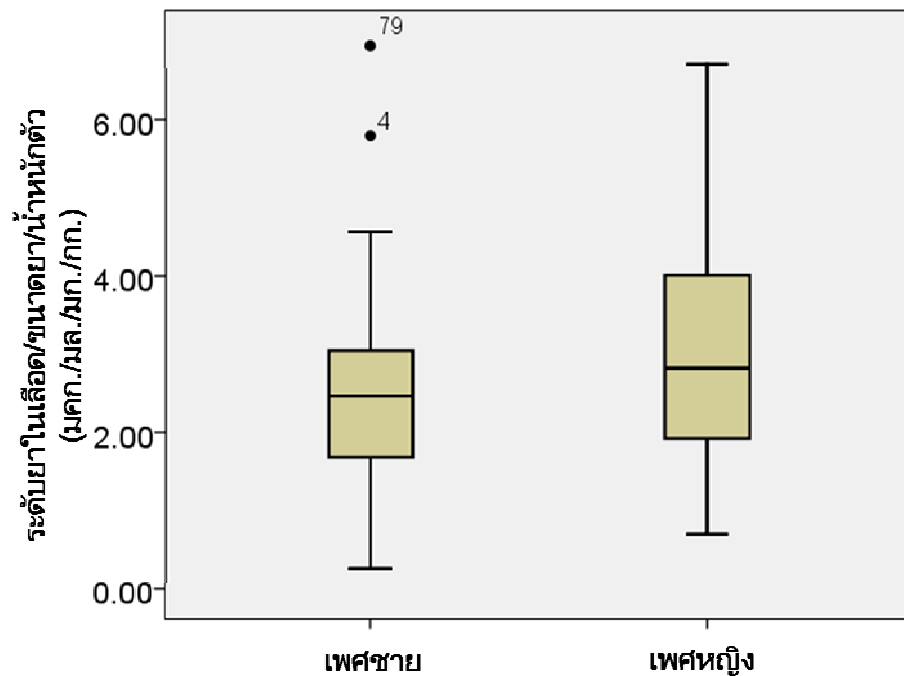
รูปที่ 8 Scatter plot แสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับยาเฟนิทอยน์ในเลือดและขนาดยาที่ได้รับ



รูปที่ 9 Scatter plot แสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับยาเฟนิทอยน์ในเลือดและน้ำหนักตัว



รูปที่ 10 Scatter plot แสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับยาเฟนิทอยน์ในเลือดต่อขนาดยาต่อน้ำหนักตัวและอายุของผู้ป่วย



รูปที่ 11 Boxplot แสดงการกระจายของระดับยาเฟนิทอยน์ในเลือดต่อขนาดยาต่อน้ำหนักตัวระหว่างเพศชายและเพศหญิง

เมื่อพิจารณาระดับยาเฟนิทอยน์ในเลือด และระดับยาเฟนิทอยน์ในเลือดต่อขนาดยาต่อน้ำหนักตัว โดยแยกตามกลุ่มยาที่ได้รับร่วมด้วย จะสามารถแบ่งผู้ป่วยออกได้เป็น 9 กลุ่ม เช่นเดียวกันกับการพิจารณาขนาดยาที่ผู้ป่วยได้รับ ซึ่งระดับยาในเลือดเฉลี่ยของผู้ป่วยแต่ละกลุ่มได้แสดงไว้ในตารางที่ 20 และเมื่อทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบระดับยาเฟนิทอยน์ในเลือด และระดับยาในเลือดต่อขนาดยาต่อน้ำหนักตัวเฉลี่ยระหว่างผู้ป่วยแต่ละกลุ่ม พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.435$ และ $p=0.363$ ตามลำดับ, Kruskal-Wallis test)

ตารางที่ 20 แสดงระดับยาเฟนิทอยน์ในเลือดในผู้ป่วยที่ได้รับยาร่วมกลุ่มต่างๆ (แสดงข้อมูลในรูปของค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน [พิสัย])

กลุ่มยาที่ได้รับร่วมด้วย	จำนวน (ราย)	ระดับยาในเลือด (มคก./มล.)	ระดับยา/ขนาดยา/น้ำหนัก (มคก./มล./มก./กก.)
ไม่ได้รับยาร่วม	72	14.784 \pm 8.300 [1.38 - 46.28]	2.84 \pm 1.35 [0.25 – 6.94]
Folic acid	14	13.716 \pm 7.351 [4.17 - 28.49]	2.67 \pm 1.24 [0.83 – 5.19]
Sodium Valproate (VPA)	10	11.764 \pm 5.695 [1.23 - 20.45]	2.31 \pm 1.07 [0.74 – 4.02]
Carbamazepine (CBZ)	4	16.645 \pm 14.255 [6.27 - 37.73]	3.15 \pm 1.41 [1.72 – 5.09]
Clobazam	2	24.640 \pm 5.445 [20.79 - 28.49]	4.87 \pm 1.28 [3.98 – 5.79]
VPA และ CBZ	2	7.650 \pm 2.305 [6.02 - 9.28]	1.68 \pm 0.29 [1.47 – 1.89]
CBZ และ Clobazam	1	5.73	2.17
Folic และ CBZ	2	9.120 \pm 10.946 [1.38 - 16.86]	1.71 \pm 1.43 [0.70 – 2.73]
Folic และ VPA และ CBZ	1	16.45	2.82
p-value		0.435[#]	0.338[#]

[#] วิเคราะห์โดย Kruskal- Wallis test

4.7 ความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะทางพันธุกรรมของยีน *CYP2C9* *CYP2C19* และ *ABCB1* กับระดับยาเฟนิโทอินในเลือด

เมื่อเปรียบเทียบระดับยาเฟนิโทอินในเลือด และระดับยาในเลือดต่อขนาดยาต่อน้ำหนักตัวของผู้ป่วยทั้ง 108 คนตามลักษณะ genotype ของ SNPs ในยีน *CYP2C9* *CYP2C19* และ *ABCB1* ดังแสดงในตารางที่ 21 พบว่าผู้ป่วยกลุ่มที่มี heterozygous variant *CYP2C9**3 (*1/*3) มีระดับยาเฟนิโทอินในเลือด และระดับยาในเลือดต่อขนาดยาต่อน้ำหนักตัวเฉลี่ยสูงกว่ากลุ่มที่เป็น homozygous wild type (*1/*1) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.032$ และ $p = 0.018$ ตามลำดับ, Mann-Whitney test) โดยแสดงการกระจายของระดับยาเฟนิโทอินในเลือดต่อขนาดยาต่อน้ำหนักตัวในแต่ละกลุ่ม genotype ของ SNPs ในยีน *CYP2C9* ไว้ในรูปแบบที่ 12 และเมื่อเปรียบเทียบตามกลุ่ม genotype ของยีน *CYP2C19* พบว่ากลุ่มที่เป็น heterozygous variant ของ *CYP2C19* (*1/*2 และ *1/*3) มีระดับยาในเลือดต่อขนาดยาต่อน้ำหนักตัวเฉลี่ยสูงกว่ากลุ่มที่เป็น homozygous wild type ของ *CYP2C19* (*1/*1) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยแสดงการกระจายของระดับยาเฟนิโทอินในเลือดต่อขนาดยาต่อน้ำหนักตัวในแต่ละกลุ่ม genotype ของ SNPs ในยีน *CYP2C19* ไว้ในรูปแบบที่ 13 และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่เป็น wild type (*1/*1) และกลุ่มที่มี variant ของยีน *CYP2C19* (*1/*2, *1/*3, *2/*2) ก็พบว่ากลุ่มที่มี variant ของยีน *CYP2C19* (*1/*2, *1/*3, *2/*2) มีแนวโน้มของระดับยาในเลือดเฉลี่ยสูงกว่ากลุ่ม wild type (*1/*1) ($p = 0.059$, Mann-Whitney test) โดยเมื่อพิจารณาระดับยาในเลือดต่อขนาดยาต่อน้ำหนักตัว พบว่ากลุ่มที่มี variant ของยีน *CYP2C19* (*1/*2, *1/*3, *2/*2) มีระดับยาในเลือดต่อขนาดยาต่อน้ำหนักตัวเฉลี่ยสูงกว่ากลุ่ม wild type (*1/*1) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.01$, Mann-Whitney test) แต่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของระดับยาเฟนิโทอินในเลือด และระดับยาในเลือดต่อขนาดยาต่อน้ำหนักตัวเฉลี่ยระหว่างแต่ละกลุ่ม genotype ของ *ABCB1* C3435T

ตารางที่ 21 แสดงระดับยาเฟนิโทยน์ในเลือดในแต่ละกลุ่ม genotype ของยีน CYP2C9 CYP2C19 และ ABCB1 (แสดงข้อมูลในรูปของค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน [พิสัย])

Genotypes		จำนวน	ระดับยาในเลือด (มคก./มล.)	ระดับยา/ขนาดยา/น้ำหนัก (มคก./มล./กก./กก.)
CYP2C9	*1/*1	103	14.052 \pm 8.282 [1.23 - 46.28]	2.71 \pm 1.31 [0.25 - 6.94]
	*1/*3	5	19.676 \pm 3.340 [16.19 - 24.89]	3.99 \pm 0.98 [2.74 - 5.36]
		<i>p</i> -value	0.032 [#]	0.018 [#]
CYP2C19	homozygous wild type (*1/*1)	53	12.696 \pm 7.374 [1.23 - 41.05]	2.44 \pm 1.23 [0.25 - 6.70]
	heterozygous variant (*1/*2, *1/*3)	49	16.037 \pm 8.859 [6.02 - 46.28]	3.09 \pm 1.36 ^{¶¶} [1.43 - 6.94]
	homozygous variant (*2/*2)	6	14.503 \pm 7.913 [1.38 - 25.00]	3.03 \pm 1.30 [0.70 - 4.32]
		<i>p</i> -value	0.166 [¶]	0.033 [¶]
CYP2C19	wild type group (*1/*1)	53	12.696 \pm 7.374 [1.23 - 41.05]	2.44 \pm 1.23 [0.25 - 6.70]
	Variant group (*1/*2, *1/*3, *2/*2)	55	15.870 \pm 8.706 [1.38 - 46.28]	3.08 \pm 1.34 [0.70 - 6.94]
		<i>p</i> -value	0.059 [#]	0.01 [#]
ABCB1	CC	32	14.144 \pm 7.300 [1.38 - 41.05]	2.73 \pm 1.19 [0.70 - 6.70]
	CT	53	14.251 \pm 8.687 [1.38 - 46.28]	2.66 \pm 1.26 [0.25 - 6.94]
	TT	23	14.688 \pm 8.559 [1.23 - 30.81]	3.07 \pm 1.61 [0.66 - 6.44]
	<i>p</i> -value	0.818 [¶]	0.617 [¶]	

[#]วิเคราะห์โดย Mann-Whitney test

[¶]วิเคราะห์โดย Kruskal- Wallis test, ^{¶¶}แตกต่างจากกลุ่ม homozygous wild type อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อพิจารณาความแตกต่างของค่า critical difference value และ mean rank ของแต่ละคู่ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (Siegel and Castellan, 1988)

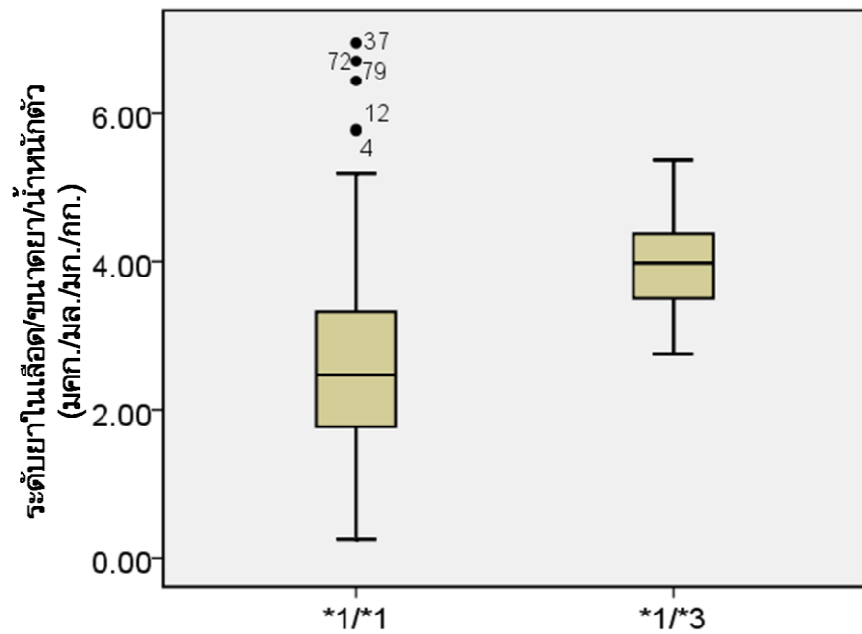
เมื่อทำการแบ่งกลุ่มผู้ป่วยออกเป็น 4 กลุ่ม (G1, G2, G3 และ G4) ตามลักษณะ genotype ของ SNPs ในยีน *CYP2C9* ควบคู่ไปกับลักษณะ genotype ของ SNPs ในยีน *CYP2C19* ซึ่งเป็นการแบ่งตามความสามารถของเอนไซม์ในการเมแทบอลิทยา (Odani et al., 1997) ดังแสดงในตารางที่ 22 พบว่าผู้ป่วยในกลุ่ม G4 ซึ่งประกอบด้วยผู้ป่วยที่มี SNPs ทั้ง *CYP2C9*3* และ *CYP2C19*2* มีระดับยาเฟนิโทยน์ในเลือด และระดับยาในเลือดต่อขนาดยาต่อน้ำหนักตัวเฉลี่ยสูงกว่ากลุ่ม G1 ซึ่งเป็นกลุ่ม homozygous wild type ของ *CYP2C9*3* และ *CYP2C19*2* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยแสดงการกระจายของระดับยาเฟนิโทยน์ในเลือดต่อขนาดยาต่อน้ำหนักตัวในแต่ละกลุ่ม genotype ของ SNPs ในยีน *CYP2C9* ควบคู่กับ *CYP2C19* ไว้ในรูปที่ 14

ตารางที่ 22 แสดงระดับยาเฟนิโทยน์ในเลือดต่อขนาดยาต่อน้ำหนักตัวในแต่ละกลุ่ม genotype ของยีน *CYP2C9* และ *CYP2C19* (แสดงข้อมูลในรูปของค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน [พิสัย])

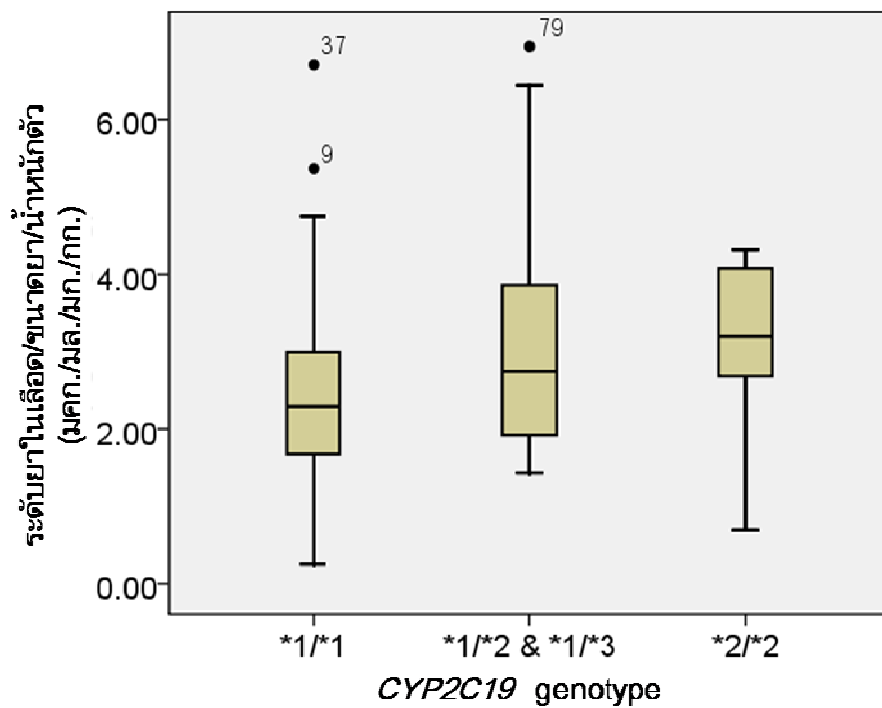
Group	<i>CYP2C9</i>	<i>CYP2C19</i>	จำนวน	ระดับยาในเลือด (มคก./มล.)	ระดับยา/ขนาดยา/น้ำหนัก (มคก./มล./กก.)
G1	*1/*1	*1/*1	50	12.404 \pm 7.490 [1.23 - 41.05]	2.35 \pm 1.18 [2.02 - 2.69]
G2	*1/*1	*1/*2 *1/*3	46 1	15.747 \pm 8.922 [6.02 - 46.28]	3.05 \pm 1.37 [2.64 - 3.45]
G3	*1/*1	*2/*2	6	14.503 \pm 7.913 [1.38 - 25.00]	3.03 \pm 1.30 [1.67 - 4.39]
G4	*1/*3	*1/*1 *1/*2	3 2	19.676 \pm 3.340 [#] [16.19 - 24.89]	3.99 \pm 0.98 [#] [2.78 - 5.21]
<i>p</i> -value				0.039 [¶]	0.004 [¶]

[¶]วิเคราะห์โดย Kruskal- Wallis test

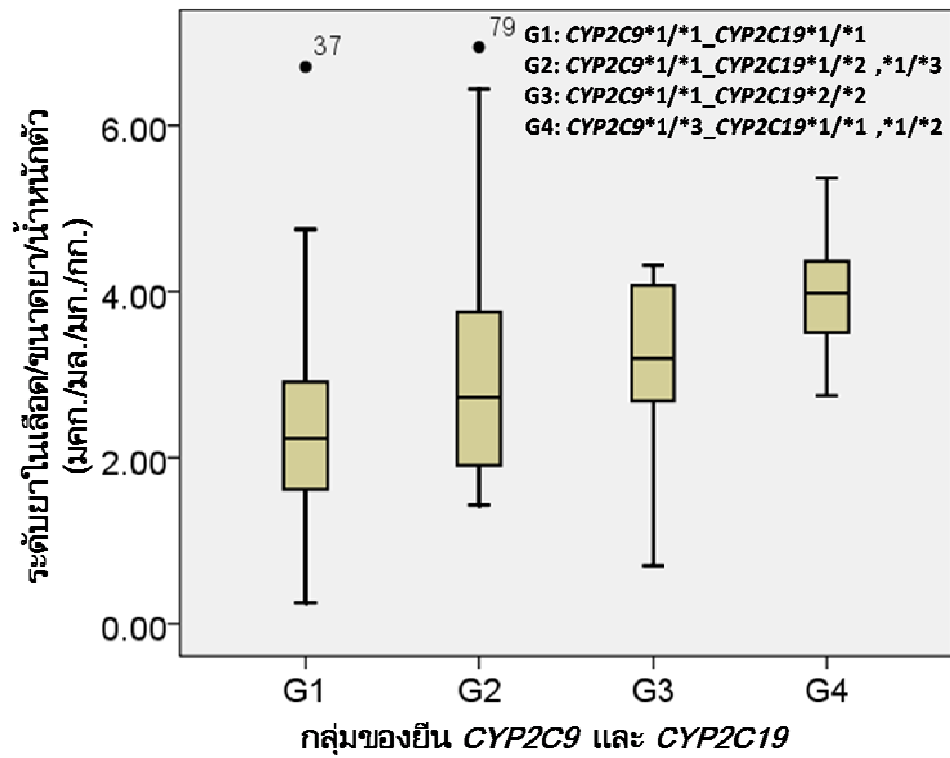
[#] G4 แตกต่างจาก G1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อพิจารณาความแตกต่างของค่า critical difference value และ mean rank ของแต่ละคู่ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (Siegel and Castellan, 1988)



รูปที่ 12 Boxplot แสดงการกระจายของระดับยาเฟนิทอยน์ในเลือดต่อขนาดยาต่อน้ำหนักตัว
ในแต่ละกลุ่ม genotype ของ SNPs ในยีน CYP2C9



รูปที่ 13 Boxplot แสดงการกระจายของระดับยาเฟนิทอยน์ในเลือดต่อขนาดยาต่อน้ำหนักตัว
ในแต่ละกลุ่ม genotype ของ SNPs ในยีน CYP2C19



รูปที่ 14 Boxplot แสดงการกระจายของระดับยาเฟนิทอยน์ในเลือดต่อขนาดยาต่อน้ำหนักตัว
ในแต่ละกลุ่ม genotype ของ SNPs ในยีน *CYP2C9* และ *CYP2C19*

4.8 ความสัมพันธ์ของปัจจัยทางพันธุกรรมร่วมกับปัจจัยที่ไม่ใช่พันธุกรรมกับระดับยาเฟนิโทยในเลือด

เนื่องจากการทดสอบการแจกแจงของข้อมูลค่าระดับยาเฟนิโทยในเลือดพบว่าข้อมูลมีการแจกแจงไม่ปกติ ($p < 0.001$, Kolmogorov Smirnov Test) จึงต้องทำการแปลงข้อมูลให้อยู่ในรูปลอการิทึมของระดับยาในเลือดต่อขนาดยา (\log PHT level/dose) เพื่อให้ข้อมูลมีการแจกแจงปกติ ($p = 0.065$, Kolmogorov Smirnov Test)

จากการวิเคราะห์โดย Stepwise Multiple Linear Regression ได้โมเดลแสดงความสัมพันธ์ที่มีนัยสำคัญระหว่างลอการิทึมของระดับยาในเลือดต่อขนาดยากับตัวแปรต่างๆ ดังแสดงไว้ในตารางที่ 23 ซึ่งในการศึกษานี้พบว่าปัจจัยทางพันธุกรรม คือ การมี genotype ของ *CYP2C19* เป็น heterozygous variant (*CYP2C19*1/*2* หรือ *CYP2C19*1/*3*) และการมี genotype ของ *CYP2C9* เป็น heterozygous variant (*CYP2C9*1/*3*) ร่วมกับปัจจัยที่ไม่ใช่พันธุกรรมคือ เพศ และน้ำหนักตัว ดังแสดงในโมเดลที่ 4 เป็นตัวแปรที่สามารถอธิบายความผันแปรของลอการิทึมของระดับยาในเลือดต่อขนาดยาได้ดีที่สุด คือ สามารถอธิบายได้ร้อยละ 26.1 ($R^2 = 0.261$, $p = 0.027$) โดยตัวแปรที่สัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของลอการิทึมของระดับยาในเลือดต่อขนาดยา ได้แก่ เพศหญิง รวมถึงการมีลักษณะ genotype ของยีน *CYP2C19* เป็น heterozygous variant (*CYP2C19*1/*2* หรือ *CYP2C19*1/*3*) และการมีลักษณะ genotype ของยีน *CYP2C9* เป็น heterozygous variant (*CYP2C9*1/*3*) โดยมีสัมประสิทธิ์ความถดถอยของตัวแปรเท่ากับ 0.140, 0.125 และ 0.221 ตามลำดับ ส่วนปัจจัยที่สัมพันธ์กับการลดลงของลอการิทึมของระดับยาเฟนิโทยในเลือดต่อขนาดยา ได้แก่ น้ำหนักตัวของผู้ป่วย โดยมีสัมประสิทธิ์ความถดถอยของตัวแปรเท่ากับ -0.006 ทั้งนี้ค่าสัมประสิทธิ์ความถดถอยและนัยสำคัญของตัวแปรดังกล่าวได้แสดงไว้ในตารางที่ 24

ตารางที่ 23 แสดงโมเดลความสัมพันธ์ระหว่างลอการิทึมของระดับยาในเลือดต่อขนาดยากับตัวแปรต่างๆ

โมเดล	ตัวแปร	โมเดลความสัมพันธ์ระหว่าง ลอการิทึมของระดับยาในเลือดต่อ ขนาดยากับตัวแปร (มคก./มล./มก.)	R ²	p-value
1	Constant Gender (female)	log PHT level/dose = (-1.464) + (0.190 x Gender)	0.134	<0.001
2	Constant Gender (female) CYP2C19 heterozygous variant	log PHT level/dose = (-1.519) + (0.196 x Gender) + (0.117 x CYP2C19 heterozygous variant)	0.182	0.008
3	Constant Gender (female) CYP2C19 heterozygous variant Weight (kg)	log PHT level/dose = (-1.149) + (0.137 x Gender) + (0.123 x CYP2C19 heterozygous variant) - (0.006 x weight)	0.232	0.006
4	Constant Gender (female) CYP2C19 heterozygous variant Weight (kg) CYP2C9*1/*3	log PHT level/dose = (-1.173) + (0.140 x Gender) + (0.125 x CYP2C19 heterozygous variant) - (0.006 x weight) +(0.221 x CYP2C9*1/*3	0.261	0.027

การแทนค่าในโมเดล; Gender: เมื่อเป็นเพศหญิงให้แทนค่าด้วย 1 เพศชายแทนค่าด้วย 0, CYP2C19 heterozygous variant: เมื่อมีลักษณะ genotype ของ CYP2C19*2 เป็น *1/*2 หรือ *1/*3 ให้แทนค่าด้วย 1 ถ้าเป็น *1/*1 หรือ *2/*2 ให้แทนค่าด้วย 0, weight: แทนค่าด้วยน้ำหนักตัวในหน่วยกิโลกรัม, CYP2C9*1/*3: เมื่อมีลักษณะ genotype ของ CYP2C9*3 เป็น *1/*3 ให้แทนค่าด้วย 1 ถ้าเป็น *1/*1 ให้แทนค่าด้วย 0 (ในกลุ่มตัวอย่างที่ศึกษาไม่มี *3/*3 ของยีน CYP2C9*3)

ตารางที่ 24 แสดงค่าสัมประสิทธิ์ความถดถอยของตัวแปรต่างๆในโมเดลที่สามารถอธิบายความผันแปรของลอการิทึมของระดับยาในเลือดต่อขนาดยาได้ดีที่สุด

ตัวแปร	p-value	Unstandardized Coefficients (B)	Standardized Coefficients (Beta)	95% CI for B
Constant	<0.001	-1.173		-1.444 ~ -0.906
Gender (female)	0.004	0.140	0.277	0.047 ~ 0.232
CYP2C19 heterozygous variant	0.003	0.125	0.252	0.043 ~ 0.208
Weight	0.007	-0.006	-0.257	-0.01 ~ -0.002
CYP2C9*1/*3	0.027	0.221	0.187	0.026 ~ 0.415

บทที่ 5

อภิปรายผลการวิจัย สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

อภิปรายผลการวิจัย

การใช้ยากันชักเป็นวิธีการหลักในการรักษาผู้ป่วยโรคลมชัก โดยเฉพาะยาเฟนิทอยน์ ซึ่งมีการใช้มาอย่างยาวนานเนื่องจากเป็นยาที่มีประสิทธิภาพดีและมีราคาถูก แต่ปัญหาที่พบในการรักษาด้วยยาเฟนิทอยน์คือ ยามี Therapeutic range แคบ ทำให้มีโอกาสที่ระดับยาในเลือดจะสูงเกินช่วงของการรักษาจนทำให้เกิดอาการไม่พึงประสงค์จากยาได้ นอกจากนี้ผู้ป่วยแต่ละรายยังมีการตอบสนองต่อการรักษาที่แตกต่างกัน อันเนื่องมาจากปัจจัยหลายอย่างทั้งที่เกี่ยวข้องและไม่เกี่ยวข้องกับพันธุกรรม จึงทำให้ในการรักษาผู้ป่วย ต้องใช้ระยะเวลาในการปรับขนาดยา เพื่อให้ได้ขนาดที่เหมาะสมที่สามารถควบคุมอาการชักได้ โดยไม่เกิดอาการไม่พึงประสงค์จากยา อันเนื่องมาจากระดับยาในเลือดสูงเกินช่วงของการรักษา ในการศึกษาครั้งนี้ ผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาถึงความสัมพันธ์ของขนาดยาเฟนิทอยน์ที่ใช้และระดับยาเฟนิทอยน์ในเลือดกับปัจจัยต่างๆ ทั้งที่เกี่ยวข้องและไม่เกี่ยวข้องกับพันธุกรรม โดยมุ่งหวังว่าข้อมูลที่ได้จากการศึกษานี้จะสามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานช่วยในการพิจารณาปรับขนาดยาในการรักษาผู้ป่วยโรคลมชัก เพื่อให้สามารถควบคุมอาการชักของผู้ป่วยได้อย่างรวดเร็ว โดยไม่เกิดอาการไม่พึงประสงค์จากยา ซึ่งจะเป็นการเพิ่มคุณภาพชีวิตที่ดีให้กับผู้ป่วยได้

ผลจากการศึกษานี้พบว่า ความถี่ของอัลลีล CYP2C9*3 มีค่าเท่ากับร้อยละ 2.5 ซึ่งไม่แตกต่างจากการศึกษาอื่นทั้งในคนไทย และในชาวเอเชียอื่นๆ ยกเว้นในชาวอินเดีย ซึ่งตรวจพบอัลลีลดังกล่าว ในความถี่ร้อยละ 8.2 ซึ่งแตกต่างออกไปจากผู้ป่วยโรคลมชักชาวไทยในการศึกษานี้และในชาวเอเชียอื่นๆ อย่างมาก รวมทั้งยังตรวจพบ อัลลีล CYP2C9*2 ในชาวอินเดียกลุ่มดังกล่าวซึ่งโดยส่วนใหญ่ของชาวเอเชียจะไม่พบอัลลีลนี้ ส่วนความถี่ของอัลลีล CYP2C19*2 มีค่าเท่ากับร้อยละ 26.7 ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับชาวเอเชียเชื้อชาติอื่นๆ พบว่าความถี่ของอัลลีล CYP2C19*2 ค่อนข้างมีความแตกต่างกันมากในแต่ละเชื้อชาติและในแต่ละการศึกษา ซึ่งอาจเนื่องมาจากวิธีการสุ่มเลือดตัวอย่างในการศึกษา เช่น บางการศึกษากลุ่มตัวอย่างอาจเป็นผู้ป่วยกลุ่มโรคที่แตกต่างกัน หรือบางการศึกษาอาจเป็นอาสาสมัครสุขภาพดีทั่วไป เป็นต้น และความถี่ของอัลลีล CYP2C19*3 มีค่าเท่ากับร้อยละ 0.4 ซึ่งมีค่าน้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาอื่นๆ ในอาสาสมัครสุขภาพดีชาวไทย (Yamada et al., 2001; Tassaneeyakul et al., 2006) ซึ่งสาเหตุอาจเนื่องมาจากในการศึกษานี้เลือกอาสาสมัครจากกลุ่มผู้ป่วยโรคลมชักเท่านั้น

ดังนั้นความถี่ของอัลลีลดังกล่าวจึงแตกต่างกันไปจากอาสาสมัครสุขภาพดีทั่วไป และเนื่องจากกลุ่มตัวอย่างที่ได้ในการศึกษานี้ เป็นการสุ่มมาจากโรงพยาบาลเพียง 3 แห่ง ซึ่งอาจยังไม่สามารถใช้เป็นตัวแทนของประชากรชาวไทยทั้งหมดได้

เมื่อศึกษาถึงความสัมพันธ์ของขนาดยาเฟนิทอยน์ที่ผู้ป่วยได้รับกับลักษณะทางพันธุกรรมของยีน *CYP2C9* *CYP2C19* และ *ABCB1* โดยการเปรียบเทียบขนาดยาเฟนิทอยน์ที่ผู้ป่วยได้รับในแต่ละ genotype ของ SNPs ในยีน *CYP2C9*3* *CYP2C19*2* *CYP2C19*3* และ *ABCB1* C3435T พบว่า ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังแสดงในตารางที่ 16 และตารางที่ 17 ทั้งนี้เมื่อพิจารณาปัจจัยอื่น ๆ ที่ไม่เกี่ยวข้องกับลักษณะทางพันธุกรรม ซึ่งได้แก่ เพศ และอายุ พบว่า ขนาดยาเฟนิทอยน์ต่อน้ำหนักตัวโดยเฉลี่ยที่ได้รับในเพศหญิงสูงกว่าในเพศชายอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติซึ่งสอดคล้องไปกับการศึกษาของ Travers และคณะ (1972) แต่ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างขนาดยาเฟนิทอยน์ที่ผู้ป่วยได้รับกับอายุของผู้ป่วย และเมื่อใช้สถิติ stepwise multiple linear regression เพื่อหาโมเดลที่อธิบายถึงความสัมพันธ์ระหว่างขนาดยาเฟนิทอยน์ที่ผู้ป่วยได้รับกับตัวแปรทั้งที่เกี่ยวข้องและไม่เกี่ยวข้องกับลักษณะทางพันธุกรรม พบว่า ปัจจัยทางพันธุกรรมของยีน *CYP2C19* (*CYP2C19*2/*2*) และ *ABCB1* (*ABCB1* TT) ร่วมกับปัจจัยที่ไม่เกี่ยวข้องกับพันธุกรรม ได้แก่ เพศและการได้รับยา carbamazepine ร่วมด้วย เป็นตัวแปรที่สามารถอธิบายความผันแปรของขนาดยาเฟนิทอยน์ที่ผู้ป่วยได้รับได้ดีที่สุด โดยพบว่า ปัจจัยที่สัมพันธ์กับการลดลงของขนาดยาเฟนิทอยน์ที่ผู้ป่วยได้รับ ได้แก่ การมีลักษณะ genotype ของยีน *ABCB1* C3435T เป็น *ABCB1* 3435TT และการมีลักษณะ genotype ของยีน *CYP2C19* เป็น *CYP2C19*2/*2* รวมถึงการได้รับยา carbamazepine ร่วมด้วย ส่วนปัจจัยที่สัมพันธ์กับการเพิ่มขนาดยาเฟนิทอยน์ที่ผู้ป่วยได้รับ ได้แก่ เพศหญิง

โดยความแตกต่างของขนาดยาเฟนิทอยน์ที่ผู้ป่วยได้รับต่อน้ำหนักตัวระหว่างเพศชายกับเพศหญิงนั้น อาจเนื่องมาจาก ในทางปฏิบัติการพิจารณาขนาดยาในผู้ป่วยแต่ละรายนั้นเป็นการคำนึงถึงขนาดยาต่อวันที่ผู้ป่วยควรได้รับ โดยไม่ได้พิจารณาถึงความแตกต่างของน้ำหนักตัวในผู้ป่วยแต่ละราย ดังนั้นเมื่อนำมาปรับด้วยน้ำหนักตัวซึ่งในเพศหญิงนั้นมีน้ำหนักตัวโดยเฉลี่ยต่ำกว่าเพศชาย จึงทำให้ได้ขนาดยาต่อน้ำหนักตัวที่สูงกว่าเพศชาย โดยที่ขนาดยาเฟนิทอยน์รวมต่อวัน (มก./วัน) ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างเพศชายและเพศหญิง ส่วนปัจจัยของการได้รับยา carbamazepine ร่วมด้วยที่สัมพันธ์กับการลดลงของขนาดยาเฟนิทอยน์ที่ผู้ป่วยได้รับนั้น อาจจะเป็นผลเนื่องมาจาก มีรายงานการเกิดอันตรกิริยา

ระหว่างเฟนิทอยน์กับยา carbamazepine ซึ่งมีนัยสำคัญทางคลินิกในระดับ 2 โดยพบว่าการได้รับยา carbamazepine เพิ่มเติมภายหลังจากได้รับยาเฟนิทอยน์เดี่ยวๆมาก่อน หรือการเพิ่มขนาดยา carbamazepine ขึ้นนั้น มีผลทำให้ระดับยาเฟนิทอยน์ในเลือดเพิ่มขึ้น ร่วมกับมีอาการทางคลินิกที่สัมพันธ์กับการเกิดพิษจากยาเฟนิทอยน์ (Browne et al., 1988; Zielinski et al., 1985; Zielinski et al., 1987) โดยกลไกการเกิดอันตรกิริยาดังกล่าวนี้น่าจะเกิดจากการที่ยา carbamazepine ไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2C19 (Lakehal et al., 2002) ส่งผลลดการเมแทบอลิซึมของยาเฟนิทอยน์ แล้วมีผลทำให้ระดับยาเฟนิทอยน์ในเลือดสูงขึ้นได้ แต่อย่างไรก็ตามผลของยา carbamazepine ที่มีต่อเฟนิทอยน์นั้นก็ยังมีรายงานที่ขัดแย้งกันออกไปซึ่งมีทั้งลดระดับยาเฟนิทอยน์ในเลือด (Lai et al., 1992) และไม่ผลต่อระดับยาเฟนิทอยน์ในเลือด (Cereghino et al., 1975 อ้างถึงใน Tatro, 2010) แต่อย่างไรก็ตามจากผลการวิเคราะห์ที่พบความสัมพันธ์ของการได้รับยา carbamazepine ร่วมด้วยกับการลดลงของขนาดยาเฟนิทอยน์ที่ผู้ป่วยได้รับนั้น อาจจะเป็นผลมาจากในทางปฏิบัติเมื่อมีการให้ยา carbamazepine ร่วมไปกับยาเฟนิทอยน์ แพทย์จะพิจารณาปรับลดขนาดยาเฟนิทอยน์ลง เพื่อป้องกันการเกิดอาการไม่พึงประสงค์จากยา

สำหรับปัจจัยของยีน *ABCB1* C3435T ที่พบว่าการมี genotype เป็น *ABCB1* 3435TT มีความสัมพันธ์กับการลดลงของขนาดยาเฟนิทอยน์นั้น อาจมีความเป็นไปได้ว่าจะมีความเกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อการรักษาของผู้ป่วย โดยได้มีการศึกษาถึงความสัมพันธ์ของลักษณะ genotype ของ *ABCB1* C3435T กับการตอบสนองต่อการรักษาในโรคลมชักก็พบว่า ในกลุ่มผู้ป่วยโรคลมชักที่มีภาวะดื้อต่อการรักษาด้วยยา (drug resistance, pharmacoresistance, intractable epilepsy) จะมีลักษณะ genotype ของ *ABCB1* C3435T เป็น CC มากกว่า TT อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มผู้ป่วยที่ตอบสนองดีต่อการรักษา (drug responsive) หรือกลุ่มควบคุม (Siddiqui et al., 2003; Ebid et al., 2007) ซึ่งสอดคล้องไปกับผลการศึกษาเกี่ยวกับการแสดงออกของ P-gp และผลของระดับยาในเลือด ดังเช่นในการศึกษาของ Hoffmeyer และคณะ (2000) ที่พบว่ากลุ่มอาสาสมัครที่มี *ABCB1* 3435TT มีการแสดงออกของ P-gp ในลำไส้เล็กส่วน duodenum ต่ำกว่า *ABCB1* 3435CC อย่างมีนัยสำคัญ และสอดคล้องไปกับผลของระดับยา digoxin ในพลาสมา โดยในกลุ่มอาสาสมัครที่มี *ABCB1* 3435TT นั้นมีระดับยาสูงกว่ากลุ่มอาสาสมัครที่มี *ABCB1* 3435CC และในทำนองเดียวกัน ในการศึกษาของ Kerb และคณะ (2001) พบว่าในกลุ่มอาสาสมัครชาวตุรกีที่มีระดับยาเฟนิทอยน์ในเลือดต่ำจะสัมพันธ์กับ CC genotype ของยีน *ABCB1* C3435T และมีการยืนยันในการศึกษาต่อมาของ Ebid และคณะ (2007) ในกลุ่มผู้ป่วยโรคลมชักชาวอียิปต์ โดยเมื่อพิจารณาระดับยาเฟนิทอยน์ในเลือดก็พบว่า

กลุ่มที่มี CC genotype ของ *ABCB1* C3435T จะมีระดับยาเฟนิทอยน์ในเลือดต่ำกว่ากลุ่มที่มี 3435TT genotype ซึ่งต่อมา Wang และคณะ (2005) ได้ศึกษาเพื่อดูการแสดงออกของ mRNA ในเซลล์ตับของมนุษย์ ซึ่งผลที่ได้นั้นเป็นไปในแนวทางเดียวกันกับการศึกษาของ Hoffmeyer และคณะ (2000) คือ อัลลีล 3435T ของยีน *ABCB1* จะมีการแสดงออกของ mRNA ต่ำกว่า อัลลีล 3435C นอกจากนี้ยังมีการศึกษาถึงการแสดงออกของ P-gp ที่บริเวณสมองของผู้ป่วยที่ติดต่อการรักษา พบว่าในเซลล์เยื่อบุผิวผนังหลอดเลือดที่แยกออกมาจากเส้นเลือดบริเวณสมองส่วน temporal lobe ของผู้ป่วยโรคลมชักที่ติดต่อการรักษา (refractory epilepsy) มีการแสดงออกของ mRNA ของยีน *ABCB1* สูงกว่าในเซลล์สมองปกติ และเมื่อวัดระดับยาเฟนิทอยน์ล่าสุดในเซลล์ neuroectodermal ที่มีการแสดงออกของ P-gp พบว่า มีระดับยาเฟนิทอยน์ต่ำกว่าในเซลล์ที่ไม่มีการแสดงออกของ P-gp ถึงสี่เท่า ซึ่งชี้ให้เห็นว่าการแสดงออกของ P-gp ที่เพิ่มขึ้น อาจมีผลทำให้มีการขนส่งยาออกจากเซลล์ในบริเวณที่จะออกฤทธิ์มากขึ้น จนอาจทำให้มีระดับยาไม่เพียงพอต่อการออกฤทธิ์ควบคุมอาการชัก จึงอาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ผู้ป่วยไม่ตอบสนองต่อการรักษา (Tishler et al., 1995)

ดังนั้นจากผลการวิเคราะห์ในการศึกษานี้ ที่พบว่ากรณี genotype ของยีน *ABCB1* C3435T เป็น TT มีความสัมพันธ์กับการลดลงของขนาดยาเฟนิทอยน์นั้น อาจสามารถอธิบายได้ในสองแง่ด้วยกันดังนี้คือ ในแง่ของเภสัชจลนศาสตร์ จากผลการศึกษาก่อนหน้านี้ที่พบว่า ในกลุ่มที่มี TT genotype จะมีระดับยาในเลือดสูงกว่ากลุ่มที่มี CC genotype ซึ่งกลไกที่ทำให้มีระดับยาสูงกว่าอาจเนื่องมาจาก TT genotype มีการแสดงออกของ P-gp ในลำไส้น้อยกว่า CC genotype (Hoffmeyer et al., 2000; Wang et al., 2005) แล้วทำให้มีการขนส่งยาออกสู่ทางเดินอาหารน้อยกว่าส่งผลให้ยาที่มีการดูดซึมได้มากกว่า หรือในบางการศึกษาพบว่าระดับการแสดงออกของ P-gp ไม่ได้แตกต่างกัน (Kimchi-Sarfaty et al., 2007; Hung et al., 2008) แต่พบว่าการเกิด polymorphism ของยีน *ABCB1* C3435T นั้นส่งผลทำให้มีการเปลี่ยนแปลง conformation ตรงตำแหน่งที่ซิปสเตอร์ทจะเข้ามาจับกับ P-gp จึงทำให้ความชอบในการจับกับซิปสเตอร์ท (affinity) ลดลง การขนส่งซิปสเตอร์ทออกจากเซลล์จึงลดลง ส่งผลให้ยาถูกดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือดได้มากขึ้น ส่วนในแง่ของเภสัชพลศาสตร์ ในสมองบริเวณตำแหน่งที่ยาไปออกฤทธิ์นั้น หากอธิบายตามกลไกที่ Kimchi-Sarfaty และคณะ (2007) ได้ตั้งสมมติฐานไว้ นั่นคือการเกิด polymorphism ของยีน *ABCB1* C3435T นั้นส่งผลทำให้มีการเปลี่ยน conformation ตรงตำแหน่งที่ซิปสเตอร์ทจะเข้ามาจับ จึงทำให้ความชอบในการจับกับซิปสเตอร์ทลดลง การขนส่งซิปสเตอร์ทออกจากเซลล์จึงลดลง โดยเมื่อพิจารณาถึงเซลล์บริเวณสมอง หากมีการขนส่งยาออก

จากเซลล์ลดลง ก็จะทำให้มีการสะสมของยาในบริเวณที่จะออกฤทธิ์ได้มากขึ้น และเพียงพอต่อการออกฤทธิ์ควบคุมอาการชักได้

ในส่วนของยีน *CYP2C19* ที่พบว่า *CYP2C19*2/*2* มีความสัมพันธ์กับการลดลงของขนาดยาเฟนิทอยน์นั้น สามารถอธิบายได้จากการทำงานที่ลดลงของเอนไซม์ *CYP2C19* เมื่อมี variant ของยีน ซึ่งเอนไซม์ที่สร้างได้จากยีน *CYP2C19*2* นั้นเป็นเอนไซม์ที่ไม่มีประสิทธิภาพในการแปรสภาพยา (de Morais et al., 1994a) ดังนั้นจึงส่งผลให้มีระดับยาในเลือดสูงขึ้นได้ สอดคล้องกับการลดขนาดยาในผู้ป่วยที่มี genotype ของยีน *CYP2C19* เป็น *CYP2C19*2/*2*

ในการวิเคราะห์ขนาดยาที่ผู้ป่วยได้รับกับปัจจัยต่างๆ จะพบว่าในการวิเคราะห์แบบ bivariate correlation ไม่พบความแตกต่างของขนาดยาเฟนิทอยน์ที่ผู้ป่วยได้รับระหว่างแต่ละ genotype ของ SNPs ในยีน *CYP2C9* *CYP2C19* และ *ABCB1* แต่พบความสัมพันธ์ของขนาดยาเฟนิทอยน์ที่ผู้ป่วยได้รับกับ genotype ของ SNPs ในยีน *CYP2C19* และ *ABCB1* เมื่อวิเคราะห์ด้วย Stepwise Multiple Linear Regression เนื่องจากในการวิเคราะห์แบบ Stepwise Multiple Linear Regression เมื่อมีการวิเคราะห์ผลของปัจจัยใดปัจจัยหนึ่งต่อตัวแปรที่ต้องการศึกษา อิทธิพลจากปัจจัยอื่นๆจะถูกควบคุมไว้ ดังนั้นจึงสามารถเห็นผลที่แท้จริงของปัจจัยนั้นๆ ต่อตัวแปรที่ต้องการศึกษา แต่ในการวิเคราะห์แบบ bivariate correlation ความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรทั้งสองที่วิเคราะห์จะถูกบงกชด้วยอิทธิพลของปัจจัยอื่นๆ ที่ไม่สามารถควบคุมได้

เมื่อพิจารณาระดับยาเฟนิทอยน์ในเลือด พบว่าขนาดยาที่ผู้ป่วยได้รับและน้ำหนักตัวของผู้ป่วยเป็นตัวแปรที่มีความสัมพันธ์กับระดับยาเฟนิทอยน์ในเลือดเป็นอย่างมาก ดังนั้นในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างสองตัวแปร (bivariate correlation) จึงได้ใช้ระดับยาในเลือดที่มีการปรับด้วยขนาดยาที่ได้รับและน้ำหนักตัวของผู้ป่วยแล้ว (ระดับยาในเลือดต่อขนาดยาต่อน้ำหนักตัว) เพื่อลดความแปรปรวนของระดับยาในเลือดอันเนื่องมาจากขนาดยาและน้ำหนักตัวที่แตกต่างกัน ซึ่งจากการวิเคราะห์ พบว่ากลุ่มที่มี variant ของยีน *CYP2C9* และ *CYP2C19* จะมีระดับยาเฟนิทอยน์ในเลือดต่อขนาดยาต่อน้ำหนักตัวเฉลี่ยสูงกว่ากลุ่ม homozygous wild type ของแต่ละยีนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งสอดคล้องไปกับการทำงานที่ลดลงของเอนไซม์ที่สร้างได้จากยีนที่มี variant allele (Rettie et al., 1999; Takanashi et al., 2000; de Morais et al., 1994a) ดังเช่นในการศึกษาของ Hung และคณะ (2004) ที่พบว่ากลุ่มที่มี variants ของ *CYP2C9* (**1/*3*) และ *CYP2C19* (**2/*3*) จะมีค่า maximum velocity (V_{max}), และค่า intrinsic clearance

(CL_{int}) ต่ำกว่ากลุ่ม wild type อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และจากการหาความสัมพันธ์ระหว่างระดับยาเฟนิทอยน์ในเลือดกับน้ำหนักตัวของผู้ป่วย ก็พบว่ามีความสัมพันธ์กันในเชิงลบ ซึ่งสอดคล้องไปกับปริมาตรการกระจายยา (Vd) ที่เพิ่มขึ้นเมื่อน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้น

เมื่อพิจารณาจากปัจจัยด้านเพศพบว่า เพศหญิงจะมีระดับยาในเลือดต่อขนาดยาเฉลี่ยสูงกว่าเพศชายอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) ซึ่งตรงกันข้ามกับบางการศึกษาก่อนหน้านี้ (Travers et al., 1972; Houghton et al., 1975) แต่มีความสอดคล้องไปกับปริมาตรการกระจายยา ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญตัวหนึ่งที่มีความสัมพันธ์กับระดับยาในเลือด เนื่องจากเพศหญิงมีน้ำหนักตัวโดยเฉลี่ยน้อยกว่าเพศชาย ทำให้มีปริมาตรการกระจายยาน้อยกว่าเพศชาย ดังนั้นจึงมีระดับยาในเลือดสูงกว่าเพศชาย และเมื่อมีการปรับด้วยน้ำหนักตัวของผู้ป่วยแล้ว ยังคงพบว่าระดับยาในเลือดต่อขนาดยาต่อน้ำหนักตัวเฉลี่ยในเพศหญิงสูงกว่าเพศชายอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.015$) ซึ่งอาจจะมีสาเหตุมาจากปัจจัยอื่นๆได้อีก ซึ่งปัจจัยหนึ่งที่น่าจะเป็นไปได้คือ อิทธิพลของการใช้ยาเม็ดคุมกำเนิด (oral contraceptive) เนื่องจากมีการศึกษาของ De Leacy และคณะ (1979) พบว่า ระดับยาเฟนิทอยน์ในเลือดในผู้ป่วยหญิงที่มีการใช้ยาเม็ดคุมกำเนิดร่วมด้วยจะสูงกว่าผู้ป่วยหญิงที่ไม่มีการใช้ยาเม็ดคุมกำเนิดร่วมด้วยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทั้งนี้ได้มีการศึกษาพบว่า การใช้ยาเม็ดคุมกำเนิดในเพศหญิงมีผลลดการทำงานของเอนไซม์ CYP2C9 (Sandberg et al., 2004; Laine et al., 2003) และ CYP2C19 (Hägg et al., 2001; Laine et al., 2000; Ramsjö et al., 2010; Tamminga et al., 1999) ได้อย่างมีนัยสำคัญ อย่างไรก็ตามในทางตรงกันข้าม ยาเฟนิทอยน์ยังมีคุณสมบัติในการเป็นตัวเหนี่ยวนำเอนไซม์ (enzyme inducer) จึงสามารถส่งผลเพิ่มการเมแทบอลิซึมของยาเม็ดคุมกำเนิดได้เช่นเดียวกัน ทำให้ประสิทธิภาพในการคุมกำเนิดลดลง (Crawford et al., 1990; Kenya, 1972; Tatro, 2010) ซึ่งกลุ่มตัวอย่างในการศึกษานี้มีเพศหญิงที่อยู่ในวัยเจริญพันธุ์ (15-49 ปี) อยู่ร้อยละ 69 ซึ่งก็อาจจะมีความเป็นไปได้ที่กลุ่มตัวอย่างเหล่านี้จะมีการใช้ยาเม็ดคุมกำเนิดร่วมด้วย แต่อย่างไรก็ตามเนื่องจากการวิเคราะห์ครั้งนี้ไม่มีข้อมูลเกี่ยวกับประวัติการใช้ยาเม็ดคุมกำเนิดของกลุ่มตัวอย่าง และจากการที่ยาเฟนิทอยน์และยาเม็ดคุมกำเนิดสามารถส่งผลกระทบต่ออีกกันและกันได้ ในประเด็นนี้จึงยังไม่สามารถสรุปได้ในที่นี้

ส่วนปัจจัยในด้านอายุนั้น พบว่าไม่มีความสัมพันธ์กับระดับยาเฟนิทอยน์ในเลือดต่อขนาดยาต่อน้ำหนักตัว ซึ่งสอดคล้องไปกับการศึกษาก่อนหน้านี้ (Eadie et al., 1973; De Leacy et al., 1979) นอกจากนี้ จากการศึกษาของ Ahn และคณะ (2008) เกี่ยวกับปัจจัยของ

อายุผู้ป่วยกับค่าพารามิเตอร์ทางเภสัชจลนศาสตร์ของยาเฟนิโทยน์นั้น ถึงแม้จะพบว่าผู้ป่วยในกลุ่มสูงอายุ (อายุมากกว่า 65 ปี) จะมีระดับยาเฟนิโทยน์ในเลือดต่ำกว่าผู้ป่วยในกลุ่มอายุ 18-65 ปี อยู่ร้อยละ 17 แต่ก็ไม่พบความแตกต่างของค่าพารามิเตอร์ทางเภสัชจลนศาสตร์ ซึ่งได้แก่ ค่า clearance ปริมาตรการกระจายยา (V_d) และ ค่า elimination half life ระหว่างผู้ป่วยสองกลุ่มอายุดังกล่าว นอกจากนี้ยังมีการศึกษาอื่น ๆ ที่ไม่พบความแตกต่างของค่าพารามิเตอร์ทางเภสัชจลนศาสตร์ในกลุ่มอายุที่แตกต่างกันเช่นเดียวกัน (Grasela et al., 1983; Estruch et al., 1992; Ismail et al., 1994)

เมื่อใช้สถิติ stepwise multiple linear regression เพื่อหาโมเดลที่อธิบายถึงความสัมพันธ์ระหว่างลอการิทึมของระดับยาเฟนิโทยน์ในเลือดต่อขนาดยากับตัวแปรทั้งที่เกี่ยวข้องและไม่เกี่ยวข้องกับลักษณะทางพันธุกรรม พบว่า ปัจจัยทางพันธุกรรมของยีน *CYP2C19* (*CYP2C19*1/*2* หรือ *CYP2C19*1/*3*) และ *CYP2C9* (*CYP2C9*1/*3*) ร่วมกับปัจจัยที่ไม่เกี่ยวข้องกับพันธุกรรม ได้แก่ เพศและน้ำหนักตัว เป็นตัวแปรที่สามารถอธิบายความผันแปรของลอการิทึมของระดับยาเฟนิโทยน์ในเลือดต่อขนาดยาได้ดีที่สุด โดยพบว่า ปัจจัยที่สัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของลอการิทึมของระดับยาเฟนิโทยน์ในเลือดต่อขนาดยา ได้แก่ เพศหญิง รวมถึงการมีลักษณะ genotype ของยีน *CYP2C19* เป็น *CYP2C19*1/*2* หรือ *CYP2C19*1/*3* และการมีลักษณะ genotype ของยีน *CYP2C9* เป็น *CYP2C9*1/*3* ส่วนปัจจัยที่สัมพันธ์กับการลดลงของลอการิทึมของระดับยาเฟนิโทยน์ในเลือดต่อขนาดยาได้แก่ น้ำหนักตัวของผู้ป่วย ซึ่งตัวแปรดังกล่าวทั้งหมดนี้สามารถอธิบายความผันแปรของระดับยาเฟนิโทยน์ในเลือดต่อขนาดยาได้ ร้อยละ 26.1

เนื่องจากยาเฟนิโทยน์ที่ผู้ป่วยได้รับนั้นแพทย์จะสั่งจ่ายให้รับประทานในมื้อก่อนนอน ดังนั้นการเก็บตัวอย่างเลือด ณ จุดที่ระดับยาต่ำสุดก่อนที่ผู้ป่วยจะรับประทานยาในมื้อถัดไป (trough level) จึงไม่สามารถทำได้ ในทางปฏิบัติจึงทำการเก็บตัวอย่างเลือด ณ เวลาที่ผู้ป่วยมาตรวจรักษาตามปกติ ซึ่งผู้ป่วยทุกรายที่คัดเลือกเข้าสู่งานวิจัยนั้นได้รับประทานยาเฟนิโทยน์ต่อเนื่องมาเป็นระยะเวลาตั้งแต่ 2 เดือนขึ้นไป ซึ่งเป็นเวลาที่ระดับยาเข้าสู่ภาวะ steady state แล้ว (Winter and Tozer, 2006) โดยในการศึกษานี้ช่วงระยะเวลาตั้งแต่รับประทานยามื้อล่าสุดจนกระทั่งถึงเวลาที่เจาะเลือดมีค่าแตกต่างกันไปตั้งแต่ 2 – 25 ชั่วโมง แต่เนื่องจากในช่วง steady state นั้น การแกว่งของระดับยามีน้อย เนื่องจากยาเฟนิโทยน์จะมีการดูดซึมอย่างช้าๆ และมีค่าครึ่งชีวิตที่ยาว (Winter and Tozer, 2006; Ahn et al., 2008) ดังนั้น ความเข้มข้นของยา

ในเลือดที่จุดสูงสุดและต่ำสุดจะไม่แตกต่างกันมาก นอกจากนี้จากผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ด้วยสถิติ Spearman-rank correlation ระหว่างระดับยาเฟนิทอยน์ในเลือดต่อขนาดยากับช่วงระยะเวลาตั้งแต่รับประทานยามื้อล่าสุดจนกระทั่งถึงเวลาที่เจาะเลือด และผลการวิเคราะห์จาก stepwise multiple linear regression ในการศึกษานี้ก็ไม่พบความสัมพันธ์ของตัวแปรทั้งสอง

สรุปผลการวิจัย

จากผลการวิจัยพบความถี่ของอัลลีล *CYP2C9**3 *CYP2C19**2 *CYP2C19**3 และ *ABCB1* 3435T ซึ่งเป็น functional SNPs ที่พบบ่อยของยีน *CYP2C9* *CYP2C19* และ *ABCB1* ในผู้ป่วยโรคลมชักชาวไทยกลุ่มนี้ มีค่าเท่ากับ ร้อยละ 2.5 ร้อยละ 26.7 ร้อยละ 0.4 และ ร้อยละ 43.8 ตามลำดับ และจากผลการวิเคราะห์พบว่า ปัจจัยที่มีความสัมพันธ์กับขนาดยาเฟนิทอยน์ที่ผู้ป่วยได้รับ ได้แก่ ความผันแปรทางพันธุกรรมในยีน *CYP2C19* (*2/*2) และยีน *ABCB1* (3435TT) ร่วมกับปัจจัยที่ไม่ใช่พันธุกรรม ได้แก่ เพศของผู้ป่วย และการได้รับยา carbamazepine ร่วมด้วย ซึ่งตัวแปรดังกล่าวทั้งหมดนี้สามารถอธิบายความผันแปรของขนาดยาที่ผู้ป่วยได้รับได้ประมาณร้อยละ 20 ส่วนปัจจัยที่มีความสัมพันธ์กับระดับยาเฟนิทอยน์ในเลือด ได้แก่ ความผันแปรทางพันธุกรรมในยีน *CYP2C9* (*1/*3) และยีน *CYP2C19* (*1/*2 หรือ *1/*3) ร่วมกับปัจจัยที่ไม่ใช่พันธุกรรม ได้แก่ เพศของผู้ป่วย และน้ำหนักตัว ซึ่งตัวแปรดังกล่าวทั้งหมดนี้สามารถอธิบายความผันแปรของระดับยาเฟนิทอยน์ในเลือดต่อขนาดยาได้ร้อยละ 26.1

ซึ่งผลการศึกษานี้ทำให้ทราบข้อมูลเบื้องต้นว่า ลักษณะ genotype ของยีน *CYP2C9* *CYP2C19* และ *ABCB1* มีความสัมพันธ์กับความแตกต่างของขนาดยาเฟนิทอยน์ที่ผู้ป่วยได้รับและระดับยาเฟนิทอยน์ในเลือดระหว่างผู้ป่วยแต่ละราย จึงชี้ให้เห็นว่าการได้ทราบลักษณะ genotype ของยีน *CYP2C9* *CYP2C19* และ *ABCB1* ของผู้ป่วยก่อนได้รับการรักษาด้วยยาเฟนิทอยน์ น่าจะมีประโยชน์ต่อแพทย์ในการพิจารณารักษาผู้ป่วยได้มีประสิทธิภาพมากขึ้นอย่างน้อยสามารถเฝ้าระวังผู้ป่วยในรายที่มีลักษณะยีนที่อาจเสี่ยงต่อการเกิดอาการไม่พึงประสงค์อันเนื่องมาจากระดับยาในเลือดสูงเกินช่วงของการรักษาได้ นอกจากนี้ยังอาจนำไปสู่การวิจัยในขั้นต่อไปเพื่อหาร้อยละของขนาดยาที่ควรลดลงในผู้ป่วยที่มีอัลลีลต่างๆ เหล่านี้

ข้อจำกัดของการศึกษานี้และข้อเสนอแนะ

เนื่องจากตัวอย่างที่ได้ในการศึกษานี้ เป็นการสุ่มมาจากโรงพยาบาลเพียง 3 แห่ง ซึ่งอาจยังไม่สามารถใช้เป็นตัวแทนของประชากรชาวไทยทั้งหมดได้ นอกจากนี้แนวทางการปฏิบัติของแพทย์ต่างโรงพยาบาลและต่างพื้นที่กัน อาจทำให้ลักษณะฟีโนไทป์มีความแตกต่างกันได้ อีกทั้งในการศึกษานี้ไม่สามารถวัดระดับยา ณ เวลาที่ระดับยาต่ำสุด (trough level) ได้ เนื่องจากแพทย์จะมีการสั่งใช้ยาเฟนิทอยน์ให้รับประทานวันละครั้งในเวลาก่อนนอน ดังนั้นหากเป็นไปได้ ควรเก็บตัวอย่างเลือดในเวลาก่อนที่ผู้ป่วยจะรับประทานยาในมือถัดไป จะทำให้ได้ค่าระดับยาในเลือดที่เป็นระดับยาต่ำสุด (trough level) ซึ่งจะสามารถลดความแปรปรวนของข้อมูลระดับยาในเลือดลงได้

เนื่องจากผลจากการวิเคราะห์ในครั้งนี้ พบว่าตัวแปรดังกล่าวนี้ สามารถอธิบายความผันแปรของขนาดยาเฟนิทอยน์ที่ผู้ป่วยได้รับได้เพียงร้อยละ 20 และอธิบายความผันแปรของระดับยาเฟนิทอยน์ในเลือดได้ร้อยละ 26.1 ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ว่าน่าจะมีตัวแปรอื่นๆอีกที่มีความสัมพันธ์และมีส่วนเกี่ยวข้องกับความผันแปรของขนาดยาเฟนิทอยน์ที่ผู้ป่วยได้รับ และความผันแปรของระดับยาเฟนิทอยน์ในเลือด เช่น ลักษณะยีนของตำแหน่งที่ยาไปออกฤทธิ์ ชนิดและความรุนแรงของโรคลมชัก จำนวนครั้งของการชักก่อนเริ่มได้รับการรักษา หรืออายุที่ผู้ป่วยเริ่มเป็นโรคลมชัก เป็นต้น ซึ่งควรจะต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

สมาคมโรคลมชักแห่งประเทศไทย และ การแพทย์, กรม. สถาบันประสาทวิทยา. 2552. แนวทางการรักษาโรคลมชัก Epilepsy : Clinical Practice Guidelines (CD-ROM).

ภาษาอังกฤษ

Ackermann, E., Cascorbi, I., Sachse, C., Brockmöller, J., Mrozikiewicz, P.M., and Roots I. (1997). Frequencies and the allelic linkage of CYP2C9 mutations in a German population, and the detection of a C/T mutation in intron 2 [abstract]. Eur J Clin Pharmacol 52: A71.

Ahn, J. E., et al. (2008). Phenytoin half-life and clearance during maintenance therapy in adults and elderly patients with epilepsy. Neurology 71: 38-43.

Asawavichienjinda, T., Sitthi-Amorn, C., and Tanyanont, W. (2002). Prevalence of epilepsy in rural Thailand: a population-based study. J Med Assoc Thai 85(10): 1066-1073.

Axelrod, J. (1956). The enzymatic N-demethylation of narcotic drugs. J Pharmac exp Ther 117: 322-330.

Aynacioglu, A. S., et al. (1999). Frequency of cytochrome P450 CYP2C9 variants in a Turkish population and functional relevance for phenytoin. Br J Clin Pharmacol 48(3): 409-415.

Bachmann, K. A., Belloto, R. J., and Belloto, Jr. (1999). Differential kinetics of phenytoin in elderly patients. Drugs Aging 15: 235-250.

Bajpai, M., Roskos, L. K., Shen, D. D., and Levy, R. H. (1996). Roles of cytochrome P4502C9 and P4502C19 in the stereoselective metabolism of phenytoin to its major metabolite. Drug Metabolism and Disposition 24: 1401-1403.

Balant, L. P., Gundert-Remy, U., Boobis, A. R., and von Bahr, C. (1989). Relevance of genetic polymorphism in drug metabolism in the development of new drugs. Eur J Clin Pharmacol 36: 551-554.

- Brodie, M. J. (2005). Response to Antiepileptic drug therapy: Winners and Losers. Epilepsia 46(Suppl.10): 31-32.
- Brown, T. R., et al. (1994). Studies of nonlinear pharmacokinetics with stable isotope labeled phenytoin. In T. A. Baillie and J. P. Jones (eds.), Synthesis and applications of isotopically labeled compounds, pp. 157-162. Amsterdam: Elsevier.
- Browne, T. R., Szabo, G. K., Evans, J. E., Evans, B. A., Greenblatt, D. J., and Mikati, M. A. (1988). Carbamazepine increases phenytoin serum concentration and reduces phenytoin clearance. Neurology 38(7): 1146-1150.
- Browne, R. T., and Leduc B. (2002). Phenytoin and other Hydantoin : Chemistry and Biotransformation. In Levy, R. H., Mattson, R. H., Medrum, B. S. and Perucca, E. (eds.), Antiepileptic drugs. 5th ed., pp. 566-580. USA: Lippincott Williams & Wilkins.
- Butler, T. C. (1957). The metabolic conversion of 5, 5-diphenyl hydantoin to 5-(p-hydroxyphenyl)-5-phenyl hydantoin. J Pharmacol Exp Ther 119(1): 1-11.
- Cereghino, J. J., Brock, J. T., Van Meter, J. C., Penry, J. K., Smith, L. D., and White, B.G. (1975). The efficacy of carbamazepine combinations in epilepsy. Clin Pharmacol Ther 18(06): 733-741.
- Cusack, B. J. (2004). Pharmacokinetics in older persons. Am J Geriatr Pharmacother 2: 274-302.
- Crawford, P., Chadwick, J. D., Martin, C., Tjia, J., Back, J. D., and Orme, M. (1990). The interaction of phenytoin and carbamazepine with combined oral contraceptive steroids. Br J Clin Pharmacol 30(6): 892-896.
- De Leacy, E. A., McLeay, C. D., Eadie, M. J., and Tyrer, J. H. (1979). Effects of subjects' sex, and intake of tobacco, alcohol and oral contraceptives on plasma phenytoin levels. Br J Clin Pharmacol 8(1): 33-36.

- Delorenzo, R. J., and Sun, D. A. (2002). Phenytoin and other Hydantoin : Mechanisms of action. In Levy, R. H., Mattson, R. H., Medrum, B. S. and Perucca, E. (eds.), Antiepileptic drugs. 5th ed., pp. 551-564. USA: Lippincott Williams & Wilkins.
- de Morais, S. M., Wilkinson, G. R., Blaisdell, J., Nakamura, K., Meyer U. A., and Goldstein, J. A. (1994a). The major genetic defect responsible for the polymorphism of S-mephenytoin metabolism in humans. J Biol Chem 269: 15419-15422.
- de Morais, S. M., Wilkinson, G. R., Blaisdell, J., Meyer, U. A., Nakamura, K., and Goldstein, J. A. (1994b). Identification of a new genetic defect responsible for the polymorphism of (S)-mephenytoin metabolism in Japanese. Mol Pharmacol 46(4): 594-598.
- Díaz, R. A. S., Sancho, J., and Serratosa, J. (2008). Antiepileptic Drug Interactions. The Neurologist 14: S55–S65.
- Eadie, M.J., Tyrer, J.H. and Hooper, W.D. (1973). Diphenylhydantoin dosage. Proc Aust Assoc Neurol 10: 53-59.
- Eadie, M. J. (2009). Phenytoin. In: Shorvon, S., Perucca, E., Engel, J. Jr. (eds), The Treatment of Epilepsy. 3rd ed., pp.604-618. UK: Blackwell Publishing.
- Ebid, A. H., Ahmed, M. M., and Mohammed, S. A. (2007). Therapeutic drug monitoring and clinical outcomes in epileptic Egyptian patients: a gene polymorphism perspective study. Ther Drug Monit 29(3): 305-312.
- Estruch, J., Galdames, D., Martinetti, A., and Saavedra, I. (1992). Phenytoin pharmacokinetics in young and older adults. Rev Med Chil 120 (10): 1106–1109.
- Fromm, M. F. (2004). Importance of P-glycoprotein at blood-tissue barriers. Trends Pharmacol Sci 25(8): 423-429.

- Gaedigk, A., Casley, W.L., Tyndale, R.F., Sellers, E.M., Jurima-Romet, M., and Leeder, J. S. (2001). Cytochrome P4502C9 (CYP2C9) allele frequencies in Canadian Native Indian and Inuit populations. Can J Physiol Pharmacol 10: 841-847.
- Garcia-Barceló, M., et al. (1999). Frequencies of defective CYP2C19 alleles in a Hong Kong Chinese population: detection of the rare allele CYP2C19*4. Clin Chem 45(12): 2273-2274.
- Gidal, B. E., and Garnet, W. R. (2005). Epilepsy. In J. T. Dipiro, R. L. Talbert, G. C. Yee, G. R. Matzke, B. G. Well and L. M. Posey (eds.), PHARMACOTHERAPY : A Pathophysiologic Approach. 6th ed., pp. 1023-1048. USA: The McGraw-Hill.
- Goldstein, J. A., et al. (1997). Frequencies of the defective CYP2C19 alleles responsible for the mephenytoin poor metabolizer phenotype in various Oriental, Caucasian, Saudi Arabian and American black populations. Pharmacogenetics 7(1): 59-64.
- Gottesman, M. M., Hrycyna, C. A., Schoenlein, P. V., Germann, U. A., and Pastan, I. (1995). Genetic analysis of the multidrug transporter. Annu Rev Genet 29: 607-647.
- Grasela, T. H., et al. (1983). Steady-state pharmacokinetics of phenytoin from routinely collected patient data. Clin Pharmacokinet 8 (4): 355-364.
- Gray, I. C., Nobile, C., Muresu, R., Ford, S., and Spurr, N. K. (1995). A 2.4-megabase physical map spanning the CYP2C gene cluster on chromosome 10q24. Genomics 28: 328-332.
- Hägg, S., Spigset, O., and Dahlqvist, R. (2001). Influence of gender and oral contraceptives on CYP2D6 and CYP2C19 activity in healthy volunteers. Br J Clin Pharmacol, 51, 169-173
- He, N., et al. (2002). CYP2C19 genotype and S-mephenytoin 4'-hydroxylation phenotype in a Chinese Dai population. Eur J Clin Pharmacol 58(1): 15-18.

- Hirsch, L. J., and Pedly, T. A. (2008). Goals of therapy. In J. J. Engel and T. A. Pedly (eds.), Epilepsy : a comprehensive textbook. 3 vols. 2nd ed., pp. 1125-1128. USA: Lippincott Williams & Wilkins, A Wolters Kluwer Business.
- Hoffmeyer, S., et al. (2000). Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A 97(7): 3473-3478.
- Hong, X., et al. (2005). CYP2C9*3 allelic variant is associated with metabolism of irbesartan in Chinese population. Eur J Clin Pharmacol 61(9):627-634.
- Houghton, G. W., Richens, A., and Leighton, M. (1975). Effect of age, height, weight and sex on serum phenytoin concentration in epileptic patients. Br J Clin Pharmacol 2(3): 251-256.
- Hung, C. C., Lin, C. J., Chen, C. C., Chang, C. J., and Liou, H. H. (2004). Dosage recommendation of phenytoin for patients with epilepsy with different CYP2C9/CYP2C19 polymorphisms. Ther Drug Monit 26(5): 534-540.
- Hung, C. C, Chen, C. C, Lin, C. J., and Liou H. H. (2008). Functional evaluation of polymorphisms in the human ABCB1 gene and the impact on clinical responses of antiepileptic drugs. Pharmacogenetics and Genomics 18: 390-402.
- Ingelman-Sundberg, M., Daly, A., and Nelbert, D. Human Cytochrome P450 (CYP) allele nomenclature Committee [online]. Available from: www.cypalleles.ki.se/cyp2c9.htm [2009, August 20]
- Ingelman-Sundberg, M., Daly, A., and Nelbert, D. Human Cytochrome P450 (CYP) allele nomenclature Committee [online]. Available from: www.cypalleles.ki.se/cyp2c19.htm [2009, August 20]
- Ismail, R., Rahman, A.F., and Chand, P. (1994). Pharmacokinetics of phenytoin in routine clinic patients in Malaysia. J Clin Pharm Ther 19 (4): 245-248.
- Kastrup, K. E. (2008). Drug Facts And Comparisons. USA: Wolter Kluwer Health.

- Kenyon, I. E. (1972). Unplanned pregnancy in an epileptic. *Br Med J* 11;1(5801): 686-687.
- Kerb, R., et al. (2001). The predictive value of MDR1, CYP2C9, and CYP2C19 polymorphisms for phenytoin plasma levels. *Pharmacogenomics J* 1(3): 204-210.
- Kimchi-Sarfaty, C., et al. (2007). A "silent" polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity. *Science* 315(5811): 525-528.
- Kimura, M., Ieiri, I., Mamiya, K., Urae, A., and Higuchi, S. (1998). Genetic polymorphism of cytochrome P450s, CYP2C19, and CYP2C9 in a Japanese population. *Ther Drug Monit* 20: 243-247.
- Kuanprasert, S., Dettrairat, S., Palacajornsuk, P., Kunachiwa, W., and Phrommintikul, A. (2009). Prevalence of CYP2C9 and VKORC1 mutation in patients with valvular heart disease in northern Thailand. *J Med Assoc Thai* 92(12): 1597-1601.
- Kuntzman, R., Mark, L. C., Brand, L., Jacobson, M., Levin, W. and Conney, A. H. (1966). Metabolism of drugs and carcinogens by human liver enzymes. *J Pharmac exp Ther* 152: 151-156.
- Kuo, C. C. (1998). A common anticonvulsant binding site for phenytoin, carbamazepine, and lamotrigine in neuronal Na channels. *Mol Pharmacol* 54: 712-721.
- Kwan, P., et al. (2007). Association between ABCB1 C3435T polymorphism and drug-resistant epilepsy in Han Chinese. *Epilepsy Behav* 11(1): 112-117.
- Lai, M. L., Lin, T. S., and Huang, J. D. (1992). Effect of single- and multiple-dose carbamazepine on the pharmacokinetics of diphenylhydantoin. *Eur J Clin Pharmacol* 43(2): 201-203.
- Laine, K., Tybring, G., and Bertilsson, L. (2000). No sex-related differences but significant inhibition by oral contraceptives of CYP2C19 activity as measured by the probe drugs mephenytoin and omeprazole in healthy Swedish white subjects. *Clin Pharmacol Ther* 68(2): 151-159.

- Laine, K., Yasar, U., Widén, J., and Tybring, G. (2003). A screening study on the liability of eight different female sex steroids to inhibit CYP2C9, 2C19 and 3A4 activities in human liver microsomes. Pharmacol Toxicol 93(2): 77-81.
- Lakehal, F., Wurden, J. C., Kalhorn, F. T., and Levy, R. H. (2002). Carbamazepine and oxcarbazepine decrease phenytoin metabolism through inhibition of CYP2C19. Epilepsy Research 52: 79-83
- Lascelles, P. T., Kocen, R. S. and Reynolds, E. H. (1970). The distribution of plasma phenytoin levels in epileptic patients. J Neurol Neurosurg Psychiat 33: 501-505.
- Lee, S. S., Kim, K. M., Thi-Le, H., Yea, S. S., Cha, I. J., and Shin, J. G. (2005). Genetic polymorphism of CYP2C9 in a Vietnamese Kinh population. Ther Drug Monit 27(2): 208-210.
- Lee, S. Y., Lee, S. T., and Kim, J. W. (2007). Contributions of CYP2C9/CYP2C19 genotypes and drug interaction to the phenytoin treatment in the Korean epileptic patients in the clinical setting. J Biochem Mol Biol 40(3): 448-452.
- Löscher, W., Klotz, U., Zimprich, F., and Schmidt, D. (2009). The clinical impact of pharmacogenetics on the treatment of epilepsy. Epilepsia 50(1): 1-23.
- Lowenstein, D. H. (2005). Seizures and Epilepsy. In D. L. Kasper, A. S. Fauci, D. L. Longo, E. Braunwald, S. L. Hauser and J. L. Jameson (eds.), Harrison's Principles of Internal Medicine. 16th ed., pp. 2357-2372. USA: The McGraw-Hill.
- Lund, L. (1973). Effects of phenytoin in patients with epilepsy in relation to its plasma concentration. In Davies, D. S. and Pritchard, B. N. C. Biological Effects of Drugs in Relation to their Plasma Concentration. pp. 227-238. London: Macmillan.

- Macdonald, R. L. (1999). Cellular actions of antiepileptic drugs. In: Eadie, M. J., and Vajda, F. J. (eds), Antiepileptic Drugs: Pharmacology and Therapeutics, pp.123–150. Germany: Springer-Verlag.
- Mamiya, K., et al. (1998). The effects of genetic polymorphisms of CYP2C9 and CYP2C19 on phenytoin metabolism in Japanese adult patients with epilepsy: studies in stereoselective hydroxylation and population pharmacokinetics. Epilepsia 39(12):1317–1323.
- McEvoy, G. K., et al. (2008). AHFS Drug Information. USA: Authority of broad of the American Society of Health-System Pharmacists.
- McNamara, J. O. (2006). Pharmacotherapy of epilepsy. In L. L. Brunton (ed), Goodman and Gillman's The pharmacological basis of therapeutics. 11th ed, pp.501-525. USA: The McGraw-Hill.
- Merritt, H. H., and Putnam, T. J. (1938). A new series of anticonvulsant drugs tested by experiments on animals. Arch Neurol Psychiatry 39: 1003-1015.
- Nasu, K., Kubota, T., and Ishizaki, T. (1997). Genetic analysis of CYP2C9 polymorphism in a Japanese population. Pharmacogenetics 7: 405–409.
- Odani, A., et al. (1997). Genetic polymorphism of the CYP2C subfamily and its effect on the pharmacokinetics of phenytoin in Japanese patients with epilepsy. Clin Pharmacol Ther 62(3): 287-292.
- O'Malley, K., Crooks, J., Duke, E. and Stevenson, I.H. (1971). Effect of age and sex on human drug metabolism. Br med J 3: 607-609.
- Persson, I., Aklillu, E., Rodrigues, F., Bertilsson, L., and Ingelman-Sundberg, M. (1996). S-mephenytoin hydroxylation phenotype and CYP2C19 genotype among Ethiopians. Pharmacogenetics 6(6): 521-526.
- Potschka, H. and Löscher, W. (2001). In vivo evidence for P-glycoprotein-mediated transport of phenytoin at the blood-brain barrier of rats. Epilepsia 42:1231–1240.

- Quinn, G. P., Axelrod, J. and Brodie, B.B. (1958). Species, strain and sex differences in metabolism of hexobarbitone, amidopyrine, antipyrine and aniline. Biochem Pharmacol 1: 152-159.
- Ramsjö, M., Aklillu, E., Bohman, L., Ingelman-Sundberg, M., Roh, H. K., and Bertilsson, L. (2010). CYP2C19 activity comparison between Swedes and Koreans: effect of genotype, sex, oral contraceptive use, and smoking. Eur J Clin Pharmacol 66(9): 871-877.
- Rettie, A. E., Haining, R. L., Bajpai, M., and Levy, R. H. (1999). A common genetic basis for idiosyncratic toxicity of warfarin and phenytoin. Epilepsy Res 35(3): 253-255.
- Rogers, J. F., Nafziger, A. N., and Bertino, J. S. (2002). Pharmacogenetics affects dosing, efficacy, and toxicity of cytochrome P450-metabolized drugs. Am J Med 113(9): 746-750.
- Roh, H. K., Dahl, M. L., Tybring, G., Yamada, H., Cha, Y. N., and Bertilsson, L. (1996). CYP2C19 genotype and phenotype determined by omeprazole in a Korean population. Pharmacogenetics 6(6): 547-551.
- Sandberg, M., Johansson, I., Christensen, M., Rane, A., and Eliasson, E. (2004). The impact of CYP2C9 genetics and oral contraceptives on cytochrome P450 2C9 phenotype. Drug Metab Dispos 32(5): 484-489.
- Sangviroon, A. (2007). VKORC1, CYP2C9 polymorphisms and clotting factors associated with Warfarin maintenance dose. Doctoral dissertation, Department of Pharmaceutical care Faculty of Pharmaceutical Sciences Chulalongkorn University.
- Scordo, G. M., Aklillu, E., Yasar, U., Dahl, M.-L., Spina, E., and Ingelman-Sundberg, M. (2001). Genetic polymorphism of cytochrome P450 2C9 in a Caucasian and a black African population. J Clin Pharmacol 52: 447-450.
- Scordo, M. G., Caputi, A. P., D'Arrigo, C., Fava, G., and Spina, E. (2004). Allele and genotype frequencies of CYP2C9, CYP2C19 and CYP2D6 in an Italian population. Pharmacol Res 50(2): 195-200.

- Seng, K. C., Gin, G. G., Sangkar, J. V. and Phipps, M. E. (2003). Frequency of Cytochrome P450 2C9 (CYP2C9) Alleles in Three Ethnic Groups in Malaysia. AsPac J Mol Biol 11: 83-91.
- Siddiqui, A., et al. (2003). Association of multidrug resistance in epilepsy with a polymorphism in the drug-transporter gene ABCB1. N Engl J Med 348(15): 1442-1448.
- Siegel, S. and Castellan N. J. (1988). Nonparametric Statistics for the Behavioral Sciences. 2nd ed. New York: McGraw-Hill.
- Soranzo, N., et al. (2004). Identifying candidate causal variants responsible for altered activity of the ABCB1 multidrug resistance gene. Genome Res 14(7): 1333-1344.
- Sullivan-Klose, T. H., et al., (1996). The role of the CYP2C9-Leu³⁵⁹ allelic variant in the tolbutamide polymorphism. Pharmacogenetics 6: 341–349.
- Tabachnic, G. B., and Fidell, S. L. (2007). Using Multivariate Statistics. 5th ed. Boston: Pearson/Allyn&Bacon.
- Takahashi, H., Kashima, T., and Nomoto, S. (1998). Comparisons between in-vitro and in-vivo metabolism of (S)-warfarin: catalytic activities of cDNA-expressed CYP2C9, its Leu359 variant and their mixture versus unbound clearance in patients with the corresponding CYP2C9 genotypes. Pharmacogenetics 8: 365–373.
- Takanashi, K., Tainaka, H., Kobayashi, K., Yasumori, T., Hosakawa, M., and Chiba, K. (2000). CYP2C9 Ile359 and Leu359 variants: enzyme kinetic study with seven substrates. Pharmacogenetics 10(2): 95-104.
- Tamminga, W. J., et al. (1999). CYP2D6 and CYP2C19 activity in a large population of Dutch healthy volunteers: indications for oral contraceptive-related gender differences. Eur J Clin Pharmacol 55: 177-184.

- Tamminga, W. J., Wemer, J., Oosterhuis, B., de Zeeuw, R. A., de Leij, L. F., and Jonkman, J. H. (2001). The prevalence of CYP2D6 and CYP2C19 genotypes in a population of healthy Dutch volunteers. Eur J Clin Pharmacol 57(10): 717-22.
- Tassaneeyakul, W., et al. (2006). CYP2C19 genetic polymorphism in Thai, Burmese and Karen populations. Drug Metab Pharmacokinet 21(4): 286-290.
- Tate, S. K., et al. (2005). Genetic predictors of the maximum doses patients receive during clinical use of the anti-epileptic drugs carbamazepine and phenytoin. Proc Natl Acad Sci U S A 102(15): 5507-5512.
- Tatro, S. D. (2010). Drug interaction fact. USA: Wolters Kluwer Health.
- Taube, J., Halsall, D., and Baglin, T. (2000). Influence of cytochrome P-450 CYP2C9 polymorphisms on warfarin sensitivity and risk of over-anticoagulation in patients on long-term treatment. Blood 96: 1816–1819.
- Tishler, D. M., Weinberg, K. I., Hinton, D. R., Barbaro, N., Annett, G. M., and Raffel, C. (1995). MDR1 gene expression in brain of patients with medically intractable epilepsy. Epilepsia 36: 1-6.
- Travers, R., Reynolds, E. H. and Gallagher, B. (1972). Variation in response to anticonvulsants in a group of epileptic patients. Arch Neurol 27: 29-33.
- Vickrey, B. G., Hays, R. D., Rausch, R., Sutherling, W. W., Engel, J. Jr., and Brook, R. H. (1994). Quality of life of epilepsy surgery patients as compared with outpatients with hypertension, diabetes, heart disease, and/or depressive symptoms. Epilepsia 35: 597–607.
- Wang, S. L., Huang, J. D., Lai, M. D., and Tsai, J. J. (1995). Detection of CYP2C9 polymorphism based on the polymerase chain reaction in Chinese Pharmacogenetics 5: 37–42.
- Wang, D., Johnson, A. D., Papp, A. C., Kroetz, D. L., and Sadee, W. (2005). Multidrug resistance polypeptide 1 (MDR1, ABCB1) variant 3435C>T affects mRNA stability. Pharmacogenet Genomics 15: 693-704 .

- Watanabe, M., Iwahashi, K., Kugoh, T., and Suwaki, H. (1998). The relationship between phenytoin pharmacokinetics and the CYP2C19 genotype in Japanese epileptic patients. Clin Neuropharmacol 21(2): 122-126.
- Winter, M. E. and Tozer, T. N. (2006). Phenytoin. In Troy, D. (ed), Applied Pharmacokinetics & Pharmacodynamics: Principles of Therapeutic Drug Monitoring. pp. 465-490. USA: Lippincott Williams&Wilkins.
- World Health Organization (WHO). Epilepsy fact sheet [online]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs999/en/index.html> [2011, March 14].
- Xiao, Z. S., et al. (1997). Differences in the incidence of the CYP2C19 polymorphism affecting the S-mephenytoin phenotype in Chinese Han and Bai populations and identification of a new rare CYP2C19 mutant allele. J Pharmacol Exp Ther 281(1): 604-609.
- Xie, H. G., Kim, R. B., Stein, C. M., Wilkinson, G. R., and Wood, A. J. J. (1999). Genetic polymorphism of (S)-mephenytoin 4'-hydroxylation in populations of African descent. Br J Clin Pharmacol 48(3): 402-408.
- Xie, H. G. (2000). Genetic variations of S-mephenytoin 4'-hydroxylase (CYP2C19) in the Chinese population. Life Sci 66: PL175-181.
- Xie, H. G., Prasad, H. C., Kim R. B., and Stein, C. M. (2002a). CYP2C9 allelic variants: ethnic distribution and functional significance. Advanced Drug Delivery Reviews 54: 1257-1270.
- Xie, H. G., et al. (2002b). Frequency of the defective CYP2C9 variant alleles in different ethnic groups [abstract]. Clin Pharmacol Ther 71: 102.
- Yu, B. N., et al. (2004). CYP2C9 allele variants in Chinese hypertension patients and healthy controls. Clin Chim Acta 348(1-2): 57-61.
- Yukawa, E., and Mamiya, K. (2006). Effect of CYP2C19 genetic polymorphism on pharmacokinetics of phenytoin and phenobarbital in Japanese epileptic patients using Non-linear Mixed Effects Model approach. J Clin Pharm Ther 31(3): 275-282.

- Yamada, S., et al. (2001). Genetic differences in *CYP2C19* single nucleotide polymorphisms among four Asian populations. J Gastroenterol 36(10): 669-672.
- Yoon, Y. R., et al. (2001). Frequency of cytochrome P450 2C9 mutant alleles in a Korean population. Br J Clin Pharmacol 51: 277–280.
- Zaphiropoulos, P. G. (1999). RNA molecules containing exons originating from different members of the cytochrome P450 2C gene subfamily (CYP2C) in human epidermis and liver. Nucleic Acids Res 27: 2585-2590.
- Zielinski, J.J., Haidukewych, D., and Leheta, B.J. (1985). Carbamazepine_/phenytoin interaction: elevation of plasma phenytoin concentrations due to carbamazepine comedication. Ther Drug Monit 7: 51-53.
- Zielinski, J.J., and Haidukewych, D. (1987). Dual effects of carbamazepine-phenytoin interaction. Ther Drug Monit 9: 21-23.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
เอกสารรับรองจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์

Q049q/52_Exp



คณะอนุกรรมการพิจารณาโครงการวิจัยกรมแพทยทหารบก

ชั้น 5 อาคารพระมงกุฎเกล้าเวชวิทยา โรงพยาบาลพระมงกุฎเกล้า

317 ถนนราชวิถี เขตราชเทวี กรุงเทพฯ 10400 โทรศัพท์ (662)354-7600-28 ต่อ 94270 โทรสาร (662)354-9011

ที่ 1778 /2552

วันที่ ๒๗ ธันวาคม 2552

เรื่อง แจ้งผลการพิจารณาโครงการวิจัย

เรียน นางสาวมาลา อินสะใจ นศ.ป.โท คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สิ่งที่ส่งมาด้วย - แบบรายงานสรุปผลการวิจัย

ตามที่ ท่านได้ส่งโครงการวิจัย เรื่อง "การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความแปรปรวนทางพันธุกรรมในยีน CYP2C9, CYP2C19 และ ABCB1 ร่วมกับความแปรปรวนที่ไม่ใช่พันธุกรรม กับขนาดยาที่ใช้ควบคุมอาการ และระดับยาในเลือดของยาเฟนิโทอิน ในผู้ป่วยโรคลมชักชาวไทย" [Association study of CYP2C9, CYP2C19 and ABCB1 genetic variants and non – genetic variants with phenytoin maintenance dose and blood levels in Thai epileptic patients.] เพื่อพิจารณาระเบียบวิธีวิจัยและจริยธรรม จากคณะอนุกรรมการพิจารณาโครงการวิจัย กรมแพทยทหารบก เพื่อประกอบการพิจารณาสันับสนุนการเก็บข้อมูล นั้น คณะอนุกรรมการพิจารณาโครงการวิจัย กรมแพทยทหารบก อนุมัติเมื่อวันที่ 24 ธันวาคม 2552 เมื่อท่านได้ทำวิทยานิพนธ์ กรุณาวิทยานิพนธ์ฉบับสมบูรณ์ของท่าน และแบบรายงานสรุปผลการวิจัย มายังคณะอนุกรรมการฯ 1 ชุด

จึงเรียนมาเพื่อทราบ

ขอแสดงความนับถือ

พันเอกหญิง

(เยาวนา ธนะพัฒน์)

ประธานคณะอนุกรรมการพิจารณาโครงการวิจัย กรมแพทยทหารบก



องค์กรแพทย์ โรงพยาบาลตำรวจ
สำนักงานแพทย์ใหญ่
492/1 ถนนพระราม 1 แขวงวังใหม่
เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

เอกสารรับรองโครงการวิจัย

โดย

คณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ องค์กรแพทย์ โรงพยาบาลตำรวจ

เลขที่หนังสือรับรอง 0036(คกท)/158

ชื่อโครงการ/ ภาษาไทย	การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความแปรปรวนทางพันธุกรรมในยีน CYP2C9, CYP2C19 และ ABCB1 ร่วมกับความแปรปรวนที่ไม่ใช่พันธุกรรม กับขนาดยาที่ใช้ ควบคุมอาการและระดับยาในเลือดของยาเฟนิทอยน์ในผู้ป่วยโรคลมชักชาวไทย
ชื่อโครงการ/ ภาษาอังกฤษ	ASSOCIATION STUDY OF CYP2C9, CYP2C19 AND ABCB1 GENETIC VARIANTS AND NON-GENETIC VARIANTS WITH PHENYTOIN MAINTENANCE DOSES AND BLOOD LEVELS IN THAI EPILEPTIC PATIENTS.
ชื่อหัวหน้าโครงการ / หน่วยงานที่สังกัด	นางสาว มาลา อินสระโร นิสิตหลักสูตรเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
รหัสโครงการ	-
สถานที่ทำการวิจัย	แผนกผู้ป่วยนอก โรงพยาบาลตำรวจ
เอกสารรับรอง	- แบบเสนอโครงการวิจัยเพื่อขอรับการพิจารณา - หนังสือให้ความยินยอมเข้าร่วมโครงการ - แบบบันทึกข้อมูล
รับรองโดย	คณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ องค์กรแพทย์ โรงพยาบาลตำรวจ
วันที่รับรอง	27 พฤศจิกายน 2552
วันหมดอายุ	26 พฤศจิกายน 2553

หนังสือรับรองฉบับนี้ออกโดยความเห็นชอบในการพิจารณาจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัย
ในมนุษย์ องค์กรแพทย์ โรงพยาบาลตำรวจ ตามกฎเกณฑ์สากล (ICH-GCP)

พันตำรวจเอก

(สุพัฒน์ เลหาะวัตนะ)

ประธานอนุกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์

โรงพยาบาลตำรวจ



โรงพยาบาลสุรินทร์
68 ถนนหลักเมือง ตำบลในเมือง
อำเภอเมือง จังหวัดสุรินทร์ 32000

เอกสารรับรองโครงการวิจัย

โดย

คณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ องค์การแพทย์ โรงพยาบาลสุรินทร์

เลขที่หนังสือรับรอง 06/2553

ชื่อโครงการ/ภาษาไทย	การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความแปรปรวนทางพันธุกรรมในยีน CYP2C9, CYP2C19 และ ABCB1 ร่วมกับความแปรปรวนที่ไม่ใช่พันธุกรรม กับขนาดยาที่ใช้ควบคุมอาการและระดับยาในเลือดของยาเฟนิทอยนในผู้ป่วยโรคลมชักชาวไทย
ชื่อโครงการ/ภาษาอังกฤษ	ASSOCIATION STUDY OF CYP2C9, CYP2C19 AND ABCB1 GENETIC VARIANTS AND NON-GENETIC VARIANTS WITH PHENYTOIN MAINTENANCE DOSES AND BLOOD LEVELS IN THAI EPILEPTIC PATIENTS
ชื่อหัวหน้าโครงการ/ หน่วยงานที่สังกัด	นางสาวมาลา อินสระโ นิสิตหลักสูตรเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
รหัสโครงการ	-
สถานที่ทำการวิจัย	แผนกผู้ป่วยนอก โรงพยาบาลสุรินทร์
เอกสารรับรอง	-แบบเสนอโครงการวิจัยเพื่อขอรับการพิจารณา -หนังสือให้ความยินยอมเข้าร่วมโครงการ -แบบบันทึกข้อมูล
รับรองโดย	คณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ องค์การแพทย์ โรงพยาบาลสุรินทร์
วันที่รับรอง	15 กรกฎาคม 2553
วันหมดอายุ	14 กรกฎาคม 2554

หนังสือรับรองฉบับนี้ออกโดยความเห็นชอบในการพิจารณาจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์
องค์การแพทย์ โรงพยาบาลสุรินทร์ ตามเกณฑ์สากล (ICH-GCP)

(นายวินัย อึ้งพินิจพงศ์)

(นายภาณุวัฒน์ วิรัตน์ภานุ)

เลขานุการคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์

ประธานคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์

โรงพยาบาลสุรินทร์

โรงพยาบาลสุรินทร์

ภาคผนวก ข
สารเคมีและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

รายการสารเคมีและบริษัทผู้ผลิต

สารเคมี

Erythrocyte lysis buffer
QIAamp DNA Blood Mini Kit
Phosphate Buffer Saline (PBS)
Sodium Chloride (NaCl)
Potassium Chloride (KCl)
Disodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4)
potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)
Taqman Drug Metabolism Genotyping assay (rs1057910, rs4244285, rs4986893, rs1045642)
Taqman Universal PCR Master Mix without UNG
DNAse free water

บริษัทผู้ผลิต

QIAGEN, Germany
QIAGEN, German
เตรียมขึ้นเอง
Ajax Finechem, Australia
Ajax Finechem, Australia
Sigma, USA
Ajax Finechem, Australia
Applied Biosystem, USA
Applied Biosystem, USA
AppliChem, Germany

รายการอุปกรณ์และเครื่องมือและบริษัทผู้ผลิต

อุปกรณ์และเครื่องมือ

K_3EDTA tube
Serum vacutainer tube
เครื่อง centrifuge Hermle Z383K
เครื่อง centrifuge Mikro 120
เครื่อง Vortex mixer
เครื่อง NanoDrop TM 1000 Spectrophotometer
MicroAmp Optical 96-well reaction plate
MicroAmp Optical Adhesive Film kit
ABI 7500 Real-Time PCR

บริษัทผู้ผลิต

BD vacutainer, USA
BD vacutainer, USA
Hermle Labortechnik GmbH, Germany
Hettich Zentrifugen, USA
Labnet International Inc., USA
Thermo Scientific, USA
Applied Biosystems, USA
Applied Biosystems, USA
Applied Biosystems, USA

การเตรียม Phosphate Buffer Saline (PBS) ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

สารเคมี

1. KH_2PO_4 0.24 กรัม
2. Na_2HPO_4 1.44 กรัม
3. KCl 0.2 กรัม
4. NaCl 8 กรัม
5. Ultrapure water

วิธีการเตรียม

1. ละลายสารทั้งหมดลงใน ultrapure water
2. นำสารละลายที่ได้ไปปรับ pH ให้ได้ในช่วง 7.2-7.4
3. ปรับปริมาตรด้วย ultrapure water ให้ครบ 1000 มิลลิลิตร
4. ทำให้ปราศจากเชื้อโดยการนำเข้าไปเครื่อง autoclave อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที
5. ตั้งไว้ให้เย็น แล้วจึงนำเข้าไปเก็บไว้ในตู้เย็น

ภาคผนวก ค

ระดับนัยสำคัญทางคลินิกของการเกิดอันตรกิริยาระหว่างยา (Significance)

ระดับนัยสำคัญทางคลินิกของการเกิดอันตรกิริยาระหว่างยา (Significance)

การกำหนดระดับนัยสำคัญทางคลินิกของการเกิดอันตรกิริยาระหว่างยาจะกำหนดเป็นตัวเลขเรียงลำดับตั้งแต่ 1-5 ตามระดับของความรุนแรงของอันตรกิริยาที่เกิดขึ้นและหลักฐานหรือเอกสารยืนยันประกอบ (Tatro, 2010) ดังแสดงไว้ในตารางที่ 25

ตารางที่ 25 แสดงระดับนัยสำคัญทางคลินิกของการเกิดอันตรกิริยาระหว่างยา

ระดับนัยสำคัญ	ระดับความรุนแรง	ระดับของหลักฐานยืนยัน
1	Major	Suspected or >
2	Moderate	Suspected or >
3	Minor	Suspected or >
4	Major/ Moderate	Possible
5	Minor	Possible
	Any	Unlikely

หมายเหตุ: Suspected or > หมายถึง มีเอกสารยืนยันแบบ suspected หรือ probable หรือ established

- ระดับนัยสำคัญระดับที่ 1 (sig.1) คือ มีความรุนแรงในระดับมาก (major) และมีเอกสารยืนยันแบบ suspected หรือ probable หรือ established
- ระดับนัยสำคัญระดับที่ 2 (sig.2) คือ มีความรุนแรงในระดับปานกลาง (moderate) และมีเอกสารยืนยันแบบ suspected หรือ probable หรือ established
- ระดับนัยสำคัญระดับที่ 3 (sig.3) คือ มีความรุนแรงในระดับน้อย (minor) และมีเอกสารยืนยันแบบ suspected หรือ probable หรือ established
- ระดับนัยสำคัญระดับที่ 4 (sig.4) คือ มีความรุนแรงในระดับ major หรือ moderate และมีเอกสารยืนยันแบบ possible
- ระดับนัยสำคัญระดับที่ 5 (sig.5) คือ มีความรุนแรงในระดับ minor และมีเอกสารยืนยันแบบ possible หรือ มีความรุนแรงในระดับใดก็ได้ (any) และมีเอกสารยืนยันแบบ unlikely

Severity: การประเมินความรุนแรงของอันตรกิริยาระหว่างยาที่เกิดขึ้นมีประโยชน์ในการพิจารณา risk และ benefit แบ่งความรุนแรงได้เป็น 3 ระดับ ดังนี้

- Major: ผลที่เกิดขึ้นจะก่อให้เกิดอันตรายถึงชีวิตหรือเป็นสาเหตุของการเสียชีวิตอย่างถาวร
- Moderate: ผลที่เกิดขึ้นทำให้ผู้ป่วยมีอาการเลวลง ทำให้ต้องการการรักษาเพิ่มขึ้น ต้องนอนพักรักษาตัวในโรงพยาบาล หรืออยู่ในโรงพยาบาลนานขึ้น
- Minor: ผลที่เกิดขึ้นน้อย เป็นเพียงก่อให้เกิดความรำคาญ หรือบางครั้งแทบสังเกตไม่ได้ แต่ทั้งนี้ต้องไม่รบกวนผลการรักษาที่ต้องการ ไม่จำเป็นต้องให้การรักษา

Documentation: หมายถึง หลักฐานหรือเอกสารยืนยันประกอบ ให้มีความมั่นใจยิ่งขึ้นว่ามีอันตรกิริยาระหว่างยาเกิดขึ้นจริง อย่างไรก็ตามหลักฐานประกอบนี้ไม่ได้บอกลถึงอุบัติการณ์หรือความถี่ของอันตรกิริยาระหว่างยาที่เกิดขึ้นหรือแม้แต่ความรุนแรงของการเกิดอันตรกิริยาระหว่างยา แนวทางการกำหนดระดับ documentation มีดังนี้

- Established หมายถึง พิสูจน์ได้ว่าเกิดอันตรกิริยาระหว่างยาจริง โดยมี controlled studies แน่นนอน หรือมีผลทำให้เภสัชจลนศาสตร์เปลี่ยนไป ซึ่งยืนยันจากผลการศึกษาในคน โดยผลจากอันตรกิริยาทางเภสัชจลนศาสตร์ทำให้ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาเปลี่ยนแปลงไป มีลักษณะทางคลินิกสนับสนุนการเกิดอันตรกิริยา
- Probable หมายถึง น่าจะใช้อันตรกิริยาระหว่างยา แต่ยังไม่ได้มีการพิสูจน์ทางคลินิก เป็นอันตรกิริยาทางเภสัชจลนศาสตร์ ซึ่งพิสูจน์ได้และมีผลมากพอ ทำให้ระดับยาในพลาสมาเปลี่ยนแปลง และอาจทำให้ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของยาเปลี่ยนแปลงไป หรือมีการทดลองยืนยันได้ในสัตว์ทดลอง ในกรณีที่ไม้อาจทำการทดลองแบบ controlled study ในมนุษย์ได้
- Suspected หมายถึง อาจเกิดอันตรกิริยาระหว่างยาได้ มีข้อมูลบ้างแต่ยังต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมอีก เป็นอันตรกิริยาทางเภสัชจลนศาสตร์ที่เกิดขึ้นจาก well controlled studies แม้คาดว่าจะทำให้ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาเปลี่ยนแปลง แต่ไม่มีการสรุปแน่ชัด เนื่องจากไม่มีผลของการเปลี่ยนแปลงระดับยาในพลาสมา หรือมีรายงานการเปลี่ยนแปลงฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของยาหลาย case หรือจาก uncontrolled studies ที่ทำซ้ำๆหลายครั้ง

- Possible หมายถึง อาจเกิดอันตรกิริยาระหว่างยาได้ แต่มีข้อมูลจำกัด แม้มีอันตรกิริยาทางเภสัชจลนศาสตร์แต่การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวไม่อาจทำนายได้ว่าจะเป็นผลจากการตอบสนองของยา หรือข้อมูลที่แสดงฤทธิ์การเปลี่ยนแปลงทางเภสัชวิทยาที่มีจำกัด
- Unlikely หมายถึง ยังสงสัย อาการทางคลินิกเปลี่ยนไปไม่ชัดเจน มีอันตรกิริยาทางเภสัชจลนศาสตร์ แต่ผลทางเภสัชวิทยาที่เปลี่ยนแปลงไม่น่าจะใช้ หรือเอกสารที่ยืนยันได้ไม่มีคุณภาพหรือไม่อาจใช้พิสูจน์ได้ หรือแม้จะมีรายงานการเกิดอันตรกิริยาระหว่างยา แต่ผลของ well controlled studies ชัดแย้งกับอาการทางคลินิก

ภาคผนวก ง

ผลการทดสอบสมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก (Hardy-Weinberg equilibrium)

ตารางที่ 26 แสดงความถี่ของ genotype (genotype frequencies) ของ candidate SNPs ในยีน CYP2C9 CYP2C19 และ ABCB1 และการทดสอบสมมติฐานดี-ไวน์เบิร์กด้วย Chi-square test

SNPs	Genotypes	Observed	%	Expected
CYP2C9*3 (c.1075A>C)	AA (*1/*1)	114	95.0	114.08
	AC (*1/*3)	6	5.0	5.85
	CC (*3/*3)	0	0.0	0.08
	total	120		
$\chi^2 = 0.0789, p = 0.7788, d.f.=1$				
CYP2C19*2 (c.681 G>A)	GG (*1/*1)	62	51.7	64.47
	GA (*1/*2)	52	43.3	46.97
	AA (*2/*2)	6	5.0	8.55
	total	120		
$\chi^2 = 1.3964, p = 0.2373, d.f.=1$				
CYP2C19*3 (c.636 G>A)	GG (*1/*1)	119	99.2	119.04
	GA (*1/*3)	1	0.8	0.96
	AA (*3/*3)	0	0.00	0.00
	total	120		
$\chi^2 = 0.0039, p = 0.9499, d.f.=1$				
ABCB1 (3435C>T)	CC	39	32.5	37.97
	CT	57	47.5	59.06
	TT	24	20.0	22.97
	total	120		
$\chi^2 = 0.1463, p = 0.7021, d.f.=1$				

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวมาลา อินสระโร เกิดวันที่ 27 เมษายน 2522 ที่จังหวัดพัทลุง สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีเภสัชศาสตรบัณฑิต เกียรตินิยมอันดับสอง จากคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ เมื่อปีการศึกษา 2545 หลังจากนั้นเข้ารับราชการตำแหน่งเภสัชกรที่โรงพยาบาลสังขะ จังหวัดสุรินทร์ เป็นเวลา 5 ปี และได้เข้าศึกษาต่อในหลักสูตรเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเภสัชวิทยา ที่คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2551 ผลงานที่ได้นำเสนอ ได้แก่ “Association of variants in *CYP2C19* and *ABCB1* with phenytoin maintenance doses in Thai patients with epilepsy” นำเสนอในรูปแบบโปสเตอร์ในงานประชุม 8th Asian & Oceanian Epilepsy Congress ณ นครเมลเบิร์น ประเทศออสเตรเลีย ระหว่างวันที่ 21-24 ตุลาคม 2553 และได้รับรางวัลรองชนะเลิศอันดับสอง ในการเสนอผลงานโปสเตอร์เรื่อง “Associations of *CYP2C9*, *CYP2C19* genetic variants and non-genetic variants with phenytoin blood concentrations in Thai epileptic patients” ในงานประชุมวิชาการประจำปี ครั้งที่ 33 สมาคมเภสัชวิทยาแห่งประเทศไทย ณ โรงแรมไดมอนด์ พลาซ่า อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา ระหว่างวันที่ 17-19 มีนาคม 2554