



ความสัมพันธ์ระหว่างภาวะพหุสัญญาณของ CYP2C9 และ VKORC1 ต่อขนาดยาแวน์ฟาริน
ในผู้ป่วยชาวไทย

โดย

นางสาวบุรฉกร ทรัพย์สุพรรณ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาการทางเภสัชศาสตร์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2556

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ความสัมพันธ์ระหว่างภาวะพหุสัณฐานของ CYP2C9 และ VKORC1 ต่อขนาดยาแวก์ฟาริน
ในผู้ป่วยชาวไทย

โดย

นางสาวบุรฉกร ทรัพย์สุพรรณ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาการทางเภสัชศาสตร์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2556

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

**WARFARIN DOSE REQUIREMENT IN THAI PATIENTS WITH CYP2C9 AND
VKORC1 GENETIC POLYMORPHISM**

By

Miss Burussakorn Subsphan

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree

Master of Pharmacy Program in Pharmaceutical Sciences

Program of pharmaceutical sciences

Graduate School, Silpakorn University

Academic Year 2013

Copyright of Graduate School, Silpakorn University

54364201 : สาขาวิชาวิทยาการทางเภสัชศาสตร์

คำสำคัญ : วาร์ฟาริน/ภาวะพหุสัณฐาน/ไซโตโครม พี2ซี9/วิเคออาร์ซี1

บุรุษกร ทรัพย์สุพรรณ : ความสัมพันธ์ระหว่างภาวะพหุสัณฐานของ CYP2C9 และ VKORC1 ต่อขนาดยารวาร์ฟารินในผู้ป่วยชาวไทย. อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ : ภก.รศ.ดร.ฉัตรชัย ฉิ้นไพศาล และ ภก.รศ.ดร.มนัส พงศ์ชัยเดชา. 61 หน้า.

การศึกษานี้เป็นการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างภาวะพหุสัณฐาน ยีน CYP2C9 และ VKORC1 กับขนาดยารวาร์ฟารินและสร้างสมการเพื่อทำนายขนาดยารวาร์ฟารินที่เหมาะสมในผู้ป่วยชาวไทย

การศึกษานี้ทำในผู้ป่วยนอกที่ได้รับยารวาร์ฟารินจำนวน 91 คนของโรงพยาบาลพลพยุหเสนา จ.กาญจนบุรี โดยทำการเก็บตัวอย่างเลือด ขนาดยา เพศ อายุ น้ำหนักและส่วนสูง หลังจากนั้นนำตัวอย่างเลือดที่ได้มาตรวจวิเคราะห์ทางพันธุกรรมและใช้เทคนิค Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) ในการวิเคราะห์พหุสัณฐานของยีน

ผลการศึกษาพบความถี่ของยีน CYP2C9 ชนิด *1/*1 (wild type) จำนวน 90 คน (ร้อยละ 98.90) ชนิด *1/*3 เพียง 1 คน (ร้อยละ 1.20) และไม่พบชนิด *3/*3 พบความถี่ของพหุสัณฐานของยีน VKORC1 -1639 ชนิด GG มีจำนวน 9 คน (ร้อยละ 9.89) ชนิด GA และชนิด AA จำนวน 30 คน (ร้อยละ 32.97) และ 52 คน (ร้อยละ 57.14) ตามลำดับ พบว่าผู้ป่วยที่มียีน VKORC1 -1639 ชนิด AA มีค่าเฉลี่ยของขนาดยารวาร์ฟารินที่ได้รับต่อสัปดาห์ (19.97 ± 7.61 mg) ต่ำกว่าชนิด GG (37.89 ± 12.02 mg) และชนิด GA (29.48 ± 11.50 mg) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อนำภาวะพหุสัณฐานของยีนและข้อมูลอื่น มาสร้างสมการถดถอยเพื่อทำนายขนาดยารวาร์ฟารินได้สมการที่มีความสามารถในการทำนายความแตกต่างของขนาดยาได้ 45.3% ซึ่งประกอบด้วยภาวะพหุสัณฐานของยีน VKORC1 -1639 ชนิด AA, อายุและน้ำหนัก โดยภาวะพหุสัณฐานของยีน VKORC1 -1639 ชนิด AA และอายุมีอิทธิพลเชิงลบต่อขนาดยา ในขณะที่น้ำหนักมีอิทธิพลเชิงบวกต่อขนาดยา

สาขาวิทยาการทางเภสัชศาสตร์

ลายมือชื่อนักศึกษา.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ 1. 2.

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2556

54364201 : MAJOR : PHARMACEUTICAL SCIENCES

KEY WORD : WARFARIN/GENETIC POLYMORPHISM/CYP2C9/VKORC1

BURUSSAKORN SUBSUPHAN : WARFARIN DOSE REQUIREMENT IN THAI PATIENTS WITH CYP2C9 AND VKORC1 GENETIC POLYMORPHISM. THESIS ADVISORS : ASSOC.PROF.CHATCHAI CHINPAISAL,Ph.D. AND ASSOC.PROF.MANAT PONGCHAIDECHA,Ph.D. 61 pp.

The purposes of this study were to investigate the influence of genetic polymorphisms of CYP2C9*3 and VKORC1 -1639 G>A on warfarin dose requirement and to establish an equation for predicting the warfarin maintenance dose in Thai patients.

91 out patients receiving warfarin at Phahol Polpayuhasena Hospital, Kanchanaburi were recruited into this study. Whole blood, dose and demographic data were collected. Blood samples were analyzed for the genetic polymorphism by Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) technique.

CYP2C9*1/*1 (wild type) genotype was found in 90 patients (98.90%), and CYP2C9*1/*3 was found in only 1 patient (1.10%). No CYP2C9*3/*3 genotype was observed. Polymorphisms of VKORC1 -1639 GG was found in 9 patients (9.89%), while GA and AA genotype were found in 30 patients (32.97%) and in 52 patients (57.14%), respectively. Patients with VKORC1 -1639 AA genotype required statistically and significantly lower, average weekly warfarin dose (19.97 ± 7.61 mg) than GG genotype (37.89 ± 12.20 mg) and GA genotype (29.48 ± 11.50 mg) with the p value < 0.05. Using stepwise multiple linear regression, VKORC1 -1639 AA, age and weight could explain about 45.3% of the variation of warfarin maintenance dose. Multivariate analysis of the equation indicated a significant negative correlation between warfarin dose and VKORC1 -1639 AA and age, but a significant positive correlation between warfarin dose and weight.

Program of Pharmaceutical Sciences

Graduate School, Silpakorn University

Student's signature

Academic Year 2013

Thesis Advisors' signature 1. 2.

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างภาวะพหุลักษณะของ CYP2C9 และ VKORC1 ต่อขนาดยารวาร์ฟารินในผู้ป่วยชาวไทย ได้รับทุนสนับสนุนจากสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยศิลปากรและทุนอุดหนุนการวิจัยจากบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร จึงทำให้เกิดการศึกษานี้ขึ้น ดิฉันขอขอบพระคุณผู้เกี่ยวข้องในหน่วยงานดังกล่าวทุกท่านที่ให้การสนับสนุนการศึกษาในครั้งนี้

ดิฉันขอขอบพระคุณคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ของโรงพยาบาลพหลพลพยุหเสนาทุกท่าน หัวหน้ากลุ่มงานเภสัชกรรม หัวหน้ากลุ่มงานเทคนิคการแพทย์ หัวหน้างานโลหิตวิทยาและเจ้าหน้าที่ห้องโลหิตวิทยาทุกท่านที่ให้การสนับสนุนการศึกษาครั้งนี้เป็นอย่างดี

ดิฉันขอกราบขอบพระคุณ ภก.รศ.ดร.ฉัตรชัย ฉิ่นไพศาล และภก.รศ.ดร.มนัส พงศ์ชัยเดชา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ทั้งสองท่านที่ให้คำ แนะนำ ความรู้ ความช่วยเหลือ เป็นกำลังใจตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆในการศึกษาครั้งนี้จนทำให้วิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จได้อย่างสมบูรณ์ ขอขอบพระคุณ ภก.ศศ.ดร.สุรวุฒิ วัฒนา ประธานกรรมการตรวจสอบวิทยานิพนธ์ที่ให้คำแนะนำและวางแผนการศึกษาในระดับปริญญาโทให้ตั้งแต่เข้าเรียน ขอขอบพระคุณพ.วิบูลย์ ภัณฑาภิรักษ์ กรรมการตรวจสอบวิทยานิพนธ์ที่ได้ให้คำแนะนำและชี้แนะในการทำวิจัยในโรงพยาบาล ขอขอบคุณรศ.นพ.บัณฑิต ชุมวรฐายี จากคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่นที่ได้ให้ความกรุณาตรวจสอบโครงการวิจัยและให้คำแนะนำในด้านจริยธรรมการวิจัย ทั้งนี้ขอขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาเภสัชวิทยาและพิษวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากรทุกท่านที่ได้ให้ความรู้ คำแนะนำ ความช่วยเหลือ ตลอดจนเป็นกำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้ สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณบิดามารดา นายสุทธิพงษ์และนางณัฐติ ทรัพย์สุพรรณรวมทั้งสามี นายอภิศักดิ์ ชัยวิจิตร ที่ให้การสนับสนุน ช่วยเหลือและเป็นกำลังใจอย่างดียิ่งจนทำให้วิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จเสร็จสิ้นลงได้ด้วยดี

สารบัญ

		หน้า
	บทคัดย่อภาษาไทย	ง
	บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
	กิตติกรรมประกาศ	ฉ
	สารบัญตาราง	ฅ
	สารบัญรูป	ญ
	บทที่	
1	บทนำ	1
	ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
	วัตถุประสงค์การวิจัย	2
	สมมติฐานการวิจัย	2
	ขอบเขตการวิจัย	3
	ประโยชน์ที่ได้รับ	3
2	วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	4
	วาร์ฟาริน	4
	ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองของยาวาร์ฟาริน	7
	การศึกษาที่ผ่านมาในประเทศไทย	15
3	วิธีดำเนินการวิจัย	19
	ลักษณะการศึกษา	19
	กลุ่มตัวอย่าง	19
	การเก็บข้อมูล	20
	การตรวจหาลักษณะทางพันธุกรรม	20
	การวิเคราะห์ทางสถิติ	22
4	ผลการวิเคราะห์ข้อมูล	24

คุณลักษณะของผู้ป่วย.....	24
ผลของภาวะพหุสัญญาณต่อขนาดยารัฟาริน	26
ความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยต่างๆกับขนาดยารัฟาริน	28

บทที่	หน้า
สมการทำนายขนาดความต้องการยารวาร์ฟาริน	28
5 สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ	31
สรุป	31
อภิปรายผล	31
ข้อจำกัด	37
ข้อเสนอแนะ	37
รายการอ้างอิง	38
ภาคผนวก	42
ภาคผนวก ก	43
ภาคผนวก ข	50
ภาคผนวก ค	53
ประวัติผู้วิจัย	61

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1	6
2.2	10
2.3	12
2.4	13
3.1	21
4.1	25
4.2	27
4.3	28
4.4	29
4.5	29
4.6	30
5.1	32
5.2	32
ตารางผนวก	
ค.1	54
ค.2	54
ค.3	57

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
1.1	ตัวแปรที่ใช้ในการศึกษา 3
2.1	สูตรโครงสร้างของยิวาร์ฟาริน 4
2.2	กลไกการทำงานของยิวาร์ฟาริน 5
2.3	บทบาทของ CYP2C9 และ VKORC1 ต่อการตอบสนองของยิวาร์ฟาริน 8
2.4	โครงสร้าง S-form ของยิวาร์ฟาริน 9
2.5	โครงสร้างของยีน CYP2C9 9
2.6	บทบาทของ VKORC1 กับยิวาร์ฟาริน 11
2.7	โครงสร้างของยีน VKORC1 12
2.8	pGL-3 vector ที่มี cDNA สำหรับสร้างเอนไซม์ luciferase 14
2.9	ชนิด pGL-3 vector ตาม genotype ของ promoter gene ที่ตำแหน่ง -1639 15
3.1	ภาวะพหุสัณฐานของยีน VKORC1 และ CYP2C9 หลังผ่านกระบวนการย่อย ด้วย Msp I และ Kpn I ตามลำดับ 22
4.1	การกระจายของขนาดยาที่ได้รับต่อสัปดาห์ในภาวะพหุสัณฐานของยีน CYP2C9 26
4.2	การกระจายของขนาดยาที่ได้รับต่อสัปดาห์ในภาวะพหุสัณฐานของยีน VKORC1 26
กราฟที่	
5.1	Scatter plot ระหว่างขนาดยาที่ใช้จริงกับขนาดยาที่ได้จากสมการในการศึกษานี้ ... 34
5.2	Overlay scatter plot ระหว่างขนาดยาที่ใช้จริงกับขนาดยาที่ได้จากสมการ ในการศึกษานี้ 34
5.3	Scatter plot ระหว่างขนาดยาที่ใช้จริงกับขนาดยาที่ได้จากสมการของอติสรา 35
5.4	Overlay scatter plot ระหว่างขนาดยาที่ใช้จริงกับขนาดยาที่ได้จากสมการของ อติสรา 35
กราฟผนวก	
ค.1	Histogram แสดงการแจกแจงของ standardized residual 55
ค.2	Normal P-P plot ของ standardized residual 55
ค.3	Scatter plot ระหว่าง standardized residual กับขนาดยาที่ได้จากสมการ 56
ค.4	Scatter plot ระหว่าง studentized residual กับขนาดยาที่ได้จากสมการ 56

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ยาวาร์ฟาริน (warfarin) เป็นยาต้านการแข็งตัวของเลือด (anticoagulants) ชนิดรับประทาน ใช้ในการรักษาและป้องกันภาวะลิ่มเลือดอุดตันหลอดเลือด (thromboembolism) โดยเฉพาะในโรคระบบหัวใจและหลอดเลือด ยาวาร์ฟารินออกฤทธิ์โดยการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ vitamin K epoxide reductase complex subunit 1 (VKORC1) ซึ่งเป็นเอนไซม์สำคัญในการนำวิตามินเคกลับมาใช้ใหม่ (vitamin K cycle)[1] การยับยั้งเอนไซม์นี้ส่งผลยับยั้งกระบวนการสร้าง vitamin K-dependent proteins ในระบบเลือด ได้แก่ factor II, VII, IX และ X [2] ยาวาร์ฟารินประกอบด้วยรูปที่มีฤทธิ์ (active form) 2 รูป คือ S-form และ R-form โดยรูป S-form ออกฤทธิ์ได้แรงกว่า R-form ถึง 3-5 เท่า[3] และถูกเปลี่ยนแปลงโดยเอนไซม์ Cytochrome P450 ชนิด 2C9 ในขณะที่ R-form ถูกเปลี่ยนแปลงโดยเอนไซม์ CYP1A2, CYP2C8, CYP2C19 และ CYP3A4 [4] ได้สารที่ไม่มีฤทธิ์และขับออกจากร่างกายทางไต

ปัญหาสำคัญทางคลินิกในการใช้ยาวาร์ฟาริน คือ การเกิดภาวะเลือดออกผิดปกติอันเป็นอาการไม่พึงประสงค์ของยา ตั้งแต่เลือดออกตามไรฟัน เลือดกำเดาไหลจนถึงเลือดออกในอวัยวะภายใน เนื่องจากยาวาร์ฟารินเป็นยาที่มีช่วงในการรักษาแคบ (narrow therapeutic range) จึงมีโอกาสเกิดพิษของยาได้ง่าย แม้มีการเปลี่ยนระดับยาเพียงเล็กน้อย[3] จากการศึกษาพบว่าปัจจัยที่มีผลต่อขนาดของยาวาร์ฟาริน ได้แก่ เพศ อายุ อาหาร เชื้อชาติ ยาที่ใช้ร่วมและพันธุกรรม[5]

ลักษณะทางพันธุกรรมที่มีความสำคัญอย่างมีนัยสำคัญ ต่อขนาดของยาวาร์ฟาริน คือ การแปรผันทางพันธุกรรมของ ยีน CYP2C9 และ VKORC1[6] โดยยีน CYP2C9 เกี่ยวข้องกับการทำลายยาขณะที่ยีน VKORC1 เกี่ยวข้องโดยเป็นเป้าหมายระดับโมเลกุลในการออกฤทธิ์ของยา จากการศึกษาที่ผ่านมามีพบว่า ความถี่ของการแปรผันทางพันธุกรรมของยีนทั้งสองนี้มีความแตกต่างกันในประชากรแต่ละเชื้อชาติทำให้ขนาดยาวาร์ฟารินที่เหมาะสมในประชากรแต่ละเชื้อชาติแตกต่างกันไป [7] การเกิดภาวะพหุสัณฐาน (polymorphism) ของยีนแบบ CYP2C9*2 (430C>T) และ CYP2C9*3(1075A>C) ทำให้ความสามารถของเอนไซม์ในการเปลี่ยนแปลงยาวาร์ฟารินให้อยู่ใน

รูปที่ไม่มีฤทธิ์ลดลงได้ 30% และ 80% ตามลำดับ โดยพบความถี่ของ CYP2C9*2 ในชาวยุโรปและแอฟริกัน แต่ไม่พบในชาวเอเชีย ในขณะที่สามารถพบความถี่ของ CYP2C9*3 ได้ในกลุ่มประชากรทั้งสามเชื้อชาติ[8] ซึ่งภาวะพหุสัณฐานทั้งสองแบบนี้ยังส่งผลให้มีความต้องการขนาดยารี่ฟารินที่ลดลง [7] ส่วนภาวะพหุสัณฐานของยีน VKORC1 มีดังนี้ VKORC1*1 (wild-type) พบเฉพาะในชาวแอฟริกันเท่านั้น ส่วน VKORC1*2 (-1639G>A) พบในชาวเอเชีย มากถึงร้อยละ 95 มักพบ VKORC1*3 (3730G>A) และ VKORC1*4 (698C>T) ในชาวยุโรปและแอฟริกัน แต่พบน้อยในชาวเอเชีย [7,9] ภาวะพหุสัณฐานแบบ VKORC1*2 สัมพันธ์กับความต้องการยารี่ฟารินในขนาดต่ำกว่า wild type ในขณะที่ VKORC1*3 และ VKORC1*4 สัมพันธ์กับความต้องการยาในขนาดที่สูงกว่า wild type[9,10]

ทั้งนี้จากการศึกษาพบว่าความแปรผันทางพันธุกรรมของยีน CYP2C9 และ VKORC1 สามารถอธิบายความแตกต่างระหว่างบุคคลในการตอบสนองต่อยารี่ฟารินถึง ร้อยละ 50 [9] โดยในปี ค.ศ. 2010 สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา ประเทศสหรัฐอเมริกา (US FDA) ได้ประกาศเพิ่มคำเตือนในฉลากยาถึงการพิจารณาข้อมูลทางพันธุกรรมของยีน CYP2C9 และ VKORC1 ในการเลือกขนาดใช้ของยารี่ฟาริน [11]

จากข้อมูลดังกล่าวจะเห็นว่าลักษณะทางพันธุกรรมของยีนทั้งสองชนิดมีผลต่อการตอบสนองต่อขนาดของยารี่ฟารินทั้งในด้านการรักษาและการเกิดอาการไม่พึงประสงค์จากการศึกษานี้จึงเป็นการศึกษาเกี่ยวกับภาวะพหุสัณฐานยีน CYP2C9 และ VKORC1 ในผู้ป่วยชาวไทย เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างภาวะพหุสัณฐานกับขนาดยารี่ฟารินที่เหมาะสม โดยทำการศึกษาเฉพาะ CYP2C9*3 และ VKORC1 -1639 G>A เนื่องจากการแปรผันที่พบมากในชนชาวเอเชียและมีผลทำให้ขนาดความต้องการยาลดลง

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

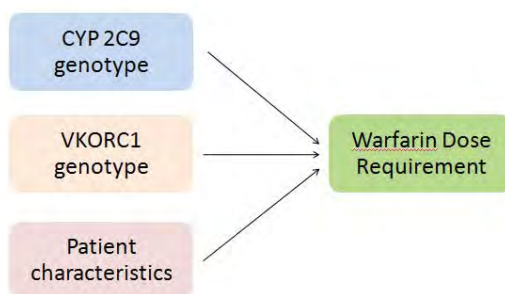
เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างภาวะพหุสัณฐานของยีน CYP2C9 และ VKORC1 กับขนาดของยารี่ฟารินในผู้ป่วยชาวไทย

สมมติฐานการวิจัย

1. ความต้องการขนาดยารี่ฟารินมีความแตกต่างกันในผู้ป่วยที่มีภาวะพหุสัณฐานของยีน CYP2C9 และ VKORC1 แตกต่างกัน
2. ลักษณะทางพันธุกรรมของยีน CYP2C9 และ VKORC1 สามารถนำมาทำนายขนาดความต้องการยารี่ฟารินได้

ขอบเขตของการวิจัย

ศึกษาความถี่ของภาวะพหุสัณฐานของยีน CYP2C9*3 (1075A>C), VKORC1 (-1639G>A), ขนาดยาแวนาร์ฟารินที่ใช้ในการรักษา , ค่า international normalized ratio (INR) และคุณลักษณะของผู้ป่วย (patient characteristics) ได้แก่ เพศ อายุ น้ำหนัก ความสูง



รูปที่ 1.1 ตัวแปรที่ใช้ในการศึกษา

ประโยชน์ที่ได้รับ

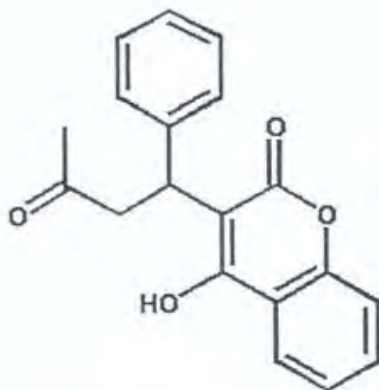
1. ทราบความถี่ของภาวะพหุสัณฐานยีน CYP2C9 และ VKORC1 ในผู้ป่วยชาวไทย
2. ทราบความสัมพันธ์ระหว่างภาวะพหุสัณฐานของยีน CYP2C9 และ VKORC1 กับขนาดของยาแวนาร์ฟารินในผู้ป่วยชาวไทย
3. ได้สมการทำนายขนาดยาแวนาร์ฟารินที่ใช้ในการรักษาสำหรับผู้ป่วยชาวไทยซึ่งมีปัจจัยทางพันธุกรรมเป็นตัวแปร

บทที่ 2 วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

1. วาร์ฟาริน

ยาวาร์ฟารินเป็นยาต้านการแข็งตัวของเลือดในกลุ่ม vitamin K antagonist ค้นพบในปี ค.ศ.1940 จากการที่ปลุสตัดวูไปกินพืชและทำให้สัตว์เหล่านั้นเกิดภาวะเลือดออกและตายจึงได้เริ่มศึกษาหาสาเหตุและพบว่าในพืชดังกล่าวมีสารที่มีฤทธิ์ต้านการแข็งตัวของเลือด ในระยะแรกยานี้ถูกนำมาใช้เป็นยาเบื่อหนู ต่อมาได้มีการพัฒนาอย่างต่อเนื่องให้เป็นยา และในปี ค.ศ.1954 องค์การอาหารและยาของประเทศสหรัฐอเมริกา (Food and Drug Administration; US FDA) ได้รับรองยา วาร์ฟารินสำหรับใช้เป็นยาต้านการแข็งตัวของเลือดในมนุษย์[3]

ยาวาร์ฟารินเป็น racemic mixture ประกอบด้วยรูปที่มีฤทธิ์ (active form) 2 รูป คือ S-form และ R-form โดยรูป S-form ออกฤทธิ์ได้แรงกว่า R-form ถึง 3-5 เท่า[12] โดยมีสูตรโมเลกุล $C_{19}H_{16}O_4$ และสูตรโครงสร้างดังรูป



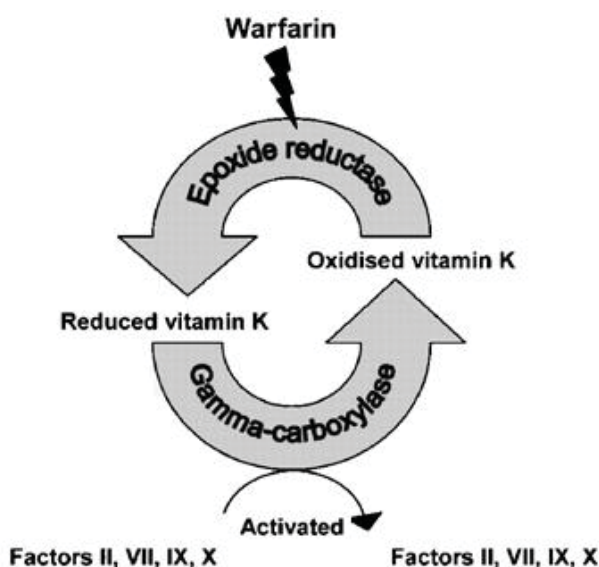
รูปที่ 2.1 สูตรโครงสร้างของยาวาร์ฟาริน

1.1 กลไกการออกฤทธิ์

ยาวาร์ฟารินมีกลไกการออกฤทธิ์โดยยับยั้ง clotting factor ที่อาศัยวิตามินเคในการเปลี่ยนเป็นรูปที่ทำงานได้ ได้แก่ clotting factor II, VII, IX และ X โดยยาไปยับยั้งการทำงานของ เอนไซม์ vitamin K epoxide reductase complex subunit 1 (VKORC1) อันเป็นเอนไซม์สำคัญใน

การผันกลับของวิตามินเคมาใช้ใหม่ (vitamin K cycle) การยับยั้งเอนไซม์นี้จึงเป็นการยับยั้งการทำงานของวิตามินเค ทำให้ลดฤทธิ์ในการทำให้เลือดแข็งตัว (coagulant activity) [3]

กล่าวคือ clotting factor II, VII, IX และ X เหล่านี้ถูกสร้างขึ้นที่ตับในรูป noncarboxylated form ซึ่งเป็น inactive form[2] จะทำงานได้ต่อเมื่อผ่านกระบวนการ gamma-carboxylation โดยมี vitamin K ในรูป reduced form เป็น essential cofactor ของกระบวนการ ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการ gamma-carboxylation คือ active coagulation factor และ vitamin K epoxide ซึ่งวิตามิน K ในรูป epoxide นี้ถูกเปลี่ยนให้เป็น reduced form อย่างรวดเร็วโดยเอนไซม์ VKORC1 เพื่อเข้าสู่กระบวนการ gamma-carboxylation ต่อไป[1] ซึ่งเมื่อเอนไซม์ VKORC1 นี้ถูกยับยั้งโดยยาวาร์ฟารินจึงทำให้มี vitamin K-dependent clotting factor ในรูป active form ลดลงจึงลดการเกิดลิ่มเลือดได้



รูปที่ 2.2 กลไกการทำงานของยาวาร์ฟาริน [13]

1.2 เกษัชจนศาสตร์

1.2.1 การดูดซึม [14]

ยาสามารถดูดซึมได้อย่างสมบูรณ์จากระบบทางเดินอาหาร โดยที่อาหารไม่มีผลต่อการดูดซึมของยา ระยะเวลาที่ทำให้ระดับยาในกระแสเลือดสูงสุด (Time to peak plasma concentration; Tmax) อยู่ภายใน 4 ชั่วโมง

1.2.1 การกระจายยา [14]

ยามี plasma protein binding สูงประมาณ 99% โดยมีปริมาตรการกระจายตัว (Volume of distribution; Vd) เท่ากับ 0.14 ลิตร/กิโลกรัม

1.2.3 การเมแทบอลิซึมและการกำจัดยา [4, 14]

ยาผ่านกระบวนการเมแทบอลิซึมที่ตับได้เป็นสารที่ไม่มีฤทธิ์ (inactive metabolites) โดยที่ S-form ถูกเปลี่ยนแปลงโดยเอนไซม์ CYP2C9 ในขณะที่ R-form ถูกเปลี่ยนแปลงโดยเอนไซม์ CYP1A2, CYP2C8, CYP2C19 และ CYP3A4 ทั้งนี้หลังจากผ่านกระบวนการเมแทบอลิซึมแล้วยาจะถูกกำจัดออกจากร่างกายทางไตประมาณ 92%

1.3 ข้อบ่งใช้

ยาแอสไพรินมีข้อบ่งใช้ในการป้องกันและรักษา venous thrombosis, pulmonary embolism และ thromboembolic disorders ใช้ในการรักษา atrial fibrillation ที่มีความเสี่ยงในการเกิดภาวะ embolism นอกจากนี้ยังสามารถใช้ในการป้องกัน systemic embolism หลังการเกิด myocardial infarction[15]

ตารางที่ 2.1 ข้อบ่งใช้และระดับ INR ที่เหมาะสม [16]

ข้อบ่งใช้	INR
Prophylaxis of venous thrombosis (high-risk surgery)	2.0-3.0
Treatment of venous thrombosis	2.0-3.0
Treatment of pulmonary embolism	2.0-3.0
Prevent of systemic embolism	2.0-3.0
Tissue heart valves	2.0-3.0
Mechanical prosthetic heart valves	2.0-3.0
Acute myocardial infarction (to prevent systemic embolism)	2.0-3.0
Valvular heart disease	2.0-3.0
Atrial fibrillation	2.0-3.0
Mechanical prosthetic valves (high risk)	2.5-3.5

1.4 ปัญหาจากการใช้ยา

ปัญหาสำคัญที่พบทางคลินิกในการใช้ยาแอสไพริน คือ เมื่อเริ่มใช้ยาในช่วงแรก ขนาดยาที่เหมาะสมที่ควบคุมค่า INR ให้คงที่ได้เร็วขึ้น มีขนาดที่แตกต่างกันอย่างมากในแต่ละคน ทำให้การจัดการและการระบุขนาดที่แน่นอนทำได้ยาก ส่วนหนึ่งอาจเกิดจากความแตกต่างของปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม เช่น การเกิดอันตรกิริยาระหว่างยา (interaction) กับอาหารที่รับประทาน เช่น ผักใบ

เขียว ชาเขียว อาหารที่มีวิตามินเคสูงอื่น ๆ เป็นต้น และการเกิดอันตรกิริยาระหว่าง ยาวาร์ฟารินกับ ยาที่ใช้ร่วม สมุนไพรต่าง ๆ เช่น ใบแปะก๊วย เป็นต้น รวมไปถึงปัจจัยทางพันธุกรรมของยีนบาง ชนิดแต่ละคน [3]

จากสรุปรายงานอาการไม่พึงประสงค์จากการใช้ยาประจำปี พ.ศ. 2554 โดยศูนย์เฝ้าระวังความปลอดภัยด้านผลิตภัณฑ์สุขภาพ สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา [17] พบว่า ตั้งแต่ปีพ.ศ. 2527 – 2554 มีรายงานการเกิดอาการไม่พึงประสงค์ทั้งสิ้น 1198 ราย เสียชีวิต 5 ราย อาการไม่พึงประสงค์ที่พบมากที่สุดคือ bleeding time increase จำนวน 159 ราย รองลงมาเป็น อาการเลือดออกตามไรฟัน (gingival bleeding) จำนวน 110 ราย อาการไม่พึงประสงค์แบบรุนแรง ได้แก่ เลือดออกในอวัยวะภายใน (internal bleeding) จำนวน 83 ราย

2. ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองของยาวาร์ฟาริน

ปัญหาสำคัญของการใช้ยาวาร์ฟารินในทางคลินิก คือ ภาวะเลือดออก ผิดปกติ ซึ่งเป็นอาการไม่พึงประสงค์ของยา เนื่องจากยาวาร์ฟารินเป็นยาที่มีช่วงในการรักษาแคบ (narrow therapeutic range) จึงมีโอกาสเกิดพิษของยาได้ง่าย แม้จะมีการเปลี่ยนแปลงระดับยาในเลือดไปเพียงเล็กน้อย ดังนั้นขนาดยาที่ใช้ในผู้ป่วยแต่ละรายจึงมีความสำคัญเพราะมีผลต่อความเข้มข้นของยาในเลือดซึ่งมีความไวต่อการเกิดอาการไม่พึงประสงค์

ขนาดยาวาร์ฟารินที่ใช้ในผู้ป่วยแต่ละรายมีความแตกต่างกันซึ่งมีหลายปัจจัยมาเกี่ยวข้อง ได้แก่ ปัจจัยทางด้านเพศ อายุ ปริมาณวิตามิน K ในอาหาร เชื้อชาติ ยาที่ใช้ร่วมและปัจจัยทางด้านพันธุกรรม [5]

2.1 ปัจจัยทางพันธุกรรม

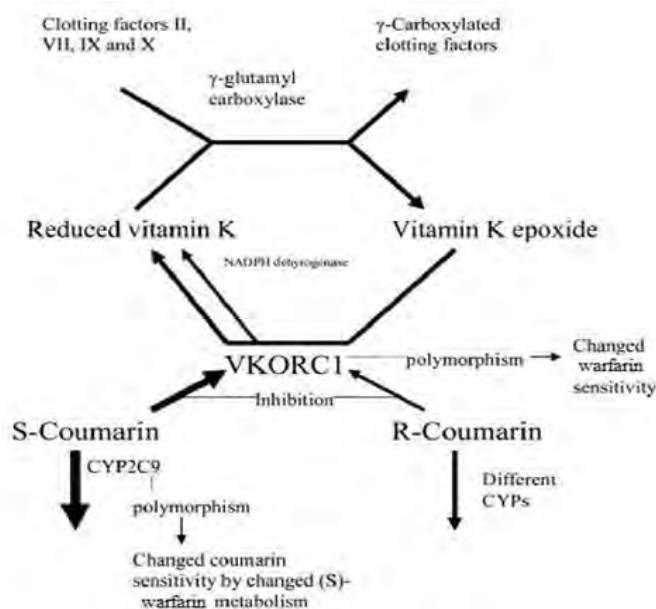
ในช่วงปี ค.ศ. 1990 ที่ผ่านได้ได้เริ่มมีการศึกษาวิจัยถึงปัจจัยทางพันธุกรรมที่ ส่งผลต่อการตอบสนองทางคลินิกของยาวาร์ฟารินหลังจากที่ค้นพบยีนที่ทำหน้าที่สร้างเอนไซม์ซึ่งทำหน้าที่ทำลายยาวาร์ฟาริน [4] จึงได้มีการศึกษาถึงผลของการเกิด allelic variant ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองทางด้านเภสัชจลนศาสตร์ (pharmacokinetic) และเภสัชพลศาสตร์ (pharmacodynamic) ของยาวาร์ฟาริน

ในปี ค.ศ.1995 Furaya และคณะได้รายงานถึงผลของการเกิดภาวะพหุสัณฐาน ของยีน CYP2C9 ซึ่งเป็นยีนที่ทำหน้าที่สร้างเอนไซม์ CYP2C9 ที่ใช้ในการทำลายยาต่อขนาดความ ต้องการยาวาร์ฟารินเป็นครั้งแรก หลังจากการค้นพบยีน CYP2C9 ในปี ค.ศ.1994 และต่อมาได้มีการศึกษาถึงลักษณะทางพันธุกรรมของยีน CYP2C9 ต่อขนาดความต้องการยาวาร์ฟารินซึ่งแสดงถึงผลการตอบสนองในการรักษาทางคลินิก[18] โดยการศึกษาทางด้านเภสัชพันธุศาสตร์เกี่ยวกับยาวาร์ฟาริน

ได้รับความสนใจมากขึ้นจากการค้นพบยีน vitamin K epoxide reductase complex subunit 1 (VKORC1) ซึ่งเป็นยีนที่ทำหน้าที่สร้างเอนไซม์ VKORC1 อันเป็นเป้าหมายการออกฤทธิ์ระดับโมเลกุลของยาวาร์ฟารินในปี ค.ศ.2004 [19, 20] และตั้งแต่นั้นได้มีการศึกษาถึงลักษณะทางพันธุกรรมของยีน VKORC1 ที่มีผลต่อการตอบสนองของยาวาร์ฟาริน [4]

ในช่วงหลายปีที่ผ่านมาได้มีการศึกษาถึงยีนที่ทำหน้าที่สร้างโปรตีนต่างๆที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการขนส่งและการทำลายยาวาร์ฟาริน Wadelius และคณะ [6] ได้ทำการศึกษาแบบ prospective cohort study ซึ่งเป็นการศึกษาที่ใหญ่ที่สุดในปัจจุบันโดยทำการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมในผู้ป่วยชาวสวีเดนจำนวน 1496 คนที่เริ่มใช้ยาวาร์ฟาริน พบ 183 polymorphism ใน 29 genes พบว่ามีเพียงยีน CYP 2C9 และยีน VKORC1 เท่านั้นที่มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับการตอบสนองของยาวาร์ฟาริน

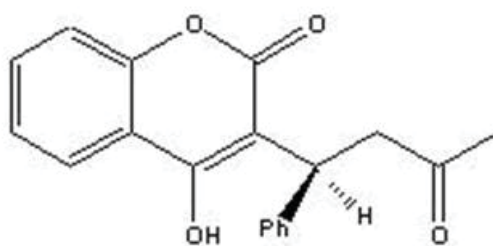
ทั้งนี้สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา ของประเทศสหรัฐอเมริกา (US FDA) ได้ระบุไว้ในข้อมูลด้านความปลอดภัยของยาเมื่อเดือนสิงหาคม ค.ศ. 2007 ว่าปัจจัยทางพันธุกรรมเป็นปัจจัยที่ควรคำนึงในการเลือกใช้ขนาดของยาวาร์ฟาริน โดยให้มีการเพิ่มข้อมูลนี้ไว้ในฉลากยาวาร์ฟารินและเมื่อเดือนมกราคม ปี ค.ศ. 2010 ที่ผ่าน US FDA ได้ประกาศให้เพิ่มเป็นคำเตือนในฉลากยาถึงการพิจารณาข้อมูลด้านพันธุกรรมของยีน CYP2C9 และ VKORC1 ในการเลือกใช้ขนาดยาวาร์ฟาริน [11]



รูปที่ 2.3 บทบาทของ CYP2C9 และ VKORC1 ต่อการตอบสนองของยาวาร์ฟาริน [4]

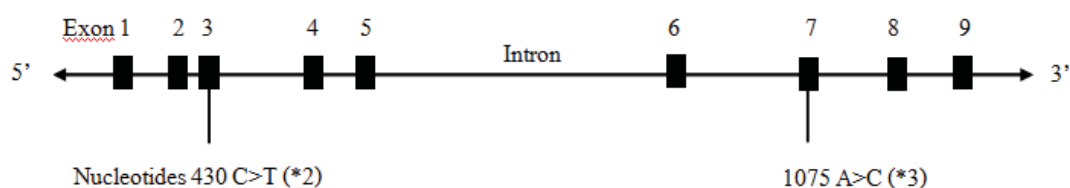
2.1.1 ภาวะพหุสัณฐานของยีน CYP2C9

ยีน CYP2C9 เป็นยีนที่สร้างเอนไซม์ CYP2C9 ซึ่งทำหน้าที่เปลี่ยนแปลงยา (drug metabolizing enzyme) โดยเอนไซม์นี้มีหน้าที่ทำลายยารวาร์ฟารินที่อยู่ในรูปของ S-form ซึ่งออกฤทธิ์ได้แรงกว่า R-form ถึง 3-5 เท่า [3] ทำให้ยีน CYP2C9 นี้มีผลต่อเภสัชจลนศาสตร์ (pharmacokinetic) ของยาและส่งผลต่อระดับยาที่คงเหลืออยู่ในเลือด



รูปที่ 2.4 โครงสร้าง S-form ของยารวาร์ฟาริน

ยีน CYP2C9 ถูกค้นพบเมื่อปี ค.ศ. 1994 มีขนาดประมาณ 55-kb อยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 10 ที่ตำแหน่ง q24 ประกอบด้วย 9 exon สามารถถอดรหัสได้โปรตีนจำนวน 490 amino acid [18] พบการเกิดแปรผันทางพันธุกรรมมากถึง 30 non-synonymous variations โดยมี CYP2C9*1 เป็น wild type ซึ่งพบมากที่สุดประชากรทุกเชื้อชาติจากการศึกษาพบว่า มีเพียง CYP2C9*2 และ CYP2C9*3 ที่ได้รับการกล่าวถึงว่ามีผลต่อการตอบสนองต่อยารวาร์ฟาริน [4]



รูปที่ 2.5 โครงสร้างของยีน CYP2C9

CYP2C9*2 เกิดจากการที่ exon 3 ของยีนมีการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง 430 จาก cytosine เป็น thymine ทำให้การถอดรหัสโปรตีนในตำแหน่งที่ 144 ของเอนไซม์เปลี่ยนจาก arginine เป็น cysteine ขณะที่ CYP2C9*3 เกิดจากการที่ exon ที่ 7 ของยีนมีการเปลี่ยนแปลงที่ตำแหน่ง 1075 จาก adenine เป็น cytosine ทำให้การถอดรหัสในตำแหน่งที่ 359 ของเอนไซม์เปลี่ยนจาก isoleucine เป็น leucine [21]

ความถี่ในการพบภาวะพหุสัณฐานของยีน CYP2C9 แตกต่างกันในประชากรแต่ละเชื้อชาติ CYP2C9*2 พบในชาวแอฟริกัน 2.0-8.7% ในชาวคอเคเซียน 9.2-26.7% [7] และไม่พบเลยใน

ชนชาวเอเชีย (ญี่ปุ่น, จีน, ไต้หวัน, เกาหลี, มาเลเซีย, สิงคโปร์และไทย) [7, 22, 23] ส่วน CYP2C9*3 พบได้ในประชากรทั้งสามเชื้อชาติ โดยในชาวแอฟริกันพบ 1.0-4.6% ชาวคอเคเซียน 8.6-26.7% และชาวเอเชีย 2.3-8.2% [7]

การเกิดภาวะพิษฐานของยีน CYP2C9 นี้ส่งผลต่อการทำงานของเอนไซม์ CYP2C9 โดย CYP2C9*2 ทำให้มี enzyme activity ลดลง 30% ในขณะที่ CYP2C9*3 ทำให้ enzyme activity ลดลงถึง 80% [22] ซึ่งในความจริงแล้วในประชากรที่มี CYP2C9*3 แบบ homozygous นี้จะมี phenotype เป็น poor metabolizer ของ CYP2C9 substrate [21]

จากการศึกษาของ Takahashi และคณะ ในปี ค.ศ.1998 ได้เปรียบเทียบ unbound oral clearance ของการเกิด CYP2C9*3 กับ CYP2C9*1/*1 ซึ่งเป็น wild type พบว่าในผู้ป่วยที่มี CYP2C9*3 แบบ heterozygous จะมี unbound oral clearance ของ (S)-warfarin ลดลง 66% ในขณะที่ผู้ป่วยที่มี CYP2C9*3 แบบ homozygous จะมี unbound oral clearance ของ (S)-warfarin ลดลง 90% เมื่อเทียบกับ wild type [24]

ในปี ค.ศ.2009 Lindh และคณะ [25] ได้ทำการสรุปรวบรวมการศึกษาเกี่ยวกับอิทธิพลของลักษณะทางพันธุกรรมของยีน CYP2C9 ที่มีต่อขนาดความต้องการยาแอร์ฟารินจำนวน 39 การศึกษาที่มีผู้ป่วยทั้งสิ้น 7,907 คน พบว่าในผู้ป่วยที่มีลักษณะทางพันธุกรรมของยีน CYP2C9 แบบต่างๆมีขนาดความต้องการยาแอร์ฟารินที่ลดลงเมื่อเทียบกับผู้ป่วยที่มี CYP2C9*1/*1 (wild type) ดังนี้

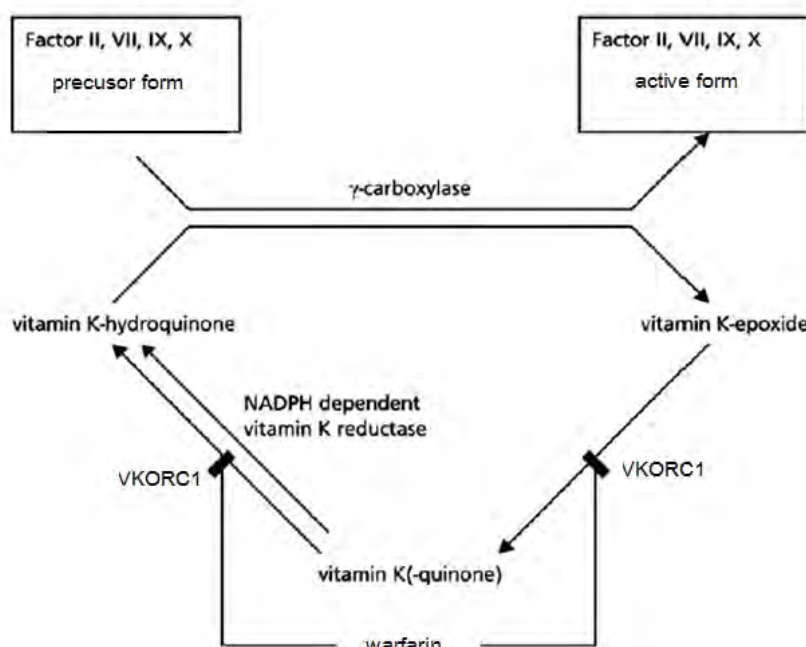
ตารางที่ 2.2 ขนาดความต้องการยาแอร์ฟารินที่ลดลงในผู้ป่วยที่มี allelic variant แบบต่างๆเมื่อเทียบกับ CYP2C9*1/*1 [25]

Allelic Variant	% Reduction dose	95% CI
CYP2C9*1/*2	19.6	17.4-21.9
CYP2C9*1/*3	33.7	29.4-38.1
CYP2C9*2/*2	36.0	29.9-42.0
CYP2C9*2/*3	56.7	49.1-64.3
CYP2C9*3/*3	78.1	72.0-84.3

ผู้ป่วยที่มี CYP2C9*2 หรือ *3 allele จะมีความต้องการขนาดยาแอร์ฟารินที่ต่ำกว่าผู้ป่วยมีลักษณะทางพันธุกรรมเป็นแบบ wild type และผู้ป่วยในกลุ่มนี้มีความเสี่ยงที่จะเกิดภาวะเลือดออกเนื่องจาก overanticoagulant ในระหว่างการรักษาด้วยยาแอร์ฟารินมากกว่าผู้ป่วยที่เป็น wild type

2.1.2 ภาวะพหุสัณฐานของยีน VKORC1

ยีน VKORC1 เป็นยีนที่ทำหน้าที่สร้างเอนไซม์ vitamin K epoxide reductase complex subunit 1 (VKORC1) ซึ่งเป็นเป้าหมายระดับโมเลกุลของยารักษาโรคหลอดเลือดหัวใจ โดยยารักษาโรคหลอดเลือดหัวใจจะไปออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์นี้ อันเป็นเอนไซม์สำคัญใน vitamin K cycle ส่งผลยับยั้งการสังเคราะห์ vitamin K-dependent clotting factor ได้แก่ factor II, VII, IX และ X ดังนั้นยีน VKORC1 จึงมีผลต่อยารักษาโรคหลอดเลือดหัวใจในด้านของเภสัชพลศาสตร์ (pharmacodynamic) เนื่องจากเป็นเป้าหมายของยาซึ่งมีผลต่อการออกฤทธิ์ของยา

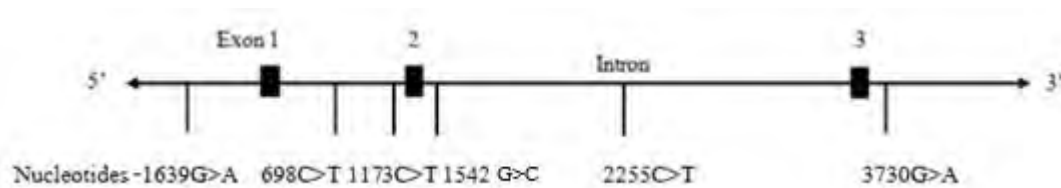


รูปที่ 2.6 บทบาทของ VKORC1 กับยารักษาโรคหลอดเลือดหัวใจ [4]

ยีน VKORC1 ถูกค้นพบเมื่อปี ค.ศ. 2004 มีขนาด 5126 bp อยู่บนโครโมโซมที่ 16 ตำแหน่ง p12-q21 ประกอบด้วย 3 exon สามารถถอดรหัสให้โปรตีนจำนวน 163 amino acid [19,20] หลังจากค้นพบยีน VKORC1 ได้มีความต้องการศึกษาการเกิด single nucleotide polymorphisms (SNPs) บนยีน VKORC1

ในปี ค.ศ. 2005 Geisen และคณะ [9] ทำการศึกษา SNPs บนยีน VKORC1 ขึ้นโดยใช้เลือดจากผู้บริจาคเลือดชาวเยอรมันจำนวน 200 คน แบ่งเป็นชาย 100 คนและหญิง 100 คน มีอายุระหว่าง 18-24 ปี จากการศึกษาพบ SNPs จำนวน 28 ตำแหน่งบน VKORC1 DNA (reference

sequence: AY587020) โดยมี 3 SNPs ที่พบบน coding region และ 25 SNPs พบบน non-coding region ของยีน จาก 28 SNPs พบว่ามี 14 SNPs ที่มีความถี่ของ allele อย่างน้อย 1% ซึ่งมี 6 SNPs สามารถใช้จำแนกภาวะพหุสัณฐานของยีน VKORC1 ได้เป็น 3 haplotype หลัก คือ VKORC1*2 (-1639G>A, 1173C>T, 1542G>C และ 2255C>T), VKORC1*3 (3730G>A) และ VKORC1*4 (698C>T) ทั้งนี้ 6 SNPs ที่ใช้จำแนก haplotype มีความสัมพันธ์แบบ complete linkage disequilibrium โดยมี VKORC1*1 เป็น wild type



รูปที่ 2.7 โครงสร้างของยีน VKORC1

นอกจากนั้น Geisen และคณะ [9] ยังนำความถี่ของการเกิด VKORC1 haplotype ที่พบมาทำการเปรียบเทียบกับข้อมูลทางพันธุกรรมที่พบในฐานข้อมูล ได้แก่ PERLEGEN database และ HapMap database แล้วมาสรุปความถี่ของแต่ละ haplotype ที่พบในประชากรแต่ละเชื้อชาติ ได้ผลดังนี้ VKORC1*1 พบเฉพาะในชาวแอฟริกัน ในขณะที่ VKORC1*2 พบมากถึง 95% ในชาวจีน ส่วน VKORC1*3 และ VKORC1*4 พบในชาวยุโรปและแอฟริกัน พบน้อยในชาวจีน ตารางที่ 2.3 ความถี่ของ VKORC1 haplotype ในประชากรแต่ละเชื้อชาติ [9]

Haplotype	Frequency (%)		
	Europeans	Africans	Chinese
VKORC1*1	<0.1	31	<0.1
VKORC1*2	42	14	95
VKORC1*3	38	43	4
VKORC1*4	20	12	<1

ในปีเดียวกัน D'Andrea และคณะ [26] ทำการศึกษาความสัมพันธ์ของภาวะพหุสัณฐานของยีน VKORC1 กับขนาดยวาร์ฟาริน พบว่า การเกิด SNP บน non-coding region ที่ตำแหน่ง 1173C>T ในผู้ป่วยที่ใช้ยวาร์ฟารินมีความสัมพันธ์กับความถี่ของขนาดยวาร์ฟารินในขนาดต่ำ เมื่อเทียบกับผู้ป่วยที่ไม่มีภาวะพหุสัณฐาน ที่ตำแหน่งนี้ กล่าวคือ ผู้ป่วยที่มีลักษณะทางพันธุกรรมเป็น 1173 CC มีขนาดยวาร์ฟารินที่ใช้สูงกว่าผู้ป่วยที่เป็น CC หรือ CT ซึ่งตำแหน่ง 1173C>T นี้

เป็น SNPs ใน VKORC1*2 haplotype และจากการศึกษาของ Geisen ที่ได้กล่าวมาพบว่า ที่ตำแหน่ง 1173C>T ซึ่งอยู่บน intron1 มีความสัมพันธ์แบบ perfect linkage disequilibrium กับตำแหน่ง -1639G>A ซึ่งเป็น SNPs ที่อยู่บน promoter ของยีน

Reider และคณะ [10] ทำการศึกษาความสัมพันธ์ของ VKORC1 haplotype กับขนาดยา วาร์ฟาริน ผลการศึกษาพบว่า สามารถแบ่ง VKORC1 ออกได้เป็น 2 haplotype คือ A haplotype และ B haplotype โดย A haplotype ประกอบด้วย H1 และ H2 มีความต้องการยารวาร์ฟารินในขนาดต่ำ (3mg/day) ซึ่งพบมากในชาวอเมริกันเชื้อสายเอเชีย (American-Asian) ขณะที่ B haplotype ประกอบด้วย H7, H8 และ H9 มีความต้องการยารวาร์ฟารินในขนาดสูง (6mg/day) โดยมีขนาดยา วาร์ฟารินเฉลี่ยของผู้ป่วยในการรักษาเท่ากับ 5.15 mg/day

ตารางที่ 2.4 สัดส่วนการกระจายของ VKORC1 haplotype ในผู้ป่วยชาวอเมริกันเชื้อสายต่างๆ

Haplotype distribution	Haplotype sequence*	European (n=119)	African (n=96)	Asian (n=120)
H1	CCGATCTCTG	0.13	0.07	0.89
H2	CCGAGCTCTG	0.26	0.06	0
H7	TCGGTCCGCA	0.21	0.42	0.10
H8	TAGGTCCGCA	0.14	0.01	0
H9	TACGTTGCGG	0.24	0.06	0
Others	-	0.04	0.38	0.01
Group distribution				
Group A (H1, H2)	-	0.37	0.14	0.89
Group B (H7, H8, H9)	-	0.58	0.49	0.10
Total group A and B	-	0.96	0.62	0.99

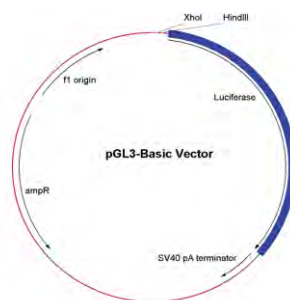
* ในแต่ละ haplotype มีลำดับของ SNPs บนยีน VKORC1 ดังนี้ 381, 861, 2653, 3673, 5808, 6009, 6484, 6853, 7566 และ 9041 (Genbank accession number AY587020)

ทั้งนี้ Geisen และคณะ [9] ได้นำการศึกษาของ Reider และคณะมาสร้างความสัมพันธ์ระหว่าง haplotype ที่ได้จากสองการศึกษาพบว่า VKORC1*2 haplotype มีความสัมพันธ์กับ haplotype A (H1 และ H2) ซึ่งเป็น low dose haplotype ขณะที่ VKORC1*3 และ VKORC1*4 haplotype มีความสัมพันธ์กับ haplotype B (H7, H8 และ H9) ซึ่งเป็น high dose haplotype

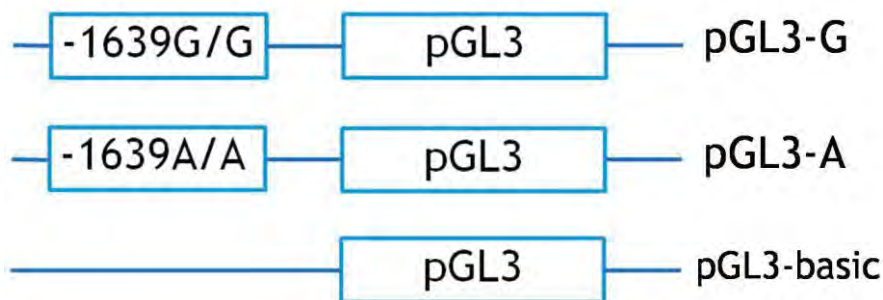
จากการศึกษา SNPs บนยีน VKORC1 เห็นได้ว่า SNPs ส่วนใหญ่ที่เกิดมักเกิดบนตำแหน่งที่เป็น non-coding region ซึ่งไม่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงการสร้างโปรตีนของเอนไซม์ แต่มีผลต่อขนาดความต้องการยารวาร์ฟารินในผู้ป่วยแต่ละราย ดังนั้นจึงมีการค้นคว้าหาความสัมพันธ์ระหว่างกลไกทางด้านหน้าที่ (functional mechanism) ของ VKORC1 gene ต่อขนาดยารวาร์ฟาริน ซึ่งมี 2 การศึกษาด้วยกัน โดยการศึกษาแรกเป็นการวัดปริมาณ messenger RNA (mRNA) ของ VKORC1 ใน human liver specimen การศึกษาที่ 2 เป็นการศึกษา VKORC1 promoter activity

การวัดปริมาณ mRNA ของ VKORC1 เป็นส่วนหนึ่งในการศึกษาของ Reider และคณะ [10] ทำการวัดระดับของ VKORC1 mRNA ใน human liver specimen ที่ได้จาก tissue bank ของ University of Washington School of Pharmacy จำนวน 53 liver specimen ซึ่งได้จากผู้ป่วยโรคหัวใจยุโรป-อเมริกัน สกัดนำ RNA และ DNA ออกจาก liver specimen วิเคราะห์หาปริมาณของ mRNA และตรวจหา VKORC1 genotype จาก DNA เพื่อระบุ VKORC1 haplotype ในแต่ละ tissue specimen ผลการศึกษาพบว่า ระดับ mRNA ในกลุ่ม B/B (high dose) มีปริมาณสูงกว่ากลุ่ม A/A (low dose) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ประมาณ 3 เท่า โดยมี 6 ตัวอย่างอยู่ในกลุ่ม A/A, 22 ตัวอย่างอยู่ในกลุ่ม A/B และ 25 ตัวอย่างอยู่ในกลุ่ม B/B

Yuan และคณะ [27] ทำการศึกษา VKORC1 promoter activity โดยใช้ luciferase reporter assay ซึ่งมีสมมติฐานของการศึกษา คือ การเกิด SNP ที่ตำแหน่ง -1639 ซึ่งอยู่บน promoter ของยีน VKORC1 จะนำไปสู่การเปลี่ยนแปลงของ promoter activity ของ VKORC1 gene โดยนำ VKORC1 DNA จากผู้ป่วยชาวจีนจำนวน 16 คนที่ได้รับยารวาร์ฟารินซึ่งมี SNP ที่ตำแหน่ง -1639 เป็น AA หรือ GG genotype มาทำการเพิ่มจำนวนด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR) แล้ว clone ลงสู่ pGL-3 vector ซึ่งสามารถแบ่งชนิดของ pGL-3 vector ในการศึกษาได้ออกได้เป็น 3 ชนิดตาม genotype ของ promoter ที่ได้ลงไป หลังจากนั้นนำ pGL-3 vector ไป transfect ใน HepG2 cell (a human hepatoma cell line) โดยสาเหตุที่เลือกใช้เซลล์ชนิดนี้เนื่องจากเป็นเซลล์ที่มีการแสดงออกของ VKORC1 มากที่สุดในตับ หลังการ transfection เป็นเวลา 48 ชั่วโมงทำ cell lysis แล้วเติม luciferase substrate ลงไป ทำการวัด luciferase activity ด้วย luminometer



รูปที่ 2.8 pGL-3 vector ที่มี cDNA สำหรับสร้างเอนไซม์ luciferase [27]



รูปที่ 2.9 ชนิด pGL-3 vector ตาม genotype ของ promoter gene ที่ตำแหน่ง -1639

ผลการศึกษา VKORC1 promoter activity โดยใช้ luciferase activity report พบว่า ลักษณะทางพันธุกรรมของ VKORC1 promoter ที่ตำแหน่ง -1639 มีผลต่อ promoter activity ของ ยีน โดย -1639 G แสดง luciferase activity สูงกว่า -1639A ประมาณ 44%

2.2 ปัจจัยอื่นๆ

ปัจจัยด้านอายุ ผู้ป่วยที่มีอายุมากขึ้นมีแนวโน้มต้องการยารวาร์ฟารินต่ำกว่าผู้ป่วยที่มีอายุน้อย ซึ่งอธิบายได้จากปริมาณอัลบูมินในพลาสมาที่ลดลงในผู้ป่วยที่มีอายุมาก ทำให้ปริมาณอัลบูมินที่จับกับยารวาร์ฟารินลดลง มียาในรูปที่ออกฤทธิ์มากขึ้น ส่งผลให้ความไวในการตอบสนองต่อยาเพิ่มขึ้น[28] นอกจากนี้อายุที่มากขึ้นมีผลทำให้ความสามารถในการเมแทบอลิซึมยาลดลงอีกด้วย [5]

ปัจจัยด้านพื้นที่ผิวของร่างกาย (Body surface area: BSA) พื้นที่ผิวเกี่ยวข้องกับขนาดยา เนื่องจากในผู้ป่วยที่อ้วนจะพบปริมาณของ fibrinogen และ factor VII สูงกว่าผู้ป่วยผอม [5] ดังนั้นพื้นที่ผิวจึงความสัมพันธ์เชิงบวกกับขนาดยารวาร์ฟาริน

ปัจจัยด้านเพศจากการศึกษาของ Sconce และคณะ [29] ในสหราชอาณาจักร สันนิษฐานว่า เพศมีความสัมพันธ์กับขนาดยา เนื่องจากขนาดร่างกายที่แตกต่างกัน โดยทั่วไปเพศหญิงจะมีขนาดร่างกายเล็กกว่าเพศชาย

3. การศึกษาที่ผ่านมาในประเทศไทย

การศึกษาเกี่ยวกับยีน CYP2C9 และ VKORC1 ในประเทศไทยที่ผ่านมามีด้วยกัน 4 การศึกษาและ 1 รายงานผู้ป่วยเกี่ยวกับความต้องการยารวาร์ฟารินในขนาดสูง สามการศึกษาแรกเป็นการศึกษาความถี่ของภาวะสถานะของยีน CYP2C9 และ VKORC1 อีกหนึ่งการศึกษาคือศึกษาความถี่และสร้างสมการทำนายขนาดยารวาร์ฟารินที่ใช้รักษาจากปัจจัยทางพันธุกรรม

การศึกษาแรกทำโดย ศรีบุญญา บุษกรเรืองรัตน์และคณะ [30] ในปี พ.ศ.2549 ที่คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี กรุงเทพฯ ทำการศึกษาความถี่ของยีน CYP2C9 ในผู้ป่วยโรค

เลือดจำนวน 326 ราย และในผู้ป่วยที่ได้รับยารวาร์ฟาริน 67 ราย ผลการศึกษาพบว่า ความถี่ของยีน CYP2C9 ชนิด *1/*1 ซึ่งเป็น wild type เท่ากับ 91.4% ชนิด *1/*3 เท่ากับ 8.6% ไม่พบ CYP2C9*2 allele และ CYP2C9*3 ชนิด homozygous ส่วนความสัมพันธ์ระหว่างภาวะพหุสัณฐานของยีน CYP2C9 กับขนาดยารวาร์ฟารินในการศึกษานี้แสดงให้เห็นได้เพียงว่าในผู้ป่วยที่มียีน CYP2C9*1/*3 มีแนวโน้มความต้องการยารวาร์ฟารินต่อสัปดาห์ (20.1 ± 5.9 mg) ต่ำกว่าผู้ป่วยที่มียีน CYP2C9*1/*1 (28.7 ± 13.0 mg) แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.081$) นอกจากนี้พบว่าอายุมีอิทธิพลต่อขนาดยารวาร์ฟาริน โดยเฉพาะในผู้ป่วยที่มีอายุมากกว่า 60 ปีมีความต้องการยาน้อยกว่าผู้ป่วยที่มีอายุน้อยกว่า

การศึกษาต่อมาทำโดย สุมลมาลย์ คล้ำชื่นและคณะ [28] ในปี พ.ศ.2551 ที่คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี กรุงเทพฯ เช่นกันทำการศึกษาความถี่ของยีน VKORC1 และ CYP2C9 ในผู้บริจาคเลือดชาวไทยจำนวนจำนวน 319 ราย และผู้ป่วยที่ได้รับยารวาร์ฟาริน 106 ราย พบว่าทั้งสองกลุ่มมีความถี่ของภาวะพหุสัณฐานของยีน VKORC1 ที่ตำแหน่ง -1639 และ CYP2C9 ไม่แตกต่างกัน ($p<0.05$) ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้ ภาวะพหุสัณฐานของยีน VKORC1 ที่ตำแหน่ง -1639 ในประชากรไทยส่วนใหญ่เป็นชนิด AA ซึ่งไม่แตกต่างจากชาวเอเชียในประเทศอื่น ส่วนยีน CYP2C9 นั้นพบว่า ประชากรไทยมากกว่า 90% เป็น wild type และไม่พบ CYP2C9*2 allele เลย นอกจากนั้นในกลุ่มผู้ป่วยที่ได้รับยารวาร์ฟาริน พบว่า ผู้ป่วยที่มีภาวะพหุสัณฐานของยีน VKORC1 ชนิด AA มีค่าเฉลี่ยของขนาดยาที่ได้รับต่อสัปดาห์ (24.0 ± 10.2 mg) ต่ำกว่าชนิด GG (39.5 ± 21.3 mg) และชนิด GA (37.6 ± 13.0 mg) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.001$) การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยอื่นๆกับขนาดยา พบว่า อายุและพื้นที่ผิวของร่างกายมีความสัมพันธ์กับขนาดยาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยเมื่ออายุมากขึ้นมีค่าเฉลี่ยของขนาดยาที่ได้รับลดลง ($p<0.001$) และเมื่อมีพื้นที่ผิวมากขึ้นจากน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้นมีค่าเฉลี่ยของขนาดยาที่ได้รับสูงขึ้น ($p=0.006$)

ในปี พ.ศ.2551 มีรายงานภาวะความต้องการยารวาร์ฟารินในขนาดสูงในผู้ป่วยเด็กหญิงที่มียีน VKORC1 ชนิด H7 haplotype โดย นงนุช สิริระชัยนันท์และคณะ [31] ซึ่งคณะผู้วิจัยได้รายงานผู้ป่วยเด็กหญิงอายุ 15 ปีเกิดในประเทศไทย ได้รับการวินิจฉัยเป็น ulcerative colitis ที่มีปัญหาลิ้มเลือดอุดตันเรื้อรังหลายครั้งจึงต้องได้รับยารวาร์ฟาริน โดยผู้ป่วยรายนี้ต้องได้รับยาในขนาด $42.0-68.3$ mg/สัปดาห์ จึงคงระดับค่า INR ระหว่าง 2-3 ได้ซึ่งสูงกว่าขนาดยาปกติในทางเวชปฏิบัติ (ไม่เกิน 5 mg/วัน) จากการตรวจภาวะพหุสัณฐานของยีน VKORC1 พบว่าเข้าได้กับ haplotype ชนิด H7 ซึ่งตามการศึกษาของ Reider และคณะ [10] เป็น haplotype ที่มีความต้องการยารวาร์ฟารินในขนาดสูง จึงสามารถอธิบายสาเหตุของความถี่ของยีน VKORC1 ที่สูงขึ้นในผู้ป่วยรายนี้ได้

การศึกษากลับมาเป็นการศึกษาความถี่ของยีน CYP2C9 และ VKORC1 ในผู้ป่วยโรคลิ้นหัวใจที่ได้รับยารวาร์ฟาริน ณ โรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่ จ.เชียงใหม่ โดย ศรัณย์ ควร

ประเสริฐและคณะ [23] ทำการศึกษาในผู้ป่วยจำนวน 242 ราย พบว่ามีภาวะพหุสัณฐานของยีน CYP2C9 ชนิด *1/*1 เท่ากับ 95% ชนิด *1/*3 เท่ากับ 5% ไม่พบ CYP2C9*2 allele และ homozygous CYP2C9*3 ในส่วนของยีน VKORC1 พบ haplotype AA มากที่สุด รองลงมาเป็น AB และ BB ตามลำดับ โดยมีความถี่ ดังนี้ 63.6%, 34.3% และ 2.1%

การศึกษาล่าสุดโดย อลิ สรา แสงวิรุณและคณะ [22] ในปี พ.ศ. 2553 มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความถี่ของยีน CYP2C9, VKORC1 ในผู้ป่วยชาวไทย ประเมินผลของยีนทั้งสองที่มีต่อ pharmacokinetic และ pharmacodynamic parameter รวมทั้งสร้างสมการทำนายขนาดยารวาร์ฟารินที่ใช้ในรักษาโดยใช้ปัจจัยทางพันธุกรรมและปัจจัยที่ไม่ใช่พันธุกรรม การศึกษานี้ทำในผู้ป่วยชาวไทยจำนวน 89 ราย ณ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ กรุงเทพมหานคร ผู้ป่วยส่วนใหญ่ (95.5%) ได้รับการผ่าตัดเปลี่ยนลิ้นหัวใจ (prosthetic heart valve replacement) โดยพบความถี่ของยีน CYP2C9 ชนิด *1/*1 มากที่สุด (95.5%) มีผู้ป่วย 1 ราย (1.1%) เป็นชนิด *3/*3 อีก 3 ราย (3.4%) เป็นชนิด *1/*3 ไม่พบ CYP2C9*2 allele เลย ความถี่ของยีน VKORC1 ที่ตำแหน่ง -1639 และ 1173 สามารถจำแนกผู้ป่วยออกได้เป็น 3 haplotype ดังนี้ AA haplotype (-1639AA, 1173TT) พบมากที่สุด 61.8% รองลงมาคือ AB haplotype (-1639GA, 1173CT) พบ 31.5% และพบ BB haplotype (-1639GG, 1173CC) น้อยที่สุด 6.7%

การศึกษา pharmacokinetic parameter โดยใช้ warfarin clearance พบว่าในผู้ป่วยที่เป็น variant group (*1/*3 และ *3/*3) มี warfarin clearance ต่ำกว่าชนิด wild type อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.0001$) ส่วนของ pharmacodynamic parameter ใช้ warfarin sensitivity index (WSI) ซึ่งเป็นค่า INR ต่อระดับยารวาร์ฟารินในพลาสมา (INR:Cp) พบว่าในผู้ป่วยที่มี VKORC1 AA haplotype มี WSI สูงกว่ากลุ่ม BB และ AB haplotype อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.0001$)

ค่าเฉลี่ยของขนาดยาต่อสัปดาห์ของผู้ป่วยที่มีภาวะพหุสัณฐานของยีน CYP2C9 มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ค่าเฉลี่ยขนาดยาต่อสัปดาห์ใน variant group (*1/*3 และ *3/*3) เป็น 0.229 ± 0.195 mg/kg น้อยกว่ากลุ่ม wild type (0.477 ± 0.204 mg/kg) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.020$) ขณะที่ค่าเฉลี่ยของขนาดยาต่อสัปดาห์ของผู้ป่วยที่มีภาวะพหุสัณฐานของยีน VKORC1 มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเช่นกัน ($p < 0.0001$) โดยค่าเฉลี่ยของขนาดยาต่อสัปดาห์ในแต่ละ haplotype เป็นดังนี้ BB 0.842 ± 0.403 mg/kg AB 0.550 ± 0.148 mg/kg และ AA 0.381 ± 0.135 mg/kg จากผลการศึกษาพบว่าในผู้ป่วยที่เป็น VKORC1 BB haplotype และ CYP2C9*1/*1 มีขนาดการใช้ยาสูงสุด ขณะที่ผู้ป่วยที่เป็น VKORC1 AA haplotype และ CYP2C9*3/*3 มีขนาดการใช้ยาดำสุด โดยที่ผู้ป่วยส่วนใหญ่ (58.4%) ในการศึกษาเป็น VKORC1 AA haplotype และ CYP2C9*1/*1 มีขนาดการใช้ยาเพียง 50% ของกลุ่มที่มีขนาดการใช้ยาสูงสุด

การศึกษานี้เป็นการศึกษาแรกในประเทศไทยที่มีการสร้างสมการทำนายขนาดยาว่า
 ฟารินที่ใช้ในการรักษาจากปัจจัยทางพันธุกรรมและปัจจัยที่ไม่ใช่พันธุกรรม ได้สมการดังนี้

$$\text{weekly warfarin dose (mg/wk)} = \exp [1.846+(0.412 \times \text{VKORC1AB})+(0.559 \times \text{VKORC1BB})+(1.512 \times \text{CYP2C9}^*1/^*1)+(1.136 \times \text{CYP2C9}^*1/^*3)-(0.007 \times \text{age})]$$

แทนค่าอายุในหน่วยปีและ 1 หรือ 0 ในกรณีที่มีหรือไม่มีภาวะพหุสัณฐานของยีน VKORC1 BB, VKORC1 AB, CYP2C9*1/*1 และ CYP2C9*1/*3 ซึ่งสมการนี้มีความสามารถในการทำนาย 53.8%

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย

1. ลักษณะการศึกษา

การศึกษาแบบ observational retrospective คือ เป็นการเก็บข้อมูลทางพันธุกรรมควบคู่ไปกับการเก็บข้อมูลขนาดยาและคุณลักษณะของผู้ป่วย ได้แก่ เพศ อายุ น้ำหนัก ความสูง

การศึกษานี้ได้รับการพิจารณาและผ่านการอนุมัติจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน โรงพยาบาลพหลพลพยุหเสนา จ.กาญจนบุรี (เอกสารรับรองเลขที่ 2012-02) ซึ่งใช้เป็นสถานที่เก็บตัวอย่าง ทั้งนี้ผู้ป่วยที่เข้าร่วมการศึกษาทุกรายต้องลงลายมือชื่อให้ความยินยอมในใบยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัย (inform consent)

2. กลุ่มตัวอย่าง

ผู้ป่วยนอกที่ได้รับยารวาร์ฟารินของโรงพยาบาลพหลพลพยุหเสนา จ.กาญจนบุรี จำนวน 91 คน โดยมีเกณฑ์การคัดเลือกผู้ป่วยเข้าและออกจากการศึกษา ดังนี้

2.1 เกณฑ์การคัดเลือกผู้ป่วยเข้าร่วมการศึกษา

- ผู้ป่วยนอกที่มีเชื้อชาติไทยและมีค่า INR อยู่ระหว่าง 2.0-3.0
- มีข้อบ่งชี้ในการได้รับยารวาร์ฟาริน ดังนี้ mitral or aortic valve replacement, rheumatic heart disease, atrial fibrillation, deep vein thrombosis, pulmonary embolism, embolic stroke, cardiomyopathy และ โรคอื่นๆที่แพทย์เห็นควรให้ใช้ยารวาร์ฟาริน
- ผู้ป่วยไม่สูบบุหรี่

2.2 เกณฑ์การคัดเลือกผู้ป่วยออกจากการศึกษา

- ผู้ป่วยที่แพทย์พิจารณาแล้วว่าไม่เหมาะสมที่จะเข้าร่วมการศึกษา เช่น เป็นโรคตับ โรคไต ภาวะไตรอยด์ผิดปกติและโรคมะเร็ง เป็นต้น
- ผู้ป่วยที่ได้รับยาร่วมในการรักษาซึ่งมีคุณสมบัติเหนี่ยวนำหรือยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่ใช้ในการทำยา (enzyme inducer or inhibitor) ยารวาร์ฟาริน

2.3 การกำหนดขนาดตัวอย่าง

การศึกษานี้มีการนำการวิเคราะห์ถดถอยแบบพหุคูณ (multiple regression analysis) เข้ามาใช้เพื่อสร้างสมการ ทำนายขนาดความต้องการยาแอสไพรินที่ใช้ในการรักษา จึงใช้สูตร การกำหนดตัวอย่างของ Lindeman, Merenda and Gold (1980 อ้างถึงใน นงลักษณ์ วิรัชชัย , 2542: 54) [32] ที่ระบุว่า โดยปกติแล้วในการวิเคราะห์สถิติประเภทพหุตัวแปร ควรกำหนดตัวอย่างประมาณ 20 เท่าของจำนวนตัวแปร ซึ่งจากการศึกษาที่ผ่านมาสมการที่ใช้ทำนายขนาดยามี 4 ตัวแปร ดังนั้นขนาดกลุ่มตัวอย่างในการศึกษานี้เท่ากับ 80 คนเป็นอย่างน้อย

3. การเก็บข้อมูล

- เก็บตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยจำนวน 5 มิลลิลิตร หลังจากผู้ป่วยลงนามในใบยินยอม
- เก็บข้อมูลขนาดยาที่ใช้ในการรักษา (maintenance dose) และข้อมูลคุณลักษณะของผู้ป่วย (patient characteristics) จากโปรแกรม HosXp ของทางโรงพยาบาล

4. การตรวจหาลักษณะทางพันธุกรรม

4.1 การสกัด Genomic DNA

นำตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยจำนวน 5 มิลลิลิตรมาปั่นที่ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกพลาสมา เม็ดเลือดขาวและเม็ดเลือดแดงออกจากกัน โดยเม็ดเลือดขาวจะอยู่ในชั้นของ buffy coat หลังจากนั้นนำ buffy coat จำนวน 300 ไมโครลิตรมาสกัด genomic DNA ด้วย Wizard® genomic DNA purification kit ของบริษัท Promega

4.2 การตรวจ VKORC1 -1639 G>A genotype

นำ genomic DNA จำนวน 5 ไมโครลิตร เพิ่มจำนวนด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยมี PCR condition ดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 PCR condition ของการตรวจ VKORC1 -1639 G>A genotype

Phase	Temperature (°C)	Duration (min)
Pre-denaturation	94	2
Denaturation	94	0.5
Primer annealing	60	0.5
Primer extension	72	1
Final extension	72	7

ในกระบวนการ denaturation, primer annealing และ primer extension จะทำซ้ำทั้งหมด 35 รอบ โดยมี forward primers ดังนี้ 5'-GCC AGC AGG AGA GGG AAA TA-3' และ reverse primers ดังนี้ 5'-AGT TTG GAC TAC AGG TGC CT-3' หลังจากนั้นนำไปทำ DNA purification ด้วย Wizard® PCR Preps DNA purification system ของบริษัท Promega แล้วนำ PCR product ที่ได้มาตัดด้วย MspI restriction enzyme หลังจากนั้นนำ DNA fragment ที่ได้มาตรวจสอบด้วยวิธี gel electrophoresis โดยใช้ 3% agarose gel ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาทีแล้วย้อมด้วย ethidium bromide นำ DNA band ไปตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต กรณีเป็น A allele จะพบ DNA fragment ขนาด 290 bp กรณีเป็น G allele จะพบ DNA fragment ขนาด 124 และ 166 bp

4.3 การตรวจ CYP2C9*3 genotype

นำ genomic DNA จำนวน 5 ไมโครลิตร เพิ่มจำนวนด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้ PCR condition ดังตารางที่ 3.1 ทั้งนี้กระบวนการ denaturation, primer annealing และ primer extension จะทำซ้ำทั้งหมด 35 รอบ ทั้งนี้ โดยมี forward primers ดังนี้ 5'-TGC ACG AGG TCC AGA GGT AC-3' และ reverse primers ดังนี้ 5'-GGG ACT TCG AAA ACA TGG AG-3' หลังจากนั้นนำไปทำ DNA purification ด้วย Wizard® PCR Preps DNA purification system ของบริษัท Promega แล้วนำ PCR product ที่ได้มาตัดด้วย KpnI restriction enzyme หลังจากนั้นนำ DNA fragment ที่ได้มาตรวจสอบด้วยวิธี gel electrophoresis โดยใช้ 3% agarose gel ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เวลา 60 นาทีแล้วย้อมด้วย ethidium bromide นำ DNA band ไปตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต กรณีที่เป็น homozygous CYP2C9*3 จะพบ DNA fragment ขนาด 124 และ 17 bp ส่วนกรณีที่เป็น heterozygous CYP2C9*3 จะพบ DNA fragment ขนาด 141 , 124 และ 17 bp ทั้งนี้ DNA fragment ที่ 17 bp ไม่สามารถมองเห็นใน gel electrophoresis ได้เนื่องจากมีขนาดเล็กมาก



รูปที่ 3.1 แสดงภาวะพหุสัณฐานของยีน VKORC1 (Genbank Accession Number: AY587020) และ CYP2C9 (Genbank Accession Number: NG_008385) หลังผ่านกระบวนการย่อยด้วย Msp I และ Kpn I ตามลำดับ โดยเลนที่ 1 ถึง 3 แสดงภาวะพหุสัณฐานของยีน VKORC1 ที่ตำแหน่ง -1639 เลนที่ 4 เป็น 100 bp ladder และเลนที่ 5 ถึง 6 แสดงภาวะพหุสัณฐานของยีน CYP2C9 โดยเลนที่ 1 มี 2 band คือ ขนาด 124 และ 166 bp เป็น VKORC1 -1639 GG เลนที่ 2 มีขนาด 290 bp เป็น VKORC1 -1639 AA เลนที่ 3 มี 3 band คือ 124, 166 และ 290 bp เป็น VKORC1 -1639 GA เลนที่ 5 มีขนาด 141 bp เป็น CYP2C9*1/*1 (wild type) เลนที่ 6 มี 2 band คือ 141 และ 124 bp แสดงว่าเป็น CYP2C9*1/*3 (heterozygous)

5. การวิเคราะห์ทางสถิติ

5.1 การแสดงข้อมูล

ข้อมูลที่เป็นข้อมูลต่อเนื่อง (continuous data) เช่น ขนาดยา อายุ แสดงเป็นค่าเฉลี่ย (mean±SD) ส่วนข้อมูลที่เป็นความถี่ (frequency) เช่น genotype เพศ แสดงเป็น เปอร์เซ็นต์ (%)

5.2 การหาความสัมพันธ์ระหว่างขนาดยาตัวแปรพหุสัณฐานกับลักษณะทางพันธุกรรม

ทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของลักษณะทางพันธุกรรม ด้วยสถิติ analysis of variance (ANOVA) ใช้สถิติ Kruskal-Wallis สำหรับการทดสอบแบบนอนพาราเมตริก โดยใช้สถิติ Mann-Whitney U สำหรับการทดสอบความแตกต่าง ระหว่างคู่ในนอนพาราเมตริกและใช้สถิติ Chi-square ในการเปรียบเทียบสัดส่วน การหาความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยทางพันธุกรรมกับขนาดยาใช้ค่าสถิติ Eta ส่วนปัจจัยอื่นๆกับขนาดยาใช้สถิติ correlation coefficient

5.3 การสร้างสมการทำนายขนาดความต้องการยาแวนิลาที่ใช้ในการรักษา

นำข้อมูลลักษณะทางพันธุกรรมของยีน CYP2C9 ยีนVKORC1 และคุณลักษณะของผู้ป่วย (patient characteristics) มาใช้ในการทำนายขนาดยาแวนิลาที่ใช้ในการรักษา โดยใช้สถิติ multiple linear regression ด้วยวิธี stepwise

ทั้งนี้การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติเชิงพรรณนาและสถิติอ้างอิงทั้งหมดใช้โปรแกรม SPSS version 11.5 โดยถ้าค่า p-value ที่ได้จากการทดสอบหากน้อยกว่า 0.05 ถือว่านัยสำคัญทางสถิติทุกการทดสอบ

บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

การศึกษาครั้งนี้ทำในผู้ป่วยนอกที่ได้รับยารวาร์ฟารินของโรงพยาบาลพหลพลพยุหเสนา จ.กาญจนบุรี ระหว่างเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2555 ถึงเดือนมกราคม พ.ศ. 2556 จำนวน 91 รายที่มีคุณสมบัติตามเกณฑ์การคัดเลือกผู้ป่วยเข้าร่วมการศึกษา

1. คุณลักษณะของผู้ป่วย

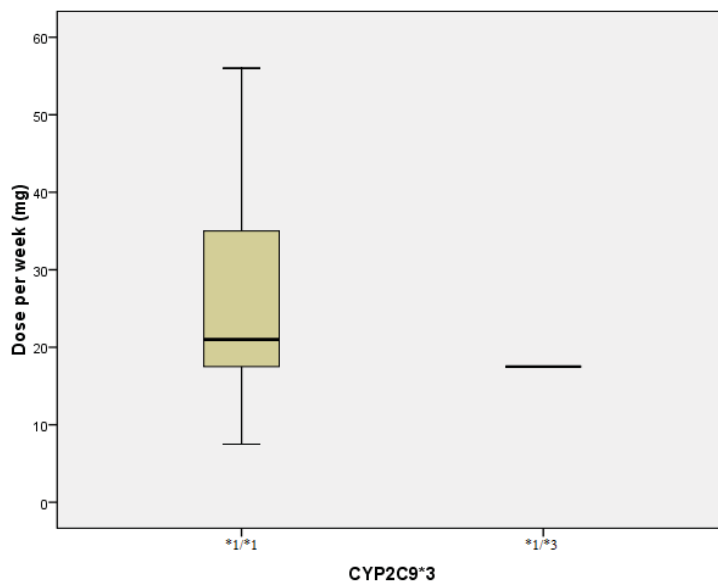
ผู้ป่วยนอกที่ได้รับยารวาร์ฟารินของโรงพยาบาลพหลพลพยุหเสนา จ.กาญจนบุรี จำนวน 91 ราย เป็นเพศหญิง 56 ราย เพศชาย 35 ราย อายุเฉลี่ย 61 ปี น้ำหนักตัวเฉลี่ย 58.51 กิโลกรัม ค่าเฉลี่ยของขนาดยาที่ได้รับต่อสัปดาห์เท่ากับ 24.88 mg พบลักษณะทางพันธุกรรมของยีน CYP2C9*1/*1 (wild type) 98.90% CYP2C9*1/*3 (heterozygous) เพียง 1 ราย เท่านั้นคิดเป็น 1.10% และไม่พบ CYP2C9*3/*3 (homozygous) เลย ขณะที่พบความถี่ของยีน VKORC1 -1639 ดังนี้ GG 9.89% GA 32.97% และ AA 57.14% โดยมีข้อบ่งชี้ของยารวาร์ฟาริน ดังนี้ Rheumatic heart disease, Heart valve replacement, Atrial fibrillation, Deep vein thrombosis และโรคอื่นๆที่แพทย์เห็นควรใช้ยารวาร์ฟารินในการรักษา ซึ่งคุณลักษณะของผู้ป่วยแสดงในตารางที่ 4.1

จากภาวะพหุสัณฐานของยีน CYP2C9 พบว่า CYP2C9*1/*1 มีค่าเฉลี่ยของขนาดยาที่ได้รับต่อสัปดาห์เท่ากับ 24.96 ± 11.27 mg ขณะที่ CYP2C9*1/*3 พบเพียง 1 รายเท่านั้นมีค่าขนาดของยาที่ได้รับต่อสัปดาห์เป็น 17.50 mg ดังรูปที่ 4.1

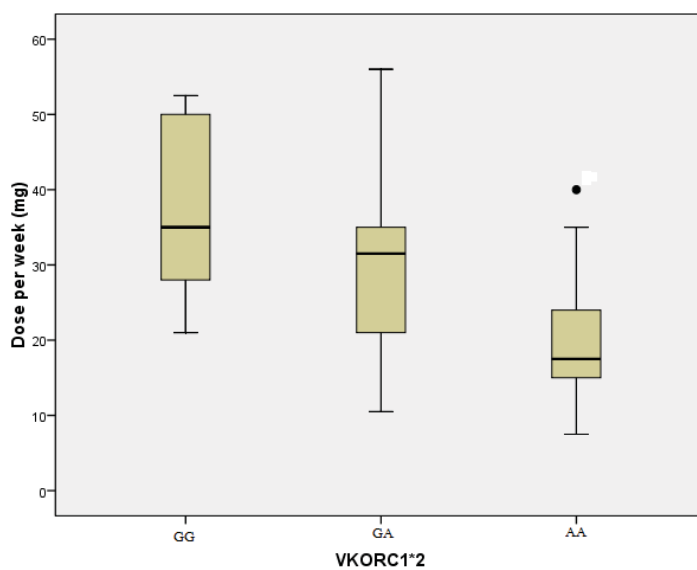
ส่วนภาวะพหุสัณฐานของยีน VKORC1 -1639 G>A พบว่า ชนิด GG มีค่าเฉลี่ยของขนาดยาที่ได้รับต่อสัปดาห์เท่ากับ 37.89 ± 12.02 mg ชนิด GA มีค่าเฉลี่ยของขนาดยาที่ได้รับต่อสัปดาห์เท่ากับ 29.48 ± 11.50 mg และ AA มีค่าเฉลี่ยของขนาดยาที่ได้รับต่อสัปดาห์เท่ากับ 19.97 ± 7.61 mg ดังรูปที่ 4.2

ตารางที่ 4.1 คุณลักษณะของผู้ป่วยในการศึกษา

	n(%)
อายุ (mean \pm SD)	60.98 \pm 14.41
ค่าเฉลี่ยขนาดยาที่ได้รับต่อสัปดาห์ (range)	24.88(7.50-56.00)
เพศ	
หญิง	56 (61.54%)
ชาย	35(38.46%)
น้ำหนักตัว (mean \pm SD)	58.51 \pm 11.92
ข้อบ่งชี้	
Rheumatic heart disease	34(37.36%)
Heart valve replacement	11(12.09%)
Atrial fibrillation	25(27.47%)
Deep vein thrombosis	8(8.79%)
อื่นๆ	13(14.29%)
CYP2C9	
*1/*1(wild type)	90(98.90%)
*1/*3	1(1.10%)
VKORC1 -1639	
GG	9(9.89%)
GA	30(32.97%)
AA	52(57.14%)



รูปที่ 4.1 การกระจายของขนาดยาที่ได้รับต่อสัปดาห์ในภาวะพหุสัณฐานของยีน CYP2C9



รูปที่ 4.2 การกระจายของขนาดยาที่ได้รับต่อสัปดาห์ในภาวะพหุสัณฐานของยีน VKORC1

2. ผลของภาวะพหุสัณฐานต่อขนาดยารัฟาริน

จากภาวะพหุสัณฐานของยีน CYP2C9 ที่พบในกลุ่มตัวอย่าง พบว่ามีชนิด *1/*3 เพียง 1 ราย จึงไม่สามารถนำมาเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยความแตกต่างของทั้งสองกลุ่มได้

ตารางที่ 4.2 ขนาดยาที่ได้รับต่อสัปดาห์และคุณลักษณะของผู้ป่วยที่มีภาวะพหุสัณฐานของยีน VKORC1 -1639 G>A

	VKORC1 -1639			P
	GG	GA	AA	
	mean \pm SD	mean \pm SD	mean \pm SD	
อายุ (ปี) ^a	54.67 \pm 13.31	63.13 \pm 14.13	60.83 \pm 14.67	0.304
น้ำหนัก (kg) ^a	58.33 \pm 12.69	57.85 \pm 10.98	58.92 \pm 12.51	0.926
พื้นที่ผิว (m ²) ^a	1.60 \pm 0.21	1.61 \pm 0.18	1.61 \pm 0.19	0.989
ขนาดยาต่อสัปดาห์ (mg) ^b	37.89 \pm 12.02	29.48 \pm 11.50	19.97 \pm 7.61	0.000*
	n(%)	n(%)	n(%)	
เพศ ^c				
หญิง	6(6.59%)	16(17.58%)	34(37.36%)	0.528
ชาย	3(3.30%)	14(15.38%)	18(19.78%)	

หมายเหตุ a: One-Way ANOVA, b: Kruskal-Wallis, c: Chi-Square และ *p < 0.05

ผลการศึกษาพบว่า ขนาดยาที่ได้รับต่อสัปดาห์ในผู้ป่วยที่มีภาวะพหุสัณฐานของยีน VKORC1 -1639 G>A ต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.000$; $p < 0.05$) ในขณะที่อายุ น้ำหนัก พื้นที่ผิวของร่างกายและเพศไม่มีความแตกต่างกันในผู้ป่วยที่มีภาวะพหุสัณฐานของยีน VKORC1 -1639 G>A ต่างกัน ดังตารางที่ 4.1

ค่าเฉลี่ยของขนาดยาที่ได้รับต่อสัปดาห์ในผู้ป่วยที่มีภาวะพหุสัณฐานของยีน VKORC1 -1639 ชนิด AA (19.97 ± 7.61 mg) น้อยกว่า GG (37.89 ± 12.02 mg) และ GA (29.48 ± 11.50 mg) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.000$; $p < 0.05$) ในขณะที่ไม่มีความแตกต่างระหว่างขนาดยาที่ได้รับต่อสัปดาห์ในผู้ป่วยที่มีภาวะพหุสัณฐานของยีน VKORC1 -1639 ชนิด GG กับ GA ($p = 0.077$; $p > 0.05$)

ผลการศึกษาพบว่าในกลุ่มตัวอย่างพบมีลักษณะทางพันธุกรรมของยีน VKORC1 -1639 AA และ CYP2C9*1/*1 มากที่สุดซึ่งมีความต้องการยาแวนธินต่อสัปดาห์เพียงครึ่งหนึ่งของ VKORC1 -1639 GG และ CYP2C9*1/*1 ซึ่งพบว่าต้องใช้ขนาดยาต่อสัปดาห์สูงสุด ดังแสดงในตารางที่ 4.3 โดยในการศึกษานี้ใช้ขนาดยาของกลุ่ม VKORC1 -1639 AA และ CYP2C9*1/*1 เป็นขนาดอ้างอิง จะเห็นได้ว่า หากพิจารณาที่ VKORC1 -1639 เพียงตำแหน่งเดียว โดยที่ CYP2C9 เป็น wild type พบว่า G allele มีผลให้มีความต้องการยาเพิ่มขึ้นถึง 50% (GA 150%, GG 200%

ตามลำดับเมื่อเทียบกับขนาดอ้างอิง) ส่วน CYP2C9 นั้นพบว่าการเกิด heterozygous ทำให้มีความต้องการยาลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มอ้างอิงแม้ว่าผู้ป่วยจะมี genotype เป็น VKORC1 -1639 GA ก็ตาม ตารางที่ 4.3 เปรียบเทียบขนาดยาที่ได้รับต่อสัปดาห์ในผู้ป่วยที่มีภาวะพหุสัณฐานของยีน VKORC1 ต่างกัน

VKORC1 -1639	CYP2C9	n(91)	ขนาดยาต่อสัปดาห์ (mg)	%CV	ค่าประมาณขนาดยาต่อขนาดอ้างอิง(%)
GG	*1/*1	9	37.89±12.02	32.20	200
	*1/*3	0	-	-	-
GA	*1/*1	29	29.90±11.48	38.39	150
	*1/*3	1	17.50	-	90
AA	*1/*1	52	19.97±7.61	38.11	100 (ขนาดอ้างอิง)
	*1/*3	0	-	-	-

3. ความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยต่างๆกับขนาดยาวาร์ฟาริน

จากผลการศึกษาพบว่า ภาวะพหุสัณฐานของยีน VKORC1 -1639 G>A มีความสัมพันธ์กับขนาดยาที่ได้รับต่อสัปดาห์ ($\text{Eta} = 0.548$) ปัจจัยอื่นๆที่มีความสัมพันธ์กับขนาดยา ได้แก่ อายุ น้ำหนักตัวและพื้นที่ผิวร่างกาย โดยมีรายละเอียดดังนี้ เมื่ออายุมากขึ้นขนาดความต้องการยาจะลดลง ($p=0.000$; $p<0.01$, $R=-0.423$) เมื่อน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้นขนาดความต้องการยาจะเพิ่มขึ้น ($p=0.005$; $p<0.01$, $R=0.292$) และเมื่อพื้นที่ผิวร่างกายเพิ่มขึ้นขนาดความต้องการยาจะเพิ่มขึ้นด้วยเช่นกัน ($p=0.005$; $p<0.01$, $R=0.289$)

4. สมการทำนายขนาดความต้องการยาวาร์ฟาริน

จากผลการวิเคราะห์ตัวแปรเดี่ยว (univariate analysis) พบว่า ตัวแปรที่มีอิทธิพลต่อขนาดยาวาร์ฟาริน ได้แก่ อายุ น้ำหนัก พื้นที่ผิวร่างกาย (Body Surface Area: BSA) ดัชนีมวลกาย (Body Mass Index: BMI) และยีน VKORC1 ดังแสดงในตารางที่ 4.4 โดยตัวแปรอายุและยีน VKORC1 -1639 ชนิด AA มีอิทธิพลในเชิงลบต่อขนาดยา ส่วนตัวแปรน้ำหนัก พื้นที่ผิวร่างกาย ดัชนีมวลกาย ยีน VKORC1 -1639 ชนิด GG และ GA มีอิทธิพลเชิงบวกต่อขนาดยา

ตารางที่ 4.4 การวิเคราะห์ตัวแปรเดี่ยว (univariate analysis)

ตัวแปร	R ²	Standardized Beta	P value
เพศ	0.000	-0.022	0.833
อายุ	0.185	-0.430	0.000*
น้ำหนัก	0.079	0.281	0.007*
ความสูง	0.018	0.135	0.201
BSA	0.075	0.274	0.009*
BMI	0.054	0.232	0.027*
ข้อบ่งชี้			
Heart valve replacement	0.001	-0.036	0.738
Rheumatic heart disease	0.038	0.196	0.063
Atrial fibrillation	0.026	-0.160	0.129
Deep vein thrombosis	0.023	0.150	0.155
อื่นๆ	0.003	-0.050	0.636
ยีน VKORC1-1639			
GG	0.121	0.347	0.001*
GA	0.087	0.295	0.005*
AA	0.239	-0.489	0.000*

เนื่องจากขนาดยารัฟารินที่ได้จากการเก็บข้อมูลมีการกระจายของข้อมูลแบบไม่ปกติ จึงต้องแก้ไขข้อมูลให้มีการแจกแจงแบบปกติ (normal distribution) ด้วยวิธีแปลงข้อมูลขนาดยาให้เป็น logarithm ฐานธรรมชาติก่อน จึงนำไปสร้างสมการทำนายขนาดยารัฟารินที่ใช้ในการรักษา (maintenance dose) ด้วยวิธี multiple stepwise regression analysis ได้สมการดังนี้

ตารางที่ 4.5 Multiple stepwise regression analysis

Parameters	Regression model	P	R ² (%)
VKORC1 genotype	Dose = exp(3.648-0.445 VKORC1 AA)	0.000*	23.1
VKORC1 genotype, age	Dose = exp(4.206-0.450 VKORC1 AA-0.014age)	0.000*	41.6
VKORC1 genotype, age, weight	Dose = exp(3.648-0.457 VKORC1 AA-0.012age+0.008weight)	0.000*	45.3

สมการที่มีความสามารถในการทำนายขนาดยาแวการ์ฟารินได้สูงสุด ($R^2 = 45.3\%$) คือ $\text{weely warfarin dose (mg)} = \exp(3.648 - 0.457 \text{ VKORC1 AA} - 0.012 \text{ age} + 0.008 \text{ weight})$ โดยแทนค่า VKORC1 AA ด้วย 0 หรือ 1 แสดงการพบภาวะพหุสัณฐานของยีน VKORC1 -1639 ชนิด AA แทนค่าตัวแปรอายุด้วยจำนวนปีและแทนค่าน้ำหนักเป็นกิโลกรัม

เมื่อนำสมการนี้มาวิเคราะห์ตัวแปรแบบพหุคูณ (multivariate analysis) พบว่ายีน VKORC1 -1639 ชนิด AA มีอิทธิพลสูงสุดต่อขนาดยา รองลงมาเป็นอายุและน้ำหนักตามลำดับ โดยยีน VKORC1 -1639 ชนิด AA และตัวแปรอายุให้อิทธิพลด้านลบต่อขนาดยา ขณะที่ตัวแปรน้ำหนักเป็นอิทธิพลด้านบวกต่อขนาดยาซึ่งเป็นไปตามการทบทวนวรรณกรรมในบทที่ 2 ทั้งนี้การตรวจสอบสมมติฐานของสมการ multiple linear regression แสดงในภาคผนวก ค ตารางที่ 4.6 การวิเคราะห์ตัวแปรแบบพหุคูณ (multivariate analysis)

ตัวแปร	Coefficient	Standard Error	Standardized Beta	P value
Constant	3.648	0.265		
VKORC1 -1639 AA	-0.457	0.071	-0.502	0.000*
อายุ	-0.012	0.003	-0.387	0.000*
น้ำหนัก	0.008	0.003	0.211	0.000*

บทที่ 5

สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

1. สรุป

การศึกษานี้เป็นการศึกษาแบบ observational retrospective ทำการศึกษาในผู้ป่วยนอกที่ได้รับยารวาร์ฟารินของโรงพยาบาลพหลพลพยุหเสนา จ.กาญจนบุรี จำนวน 91 ราย เพศหญิง 56 ราย เพศชาย 35 ราย มีอายุเฉลี่ย 61 ปี ค่าเฉลี่ยของขนาดยาที่ได้รับต่อสัปดาห์ 24.88 mg ภาวะพหุสัณฐานของยีนที่พบส่วนมาก คือ CYP2C9*1/*1 พบมากถึง 98.90% และ VKORC1 -1639 ชนิด AA พบ 57.14%

การศึกษานี้สามารถแสดงความสัมพันธ์ระหว่างภาวะพหุสัณฐานของยีน VKORC1 ที่ตำแหน่ง -1639 กับขนาดยาในผู้ป่วยชาวไทยได้ โดยในผู้ป่วยที่มียีน VKORC1 -1639 ชนิด AA มีความต้องการยาน้อยกว่าภาวะพหุสัณฐานอื่นอยู่ จึงมีนัยสำคัญทางสถิติ ทั้งนี้ในผู้ป่วยชาวไทยพบลักษณะทางพันธุกรรมของยีน VKORC1 -1639 AA และ CYP2C9*1/*1 มากที่สุด (57.14%) นอกจากนี้ยีน VKORC1 ที่มีความสัมพันธ์กับขนาดยาแล้วยังพบว่าปัจจัยด้านอายุ น้ำหนักตัวและพื้นที่ผิวของร่างกายต่างมีความสัมพันธ์กับขนาดยาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเช่นกัน

จากการนำข้อมูลขนาดยาและตัวแปรต่างๆมาทำการวิเคราะห์การถดถอยแบบพหุคูณ (multiple regression analysis) ได้สมการทำนายขนาดยารวาร์ฟารินที่ใช้ในการรักษา (maintenance dose) ดังนี้ $\text{weekly warfarin dose (mg)} = \exp(3.648 - 0.457 \text{VKORC1 AA} - 0.012 \text{age} + 0.008 \text{weight})$ ซึ่งมีความสามารถทำนายความแตกต่างของขนาดยารวาร์ฟารินที่เหมาะสมได้ 45.3%

2. อภิปรายผล

การศึกษานี้พบว่า ความถี่ของภาวะพหุสัณฐานของยีน CYP2C9 ส่วนใหญ่เป็น *1/*1 (wild type) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมาในประเทศไทย (ตารางที่ 5.1) โดยพบ wild type มากกว่า 90% ขณะที่ความถี่ของภาวะพหุสัณฐานของยีน VKORC1 ที่ตำแหน่ง -1639 พบชนิด AA เป็นส่วนใหญ่ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมาในประเทศไทย แต่เป็นที่น่าสังเกตว่าพบความถี่ของยีน VKORC1 -1639 ชนิด GG ในการศึกษานี้สูงกว่าการศึกษาอื่นๆ คาดว่าภูมิภาคนี้ทำการศึกษามีผลต่อความถี่ของยีนที่พบ เนื่องจากการศึกษาของสุมลมมาลย์ คล้าซัน [28] และอิลิสรา

แสงวิรุณ [22] ทำในกรุงเทพมหานคร ส่วนการศึกษาของศรีณย์ ครอบประเสริฐ [23] ทำในจังหวัด เชียงใหม่ ขณะที่การศึกษานี้ทำในจังหวัดกาญจนบุรีซึ่งอยู่ในภาคตะวันตกของประเทศ สาเหตุของ ความถี่ที่แตกต่างยังไม่สามารถระบุชัดเจน แต่อย่างไรก็ตามสัดส่วนของยีน VKORC1 ที่พบในแต่ละ การศึกษาไม่มีความแตกต่างกัน ทดสอบโดยใช้สถิติ Chi-square ($p=0.804$; $p>0.05$)

ตารางที่ 5.1 การศึกษาความถี่ของภาวะพหุสัณฐานของยีน CYP2C9 และ VKORC1 ในประเทศไทย

ยีน	สุมนลมาลย์ (%)	อลิสรา (%)	ศรีณย์ (%)	การศึกษานี้ (%)
VKORC1 -1639				
GG	5.7	6.7	2.1	9.9
GA	31.1	31.5	34.3	33.0
AA	63.2	61.8	63.6	57.0
CYP2C9				
*1/*1	92.5	95.5	95.0	98.9
*1/*3	7.5	3.4	5.0	1.1
*3/*3	-	1.1	-	-

ตารางที่ 5.2 เปรียบเทียบขนาดยาต่อสัปดาห์กับการศึกษาของอลิสรา แสงวิรุณและคณะ

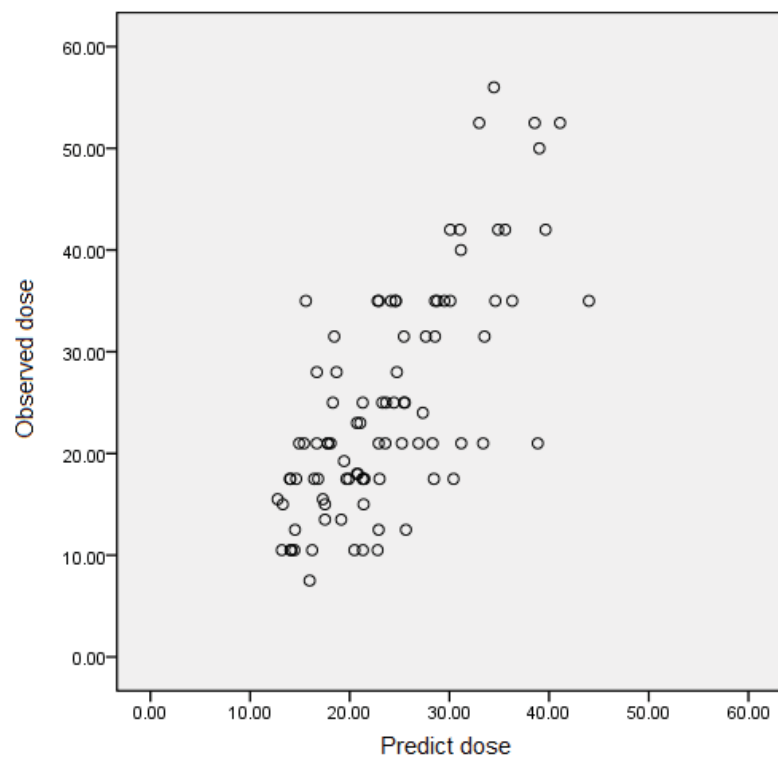
VKORC1-1639	CYP2C9	อลิสรา			การศึกษานี้			P
		n (89)	ขนาดยาต่อสัปดาห์ (mg/kg/wk)	%CV	n (91)	ขนาดยาต่อสัปดาห์ (mg/kg/wk)	%CV	
GG	*1/*1	6	0.842±0.403	47.86	9	0.664±0.210	31.63	0.358
	*1/*3	0	-	-	0	-	-	-
	*3/*3	0	-	-	0	-	-	-
GA	*1/*1	27	0.552±0.151	27.35	29	0.517±0.191	36.94	0.449
	*1/*3	1	0.509	-	1	0.389	-	-
	*3/*3	0	-	-	0	-	-	-
AA	*1/*1	52	0.395±0.124	31.39	52	0.345±0.123	35.65	0.042*
	*1/*3	2	0.173±0.041	23.70	0	-	-	-
	*3/*3	1	0.062	-	0	-	-	-

ผลการเปรียบเทียบขนาดยาต่อสัปดาห์กับการศึกษาล่าสุดเกี่ยวกับปัจจัยทางพันธุกรรม กับขนาดยาวาร์ฟารินในประเทศโดยอติสรา แสงวิรุณและคณะ [22] พบว่า ขนาดยาที่ได้รับต่อ สัปดาห์ในผู้ป่วยที่มี ภาวะพหุสัณฐานของยีน VKORC1 -1639 ชนิด AA และ CYP2C9 *1/*1 ใน สองการศึกษา มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ทางสถิติ โดยค่าเฉลี่ยของขนาดยาที่ได้รับต่อ สัปดาห์ในการศึกษานี้ (0.345 ± 0.123 mg/kg/wk) ต่ำกว่าค่าเฉลี่ยของขนาดยาที่ได้รับต่อสัปดาห์จาก การศึกษาของอติสรา (0.395 ± 0.124 mg/kg/wk) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

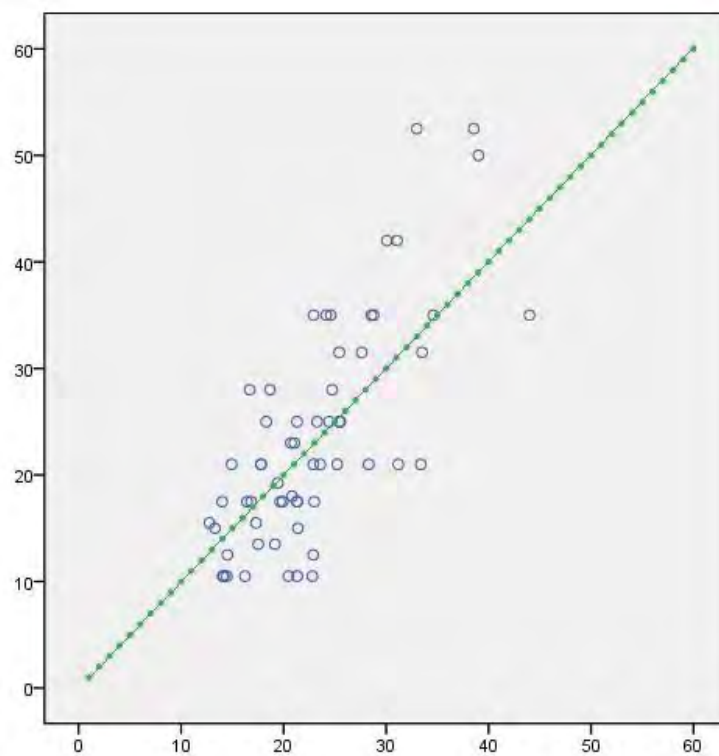
นอกจากนี้ในตารางที่ 5.2 จะเห็นได้ว่าในกลุ่มผู้ป่วยที่มี ภาวะพหุสัณฐานของยีน VKORC1 -1639 ชนิด GG และ GA มีการกระจายของข้อมูลในทั้งสองการศึกษาแตกต่างกัน ซึ่ง สังเกตได้จากสัมประสิทธิ์ความแปรผัน (%CV) โดยในชนิด GG พบว่า ในการศึกษาของอติสรา มี การกระจายของขนาดยาที่ใช้มากกว่าการศึกษานี้ซึ่ง แตกต่างจากชนิด GA ที่ในการศึกษานี้มีการ กระจายของขนาดยามากกว่าการศึกษาของอติสรา ส่วนในชนิด AA พบว่าทั้งสองการศึกษามีการ กระจายของขนาดยาไม่แตกต่างกัน

จากการศึกษานี้ทำให้ได้สมการทำนายขนาดยาวาร์ฟาริน คือ weekly warfarin dose (mg) = $\exp(3.648 - 0.457 \text{VKORC1 AA} - 0.012 \text{age} + 0.008 \text{weight})$ ให้ค่า $R^2 = 45.3\%$ โดยที่การศึกษาล่าสุดโดยอติสรา แสงวิรุณและคณะ[22] ได้สมการทำนายขนาดยาวาร์ฟาริน ดังนี้ weekly warfarin dose (mg) = $\exp[1.846 + (0.412 \times \text{VKORC1AB}) + (0.559 \times \text{VKORC1BB}) + (1.512 \times \text{CYP2C9}^*1/^*1) + (1.136 \times \text{CYP2C9}^*1/^*3) - (0.007 \times \text{age})]$ ให้ค่า $R^2 = 53.8\%$ ทำการเปรียบเทียบความสามารถในการทำนายของทั้งสองสมการ แทนค่าตัวแปรต่างๆในสมการทั้งสองด้วยข้อมูลที่เก็บได้จากการศึกษาครั้งนี้ หลักการแทนค่าตัวแปรต่างๆในสมการของอติสรา แสงวิรุณและคณะใช้หลักการเดียวกับสมการที่ได้จากการศึกษานี้

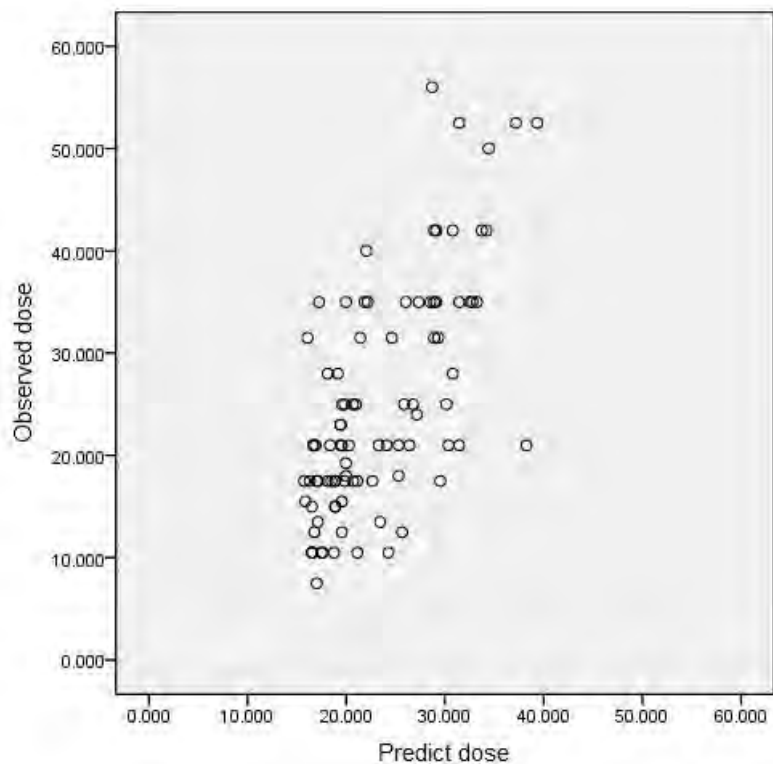
นำข้อมูลที่เก็บได้มาแทนค่าลงในสมการทั้งสองแล้วนำมาสร้างกราฟระหว่างขนาดยาที่ใช้จริง (observed dose) กับขนาดยาที่ได้จากสมการ (predicted dose) แสดงในกราฟที่ 5.1 และ 5.3 หลังจากนั้นสร้าง overlay scatter graph เพื่อสังเกตการกระจายของข้อมูล แสดงในกราฟที่ 5.2 และ 5.4



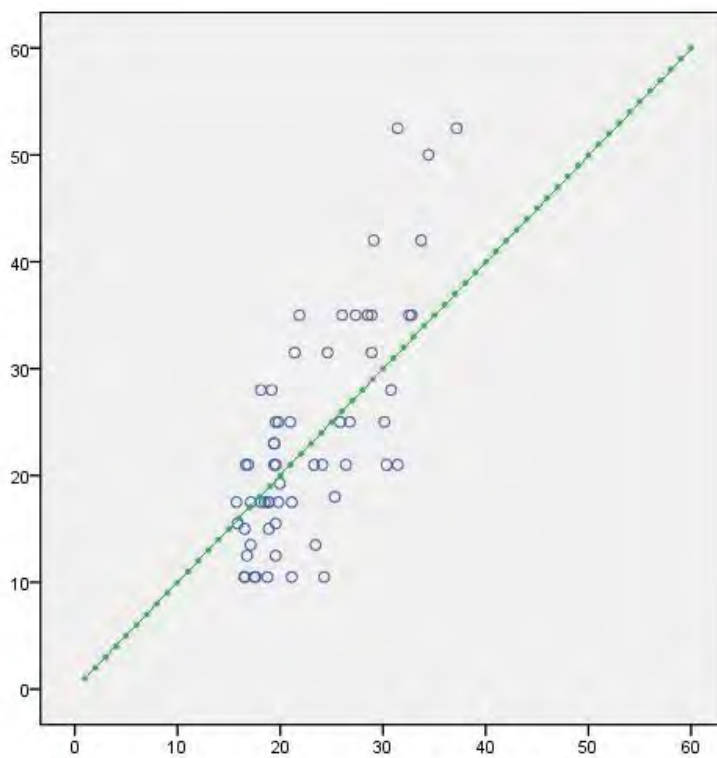
กราฟที่ 5.1 Scatter plot ระหว่างขนาดยาที่ใช้จริงกับขนาดยาที่ได้จากสมการในการศึกษานี้



กราฟที่ 5.2 Overlay scatter plot ระหว่างขนาดยาที่ใช้จริงกับขนาดยาที่ได้จากสมการในการศึกษานี้



กราฟที่ 5.3 Scatter plot ระหว่างขนาดยาที่ใช้จริงกับขนาดยาที่ได้จากสมการของอติสรา



กราฟที่ 5.4 Overlay scatter plot ระหว่างขนาดยาที่ใช้จริงกับขนาดยาที่ได้จากสมการของอติสรา

จากกราฟที่ 5.2 พบว่าขนาดยาที่ใช้จริงกับขนาดยาที่ได้จากสมการของการศึกษานี้มีการซ้อนทับและเกาะกลุ่มกันอยู่บริเวณส่วนกลางของกราฟ จากการสังเกตพบว่ากราฟที่ 5.2 และกราฟที่ 5.4 ขนาดยาที่ใช้จริงกับขนาดยาที่ได้จากสมการของอติสรามีการกระจายของข้อมูลไม่แตกต่างกัน ทำการยืนยันด้วยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของค่าสัมบูรณ์ของความแตกต่างระหว่างขนาดยาที่ได้จากสมการทั้งสองกับขนาดยาที่ใช้จริง (Mean absolute different dose) และค่าความคลาดเคลื่อนกำลังสองเฉลี่ยของขนาดยาจากสมการทั้งสอง (Mean square error) โดยใช้สถิติ paired t-test ทดสอบที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

ผลการทดสอบค่าเฉลี่ยของค่าสัมบูรณ์ของความแตกต่างระหว่างขนาดยาที่ได้จากสมการกับขนาดยาที่ใช้จริง (Mean absolute different dose) พบว่าค่าเฉลี่ยของค่าสัมบูรณ์ที่ได้จากทั้งสองสมการไม่มีความแตกต่างกัน ($p=0.229$) ขณะที่ผลของค่าความคลาดเคลื่อนกำลังสองเฉลี่ยของขนาดยาจากสมการทั้งสอง (Mean square error) ไม่มีความแตกต่างกันเช่นเดียวกัน ($p=0.076$)

ดังนั้นจะเห็นได้ว่าสมการทำนายขนาดยารวาร์ฟารินที่ใช้ในการรักษาที่ได้จากการศึกษานี้กับการศึกษาของอติสรา แสงวิรุณและคณะมีความสามารถในการทำนายไม่แตกต่างกัน สามารถใช้ทดแทนกันได้ โดยสมการของอติสรา แสงวิรุณและคณะใช้ตัวแปรทั้งหมด 5 ตัว ได้แก่ VKORC1 AB haplotype, VKORC1 BB haplotype, CYP2C9*1/*1, CYP2C9*1/*3 และอายุ ขณะที่สมการที่ได้จากการศึกษานี้ใช้ตัวแปรเพียง 3 ตัวแปร ได้แก่ VKORC1 -1639 AA, อายุและน้ำหนัก จากการศึกษาที่แสดงให้เห็นว่าการตรวจภาวะพหุสัณฐานของยีน VKORC1 มีความสำคัญเป็นอันดับแรกในการตรวจสอบลักษณะทางพันธุกรรมในการใช้ยารวาร์ฟารินในผู้ป่วยชาวไทย เนื่องจากผู้ป่วยชาวไทยมากกว่า 90% มีภาวะพหุสัณฐานของยีน CYP2C9 ชนิด *1/*1 (wild type) ขณะที่ตรวจพบภาวะพหุสัณฐานของยีน VKORC1 ที่ตำแหน่ง -1639 ชนิด AA มากกว่า 50% ซึ่งเป็นชนิดที่มีความต้องการยารวาร์ฟารินลดลง จึงควรให้ความสำคัญกับการตรวจภาวะพหุสัณฐานของยีน VKORC1 เป็นอันดับแรก

ทั้งนี้ในการเลือกใช้สมการการถดถอยนั้นโดยมากมักเลือกจากสมการที่ให้ค่า R^2 สูง เนื่องจากแสดงว่าตัวแปรต้นทั้งหมดในสมการสามารถใช้ทำนายตัวแปรตามได้ดี แต่ทั้งนี้ต้องคำนึงด้วยว่าการได้ซึ่งตัวแปรแต่ละนั้นทำให้เสียค่าใช้จ่ายมากขึ้นหรือไม่ เพราะโดยความเป็นจริงแล้วการเพิ่มตัวแปรอิสระมากขึ้น ค่า R^2 จะเพิ่มขึ้นเสมอ [33] ดังนั้นหากพิจารณาตัวแปรของสมการทั้งสองแล้ว พบว่า สมการจากการศึกษาของอติสรา แสงวิรุณและคณะใช้ตัวแปรจำนวน 5 ตัวแปร ต้องตรวจภาวะพหุสัณฐานของยีนทั้งสอง คือ VKORC1 และ CYP2C9 ในขณะที่ สมการที่ได้จากการศึกษานี้มี 3 ตัวแปร ใช้การตรวจภาวะพหุสัณฐานของยีน VKORC1 เพียงยีนเดียว จึงประหยัดเวลาและค่าใช้จ่ายมากกว่า

ดังนั้นเมื่อพิจารณาความสามารถในการทำนายขนาดยารัฟารินของสมการทั้งสอง ความสำคัญของการตรวจภาวะพหุสัณฐานของยีน VKORC1 ในผู้ป่วยชาวไทย ค่าใช้จ่ายและเวลา จึงทำให้สมการที่ได้จากการศึกษานี้เหมาะสมที่จะนำไปใช้ทางคลินิกต่อไป

จากการสังเกตตัวแปรยีน VKORC1 จากทั้งสองสมการพบว่า ในสมการของอติสรา แสงวิรุณและคณะ ตัวแปรของยีน VKORC1 เป็นภาวะพหุสัณฐานชนิด BB และ AB haplotype ซึ่งเป็นภาวะพหุสัณฐานที่ไม่พบในชาวไทยส่วนใหญ่ ขณะที่สมการที่ได้จากการศึกษานี้ใช้ภาวะพหุสัณฐานของยีน VKORC1 ที่ตำแหน่ง -1639 ชนิด AA ซึ่งเป็นภาวะพหุสัณฐานที่พบบ่อยในชาวไทย (มากกว่า 50%) นอกจากนี้จากการสังเกตค่าสัมประสิทธิ์ในสมการของอติสรา แสงวิรุณและคณะ พบว่า ค่าสัมประสิทธิ์หน้าตัวแปร CYP2C9*1/*3 ในสมการมีค่าเป็นบวก จากการทบทวนวรรณกรรมพบว่าหากผู้ป่วยมีภาวะพหุสัณฐานของยีน CYP2C9 ชนิด *1/*3 จะมีการทำงานของเอนไซม์ CYP2C9 ในการเปลี่ยนแปลงยารัฟารินลดลง จึงต้องปรับลดขนาดยาจากขนาดในคนปกติประมาณ 20-30% [3] ทั้งนี้ในการศึกษาของอติสรา แสงวิรุณและคณะเองพบว่าในผู้ป่วยทุก VKORC1 haplotype หากมีภาวะพหุสัณฐานของยีน CYP2C9*3 แล้วทำให้ขนาดยาที่ใช้ลดลง ค่าสัมประสิทธิ์หน้าตัวแปร CYP2C9*1/*3 จึงควรมีค่าเป็นลบ

3. ข้อจำกัด

ในการศึกษานี้ไม่ได้ทำการควบคุมตัวแปรที่อาจรบกวนการออกฤทธิ์ของยา เช่น ปัจจัยด้านอาหาร เนื่องจากยารัฟารินเป็น vitamin K antagonist ดังนั้นอาหารที่มีส่วนประกอบของวิตามินเคจึงรบกวนการทำงานของยา การศึกษานี้ไม่ได้มีตรวจสอบการให้ความร่วมมือ (compliance) ในการรับประทานยาและอาการไม่พึงประสงค์จากการใช้ยา นอกจากนี้ในเกณฑ์การคัดเลือกผู้ป่วยเข้าร่วมการศึกษา (inclusion criteria) ไม่ได้มีการกำหนดเกณฑ์ของน้ำหนักตัวของผู้ป่วย

4. ข้อเสนอแนะ

การศึกษานี้เป็นการศึกษาแบบ observational retrospective ทำให้ได้สมการทำนายขนาดยารัฟารินที่ใช้ในการรักษาสำหรับผู้ป่วยชาวไทย ดังนั้นเพื่อเป็นการต่อยอดการศึกษาจึงควรนำสมการที่ได้ไปทำการศึกษาในรูปแบบของ prospective study ต่อไป โดยทำการศึกษาระหว่างการให้ยารัฟารินในขนาดมาตรฐานกับการให้ยาในขนาดที่ได้จากสมการ เปรียบเทียบระยะเวลาในการเข้าสู่ระดับ INR ที่เหมาะสมและอัตราการเกิดอาการไม่พึงประสงค์ เพื่อแสดงประโยชน์และความสำคัญของปัจจัยทางพันธุกรรมในการกำหนดขนาดยารัฟาริน

รายการอ้างอิง

- [1] Oldenburg, Johannes. et al. (2007). “VKORC1: molecular target of coumarins.” **Journal of Thrombosis and Haemostasis** 5, suppl.1: 1–6.
- [2] Garcia, Andrea A., and Reitsma, Pieter H. (2008). “VKORC1 and the vitamin K cycle.” **Vitamins and Hormones**, 78: 23-33.
- [3] อธิกา จารุโชติภมม. (2553). “วาร์ฟารินและความหลากหลายของลักษณะทางพันธุกรรม.” **ไทยเภสัชศาสตร์และวิทยาการสุขภาพ** 15, 5 (เมษายน – มิถุนายน): 180-184.
- [4] Schalekamp, T., and Boer, A. (2010). “Pharmacogenetics of oral anticoagulant therapy.” **Current Pharmaceutical Design** 16, 2: 187-203.
- [5] Ozer, Nihat. et al. (2010). “The impact of CYP2C9 and VKORC1 genetic polymorphism and patient characteristics upon warfarin dose requirement in an adult Turkish population.” **Heart Vessels** , 25: 155-162.
- [6] Wadelius, Mia. et al. (2007). “Association of warfarin dose with genes involved in its action and metabolism.” **Human Genetics**, 121: 23-34.
- [7] Oldenburg, Johannes. et al. (2007). “Current pharmacogenetic developments in oral anticoagulation therapy: The influence of variant VKORC1 and CYP2C9 alleles.” **Thrombosis and Haemostasis**, 98: 570-578.
- [8] Kudzi, William., Dodoo, Alexander NO, and Mills, Jeremy J. (2009). “Characterisation of CYP2C8, CYP2C9 and CYP2C19 polymorphisms in a Ghanaian population.” **BMC Medical Genetics**, 10: 1-6.
- [9] Geisen, Christof. et al. (2005). “VKORC1 haplotypes and their impact on the inter-individual and inter-Ethnic variability of oral anticoagulation.” **Thrombosis and Haemostasis**, 94: 773-779.
- [10] Rieder, Mark J. et al. (2005). “Effect of VKORC1 haplotypes on transcriptional regulation and warfarin dose.” **The New England Journal of Medicine** 22, 352(June): 2285-2293.

- [11] US FDA. (2010). **Coumadin (warfarin sodium) tablet and injection** [Online]. Accessed 5 July 2011. Available from <http://www.fda.gov/Safety/MedWatch/SafetyInformation/ucm201100.htm>
- [12] Breckenridge, Alasdair M. et al. (1974). "Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the enantiomers of warfarin in man." **Clinical Pharmacology & Therapeutics** 15, 4 (Apr): 424-430.
- [13] Wadelius, Mia. et al. (2005). "Common VKORC1 and GGCX polymorphisms associated with warfarin dose." **The Pharmacogenomics Journal** 5, 4: 262-270.
- [14] McEvoy, G. K., ed. (2006). **AHFS Drug Information**. Bethesda USA: The American Society of Health-System Pharmacists Inc.
- [15] Lacy, Charles F. et al. (2004). **Drug Information Handbook International**. 12. Ohio: Lexi-Comp Inc.
- [16] สมาคมแพทย์โรคหัวใจแห่งประเทศไทย ในพระบรมราชูปถัมภ์. (2553). **แนวทางการรักษาผู้ป่วยด้วยยาต้านการแข็งตัวของเลือดชนิดรับประทาน** เข้าถึงเมื่อ 20 กุมภาพันธ์ 2554. เข้าถึงได้จาก [http://www.thaiheart.org/images/column_1292154183/warfarin_Guideline\(1\).pdf](http://www.thaiheart.org/images/column_1292154183/warfarin_Guideline(1).pdf)
- [17] ศูนย์เฝ้าระวังความปลอดภัยด้านผลิตภัณฑ์สุขภาพ กองแผนงานและวิชาการ สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา. (2555). **สรุปรายงานอาการไม่พึงประสงค์จากการใช้ยาประจำปี 2554**. เข้าถึงเมื่อ 5 พฤษภาคม 2556. เข้าถึงได้จาก http://thaihpvc.fda.moph.go.th/thaihvc/Public/News/uploads/hpvc_1_3_4_100322.pdf
- [18] Furuya Hiroyuki. et al. (1995). "Genetic polymorphism of CYP2C9 and its effect on warfarin maintenance dose requirement in patients undergoing anticoagulation therapy." **Pharmacogenetics** 5, 6 (Dec): 389-392.
- [19] Li Tao. et al. (2004). "Identification of the gene for vitamin K epoxide reductase." **Nature**, 427 (Feb): 541-544.
- [20] Rost, S. et al. (2004). "Mutations in VKORC1 cause warfarin resistance and multiple coagulation factor deficiency type 2" **Nature**, 427 (Feb): 537-541.
- [21] Xie Hong-Guang. et al. (2002). "CYP2C9 allelic variants: ethnic distribution and functional significance." **Advanced Drug Delivery Reviews**, 54: 1257-1270.

- [22] Alisara Sangviroon. et al. (2010). “Pharmacokinetic and pharmacodynamic variation associated with VKORC1 and CYP2C9 polymorphisms in Thai patients taking warfarin.” **Drug Metabolism and Pharmacokinetics** 25, 6: 531-538.
- [23] Srun Kuanprasert. et al. (2009). “Prevalence of CYP2C9 and VKORC1 mutation in patients with valvular heart disease in northern Thailand.” **Journal of the Medical Association of Thailand**, 92: 1597-1601.
- [24] Takahashi Hirokazu, Kashima Tomoyuki, and Nomoto Shinya. (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: 365-73.
- [25] Lindh, Jonatan D. et al. (2009). “Influence of CYP2C9 genotype on warfarin dose requirement-a systematic review and meta-analysis.” **European Journal of Clinical Pharmacology** 65, 4 (Apr): 365-375.
- [26] D’Andrea, Giovanna. et al. (2005). “A polymorphism in the VKORC1 gene is associated with an interindividual variability in the dose-anticoagulant effect of warfarin.” **Blood**, 105(Jan): 645-649.
- [27] Yuan Hsiang-Yu. et al. (2005). “A novel functional VKORC1 promoter polymorphism is associated with inter-individual and inter-ethnic differences in warfarin sensitivity.” **Human Molecular Genetics**, 14: 1745-1751.
- [28] สุมลมาลย์ คัล้าซึ้น และคณะ. (2551). “ความถี่ของยีน VKORC1 ในผู้ป่วยโรคเลือดชาวไทยและผู้ป่วยที่ได้รับยา warfarin.” **วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต** 18, 4 (ตุลาคม): 307-313.
- [29] Sconce, Elizabeth A. et al. (2005). “The impact of CYP2C9 and VKORC1 genetic polymorphism and patient characteristics upon warfarin dose requirements: proposal for a new dosing regimen.” **Blood**, 106(Oct): 2329-2333.
- [30] ศรีบุญญา บุญกรเรืองรัตน์ และคณะ. (2549). “ความถี่ของยีนไซโตโครม P450 2C9 ในคนไทย.” **วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต** 16, 3(กรกฎาคม): 213-220.

- [31] นงนุช สิริชัยนันท์ และคณะ. (2551). “ภาวะความต้องการยา warfarin ในขนาดสูงในผู้ป่วยเด็กหญิงที่มียีน VKORC1 ชนิด H7 haplotype.” วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต 18, 4(ตุลาคม): 315-320.
- [32] นงลักษณ์ วิรัชชัย. (2542). โมเดลลิสมเรด: สถิติวิเคราะห์สำหรับการวิจัย. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- [33] ศิริชัย พงษ์วิชัย. (2552). การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยคอมพิวเตอร์. พิมพ์ครั้งที่ 20. กรุงเทพฯ: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก



เอกสารชี้แจงผู้เข้าร่วมการวิจัย

(Participant Information Sheet)

ในเอกสารนี้อาจมีข้อความที่ท่านอ่านแล้วยังไม่เข้าใจ โปรดสอบถามหัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้แทนให้ช่วยอธิบายจนกว่าจะเข้าใจดี ท่านอาจจะขอเอกสารนี้กลับไปอ่านที่บ้าน เพื่อปรึกษาหารือกับญาติพี่น้อง เพื่อนสนิท แพทย์ประจำตัวของท่าน หรือแพทย์ท่านอื่น เพื่อช่วยในการตัดสินใจเข้าร่วมการวิจัย

โครงการวิจัยเรื่อง ความสัมพันธ์ระหว่างภาวะพหุสัณฐานของ CYP2C9 และ VKORC1 ต่อขนาดยา วาร์ฟารินในผู้ป่วยชาวไทย

ชื่อผู้วิจัย ภาณุ บุรัสกร ทรัพย์สุพรรณ
 ภก. รศ. ดร. นิตชัย นินไพศาล
 นพ. ธเนศ ปิ่นทอง
 นพ. วิบูลย์ ภัณฑาภิรักษ์

สถานที่วิจัย โรงพยาบาลพหลพลพยุหเสนา จ.กาญจนบุรี

ผู้ให้ทุน สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยศิลปากร

บทนำ

ยา วาร์ฟาริน (warfarin) เป็นยาต้านการแข็งตัวของเลือด (anticoagulant) ใช้ในการรักษาและป้องกันภาวะลิ่มเลือดอุดตันหลอดเลือด (thromboembolism) โดยเฉพาะในโรคระบบหัวใจและหลอดเลือด ปัญหาสำคัญทางคลินิกในการใช้ยา วาร์ฟาริน คือ การเกิดภาวะเลือดออกผิดปกติอันเป็นอาการไม่พึงประสงค์ของยา เนื่องจากยา วาร์ฟารินเป็นยาที่มีช่วงในการรักษาแคบ (narrow therapeutic range) จึงมีโอกาสเกิดพิษของยาได้ง่าย แม้มีการเปลี่ยนระดับยาเพียงเล็กน้อยจากการศึกษาพบว่าปัจจัยที่มีผลต่อขนาดของยา วาร์ฟาริน ได้แก่ เพศ อายุ อาหาร เชื้อชาติ ยาที่ใช้ร่วมและพันธุกรรม

ลักษณะทางพันธุกรรมของที่มีความสำคัญต่อขนาดของยา วาร์ฟาริน คือ การแปรผันทางพันธุกรรมของ ยีน CYP2C9 และ VKORC1 ความถี่ของการแปรผันทางพันธุกรรมของยีนทั้งสองนี้มี ความแตกต่างกันในประชากรแต่ละเชื้อชาติทำให้ขนาดยา วาร์ฟารินที่เหมาะสมในประชากรแต่ละเชื้อชาติแตกต่างกันไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย โครงการวิจัยนี้ทำขึ้นเพื่อ หาความสัมพันธ์ระหว่างภาวะพหุสัณฐานของยีน CYP2C9 และ VKORC1 กับขนาดของยาวาร์ฟารินในผู้ป่วยชาวไทย ซึ่งจะมีประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับคือ

1. ทราบความถี่ของภาวะพหุสัณฐานของยีน CYP2C9, VKORC1 ในผู้ป่วยชาวไทย
2. ทราบความสัมพันธ์ระหว่างภาวะพหุสัณฐานของยีน CYP2C9 และ VKORC1 กับขนาดของยาวาร์ฟารินในผู้ป่วยชาวไทย
3. ทราบแนวทางและ/หรือสมการในการปรับขนาดยาวาร์ฟารินในผู้ป่วยชาวไทยโดยอาศัยข้อมูลพื้นฐานและข้อมูลทางพันธุกรรม

ท่านได้รับเชิญให้เข้าร่วมการวิจัยนี้เพราะ ท่านเป็นผู้ป่วยเชื้อชาติไทย ที่มีข้อบ่งใช้ในการได้รับยาวาร์ฟารินและมีค่า INR คงที่ โดยมีข้อบ่งใช้ในการรักษา ดังนี้ เป็นผู้ป่วยที่ได้รับการเปลี่ยนลิ้นหัวใจเทียม (mitral or aortic valve replacement) ผู้ป่วยหลอดเลือดดำอุดตัน (deep vein thrombosis) โรคหัวใจรูมาติก (rheumatic heart disease) ภาวะหัวใจห้องบนเต้นผิดจังหวะชนิดสั้นพริ้ว (atrial fibrillation) และโรคอื่นๆที่แพทย์เห็นควรให้ใช้ยาวาร์ฟารินในการรักษา

ขั้นตอนการปฏิบัติตัวหากท่านเข้าร่วมโครงการวิจัย

เมื่อท่านเข้าร่วมการวิจัยแล้ว สิ่งที่ท่านจะต้องปฏิบัติ คือ มาตรวจติดตามการรักษาและรับประทานยาของท่านตามปกติ ผู้วิจัยเพียงแต่ขอข้อมูลทางพันธุกรรมของท่านรวมทั้งผลการติดตามการรักษาของท่าน ไปวิเคราะห์ ซึ่งจะต้องมีการเจาะเลือดของท่านจำนวน 2-5 ซีซี ระหว่างที่ท่านเข้าร่วมการวิจัยหากท่านมีอาการไม่พึงประสงค์ให้แจ้งผู้วิจัยทราบโดยเร็ว

ความเสี่ยงและ/หรือความไม่สบายที่อาจเกิดขึ้น

ความเสี่ยงที่อาจจะเกิดขึ้นเมื่อทำการวิจัยมีน้อยมาก เนื่องจากในขั้นตอนการรักษาของท่านก็จะมีบุคลากรทางการแพทย์คอยดูแลอยู่แล้ว หากเกิดความไม่สบายในช่วงที่ทำการวิจัยอยู่ ท่านสามารถแจ้งผู้วิจัยหรือติดต่อทางโรงพยาบาลได้

การเข้าร่วมโครงการวิจัยของท่านต้องเป็นไปด้วยความสมัครใจ

หากท่านไม่เข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้จะไม่มีผลกระทบใดๆ ทั้งในปัจจุบันและอนาคต ด้านการรักษาพยาบาลของท่าน โดยท่านก็จะได้รับการตรวจเพื่อการวินิจฉัยและรักษาโรคของท่านตามวิธีการที่เป็นมาตรฐาน หากเกิดผลข้างเคียงที่ไม่พึงประสงค์จากการวิจัย ท่านจะได้ รับการช่วยเหลือจากบุคลากรทางการแพทย์ของทางโรงพยาบาล

ระบุชื่อผู้วิจัยที่จะสามารถติดต่อได้

หากมีข้อข้องใจที่จะสอบถามเกี่ยวข้องกับกรวิจัย หรือเมื่อบาดเจ็บ หรือเจ็บป่วยจากการวิจัย ท่านสามารถติดต่อ ภาญ. บุรุษกร ทรัพย์สุพรรณ โรงพยาบาลพหลพลพยุหเสนา โทร . 089-9199392 หรือ ภก. รศ. ดร. นิตชัย ฉิ้นไพศาล คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร โทร . 087-1547171

ค่าใช้จ่ายที่เข้าร่วมการวิจัยจะต้องรับผิดชอบเองมีอะไรบ้าง ท่านจะต้องรับผิดชอบเกี่ยวกับค่าใช้จ่ายในการรักษาของตัวเองท่านเองเช่น ค่ายา ค่าตรวจทางห้องปฏิบัติการ และอื่นๆ ที่เป็นการตรวจประจำของท่าน เว้นแต่ผู้วิจัยจะนัดตรวจพิเศษ ท่านจะไม่ต้องเสียค่าใช้จ่าย

หากมีข้อมูลเพิ่มเติมทั้งด้านประโยชน์และโทษที่เกี่ยวกับการวิจัยนี้ ผู้วิจัยจะแจ้งให้ทราบโดยรวดเร็วไม่ปิดบัง

การรักษาความลับ ข้อมูลส่วนตัวของท่านจะถูกเก็บรักษาไว้ ไม่เปิดเผยต่อสาธารณะเป็นรายบุคคล โดยตั้งเป็นรหัสเก็บข้อมูล และจะรายงานผลการวิจัยเป็นข้อมูลส่วนรวม ข้อมูลของผู้ร่วมการวิจัยเป็นรายบุคคลอาจมีคณะบุคคลบางกลุ่มเข้ามาตรวจสอบได้ เช่น ผู้ให้ทุนวิจัย สถาบัน หรือองค์กรของรัฐที่มีหน้าที่ตรวจสอบ คณะกรรมการจริยธรรมฯ เป็นต้น

ท่านมีสิทธิ์ถอนตัวออกจากโครงการวิจัยเมื่อใดก็ได้ โดยไม่ต้องแจ้งให้ทราบล่วงหน้า และการไม่เข้าร่วมการวิจัยหรือถอนตัวออกจากโครงการวิจัยนี้จะไม่มีผลกระทบต่อกรบริการและการรักษาที่สมควรจะได้รับแต่ประการใด

หากท่านได้รับการปฏิบัติที่ไม่ตรงตามที่ได้ระบุไว้ในเอกสารชี้แจงนี้ ท่านจะสามารถแจ้งให้ประธานคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน โรงพยาบาลพหลพลพยุหเสนา ทราบได้ที่ ฝ่ายเลขานุการคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน โรงพยาบาลพหลพลพยุหเสนา (คุณผกามาศ นามประดิษฐ์กุล) เบอร์โทร 034-622999 ต่อ 6827

ข้าพเจ้าได้อ่านรายละเอียดในเอกสารนี้ครบถ้วนแล้ว

ลงชื่อ

(.....)

วันที่



แบบ จว.3/2552

หนังสือแสดงความยินยอมการเข้าร่วมโครงการวิจัย
กรณีอาสาสมัครผู้เข้าร่วมโครงการวิจัยเป็นผู้ที่บรรลุนิติภาวะ

INFORMED CONSENT FORM

โครงการวิจัยเรื่อง ความสัมพันธ์ระหว่างภาวะพหุสัญญาณของ CYP2C9 และ VKORC1 ต่อขนาดยาแอสไพรินในผู้ป่วยชาวไทย

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

ข้าพเจ้า(นาย/นาง/นางสาว).....

อยู่บ้านเลขที่..... ซอย..... ถนน..... แขวง/ตำบล

.....เขต/อำเภอ..... จังหวัด..... รหัสไปรษณีย์.....

บัตรประชาชน/ข้าราชการเลขที่.....

ก่อนที่จะลงนามในใบยินยอมให้ทำการวิจัยนี้ ข้าพเจ้าได้รับเอกสารและคำอธิบายจากผู้วิจัย ถึงวัตถุประสงค์ของการวิจัย วิธีวิจัย อันตรายหรืออาการข้างเคียงที่อาจเกิดขึ้นจากการวิจัยหรือจากยาที่ใช้ รวมทั้งประโยชน์ที่ เกิดขึ้นจากการวิจัยอย่างละเอียด และมีความเข้าใจดีแล้ว ผู้วิจัยได้ตอบคำถามต่างๆ ที่ข้าพเจ้าสงสัยด้วยความเต็มใจ ไม่ ปิดบัง ไม่ซ่อนเร้นจนข้าพเจ้าพอใจ ข้าพเจ้านุญาตให้ผู้วิจัยเปิดเผย ข้อมูลเกี่ยวกับตัวข้าพเจ้าได้ตามที่ผู้วิจัยเห็นสมควร ข้าพเจ้าเข้าร่วม โครงการนี้โดยความสมัครใจ และมีสิทธิ์ที่จะบอกเลิกการเข้าร่วม โครงการวิจัยนี้เมื่อใดก็ได้

ผู้วิจัยและ/หรือผู้ให้ทุนสนับสนุนการวิจัย ขอให้รับรองว่าจะเก็บข้อมูลเกี่ยวกับข้าพเจ้าเป็นความลับ และ จะเปิดเผยเฉพาะในรูปที่เป็นการสรุปการวิจัย โดยไม่ระบุตัวบุคคลผู้เป็นเจ้าของข้อมูล และหากเกิดอันตรายหรือความเสียหายอันเป็นผลจากการวิจัยต่อข้าพเจ้า ผู้วิจัยและ/หรือผู้ให้ทุนสนับสนุนการวิจัยจะจัดการรักษาพยาบาลให้จนกลับคืน สภาพเดิม และจะเป็นผู้ออกค่าใช้จ่ายทั้งหมดในการรักษาพยาบาลรวมทั้งค่าใช้จ่ายค่าเสียหายอื่นถ้าหากมี

ผู้วิจัยแจ้งด้วยว่าข้าพเจ้าสามารถติดต่อกับผู้วิจัย ภญ.บุรฉกร ทรัพย์สุพรรณ ได้ที่ ภาควิชาเภสัชวิทยาและ พิษวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัย ศิลปากร อ. เมือง จ. นครปฐม 73000 โทร.089-9199392 ข้าพเจ้าได้อ่านข้อความข้างต้นแล้วและมีความเข้าใจดีทุกประการ จึงได้ลงนามในใบยินยอมนี้ด้วยความเต็มใจ

ลงนาม.....อาสาสมัครผู้เข้าร่วม โครงการวิจัย

()

ลงนาม.....ผู้วิจัย

()

ลงนาม.....พยาน

()

ลงนาม.....พยาน

()

ภาคผนวก ข

VKORC1 gene (Genbank Accession number: AY587020)

3481 accattattc tgtctaccac actctctaga agagagtaga tgtgagaaac
Forward primer: g ccagcaggag agggaaata
3531 agcatctgga gagggagga g ccagcaggag agggaaata t cacagacgcc
3581 agaggaagag agttcccaga agggtaggtg caacagtaag ggatccctct
3631 ggaagtcaa gcaagagaag acctgaaaa caaccattgg cgggtgcgg
3681 tggctcacgc ctataatcct agcattttgg gaggccgagg tgggtggatc
3731 acttgaggtc aggagttaa gacaagcctg gccaacatgg tgaaaccctg
Reverse primer: t ccgtggacat
3781 tcttactaa aaatacaaaa attagccaga catggtggca ggcacctgta
caggtttga
3831 gtccaaacta cttgggaggc tgaggcacga gaaccacttg aaccctggag

CYP2C9 gene (Genbank Accession number: NG008385)

```
47521 atcagctaaa gtccaggaag agattgaacg tgtgattggc agaaaccgga
                                         Forward primer:tg
47571 gcccctgcat gcaagacagg agccacatgc cctacacaga tgctgtggtg
cacgaggtcc agaggtac
47621 cacgaggtcc agagatacat tgaccttctc cccaccagcc tgccccatgc
47671 agtgacctgt gacattaat tcagaaacta ttcattccc aaggtaagtt
Reverse primer:g aggtacaaaa gcttcaggg
47721 tgtttctcct aactgcaac tccatgtttt cgaagtccc aaattcatag
```


ภาคผนวก ค

การตรวจสอบสมการ

สมการถดถอยแบบเส้นตรงพหุคูณ (multiple linear regression) ที่ได้มานั้นต้องผ่านการตรวจสอบสมการก่อนที่จะนำไปใช้เพื่อเป็นการยืนยันว่าสมการที่ได้มานั้นมีความเป็นเส้นตรงและเหมาะสมแก่การนำไปใช้เป็นตัวแบบ (model) ในการพยากรณ์ โดยการตรวจสอบสมการประกอบด้วย การตรวจสอบความเป็นอิสระของตัวแปร การแจกแจงและความแปรปรวนของส่วนเหลือ การตรวจสอบความเป็นเชิงเส้นของสมการและการตรวจสอบค่าผิดปกติ

จากการศึกษานี้ได้ สมการทำนายขนาดยารวาร์ฟารินที่ใช้ในการรักษา (maintenance dose) ด้วยวิธี multiple stepwise regression analysis ดังนี้

$$\text{weely warfarin dose (mg)} = \exp(3.648 - 0.457 \text{ VKORC1 AA} - 0.012 \text{ age} + 0.008 \text{ weight})$$

1. การตรวจสอบความเป็นอิสระของตัวแปร

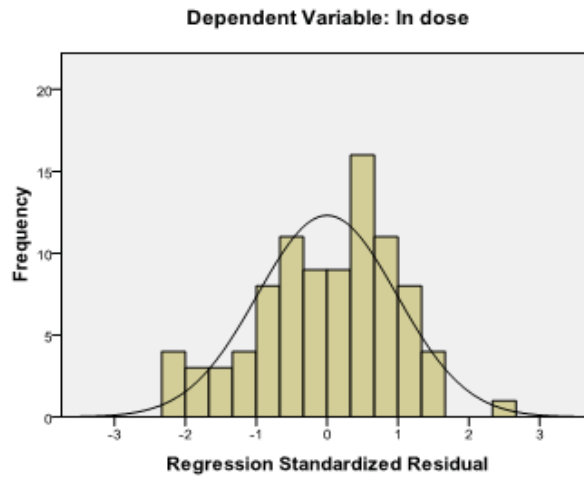
ตารางผนวก ก.1 ทดสอบสหสัมพันธ์ความคาดเคลื่อนโดยใช้สถิติ Durbin-Watson

Change Statistics					Durbin-Watson
R Square Change	F Change	df1	df2	Sig. F change	
0.042	6.911	1	87	0.01	2.155

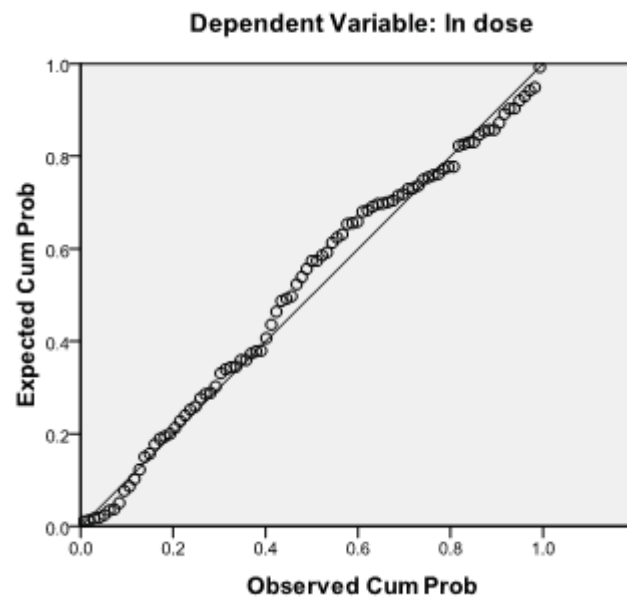
ตารางผนวก ก.2 ตรวจสอบ Multiple-Collinearity

ตัวแปรในสมการ	Collinearity Statistics	
	Tolerance	VIF
VKORC1 AA	0.998	1.002
อายุ	0.946	1.057
น้ำหนัก	0.945	1.059

2. ตรวจสอบการแจกแจงของส่วนเหลือโดยใช้ standardized residual

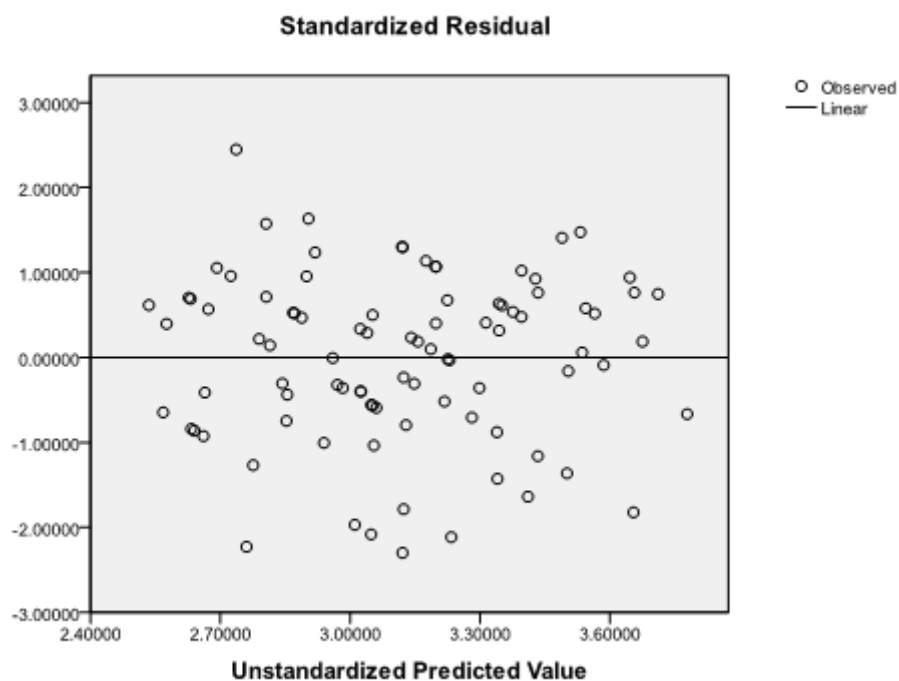


กราฟแผนวก ค.1 Histogram แสดงการแจกแจงของ standardized residual



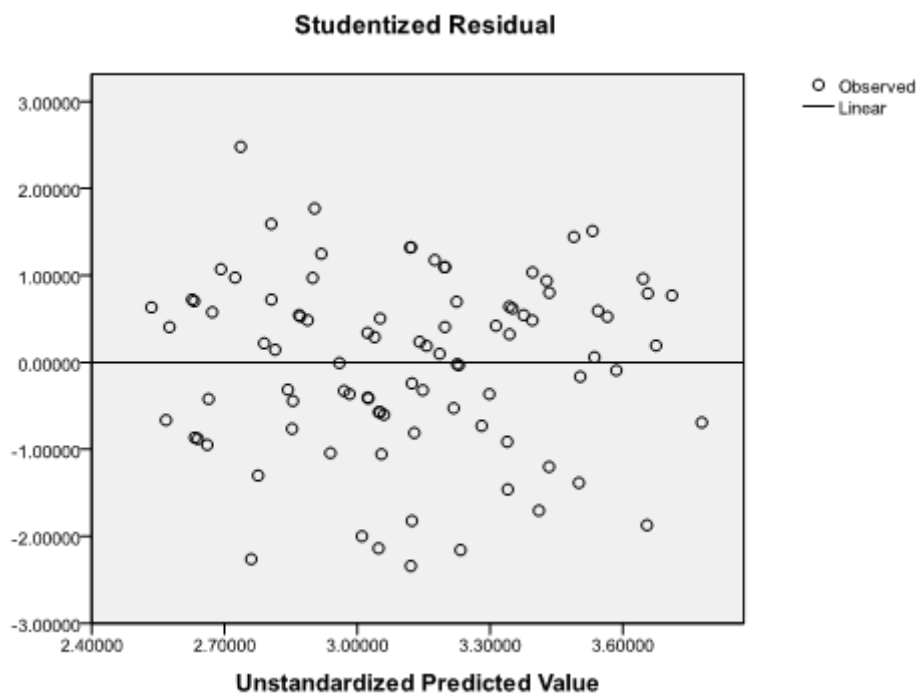
กราฟแผนวก ค.2 Normal P-P plot ของ standardized residual

3. ตรวจสอบความเป็นเชิงเส้นของสมการ



กราฟผนวก ค.3 Scatter plot ระหว่าง standardized residual กับขนาดยาที่ได้จากสมการ

4. ตรวจสอบความแปรปรวนของส่วนเหลือ



กราฟผนวก ค.4 Scatter plot ระหว่าง studentized residual กับขนาดยาที่ได้จากสมการ

5. ตรวจสอบค่าผิดปกติ (Outliers)

ตารางผนวก ก.3 แสดงค่าผิดปกติ (Outliers)

No.	Mahalanobis distance	Cook's distance	Leverage value
1	2.17262	0.00861	0.02414
2	3.10899	0.01428	0.03454
3	1.00284	0.00883	0.01114
4	2.40360	0.01092	0.02671
5	2.95676	0.00669	0.03285
6	5.73933	0.01273	0.06377
7	5.32519	0.01570	0.05917
8	1.00608	0.00075	0.01118
9	3.95268	0.00582	0.04392
10	3.00493	0.01075	0.03339
11	4.05443	0.00778	0.04505
12	3.48576	0.00215	0.03873
13	2.16358	0.01044	0.02404
14	3.89831	0.00142	0.04331
15	2.17980	0.00600	0.02422
16	2.57305	0.03421	0.02859
17	2.17516	0.00161	0.02417
18	1.95696	0.00000	0.02174
19	0.98243	0.00064	0.01092
20	1.50836	0.00765	0.01676
21	2.03143	0.00000	0.02257
22	3.67002	0.06238	0.04078
23	2.34077	0.00026	0.02601
24	1.52594	0.00296	0.01695

ตารางผนวก ก.3 แสดงค่าผิดปกติ (Outliers) (ต่อ)

No.	Mahalanobis distance	Cook's distance	Leverage value
26	1.69560	0.00296	0.01884
27	4.47006	0.00287	0.04967
28	1.43617	0.00074	0.01596
29	2.28050	0.00009	0.02534
30	1.82412	0.01547	0.02027
31	1.33944	0.00032	0.01488
32	3.52747	0.00432	0.03919
33	1.81550	0.00223	0.02017
34	2.23420	0.05091	0.02482
35	1.40326	0.00601	0.01559
36	4.80919	0.02484	0.05344
37	1.94856	0.00048	0.02165
38	2.26125	0.00001	0.02512
39	5.19732	0.02559	0.05775
40	1.66177	0.03032	0.01846
41	3.30969	0.02612	0.03677
42	2.84420	0.01952	0.03160
43	2.44011	0.00021	0.02711
44	3.14136	0.00004	0.03490
45	3.34259	0.01137	0.03714
46	2.57305	0.00060	0.02859
47	5.08098	0.00880	0.05646
48	1.08634	0.00193	0.01207
49	1.13283	0.01530	0.01259
50	4.41506	0.00275	0.04906

ตารางผนวก ก.3 แสดงค่าผิดปกติ (Outliers) (ต่อ)

No.	Mahalanobis distance	Cook's distance	Leverage value
51	5.15136	0.00873	0.05724
52	5.23975	0.02021	0.05822
53	3.92275	0.01080	0.04359
54	3.50882	0.02227	0.03899
55	4.53737	0.00483	0.05042
56	2.47963	0.00774	0.02755
57	2.49711	0.00281	0.02775
58	1.13599	0.00051	0.01262
59	4.79860	0.00176	0.05332
60	1.98648	0.00142	0.02207
61	1.43683	0.00362	0.01596
62	1.69515	0.00228	0.01884
63	3.79097	0.01689	0.04212
64	2.99403	0.02470	0.03327
65	1.49183	0.00094	0.01658
66	5.37549	0.00071	0.05973
67	1.98495	0.00310	0.02205
68	7.79845	0.01740	0.08665
69	2.51298	0.00106	0.02792
70	2.73379	0.00535	0.03038
71	2.09639	0.00296	0.02329
72	4.64983	0.00992	0.05166
73	3.37877	0.00449	0.03754
74	5.87065	0.05992	0.06523
75	1.50560	0.04386	0.01673

ตารางผนวก ก.3 แสดงค่าผิดปกติ (Outliers) (ต่อ)

No.	Mahalanobis distance	Cook's distance	Leverage value
76	3.67859	0.00603	0.04087
77	2.30489	0.00904	0.02561
78	1.16812	0.00100	0.01298
79	1.81683	0.04120	0.02019
80	1.88218	0.00030	0.02091
81	5.24850	0.00438	0.05832
82	2.57230	0.04794	0.02858
83	1.34264	0.00155	0.01492
84	3.40018	0.02931	0.03778
85	2.13551	0.00248	0.02373
86	12.41177	0.13703	0.13791
87	1.50250	0.00140	0.01669
88	4.44955	0.00855	0.04944
89	3.72520	0.04844	0.04139
90	1.77340	0.01383	0.01970
91	2.43823	0.00008	0.02709

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ – สกุล	นางสาวบุรฉกร ทรัพย์สุพรรณ
ที่อยู่	160/124-125 ถนนแสงชูโต ตำบลบ้านเหนือ อำเภอเมือง จังหวัดกาญจนบุรี
ที่ทำงาน	กลุ่มงานเภสัชกรรม โรงพยาบาลพหลพลพยุหเสนา จังหวัดกาญจนบุรี
ประวัติการศึกษา	
พ.ศ. 2549	สำเร็จการศึกษาเภสัชศาสตรบัณฑิต (เกียรตินิยมอันดับ 2) มหาวิทยาลัยศิลปากร
พ.ศ. 2553	สำเร็จการศึกษาระดับบริหารธุรกิจมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยขอนแก่น
พ.ศ. 2554	ศึกษาต่อเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาการทางเภสัชศาสตร์ ภาควิชาเภสัชวิทยาและพิษวิทยา มหาวิทยาลัยศิลปากร
ประวัติการทำงาน	
พ.ศ. 2549-2551	อาจารย์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร
พ.ศ. 2551-ปัจจุบัน	เภสัชกร กลุ่มงานเภสัชกรรม โรงพยาบาลพหลพลพยุหเสนา จังหวัดกาญจนบุรี