จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ทุนพัฒนาอาจารย์ใหม่/ นักวิจัยใหม่
กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานวิจัย

# การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมในยีน *CYP2C9, CYP2C19* และ *ABCB1* ร่วมกับความผันแปรที่ไม่ใช่พันธุกรรมกับขนาดยาเฟนิทอยน์ในผู้ป่วยโรคลมชักชาวไทย.

โดย

พรพิมล กิจสนาโยธิน

มิถุนายน 2557

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ทุนพัฒนาอาจารย์ใหม่/ นักวิจัยใหม่
กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานวิจัย

# การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมในยีน *CYP2C9, CYP2C19* และ *ABCB1* ร่วมกับความผันแปรที่ไม่ใช่พันธุกรรมกับขนาดยาเฟนิทอยน์ในผู้ป่วยโรคลมชักชาวไทย.

โดย

พรพิมล กิจสนาโยธิน

มิถุนายน 2557

## กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ รศ. ภญ. ดร.มยุรี ตันติสิระ อาจารย์อาวุโส ที่ได้ให้คำปรึกษา คำแนะนำ และความช่วยเหลือต่างๆในการเริ่มทำโครงการวิจัยในสาขาใหม่นี้

ขอขอบพระคุณ พ.อ. นพ. ดร.โยธิน ชินวลัญช์ และ นพ.ประพันธ์ ยอดนพเกล้าที่ได้ให้ความช่วยเหลือในการดำเนินการคัดเลือกกลุ่มตัวอย่างจากแผนกประสาทวิทยา โรงพยาบาลพระมงกุฎเกล้า และโรงพยาบาลสุรินทร์ เข้าสู่งานวิจัย

ขอขอบพระคุณกองทุนรัชดาภิเษกสมโภช (ทุนพัฒนาอาจารย์ใหม่/ นักวิจัยใหม่) และทุนวิจัยทางเภสัชศาสตร์ ที่ร่วมให้ทุนสนับสนุนการทำวิจัยนี้



เอกสารหมู่
เลขทะเบียน 018112
วัน. เดือน. ปี 6 ก.พ. 62

**ชื่อโครงการวิจัย** การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมในยีน *CYP2C9, CYP2C19* และ *ABCB1* ร่วมกับความผันแปรที่ไม่ใช่พันธุกรรมกับขนาดยาเฟนิทอยน์ในผู้ป่วยโรคลมชักชาวไทย.

**ชื่อผู้วิจัย** พรพิมล กิจสนาโยธิน

**เดือนและปีที่ทำวิจัยเสร็จ** มิถุนายน 2557

## บทคัดย่อ

ยาเฟนิทอยน์เป็นยากันชักที่มีประสิทธิภาพดีและมีราคาถูก แต่เนื่องจากยาเฟนิทอยน์มีช่วงของการรักษาแคบ จึงทำให้มีโอกาสเกิดอาการไม่พึงประสงค์ได้เมื่อระดับยาในเลือดสูงเกินช่วงของการรักษา หรือทำให้การรักษาไม่ได้ผลเมื่อระดับยาในเลือดต่ำกว่าช่วงของการรักษา และขนาดยาที่เหมาะสมในการควบคุมอาการชักในผู้ป่วยแต่ละรายก็มีความแตกต่างกัน ดังนั้นการศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความผันแปรทางพันธุกรรมในยีน *CYP2C9, CYP2C19* และ *ABCB1* ร่วมกับปัจจัยที่ไม่ใช่พันธุกรรมกับความผันแปรของขนาดยาเฟนิทอยน์ที่ใช้ ในผู้ป่วยโรคลมชักชาวไทย โดยผู้ป่วยโรคลมชักจำนวน 108 คนได้ถูกคัดเลือกเข้าสู่งานวิจัย โดยการเก็บข้อมูลทางคลินิกและตัวอย่างเลือดเพื่อตรวจลักษณะจีโนไทป์ของพหุสัณฐาน *CYP2C9*3, CYP2C19*2, CYP2C19*3* และ *ABCB1* C3435T จากนั้นวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างขนาดยาเฟนิทอยน์ที่ใช้กับปัจจัยทั้งที่เกี่ยวข้องและไม่เกี่ยวข้องกับพันธุกรรมโดยใช้สถิติ Stepwise multiple linear regression ผลจากการศึกษาพบว่า ความถี่อัลลีลของ *CYP2C9*3 CYP2C19*2 CYP2C19*3* และ *ABCB1* 3435T ในผู้ป่วยโรคลมชักชาวไทย มีค่าเท่ากับ 2.5% 26.7% 0.4% และ 43.8% ตามลำดับ และผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ด้วย สถิติ 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) ดังนั้นจากการศึกษานี้ได้แสดงให้เห็นว่า ความผันแปรทางพันธุกรรมของยีน *CYP2C19* และ *ABCB1* ร่วมกับ ปัจจัยที่ไม่ใช่พันธุกรรม ได้แก่ เพศ และการได้รับยาร่วมนั้นมีอิทธิพลต่อความผันแปรของขนาดยาที่ใช้ในผู้ป่วยโรคลมชักชาวไทย ซึ่งผลที่ได้จากการศึกษานี้อาจสามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานเพื่อช่วยให้การรักษาผู้ป่วยโรคลมชักมีประสิทธิภาพมากขึ้นต่อไป

Project Title ASSOCIATION OF *CYP2C9*, *CYP2C19* AND *ABCB1* AND NON- GENETIC VARIANTS WITH PHENYTOIN DOSES IN THAI PATIENTS WITH EPILEPSY

Name of the Investigator Pornpimol Kijsanayotin

Year June 2014


## Abstract

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 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 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). This study suggests that genetic variants in *CYP2C19* and *ABCB1* and non-genetic variants including gender and co-medication influence variability in phenytoin doses in Thai patients with epilepsy. This finding could be to use to determine the efficacy of phenytoin in the treatment of epileptic patients.

# สารบัญ


| | หน้า |
|---|---|
| กิตติกรรมประกาศ | i |
| บทคัดย่อภาษาไทย | ii |
| บทคัดย่อภาษาอังกฤษ | iii |
| สารบัญ | iv |
| สารบัญตาราง | v |
| สารบัญภาพ | vi |
| คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ | vii |
| บทนำ | 1 |
| เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง | 5 |
| วิธีดำเนินการวิจัย | 15 |
| ผลการวิจัย | 21 |
| อภิปรายผลและสรุปผลการวิจัย | 29 |
| เอกสารอ้างอิง | 34 |
| ภาคผนวก | 43 |

# สารบัญตาราง


| ตารางที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| 1 | แสดงส่วนประกอบในปฏิกิริยา PCR การตรวจลักษณะ genotype ของยีน..... | 18 |
| 2 | แสดงปริมาณของแต่ละส่วนประกอบในแต่ละ reaction mixture..... | 19 |
| 3 | แสดงค่าอุณหภูมิและระยะเวลาของแต่ละขั้นตอนในการทำ PCR..... | 20 |
| 4 | แสดงข้อมูลทั่วไปและข้อมูลทางคลินิกของผู้ป่วย..... | 22 |
| 5 | แสดงร้อยละของรายการยากันชักอื่นๆที่ผู้ป่วยได้รับร่วมกับยาเฟนิทอยน์และระดับนัยสำคัญทางคลินิกของการเกิดอันตรกิริยาระหว่างยา | 23 |
| 6 | แสดงความถี่อัลลีลของcandidate SNPs ในยีน *CYP2C9 CYP2C19* และ *ABCB1*..... | 24 |
| 7 | แสดงความถี่ของ genotype ของของ candidate SNPs ในยีน *CYP2C9 CYP2C19* และ *ABCB1*..... | 25 |
| 8 | แสดงโมเดลความสัมพันธ์ระหว่างขนาดยาเฟนิทอยน์ที่ผู้ป่วยได้รับกับตัวแปรต่างๆ..... | 27 |
| 9 | แสดงค่าสัมประสิทธิ์ความถดถอยของตัวแปรต่างๆในโมเดลที่สามารถอธิบายความผันแปรของขนาดยาเฟนิทอยน์ที่ผู้ป่วยได้รับ..... | 28 |

# สารบัญภาพ


| ภาพที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| 1 | สูตรโครงสร้างของเฟนิทอยน์..... | 6 |

# 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 |
| mean ± SD. | ค่าเฉลี่ยบวกลบส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน |
| มก./วัน | มิลลิกรัมต่อวัน |
| $\chi^2$ | ไคสแควร์ |
| d.f. | Degree of freedom |

# บทนำ

โรคลมชักเป็นสาเหตุสำคัญของความทุพลภาพและเป็นภาระโรค (disease burden)ของโลก โดยเฉพาะในประเทศกำลังพัฒนาที่มีอัตราการให้การรักษาแก่ผู้ป่วยโรคลมชักต่ำ (Chisholm, 2005) การเกิดอาการชักในโรคลมชักนั้นไม่เพียงมีผลเสียต่อสมอง ร่างกายและเกิดความพิการทางด้านจิตใจของผู้ป่วย แต่ยังทำให้เกิดภาระทางสังคมและเศรษฐกิจโดยรวม (social and economic burdens)เนื่องจากการเสียชีวิตก่อนวัยอันควรและการสูญเสียความสามารถในการทำงาน

ในปัจจุบัน วิธีการหลักในการรักษาโรคลมชักคือการรักษาโดยการใช้ยากันชัก โดยมีเป้าหมายสูงสุดของการรักษา คือ การที่ผู้ป่วยไม่มีอาการชักอีกเลย (seizure free) และไม่มีอาการข้างเคียงจากยา โดยมุ่งหวังให้ผู้ป่วยมีคุณภาพชีวิตที่ดีที่สุด แต่เป้าหมายนี้ยังยากที่จะบรรลุได้ เนื่องจากพบว่ามีความผันแปรในการตอบสนองต่อยาของผู้ป่วยสูง โดยพบว่ามากกว่าร้อยละ 30 ของผู้ป่วยจะไม่สามารถควบคุมอาการชักได้แม้จะได้รับยากันชักที่เหมาะสมแล้ว (Cockerell *et al.*, 1997; Kwan *et al.*, 2000) นอกจากนี้ขนาดยาที่ใช้ในการควบคุมอาการของผู้ป่วยแต่ละรายก็แตกต่างกันทำให้ต้องใช้เวลานานในการปรับขนาดยาให้ผู้ป่วย และมีผู้ป่วยจำนวนหนึ่งเกิดอาการไม่พึงประสงค์จากการใช้ยา

ยาเฟนิทอยน์ (phenytoin PHT) เป็นยากันชักที่มีประสิทธิผลสูงและมีราคาถูก (most cost-effective) สำหรับการรักษาโรคลมชักในประเทศกำลังพัฒนา(Chisholm, 2005) โดยยาเฟนิทอยน์ จัดเป็นยาเลือกอันดับแรกในการรักษา (first line drug)โรคลมชักชนิด generalized tonic-clonic seizure และ complex partial seizure แต่ปัญหาที่เกิดจากการใช้ยาเฟนิทอยน์ ก็คือ การควบคุมโรคลมชักโดยใช้ยาเฟนิทอยน์ นั้นทำได้ค่อนข้างยาก และต้องใช้ระยะเวลานานในการปรับขนาดยาที่เหมาะสมในการควบคุมอาการชักโดยไม่เกิดอาการไม่พึงประสงค์จากยา เนื่องจากยาเฟนิทอยน์ มีช่วงในการรักษา(therapeutic range) แคบ และผู้ป่วยมีการตอบสนองต่อยาแตกต่างกันมาก

ความแตกต่างในการตอบสนองต่อยาเป็นลักษณะเฉพาะ (trait) ที่เชื่อว่าเกิดจากความแตกต่างของปัจจัยทางพันธุกรรม (genetic factors) ร่วมกับปัจจัยที่ไม่ใช่พันธุกรรม (non-genetic factors) (Roden *et al.*, 2002) ปัจจัยทางพันธุกรรมที่สำคัญได้แก่ความแปรปรวนทางพันุกรรม (genetic variants) ที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการทำงานของโปรตีนที่เกี่ยวข้องในกระบวนการทางเภสัชจลนศาสตร์ (pharmacokinetic) และเภสัชพลศาสตร์ (pharmacodynamic) ของยานั้นๆ ตั้งแต่กระบวนการดูดซึมยา (absorption), การกระจายยา (distribution), การเมตาบอลิสม (metabolism), การออกฤทธิ์ที่ตำแหน่งเป้าหมายของยา (target) ตลอดจนการกำจัดยาออกจากร่างกาย (elimination)(Rogers *et al.*, 2002; Romphruk *et al.*, 2003) ส่วนปัจจัยที่ไม่ใช่พันธุกรรม ได้แก่ ลักษณะทางกายภาพของผู้ป่วย พยาธิสภาพของโรค ตลอดจนอันตรกิริยาระหว่างยาที่ได้รับร่วมกัน (drug interactions)

ยาเฟนิทอยน์ ส่วนใหญ่ถูกเปลี่ยนแปลงในร่างกายโดยเอนไซม์ CYP2C9(Fritz *et al.*, 1987) และ CYP2C19(Depondt *et al.*, 2006) ได้เมตาบอไลต์ที่หมดฤทธิ์ และยังเป็น substrate ตัวหนึ่งของตัวขนส่งยา (drug transporter) P-glycoprotein (P-gp) (Luna-Torts *et al.*, 2008) ซึ่งล้วนพบมีความแปรปรวนทางพันธุกรรมสูงและอาจส่งผลให้เกิดความผิดปกติในการทำงานของโปรตีน เช่น การเกิด single nucleotide polymorphism (SNPs) ในยีน *CYP2C9* ได้แก่ *CYP2C9*2* และ *CYP2C9*3* (Xie *et al.*, 2002) มีผลให้เกิดเอนไซม์ที่มีประสิทธิภาพในการเปลี่ยนแปลงยาลดลง 29%(Rettie *et al.*, 1999; Rettie *et al.*, 1994) และ 93-95%(Rettie *et al.*, 1999; Sullivan-Klose *et al.*, 1996; Takanashi *et al.*, 2000) ตามลำดับ ส่วน SNPs ที่พบได้บ่อยของยีน *CYP2C19* คือ *CYP2C19*2* และ *CYP2C19*3* มีผลทำให้ได้เอนไซม์ที่ไม่มีประสิทธิภาพในการเปลี่ยนแปลงยา (inactive enzyme)(De Morais *et al.*, 1994a) (De Morais *et al.*, 1994b) ส่งผลให้มีปริมาณยา phenytoin ในร่างกายที่สามารถออกฤทธิ์ได้เปลี่ยนแปลงไป

นอกจากนี้กระบวนการดูดซึมยาจากทางเดินอาหารและการกระจายยา ก็เป็นกระบวนการที่มีผลต่อระดับยาในเลือดและในบริเวณเป้าหมายของการออกฤทธิ์ของยา (drug target) ซึ่งนอกจากคุณสมบัติทางเคมีฟิสิกส์ของยาจะเป็นปัจจัยที่สำคัญต่อการดูดซึมยาเข้าสู่กระแสเลือดและแพร่กระจายยาแล้ว ยังพบว่ามี drug efflux transporters หลายชนิดทำหน้าที่ขับยาออกนอก

เซลล์ โดยพบว่าตัวขนส่งยาชนิดหนึ่งที่สำคัญและมีความเกี่ยวข้องกับการดื้อยาหลายชนิดคือ P-glycoprotein (P-gp)(Fromm, 2002) (Gottesman, 2002) ซึ่งพบมีการแสดงออกที่เนื้อเยื่อของอวัยวะต่างๆเช่น ลำไส้เล็ก และ blood-brain barrier (Biedler *et al.*, 1989; Fromm, 2004) โดยมีรายงานพบว่า SNP ตัวหนึ่งของยีน ATP-binding cassette subfamily B member 1 (*ABCB1)* ที่ถ่ายทอด P-gp คือ *ABCB1* C3435T เป็น variant ที่มีรายงานพบว่ามีความสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกและการทำหน้าที่ของ P-gp ของมนุษย์(Hoffmeyer *et al.*, 2000) (Kimchi-Sarfaty *et al.*, 2007) ดังนั้นหากมีการแสดงออกเกินของ P-gp (over expression) หรือการทำงานผิดปกติของ P-gp ในบริเวณทางเดินอาหารก็จะส่งผลให้ยาถูกดูดซึมได้ลดลง ในทำนองเดียวกันการแสดงออกเกินและการทำงานผิดปกติของ P-gp ที่บริเวณ blood-brain barrier ก็จะเป็นการจำกัดการแพร่กระจายของยาเข้าสู่สมองโดยการขับยากลับออกจากสมอง ซึ่งจะส่งผลให้เกิดการจำกัดการออกฤทธิ์ของยากันชักที่มีเป้าหมายอยู่ในสมองและอาจเป็นสาเหตุหนึ่งของการดื้อต่อยา หรือความแตกต่างของผู้ป่วยในการตอบสนองต่อยากันชัก

นอกจากนี้ความถี่ของความแปรปรวนทางพันธุกรรม (frequencies of genetic variants) ซึ่งพบแตกต่างกันไปตามเชื้อชาติหรือภูมิลำเนาของประชากรก็อาจส่งผลให้มีการตอบสนองต่อยาของประชากรแตกต่างกัน (Xie *et al.*, 2002)

นอกจากปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับพันธุกรรมแล้ว ยังพบว่าปัจจัยที่ไม่เกี่ยวข้องกับพันธุกรรมก็สามารถส่งผลกระทบต่อขนาดยา และระดับยาเฟนิทอยน์ในเลือด หรือการตอบสนองต่อยาได้ เช่น ลักษณะทางกายภาพของผู้ป่วย พยาธิสภาพของโรคลมชัก และการเกิดอันตรกิริยาระหว่างยา (drug interactions) โดยทั่วไปแล้วผู้ป่วยโรคลมชักที่รักษาด้วยยาเฟนิทอยน์ มักจะได้รับยาอื่นๆ ร่วมด้วยเสมอ ซึ่งอาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงปริมาณยาเฟนิทอยน์ ในร่างกายหรือการออกฤทธิ์ของยาเฟนิทอยน์ได้

ด้วยเหตุที่แพทย์ยังคงไม่สามารถคาดเดาการตอบสนองต่อยาเฟนิทอยน์ ของผู้ป่วยแต่ละรายได้ การรักษาโรคลมชักด้วยยาเฟนิทอยน์ ในปัจจุบันจึงยังคงใช้วิธีการลองผิดลองถูก (trial and error) ดังนั้นความสามารถในการพยากรณ์ (predict) การตอบสนองต่อยาหรือขนาดยาที่เหมาะสมของผู้ป่วยแต่ละรายได้ล่วงหน้า ย่อมสามารถช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษาด้วย

ยาเฟนิทอยน์ โดยการลดความเสี่ยงในการได้รับยาที่ไม่เหมาะสมกับผู้ป่วย และลดการเกิดอาการไม่พึงประสงค์จากยาได้

ดังนั้นการวิจัยทางเภสัชพันธุศาสตร์นี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อที่จะศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความแปรปรวนทางพันธุกรรมร่วมกับปัจจัยที่ไม่ใช่พันธุกรรมกับความผันแปรของขนาดยาเฟนิทอยน์ ในผู้ป่วยโรคลมชักชาวไทย และหาแบบจำลอง (model) ที่ใช้ปัจจัยทางพันธุกรรมร่วมกับปัจจัยที่ไม่ใช่พันธุกรรมในการอธิบายและพยากรณ์ขนาดยาเฟนิทอยน์ ของผู้ป่วย ซึ่งจะมีประโยชน์ในการนำไปประยุกต์ใช้ในทางคลินิกต่อไป โดยใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการพิจารณาเลือกใช้หรือปรับขนาดยา phenytoin ที่เหมาะสมสำหรับผู้ป่วยแต่ละราย เพื่อให้การใช้ยา phenytoin เกิดประโยชน์สูงสุดต่อผู้ป่วย

# เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

## 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)

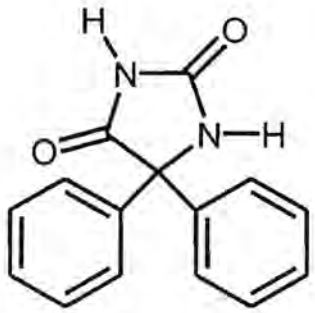
ในปัจจุบัน วิธีการหลักในการรักษาโรคลมชักคือการรักษาโดยการใช้ยากันชัก ซึ่งพบว่าผู้ป่วยกว่าร้อยละ 70 สามารถควบคุมอาการชักได้ด้วยยากันชัก แต่พบว่าผู้ป่วยอีกประมาณร้อยละ 30 ไม่สามารถควบคุมอาการได้ ทั้งที่ได้รับการรักษาด้วยยากันชักที่เหมาะสมแล้วก็ตาม นอกจากนี้ยังมีผู้ป่วยอีกส่วนหนึ่งที่เกิดอาการไม่พึงประสงค์จากการใช้ยา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

ทั้งนี้มีปัจจัยหลายอย่างที่ทำให้ผู้ป่วยแต่ละรายมีการตอบสนองต่อการรักษาด้วยยาที่แตกต่างกัน โดยสามารถแบ่งออกได้เป็นปัจจัยที่ไม่เกี่ยวข้องกับลักษณะทางพันธุกรรม (non-genetic factors) ซึ่งได้แก่ เพศ อายุ น้ำหนักตัว การเกิดอันตรกิริยาจากยาอื่นๆที่ใช้ร่วมกัน (drug interaction) เป็นต้น และปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับลักษณะทางพันธุกรรม (genetic factors) ที่ส่งผล

ต่อกระบวนการทางเภสัชจลนศาสตร์ และเภสัชพลศาสตร์ของยาในร่างกาย ตั้งแต่กระบวนการดูดซึมยา (absorption) การกระจายยา (distribution) การเมแทบอลิซึม (metabolism) การออกฤทธิ์ที่ตำแหน่งเป้าหมายของยา (target) ตลอดจนการกำจัดยาออกจากร่างกาย (elimination) (Balant et al., 1989)

**ยาเฟนิทอยน์** (Phenytoin; PHT)

ยาเฟนิทอยน์ (Diphenylhydantoin) มีสูตรโครงสร้างทางเคมีเป็น 5,5-diphenyl-2,4-imidazolidinedione ดังแสดงในรูปที่ 1 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 ทำให้กดการเกิด depolarization ของเซลล์ประสาทที่มีความถี่ในการส่งกระแสประสาทมาก ส่วนเซลล์ที่มีความถี่ในการส่งกระแสประสาทน้อยจะได้รับผลจากยาน้อย (use dependent activity) (Macdonald, 1999)

**คุณสมบัติทางเภสัชจลนศาสตร์ของยาเฟนิทอยน์**

ยาเฟนิทอยน์ถูกดูดซึมจากทางเดินอาหารได้ช้า แต่ดูดซึมได้เกือบสมบูรณ์ (bioavailability = 95%) นอกจากนี้ยาเฟนิทอยน์ยังสามารถจับกับโปรตีน ได้มากกว่าร้อยละ 90 โดยส่วนใหญ่จะจับกับโปรตีนอัลบูมิน (Winter and Tozer, 2006) ยาเฟนิทอยน์ถูกเปลี่ยนแปลงในร่างกายได้โดยเอนไซม์ CYP2C9 เป็นหลัก (ประมาณร้อยละ 90) และอีกส่วนหนึ่งสามารถถูกเปลี่ยนแปลงได้โดยเอนไซม์ CYP2C19 (ประมาณร้อยละ 10) (Bajpai et al., 1996) โดยผ่านกระบวนการ parahydroxylation ได้เมแทบอไลท์ตัวหลัก คือ 5-(4-hydroxyphenyl)-5-phenylhydantoin (p-HPPH) ที่ไม่มีฤทธิ์ในการรักษา (Brown, 1994; Butler, 1957) นอกจากนี้ยาเฟนิทอยน์ยังเป็น substrate ตัวหนึ่งของตัวขนส่งยา P-glycoprotein (P-gp) (Potschka and Löscher, 2001)

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 และใช้ระยะเวลานานกว่าจะได้ขนาดยาที่เหมาะสมที่สามารถควบคุมอาการชักได้ โดยไม่เกิดอาการไม่พึงประสงค์จากยา และขนาดยาที่เหมาะสมในผู้ป่วยแต่ละรายค่อนข้างแตกต่างกันมาก (Tate et al., 2005)

**ปัจจัยที่มีความเกี่ยวข้องกับขนาดยาและระดับยาเฟนิทอยน์ในเลือด**

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

**การเกิด polymorphisms ของยีน *CYP2C9***

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

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* ในประชากรเชื้อชาติต่างๆนั้นจะมีความแตกต่างกันออกไป โดยพบว่าในประชากรชาวไทยและชาวเอเชียอื่นๆ เช่น จีน ญี่ปุ่น และเกาหลีนั้น จะไม่พบ *CYP2C9*2* ส่วนในชาวคอเคเซียนนั้นจะพบ *CYP2C9*2* ในความถี่ที่ค่อนข้างแตกต่างกันอย่างมากในแต่ละเชื้อชาติ ในส่วนของ *CYP2C9*3* นั้นพบว่าในชาวเอเชีย และชาวผิวดำนั้นมีความถี่ที่ใกล้เคียงกัน แต่จะค่อนข้างต่ำกว่าชาวคอเคเซียน

ในการศึกษาของ 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 ของประชากรจีนที่คำนวณได้จากการศึกษานี้ 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

**การเกิด polymorphisms ของยีน *CYP2C19***

*CYP2C19* เป็นยีนที่ควบคุมการแสดงออกของเอนไซม์ CYP2C19 ซึ่งเป็นโปรตีนที่ประกอบไปด้วยกรดอะมิโนจำนวน 490 ตัว โดยยีน *CYP2C19* เป็นส่วนหนึ่งของยีนกลุ่ม *CYP2C* ซึ่งอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 10 เช่นเดียวกับยีน *CYP2C9* 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) ส่งผลให้เกิดความบกพร่องในการเชื่อมต่อของ 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 โดยในชาวไทยและชาวเอเชียอื่นๆนั้นจะมีความถี่ของทั้ง *CYP2C19*2* และ *CYP2C19*3* สูงกว่าชาวผิวดำและชาวผิวขาว

ถึงแม้ว่าเอนไซม์ CYP2C19 จะมีบทบาทรองในการแปรสภาพยาเฟนิทอยน์ แต่เนื่องจากลักษณะทางเภสัชจลนศาสตร์ของยาเฟนิทอยน์ที่มีการอิ่มตัวของการแปรสภาพยา ดังนั้นเมื่อมีการใช้ยาในขนาดที่สูงขึ้น เอนไซม์ CYP2C9 จะเกิดการอิ่มตัว ทำให้ CYP2C19 มีบทบาทเพิ่มมากขึ้น (Bajpai et al., 1996; Yukawa and Mamiya, 2006) ดังนั้นในความเข้มข้นขนาดสูงของเฟนิทอยน์หากผู้ป่วยมี functional variants ของ *CYP2C19* ก็จะมีผลกระทบต่อการแปรสภาพยาได้อย่างมาก เนื่องจากเอนไซม์ที่เกิดจาก variants ดังกล่าวนั้นเป็นเอนไซม์ที่ไม่มีประสิทธิภาพในการเปลี่ยนแปลงยา ทำให้มีโอกาสที่ระดับยาในเลือดสูงเกินช่วงของการรักษา และเกิดพิษจากยาขึ้นมาได้

Watanabe และคณะ (1998) ได้ทำการศึกษาในผู้ป่วยโรคลมชักชาวญี่ปุ่นจำนวน 16 คน เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะ genotype ของ *CYP2C19* และค่าพารามิเตอร์ทางเภสัชจลนศาสตร์ของยาเฟนิทอยน์ ซึ่งผู้วิจัยพบว่าในผู้ป่วยที่มีอัลลีล *CYP2C19*3* จะมีค่า $V_{max}$ ต่ำกว่าผู้ป่วยที่ไม่มีอัลลีลดังกล่าวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จึงอาจเป็นไปได้ว่าอัลลีล *CYP2C19*3* อาจจะเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลทำให้มีการเปลี่ยนแปลงยาเฟนิทอยน์ได้ช้าลง

**การเกิด polymorphisms ของยีน *ABCB1***

กระบวนการดูดซึมยาจากทางเดินอาหาร เป็นอีกกระบวนการหนึ่งที่มีผลต่อระดับยาในเลือด ซึ่งนอกจากคุณสมบัติทางเคมีฟิสิกส์ของยาจะเป็นปัจจัยที่สำคัญที่มีผลต่อการดูดซึมยาเข้าสู่กระแสเลือดแล้ว ยังพบว่า มี drug efflux transporter ในบริเวณทางเดินอาหารที่เป็นตัวจำกัดการดูดซึมของยา โดยผ่านกระบวนการขับยากลับออกไปสู่ทางเดินอาหาร ส่งผลให้ยาถูกดูดซึมได้ลดลง โดยปกติในร่างกายจะมี drug efflux transporter หลายชนิดที่มีการแสดงออกอยู่ที่เซลล์เยื่อบุทางเดินอาหาร 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 ตัวแรกที่มีรายงานว่ามีความสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกและการทำหน้าที่ของ 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) พบว่าในกลุ่มอาสมัครชาวตุรกีที่มีระดับยาเฟนิทอยน์ในเลือดต่ำจะสัมพันธ์กับ 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* ในหลายการศึกษาที่ผ่านมานั้น พบว่าในกลุ่มประชากรที่แตกต่างกันจะได้ผลการศึกษาที่แตกต่างกัน เช่น ในชาวคอเคเซียน (Siddiqui et al., 2003; Soranzo et al., 2004) กับชาวเอเชีย (Kwan et al., 2007) นั้นจะได้ผลในทางตรงข้ามกัน ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องทำการศึกษาในกลุ่มเชื้อชาติต่างๆ เพื่อหาปัจจัยที่อาจอธิบายถึงความแตกต่างดังกล่าว

**ความแตกต่างของผู้ป่วยแต่ละรายในด้านอายุ เพศ และน้ำหนักตัว**

**- อายุ**

อายุที่มากขึ้นมีความสัมพันธ์กับปัจจัยหลายอย่าง เช่น การทำงานที่ผิดปกติไปของระบบทางเดินอาหาร การลดลงของระดับอัลบูมินในเลือด และความสามารถในการทำงานของตับก็ลดลง ซึ่งปัจจัยต่างๆเหล่านี้สามารถที่จะส่งผลกระทบต่อกระบวนการทางเภสัชจลนศาสตร์ของยาได้ (Bachmann et al., 1999; Cusack, 2004)

**- น้ำหนักตัว**

เนื่องจากน้ำหนักตัวมีความสัมพันธ์โดยตรงกับปริมาตรการกระจายยา (Vd) ดังนั้นระดับความเข้มข้นของยาในเลือดจึงมีความสัมพันธ์ในทิศทางตรงกันข้ามกับน้ำหนักตัวของผู้ป่วย โดยจากการศึกษาของ Houton และคณะ (1975) พบว่าระดับยาเฟนิทอยน์ในเลือดนั้นจะลดลงเมื่อน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้น แต่ทั้งนี้ในบางการศึกษา (Lascelles et al., 1970; Lund, 1973 cited in

Houton et al.,1975) พบว่าแม้จะมีการปรับขนาดยาด้วยน้ำหนักตัวแล้ว ก็ยังคงพบว่าระดับยาเฟนิทอยน์ในเลือดยังมีความแตกต่างกันอย่างมาก ซึ่งแสดงให้เห็นว่ายังมีปัจจัยอื่นๆอีกมากมายที่มีผลต่อระดับยาเฟนิทอยน์ในเลือด

**- เพศ**

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

**การเกิดอันตรกิริยาระหว่างยา**

โรคลมชักเป็นโรคที่มีความผิดปกติของระบบประสาทอย่างหนึ่งที่จำเป็นต้องได้รับการรักษาด้วยยาเป็นระยะเวลานาน และผู้ป่วยบางส่วนที่ไม่สามารถควบคุมอาการชักได้ด้วยยากันชักเพียงตัวเดียว ก็มีความจำเป็นที่จะต้องได้รับยากันชักตัวอื่นๆร่วมด้วย นอกจากนี้ผู้ป่วยส่วนหนึ่งมักมีโรคประจำตัวอื่นๆที่มีความจำเป็นต้องได้รับยาเพื่อรักษาโรคอื่นๆร่วมด้วย ดังนั้นจากการที่ผู้ป่วยได้รับยาในการรักษามากกว่าหนึ่งตัว จึงทำให้มีโอกาสที่จะเกิดอันตรกิริยาระหว่างยาดังกล่าวได้ และอาจส่งผลให้เกิดอาการไม่พึงประสงค์จากยา หรือทำให้การรักษาไม่ได้ผล

เนื่องจากกลไกการเกิดอันตรกิริยาสามารถเกิดได้ 2 กลไกหลัก คือ อันตรกิริยาทางเภสัชจลนศาสตร์และเภสัชพลศาสตร์ ซึ่งผลจากการเกิดอันตรกิริยาทางเภสัชจลนศาสตร์นั้น อาจทำให้มีการเปลี่ยนแปลงระดับความเข้มข้นของยาในเลือดได้ (Díaz et al., 2008) และจากคุณสมบัติของยาเฟนิทอยน์ที่มีการอิ่มตัวในการแปรสภาพยา ดังนั้นการใช้ยาอื่นๆที่ถูกเปลี่ยนแปลงได้โดยเอนไซม์ CYP2C9 และ CYP2C19 เช่นเดียวกับยาเฟนิทอยน์ ก็สามารถส่งผลยับยั้งการเมแทบอลิซึมของยาเฟนิทอยน์ แล้วส่งผลให้ระดับยาในเลือดสูงขึ้นได้ นอกจากนี้การใช้ยาเฟนิทอยน์ร่วมกับยาอื่นๆที่สามารถเหนี่ยวนำ หรือยับยั้งเอนไซม์ CYP2C9 และ CYP2C19 ได้ ก็สามารถส่งผลต่อระดับยาเฟนิทอยน์ในเลือดได้อีกเช่นเดียวกัน (McNamara, 2006)

ถึงแม้ว่าโดยทั่วไปแล้วผู้ป่วยโรคลมชักที่รักษาด้วยยาเฟนิทอยน์มักจะได้รับยาอื่นๆร่วมด้วยเสมอ ซึ่งอาจเป็นยาที่สามารถเกิดอันตรกิริยากับยาเฟนิทอยน์ได้ แล้วส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพในการรักษาผู้ป่วย แต่ในหลายการศึกษาที่ผ่านมานั้นไม่ได้นำเอาอิทธิพลของการเกิดอันตรกิริยาระหว่างยาเข้ามาร่วมในการศึกษาด้วย จนกระทั่ง Lee และคณะ (2007) ได้ทำการศึกษาความสัมพันธ์ของลักษณะทางพันธุกรรมของเอนไซม์ CYP2C9 และ CYP2C19 และการเกิดอันตรกิริยาระหว่างยา กับระดับยาเฟนิทอยน์ในเลือดของผู้ป่วยโรคลมชักชาวเกาหลี พบว่าลักษณะทางพันธุกรรมของเอนไซม์ CYP2C9 และ CYP2C19 และขนาดยาเฟนิทอยน์ที่ผู้ป่วยได้รับเป็นตัวแปรที่มีนัยสำคัญในการอธิบายความผันแปรของระดับยาในเลือด โดยสามารถอธิบายได้ร้อยละ 39.6 ของความผันแปรของระดับยาในเลือดทั้งหมด และพบว่ากลุ่มผู้ป่วยที่ได้รับยาอื่นๆร่วมไปกับยาเฟนิทอยน์นั้น จะมีความแปรปรวนของค่า $V_{max}$ ทั้งภายในกลุ่ม genotype เดียวกัน และระหว่างกลุ่มที่มี genotype ต่างกัน ซึ่งอิทธิพลจากการได้รับยาอื่นร่วมด้วยนั้นอาจจะไปบดบังอิทธิพลของ genetic polymorphisms ของ *CYP2C19* ได้ โดยเมื่อวิเคราะห์ในกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่ได้รับยาอื่นร่วมด้วย (monotherapy) ก็สามารถเห็นอิทธิพลของ *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 แต่จากการศึกษาที่ผ่านมานั้นยังไม่ได้มีการศึกษาร่วมกันระหว่างปัจจัยทางพันธุกรรมของยีน *CYP2C9*, *CYP2C19* และ *ABCB1* กับปัจจัยที่ไม่ใช่พันธุกรรม ซึ่งได้แก่ การเกิดอันตรกิริยาระหว่างยาเฟนิทอยน์กับยาอื่นๆที่ผู้ป่วยได้รับร่วมกัน และเนื่องจากเชื้อชาติที่แตกต่างกันก็จะมีการแสดงออกของลักษณะทางพันธุกรรมของยีน *CYP2C9*, *CYP2C19* และ *ABCB1* ที่แตกต่างกันไป ดังนั้นในการศึกษานี้ผู้วิจัยจึงต้องการที่จะศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความผันแปรทางพันธุกรรมของยีน *CYP2C9*, *CYP2C19* และ *ABCB1* ร่วมกับอิทธิพลของปัจจัยที่ไม่ใช่พันธุกรรม ซึ่งได้แก่ การเกิดอันตรกิริยาระหว่างยา รวมถึงลักษณะทั่วไปของผู้ป่วยได้แก่ เพศ อายุ และน้ำหนักตัว ต่อขนาดยาที่ใช้ในผู้ป่วยโรคลมชักชาวไทย ซึ่งยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน และหาแบบจำลองเพื่ออธิบายความผันแปร

ของขนาดยาเฟนิทอยน์ที่ใช้ในผู้ป่วยโรคลมชักชาวไทย ซึ่งอาจช่วยในการทำนายขนาดยาเฟนิทอยน์ที่เหมาะสมในผู้ป่วยแต่ละรายก่อนได้รับยา

# วิธีดำเนินการวิจัย

## ลักษณะตัวอย่างหรือประชากรที่ทำการศึกษา

**ประชากรเป้าหมาย** คือ ผู้ป่วยโรคลมชักเพศชายและเพศหญิงชาวไทยที่เข้ารับการรักษาที่แผนกผู้ป่วยนอก คลินิกประสาทวิทยา ในโรงพยาบาล 2 แห่ง ได้แก่ โรงพยาบาลพระมงกุฎเกล้า ถนนราชวิถี เขตราชเทวี กรุงเทพฯ และโรงพยาบาลสุรินทร์ จังหวัดสุรินทร์

**การเลือกตัวอย่าง**

คัดเลือกตัวอย่างผู้ป่วยเข้าร่วมงานวิจัยตามเกณฑ์การคัดเลือกผู้ป่วยเข้า (Inclusion criteria) ดังนี้คือ

- เป็นผู้ป่วยที่มีอายุตั้งแต่ 15 ปีขึ้นไป
- เป็นผู้ป่วยที่ได้รับยาเฟนิทอยน์ในขนาดเดิมติดต่อกันเป็นระยะเวลาอย่างน้อย 2 เดือนก่อนเข้าสู่การวิจัย และหากผู้ป่วยมีการใช้ยาอื่นๆร่วมด้วยจะต้องมีชนิดของยา และขนาดของยาอื่นๆที่ใช้ร่วมนั้นคงที่ภายในระยะเวลา 2 เดือนก่อนเข้าสู่การวิจัย

ผู้ป่วยจะถูกคัดออกจากการวิจัยหากมีลักษณะเข้าตามเกณฑ์การคัดเลือกกลุ่มตัวอย่างออก (Exclusion criteria) ดังนี้คือ

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

ประเมินความร่วมมือในการรับประทานยา (Compliance) โดยการให้ผู้ป่วยหรือญาติบันทึกประวัติการรับประทานยาลงในปฏิทินบันทึกการรับประทานยา ร่วมกับการสัมภาษณ์ผู้ป่วยหรือญาติผู้ดูแล

การพิจารณาว่าผู้ป่วยให้ความร่วมมือในการรับประทานยาดี คือ ผู้ป่วยไม่มีการลืมทานยาเลยภายในระยะเวลา 1 เดือนก่อนนัดมาเจาะเลือด

การพิจารณาว่าผู้ป่วยไม่ให้ความร่วมมือในการรับประทานยา คือ มีการลืมทานยาตั้งแต่ 1 ครั้งขึ้นไปภายในระยะเวลา1 เดือนก่อนนัดมาเจาะเลือด

**ขนาดตัวอย่าง**

การคำนวณขนาดตัวอย่างที่ใช้สำหรับการวิเคราะห์ข้อมูลแบบ Multiple Linear Regression จะใช้หลักเกณฑ์ Rule of Thumb (Tabachnic and Fidell, 2007) โดยมีข้อตกลงเบื้องต้นว่า 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 รวมตัวแปรอิสระที่จะนำเข้าสมการทั้งหมดเท่ากับ 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

**วิธีการดำเนินการวิจัย**

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

1. การเก็บข้อมูลทั่วไปของผู้ป่วย

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

2. การเก็บตัวอย่างเลือด

หลังจากผู้ป่วยหรือผู้แทนโดยชอบธรรมลงลายมือชื่อยินยอมเข้าร่วมการวิจัย จะทำการเก็บตัวอย่างเลือดจากเส้นเลือดดำบริเวณแขนของผู้ป่วยแต่ละราย ประมาณ 10 มิลลิลิตรใส่ใน EDTA tube เพื่อนำใช้ในการสกัด DNA และตรวจลักษณะ Genotype

3. การเตรียมตัวอย่าง DNA

นำตัวอย่างเลือดที่อยู่ใน EDTA tube มาปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ที่ควบคุมอุณหภูมิได้ ความเร็วรอบ 2500 rpm เวลา 15 นาที อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส แล้วดูดเอาชั้น Buffy coat จากนั้นนำตัวอย่างชั้น Buffy coat ที่ดูดได้ไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งเพื่อแยกชั้นพลาสม่าที่ปะปนมาออก แล้วเก็บเฉพาะชั้น Buffy coat ไว้ โดยเก็บตัวอย่าง Buffy coat ที่ได้ไว้ในตู้แช่ -20 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำไปสกัด DNA และตรวจลักษณะ Genotype

ทำการสกัด DNA จาก buffy coat 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 ไมโครลิตรลงไปใน 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 reactiom mixture

เตรียม reaction mixtures ให้มีปริมาตรต่อหนึ่งปฏิกิริยาเท่ากับ 10 ไมโครลิตร โดยมีส่วนประกอบดังแสดงในตารางที่ 1 และใช้ DNAse free water เป็น negative control

**ตารางที่ 1** 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

**ตารางที่** 2 แสดงปริมาณของแต่ละส่วนประกอบในแต่ละ reaction mixture

| **ส่วนประกอบในปฏิกิริยา** | **ปริมาตรต่อหนึ่งปฏิกิริยา (มคล.)** |
|---|---|
| 2X TaqMan Genotyping Master Mix | 5 |
| 20X Taqman Drug Metabolism Genotyping Assay | 0.5 |
| DNAse free Water | 2.5 |
| ปริมาตรรวมต่อหนึ่งปฏิกิริยา | 8 |

ทำการเตรียม reaction mixture ของแต่ละ SNPs โดยการปิเปต 2X TaqMan Genotyping Master Mix, 20X Taqman Drug Metabolism Genotyping Assay และ DNAse free Water ตามปริมาตรที่ได้คำนวณไว้ ใส่ลงใน microcentrifuge tube แล้วนำไปผสมให้เข้ากัน โดยเตรียมทีละ 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 ไว้ ดังแสดงในตารางที่ 3

**ตารางที่** 3 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 เวอร์ชั่น 2.0.4

**การวิเคราะห์ข้อมูล**

ข้อมูลทั่วไปของผู้ป่วย

- เพศ ยาอื่นๆที่ใช้ร่วม แสดงในรูปความถี่ และร้อยละ
- อายุ น้ำหนักตัว ขนาดยาเฟนิทอยน์ที่ใช้ แสดงในรูปค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean ± SD)

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

หาความสัมพันธ์ของปัจจัยทางพันธุกรรม ร่วมกับปัจจัยที่ไม่ใช่พันธุกรรม กับขนาดยาเฟนิทอยน์โดยใช้ Stepwise Multiple Linear Regression analysis

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

# ผลการวิจัย

## ข้อมูลทั่วไปของผู้ป่วย

ในการศึกษานี้มีผู้ป่วยอาสาสมัครได้รับคัดเลือกเข้าร่วมงานวิจัยและเซ็นต์ยินยอมเข้าร่วมงานวิจัยทั้งสิ้น 120 คน แต่มีผู้ป่วยอาสาสมัครถูกคัดออกจากงานวิจัยทั้งสิ้น 12 คนเนื่องจากไม่ให้ความร่วมมือในการรับประทานยา (non compliance) จำนวน 7 คน มีประวัติการใช้ยาไม่ชัดเจน จำนวน 1 คน และปฏิเสธการเข้าร่วมงานวิจัยในภายหลังด้วยเหตุผลส่วนตัว 4 คน จึงเหลือผู้ป่วยอาสาสมัครที่เข้าสู่การวิจัยและการวิเคราะห์ข้อมูลทั้งสิ้น 108 คน

ข้อมูลเกี่ยวกับลักษณะทั่วไปและข้อมูลทางคลินิกของผู้ป่วยได้แสดงไว้ใน ตารางที่ 4 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.

ในการศึกษานี้พบว่าผู้ป่วยประมาณร้อยละ 65 ได้รับ ยาเฟนิทอยน์เพื่อควบคุมอาการชักเพียงตัวเดียว (monotherapy) และอีกประมาณร้อยละ 35 ได้รับยากันชักร่วมกันตั้งแต่สองชนิดขึ้นไป (polytherapy)

ตารางที่ 4 แสดงข้อมูลทั่วไปและข้อมูลทางคลินิกของผู้ป่วย

| ลักษณะผู้ป่วย/ข้อมูลทางคลินิก | ความถี่, (ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน) | ร้อยละ, (พิสัย) |
|---|---|---|
| จำนวนผู้ป่วยทั้งหมด (คน) | 108 | |
| เพศ | | |
| เพศชาย | 63 | 58.30 |
| เพศหญิง | 45 | 41.70 |
| อายุ (ปี) | (43.55 ± 14.57) | (19 - 77) |
| น้ำหนักตัว (กก.) | (60.43 ± 11.47) | (40 - 94) |
| อายุที่เริ่มมีอาการชัก (ปี), N=103 | (24.899 ± 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 |
| ขนาดยาเฟนิทอยน์ที่ได้รับต่อวัน (มก./วัน) | (295.14 ± 47.42) | (100 - 400) |
| ขนาดยาเฟนิทอยน์ที่ได้รับต่อวันต่อน้ำหนักตัว (มก./วัน/กก.) | (5.037 ± 1.174) | (1.67 - 7.50) |

ตารางที่ 5 ได้แสดงรายการยากันชักอื่นๆที่ผู้ป่วยได้รับร่วมกับยาเฟนิทอยน์ โดยยากันชักที่มีการใช้ร่วมกับเฟนิทอยน์มากที่สุด คือ sodium valproate รองลงมาคือ phenobarbital และ carbamazepine

เมื่อพิจารณาถึงระดับนัยสำคัญของการเกิดอันตรกิริยาระหว่างเฟนิทอยน์และยาอื่นๆที่ได้รับร่วมด้วย พบว่า sodium valproate, carbamazepine และ clobazam เป็น ยาร่วมที่มีระดับนัยสำคัญของการเกิดอันตรกิริยากับเฟนิทอยน์ในระดับ 2 (sig.2) คือมีระดับความรุนแรงของการเกิดอันตรกิริยาในระดับปานกลาง (moderate) ซึ่งผลที่เกิดขึ้นทำให้ผู้ป่วยมีอาการเลวลง ต้องการการรักษาเพิ่มขึ้น ต้องนอนพักรักษาตัวในโรงพยาบาลหรืออยู่ในโรงพยาบาลนานขึ้น (Tatro, 2010) ดังนั้นในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของขนาดยาและระดับยาเฟนิทอยน์ในเลือดกับปัจจัยทางพันธุกรรมร่วมกับปัจจัยที่ไม่ใช่พันธุกรรมนั้น จะเลือกพิจารณาเฉพาะยาทั้ง 3 ตัวดังกล่าวนี้

**ตารางที่** 5 แสดงร้อยละของรายการยากันชักอื่นๆที่ผู้ป่วยได้รับร่วมกับยาเฟนิทอยน์และระดับนัยสำคัญทางคลินิกของการเกิดอันตรกิริยาระหว่างยา[#]

| รายการยากันชักที่ใช้ร่วม | จำนวนผู้ป่วย | ร้อยละ |
|---|---|---|
| **กลุ่มยากันชัก** (antiepileptic drugs) | | |
| Sodium valproate [sig.2] | 13 | 22.81 |
| Phenobarbital [sig.5] | 12 | 21.05 |
| Carbamazepine [sig.2] | 10 | 17.54 |
| Clonazepam [sig.4] | 6 | 10.53 |
| Topiramate [sig.4] | 6 | 10.53 |
| Clobazam [sig.2] | 3 | 5.26 |
| Levetiracetam | 3 | 5.26 |
| Pregabalin | 2 | 3.51 |
| Gabapentin [sig.4] | 1 | 1.75 |
| Oxcarbazepine | 1 | 1.75 |
| **รวม** | 57 | 100.00 |

**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 6 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** 6 แสดงความถี่อัลลีล (allele frequencies) ของ candidate SNPs ในยีน *CYP2C9 CYP2C19* และ *ABCB1*

| SNPs | จำนวนอัลลีล | % Allele frequency (95%CI) |
|---|---|---|
| *CYP2C9*3* (1075A>C) | | |
| A allele | 234 | 97.5 (95.5-99.5) |
| C allele | 6 | 2.5 (0.5-4.5) |
| รวม | 240 | |
| *CYP2C19*2* (681 G>A) | | |
| G allele | 176 | 73.3 (67.7- 78.9) |
| A allele | 64 | 26.7 (21.1-32.3) |
| รวม | 240 | |
| *CYP2C19*3* (636 G>A) | | |
| G allele | 239 | 99.6 (98.8-100.2) |
| A allele | 1 | 0.4 (-0.4-1.2) |
| รวม | 240 | |
| *ABCB1* (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 ในยีน *CYP2C9 CYP2C19* และ *ABCB1* ได้แสดงไว้ในตารางที่ 7 โดยไม่พบ homozygous genotype คือ *CYP2C9*3/*3* และ *CYP2C19*3/*3* ในกลุ่มผู้ป่วยโรคลมชักชาวไทยที่ศึกษา และพบว่าทุก genotype ของยีน *CYP2C9*3 CYP2C19*2 CYP2C19*3* และ *ABCB1 C3435T* นั้นอยู่ในสมดุลของฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก (Hardy-Weinberg equilibrium) ($p$>0.05, Chi-Square Test)

**ตารางที่ 7** แสดงความถี่ของจีโนไทป์ (genotype frequencies) ของ candidate SNPs ในยีน *CYP2C9 CYP2C19* และ *ABCB1*

| SNPs | Genotypes | จำนวน | % genotype frequency |
|---|---|---|---|
| *CYP2C9*3* (c.1075A>C) | AA (*1/*1) | 114 | 95.00 |
| | AC (*1/*3) | 6 | 5.00 |
| | CC (*3/*3) | 0 | 0.00 |
| | รวม | 120 | |
| *CYP2C19*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 | |
| *CYP2C19*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 | |
| *ABCB1* (3435C>T) | CC | 39 | 32.50 |
| | CT | 57 | 47.50 |
| | TT | 24 | 20.00 |
| | รวม | 120 | |

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

ชาวเอเชียเชื้อสายอื่นๆ นั้นไม่พบอัลลีล *CYP2C9*2* ยกเว้นในชาวอินเดียที่อาศัยอยู่ในประเทศมาเลเซีย (Seng et al., 2003) ดังนั้นในการศึกษานี้จึงตรวจหาเฉพาะอัลลีล *CYP2C9*3*

**ความสัมพันธ์ของปัจจัยทางพันธุกรรมร่วมกับปัจจัยที่ไม่ใช่พันธุกรรมกับขนาดยา เฟนิทอยน์**

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 8

**ตารางที่** 8 แสดงโมเดลความสัมพันธ์ระหว่างขนาดยาเฟนิทอยน์ที่ผู้ป่วยได้รับกับตัวแปรต่างๆ

| โมเดล | ตัวแปร | โมเดลความสัมพันธ์ระหว่างขนาดยาเฟนิทอยน์กับตัวแปร (มก./วัน/กก.) | $R^2$ | *p*-value |
|---|---|---|---|---|
| 1 | Constant<br>Gender (female) | Dose = 4.707 + (0.792 x Gender) | 0.103 | <0.001 |
| 2 | Constant<br>Gender (female)<br>CBZ co-med | Dose = 4.758 + (0.849 x Gender) - (0.817 x CBZ co-med) | 0.136 | 0.027 |
| 3 | Constant<br>Gender (female)<br>CBZ co-med<br>*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<br>Gender (female)<br>CBZ co-med<br>*ABCB1* TT<br>*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** 9 แสดงค่าสัมประสิทธิ์ความถดถอยของตัวแปรต่างๆในโมเดลที่สามารถอธิบายความผันแปรของขนาดยาเฟนิทอยน์ที่ผู้ป่วยได้รับได้ดีที่สุด

| 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 |

# อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

การใช้ยากันชักเป็นวิธีการหลักในรักษาผู้ป่วยโรคลมชัก โดยเฉพาะยาเฟนิทอยน์ซึ่งมีการใช้มาอย่างยาวนานเนื่องจากเป็นยาที่มีประสิทธิภาพดีและมีราคาถูก แต่ปัญหาที่พบในการรักษาด้วยยาเฟนิทอยน์คือ ยามี Therapeutic range แคบ นอกจากนี้ผู้ป่วยแต่ละรายยังมีการตอบสนองต่อการรักษาที่แตกต่างกัน อันเนื่องมาจากปัจจัยหลายอย่างทั้งที่เกี่ยวข้องและไม่เกี่ยวข้องกับพันธุกรรม จึงทำให้ในการรักษาผู้ป่วย ต้องใช้ระยะเวลานานในการปรับขนาดยาเพื่อให้ได้ขนาดที่เหมาะสมที่สามารถควบคุมอาการชักได้ โดยไม่เกิดอาการไม่พึงประสงค์จากยา ในการศึกษาครั้งนี้ ผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาถึงความสัมพันธ์ของขนาดยาเฟนิทอยน์ที่ใช้กับปัจจัยต่างๆ ทั้งที่เกี่ยวข้องและไม่เกี่ยวข้องกับพันธุกรรม โดยมุ่งหวังว่าข้อมูลที่ได้จากการศึกษานี้อาจสามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานช่วยในการพิจารณาปรับขนาดยาในการรักษาผู้ป่วยโรคลมชัก 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 ซึ่งอาจเนื่องมาจากวิธีการสุ่มเลือกตัวอย่างในการศึกษา เช่น บางการศึกษากลุ่มตัวอย่างอาจเป็นผู้ป่วยกลุ่มโรคที่แตกต่างกัน หรือบางการศึกษาอาจเป็นอาสาสมัครสุขภาพดีทั่วไป เป็นต้น และ ความถี่ของอัลลีล *CYP2C19*3* มีค่าเท่ากับร้อยละ 0.4 ซึ่งมีค่าน้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาอื่นๆในอาสาสมัครสุขภาพดีชาวไทย (Yamada et al., 2001; Tassaneeyakul et al., 2006) ซึ่งสาเหตุอาจเนื่องมาจากในการศึกษานี้เลือกอาสาสมัครจากกลุ่มผู้ป่วยโรคลมชักเท่านั้น ดังนั้นความถี่ของอัลลีลดังกล่าวจึงแตกต่างไปจากอาสาสมัครสุขภาพดีทั่วไป และเนื่องจากกลุ่มตัวอย่างที่ได้ในการศึกษานี้ เป็นการสุ่มมาจากโรงพยาบาลเพียง 2 แห่ง ซึ่งอาจยังไม่สามารถใช้เป็นตัวแทนของประชากรชาวไทยทั้งหมดได้

เมื่อศึกษาถึงความสัมพันธ์ของขนาดยาเฟนิทอยน์ที่ผู้ป่วยได้รับกับลักษณะทางพันธุกรรมของยีน *CYP2C9* *CYP2C19* และ *ABCB1* ร่วมกับปัจจัยอื่นๆที่ไม่เกี่ยวข้องกับลักษณะทางพันธุกรรม ซึ่งได้แก่ เพศ อายุและยาที่ใช้ร่วมด้วย พบว่า เมื่อใช้สถิติ stepwise multiple linear regression พบว่า ปัจจัยทางพันธุกรรมของยีน *CYP2C19* (*CYP2C19*2/*2*) และ *ABCB1* (*ABCB1* TT) ร่วมกับปัจจัยที่ไม่เกี่ยวข้องกับพันธุกรรม ได้แก่ เพศและการได้รับยา carbamazepine ร่วมด้วย เป็นตัวแปรที่สามารถอธิบายความผันแปรของขนาดยาเฟนิทอยน์ที่ผู้ป่วยได้รับได้ดีที่สุด โดยพบว่า ปัจจัยที่สัมพันธ์กับการลดลงของขนาดยาเฟนิทอยน์ที่ผู้ป่วยได้รับได้แก่ การมีลักษณะ genotype ของยีน *ABCB1* C3435T เป็น *ABCB1* 3435TT และการมีลักษณะ genotype ของยีน *CYP2C19* เป็น *CYP2C19*2/*2* รวมถึงการได้รับยา carbamazepine ร่วมด้วย ส่วนปัจจัยที่สัมพันธ์กับการเพิ่มขนาดยาเฟนิทอยน์ที่ผู้ป่วยได้รับ ได้แก่ เพศหญิง

โดยความแตกต่างของขนาดยาเฟนิทอยน์ที่ผู้ป่วยได้รับต่อน้ำหนักตัวระหว่าง เพศชายกับเพศหญิงนั้น อาจเนื่องมาจาก ในทางปฏิบัติการพิจารณาขนาดยาในผู้ป่วยแต่ละรายนั้นเป็นการคำนึงถึงขนาดยาต่อวันที่ผู้ป่วยควรได้รับ โดยไม่ได้พิจารณาถึงความแตกต่างของน้ำหนักตัวในผู้ป่วยแต่ละราย ดังนั้นเมื่อนำมาปรับด้วยน้ำหนักตัวซึ่งในเพศหญิงนั้นมีน้ำหนักตัวโดยเฉลี่ยต่ำกว่าเพศชาย จึงทำให้ได้ขนาดยาต่อน้ำหนักตัวที่สูงกว่าเพศชาย โดยที่ขนาดยาเฟนิทอยน์รวมต่อวัน (มก./วัน) ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างเพศชายและเพศหญิง

ส่วนปัจจัยของการได้รับยา carbamazepine ร่วมด้วยที่สัมพันธ์กับการลดลงของขนาดยาเฟนิทอยน์ที่ผู้ป่วยได้รับนั้น อาจจะเป็นผลเนื่องมาจาก มีรายงานการเกิดอันตรกิริยาระหว่างเฟนิทอยน์กับยา carbamazepine ซึ่งมีนัยสำคัญทางคลินิกในระดับ 2 โดยพบว่าการได้รับยา carbamazepine เพิ่มเติมภายหลังจากได้รับยาเฟนิทอยน์เดี่ยวๆมาก่อน หรือการเพิ่มขนาดยา carbamazepine ขึ้นนั้น มีผลทำให้ระดับยาเฟนิทอยน์ในเลือดเพิ่มขึ้น ร่วมกับมีอาการทางคลินิกที่สัมพันธ์กับการเกิดพิษจากยาเฟนิทอยน์ (Browne et al., 1988; Zielinski et al., 1985; Zielinski et al., 1987) โดยกลไกการเกิดอันตรกิริยาดังกล่าวนี้ น่าจะเกิดจากการที่ยา carbamazepine ไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2C19 (Lakehal et al., 2002) ส่งผลลดการเมแทบอลิซึมของยาเฟนิทอยน์ แล้วมีผลทำให้ระดับยาเฟนิทอยน์ในเลือดสูงขึ้นได้

สำหรับปัจจัยของยีน *ABCB1* C3435T ที่พบว่าการมี genotype เป็น *ABCB1* 3435TT มีความสัมพันธ์กับการลดลงของขนาดยาเฟนิทอยน์นั้น อาจมีความเป็นไปได้ว่าจะมีความเกี่ยวข้อง

กับการตอบสนองต่อการรักษาของผู้ป่วย 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 ในพลาสม่า โดยในกลุ่มอาสาสมัครที่มี *ABCB1* 3435TT นั้นมีระดับยาสูงกว่ากลุ่มอาสาสมัครที่มี *ABCB1* 3435CC และในทำนองเดียวกัน ในการศึกษาของ Kerb และคณะ (2001) พบว่าในกลุ่มอาสาสมัครชาวตุรกีที่มีระดับยาเฟนิทอยน์ในเลือดต่ำจะสัมพันธ์กับ CC genotype ของยีน *ABCB1* C3435T และมีการยืนยันในการศึกษาต่อมาของ Ebid และคณะ (2007) ในกลุ่มผู้ป่วยโรคลมชักชาวอียิปต์ โดยเมื่อพิจารณาระดับยาเฟนิทอยน์ในเลือดก็พบว่ากลุ่มที่มี 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 ที่บริเวณสมองของผู้ป่วยที่ดื้อต่อการรักษา พบว่าในเซลล์เยื่อบุผิวผนังหลอดเลือดที่แยกออกมาจากเส้นเลือดบริเวณสมองส่วน temporal lobe ของผู้ป่วยโรคลมชักที่ดื้อต่อการรักษา (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 ที่พบว่าการมี genotype ของยีน *ABCB1* C3435T เป็น TT มีความสัมพันธ์กับการลดลงของขนาดยาเฟนิทอยน์นั้น อาจสามารถอธิบายได้

ในสองแง่ด้วยกันดังนี้คือ 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) แล้วทำให้มีการขนส่งยาออกสู่ทางเดินอาหารน้อยกว่าส่งผลให้ยามีการดูดซึมได้มากกว่า หรือในบางการศึกษาพบว่าระดับการแสดงออกของ P-gp ไม่ได้แตกต่างกัน (Kimchi-Sarfaty et al., 2007; Hung et al., 2008) แต่พบว่าการเกิด polymorphism ของยีน *ABCB1* C3435T นั้นส่งผลทำให้มีการเปลี่ยนแปลง conformation ตรงตำแหน่งที่ซับสเตรทจะเข้ามาจับกับ P-gp จึงทำให้ความชอบในการจับกับ ซับสเตรท (affinity) ลดลง การขนส่งซับสเตรทออกจากเซลล์จึงลดลง ส่งผลให้ยาถูกดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือดได้มากขึ้น ส่วนในแง่ของเภสัชพลศาสตร์ ในสมองบริเวณตำแหน่งที่ยาไปออกฤทธิ์นั้น หากอธิบายตามกลไกที่ Kimchi-Sarfaty และคณะ (2007) ได้ตั้งสมมติฐานไว้ นั่นคือการเกิด polymorphism ของยีน *ABCB1* C3435T นั้นส่งผลทำให้มีการเปลี่ยน conformation ตรงตำแหน่งที่ซับสเตรทจะเข้ามาจับ จึงทำให้ความชอบในการจับกับซับสเตรทลดลง การขนส่ง ซับสเตรทออกจากเซลล์จึงลดลง โดยเมื่อพิจารณาถึงเซลล์บริเวณสมอง หากมีการขนส่งยาออกจากเซลล์ลดลง ก็จะทำให้มีการสะสมของยาในบริเวณที่จะออกฤทธิ์ได้มากขึ้น และเพียงพอต่อการออกฤทธิ์ควบคุมอาการชักได้

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

ส่วนกรณีของยีน *CYP2C9* ที่ไม่พบความสัมพันธ์ของ *CYP2C9*3* กับขนาดยาเฟนิทอยน์นั้น ทั้งที่การทำงานของเอนไซม์ CYP2C9*3 ที่ลดลงมากเมื่อเทียบกับ wild type allele อาจสามารถอธิบายได้จากการที่พบ ความถี่อัลลีลนี้ต่ำมากในตัวอย่างผู้ป่วยโรคลมชักชาวไทยที่ทำการศึกษา (ร้อยละ 2.5 % การศึกษานี้) จึงไม่เห็นอิทธิพลของ *CYP2C9*3* ในการศึกษานี้ แต่กลับเห็นอิทธิพลของ *CYP2C19*2* ซึ่งพบมีความถี่อัลลีลสูงถึงร้อยละ 26.7

ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของขนาดยาที่ผู้ป่วยได้รับกับปัจจัยต่างๆ ด้วย Stepwise Multiple Linear Regression พบความสัมพันธ์ของขนาดยาเฟนิทอยน์ที่ผู้ป่วยได้รับกับ genotype ของ SNPs ในยีน *CYP2C19* และ *ABCB1* เป็นข้อดีเนื่องจากในการวิเคราะห์แบบ Stepwise

Multiple Linear Regression เมื่อมีการวิเคราะห์ผลของปัจจัยใดปัจจัยหนึ่งต่อตัวแปรที่ต้องการศึกษา อิทธิพลจากปัจจัยอื่นๆจะถูกควบคุมไว้ ดังนั้นจึงสามารถเห็นผลที่แท้จริงของปัจจัยนั้นๆ ต่อตัวแปรที่ต้องการศึกษา

## 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 และร้อยละ 43.8 ตามลำดับ และจากผลการวิเคราะห์พบว่า ปัจจัยที่มีความสัมพันธ์กับขนาดยา เฟนิทอยน์ที่ผู้ป่วยได้รับ ได้แก่ ความผันแปรทางพันธุกรรมในยีน *CYP2C19* (*2/*2) และยีน *ABCB1* (3435TT) ร่วมกับปัจจัยที่ไม่ใช่พันธุกรรม ได้แก่ เพศของผู้ป่วย และการได้รับยา carbamzepine ร่วมด้วย ซึ่งตัวแปรดังกล่าวทั้งหมดนี้สามารถอธิบายความผันแปรของขนาดยาที่ผู้ป่วยได้รับได้ประมาณร้อยละ 20 ซึ่งผลการศึกษาครั้งนี้ทำให้ทราบข้อมูลเบื้องต้นว่า ลักษณะ genotype ของยีน *CYP2C19* และ *ABCB1* อาจมีอิทธิพลกับความแตกต่างของขนาดยาเฟนิทอยน์ที่ผู้ป่วยได้รับระหว่างผู้ป่วยแต่ละราย จึงชี้ให้เห็นว่าว่าการทราบลักษณะ genotype ของยีน *CYP2C9* *CYP2C19* และ *ABCB1* ของผู้ป่วยก่อนได้รับการรักษาด้วยยาเฟนิทอยน์ น่าจะมีประโยชน์ต่อแพทย์ในการพิจารณารักษาผู้ป่วยได้มีประสิทธิภาพมากขึ้น อย่างน้อยสามารถเฝ้าระวังผู้ป่วยในรายที่มีลักษณะยีนที่อาจเสี่ยงต่อการเกิดอาการไม่พึงประสงค์อันเนื่องมาจากระดับยาในเลือดสูงเกินช่วงของการรักษาได้ จึงควรมีการศึกษาในขั้นต่อไปเพื่อยืนยันผลดังกล่าว

## ข้อจำกัดของการศึกษานี้และข้อเสนอแนะ

เนื่องจากตัวอย่างที่ได้ในการศึกษานี้ เป็นการสุ่มมาจากโรงพยาบาลเพียง 2 แห่ง ซึ่งอาจยังไม่สามารถใช้เป็นตัวแทนของประชากรชาวไทยทั้งหมดได้ นอกจากนี้แนวทางการปฏิบัติของแพทย์ต่างโรงพยาบาลและต่างพื้นที่กัน อาจทำให้ลักษณะฟีโนไทป์มีความแตกต่างกันได้ เนื่องจากผลจากการวิเคราะห์ในครั้งนี้ พบว่าตัวแปรดังกล่าวนั้น สามารถอธิบายความผันแปรของขนาดยาเฟนิทอยน์ที่ผู้ป่วยได้รับได้เพียงร้อยละ 20 ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ว่าน่าจะมีตัวแปรอื่นๆอีกที่มีความสัมพันธ์และมีส่วนเกี่ยวข้องกับความผันแปรของขนาดยาเฟนิทอยน์ที่ผู้ป่วยได้รับ เช่น ลักษณะยีนของตำแหน่งที่ยาไปออกฤทธิ์ ชนิดและความรุนแรงของโรคลมชัก จำนวนครั้งของการชักก่อนเริ่มได้รับการรักษา หรืออายุที่ผู้ป่วยเริ่มเป็นโรคลมชัก เป็นต้น ซึ่งควรจะต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

# เอกสารอ้างอิง


**ภาษาไทย**

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

**ภาษาอังกฤษ**

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): 1066-73.

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.

Biedler, JL, Melamed, MR, Bertino, JR (1989). Multidrug-resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at blood-brain barrier sites. Proc. Nati. Acad. Sci. USA 86: 695-698.

Brodie, M. J. (2005). Response to Antiepileptic drug therapy: Winners and Loosers. 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. Jone (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): 1146-50.

Browne, R. T., and Leduc B. (2002). Phenytoin and other Hydantoins : 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.

Chisholm, D (2005). Cost-effectiveness of First-line Antiepileptic Drug Treatments in the Developing World: A Population-level Analysis. Epilepsia 46: 751-759.

Cockerell, OC, Johnson, AL, Sander, JWAS, Shorvon, SD (1997). Prognosis of Epilepsy: A Review and Further Analysis of the First Nine Years of the British National General Practice Study of Epilepsy, a Prospective Population-Based Study. Epilepsia 38: 31-46.

Cusack, B. J. (2004). Pharmacokinetics in older persons. Am J Geriatr Pharmacother 2: 274–302.

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: 15419-22.

i 2880 1954

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.

Depondt, C, Shorvon, SD (2006). Genetic association studies in epilepsy pharmacogenomics: lessons learnt and potential applications. Pharmacogenomics 7: 731-745.

Diaz, 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.

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.

Fritz, S, Lindner, W, Roots, I, Frey, BM, Kupfer, A (1987a). Stereochemistry of aromatic phenytoin hydroxylation in various drug hydroxylation phenotypes in humans. J Pharmacol Exp Ther 241: 615-622.

Fromm, MF (2002). The influence of polymorphisms on P-glycoprotein expression and function in humans. *Advanced Drug Delivery Reviews* 54: 1295-1310.

Fromm, M. F. (2004). Importance of P-glycoprotein at blood-tissue barriers. Trends Pharmacol Sci 25(8): 423-429.

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.

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: 607–47.

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.

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.

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.

Kastrup, K. E. (2008). Drug Facts And Comparisons. USA: Wolter Kluwer Health.

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.

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, Brodie, MJ (2000). Early identification of refractory epilepsy. *N Engl J Med* 342: 314-9.

Kwan, P., et al. (2007). Association between ABCB1 C3435T polymorphism and drug-resistant epilepsy in Han Chinese. Epilepsy Behav 11(1): 112-117.

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. 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.

Luna-Tortos, C, Fedrowitz, M, Lɔscher, W (2008). Several major antiepileptic drugs are substrates for human P-glycoprotein. Neuropharmacology 55: 1364-1375.

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 Ameriacan Society of Health-System Pharmacist.

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.

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.

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.

Rettie, AE, Wienkers, LC, Gonzalez, FJ, Trager, WF, Korzekwa, KR (1994). Impaired (S)-warfarin metabolism catalysed by the R144C allelic variant of CYP2C9. Pharmacogenetics 4: 39-42.

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.

Roden, DM, George, AL, Jr. (2002). The genetic basis of variability in drug responses. Nat Rev Drug Discov 1: 37-44.

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.

Romphruk, A, Phongaen, K, Chotechai, J, Puapairoj, C, Leelayuwat, C, Romphruk, AV (2003). HLA-B* 15 subtypes in the population of north-eastern Thailand. European Journal of Immunogenetics 30: 153.

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.

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-Leu$^{359}$ 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.

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.

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.

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, 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): 122-6.

Winter ME and Tozer TN. (2006). Phenytoin. In Troy D (ed), Applied Pharmacokinetics & Pharmacodynamics: Principles of Therapeutic Drug Monitoring. pp. 465-490. USA: Lippincott Williams&Wilkins.

Xie, H. G., . Prasad, H. C., Kim R. B., and Stein, C. M. (2002). *CYP2C9* allelic variants: ethnic distribution and functional significance. Advanced Drug Delivery Reviews 54: 1257–1270.

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.

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: 2585-90.

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

## สารเคมีและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

รายการสารเคมีและบริษัทผู้ผลิต

| สารเคมี | บริษัทผู้ผลิต |
|---|---|
| Erythrocyte lysis buffer | QIAGEN, Germany |
| QIAamp DNA Blood Mini Kit | QIAGEN, German |
| Phosphate Buffer Saline (PBS) | เตรียมขึ้นเอง |
| Sodium Chloride (NaCl) | Ajax Finechem, Australia |
| Potassium Chloride (KCl) | Ajax Finechem, Australia |
| Disodium hydrogen phosphate ($Na_2HPO_4$) | Sigma, USA |
| potassium dihydrogen phosphate ($KH_2PO_4$) | Ajax Finechem, Australia |
| Taqman Drug Metabolism Genotyping assay (rs1057910, rs4244285, rs4986893, rs1045642) | Applied Biosystem, USA |
| Taqman Universal PCR Master Mix without UNG | Applied Biosystem, USA |
| DNAse free water | AppliChem, Germany |

รายการอุปกรณ์และเครื่องมือและบริษัทผู้ผลิต

| อุปกรณ์และเครื่องมือ | บริษัทผู้ผลิต |
|---|---|
| $K_3$EDTA tube | BD vacutainer, USA |
| Serum vacutainer tube | BD vacutainer, USA |
| เครื่อง centrifuge Hermle Z383K | Hermle Labortechnik Gmbh, Germany |
| เครื่อง centrifuge Mikro 120 | Hettich Zentrifugen, USA |
| เครื่อง Vortex mixer | Labnet International Inc., USA |
| เครื่อง NanoDropTM 1000 Spectrophotometer | Thermo Scientific, USA |
| MicroAmp Optical 96-well reaction plate | Applied Biosystems, USA |
| MicroAmp Optical Adhesive Film kit | Applied Biosystems, USA |
| ABI 7500 Real-Time PCR | Applied Biosystems, USA |