



สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

The Thailand Research Fund

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ ความผันแปรทางพันธุกรรมของ Cytochrome P450C19 ในประชากรไทย
(Genetic polymorphism of Cytochrome P450C19 in Thai population)

โดย

รองศาสตราจารย์ ดร. วิจิตรา ทศนียกุล



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ ความผิดปกติทางพันธุกรรมของ Cytochrome P450C19 ในประชากรไทย
(Genetic polymorphism of Cytochrome P450C19 in Thai population)

รองศาสตราจารย์ ดร. วิจิตรา ทศนียกุล
ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยขอนแก่น

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

รายนามคณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการวิจัย

รศ. ดร. วิจิตรา ทศนียกุล

ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ผู้ร่วมวิจัย

1. ดร. กนกพร นิวัฒน์นันท์

ภาควิชาเภสัชกรรมคลินิก คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

2. ผศ.นพ. วีรวัฒน์ มัทธอนตระกูล

ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

3. ศ. ดร. เกศรา ณ บางช้าง

คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

4. นาง อารณีย์ ทวะลี

ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

5. นาย ณัฐวุฒิ ไกรเกรียงศักดิ์

คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

6. นางอุทัยวรรณ ชัยเกลี้ยง

ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

7. รศ. ดร. วงศ์วิวัฒน์ ทศนียกุล

ภาควิชาพิษวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

Abstract

CYP2C19 is a polymorphically expressed cytochrome P450 responsible for the metabolism of several clinically used drugs, including some barbiturates, diazepam, proguanil, propranolol and several proton pump inhibitors. Genetic polymorphism of this enzyme shows a marked ethnic difference, with the poor metabolizer (PM) phenotype representing 2-5% of Caucasian and 11-23% of Asian populations. In the present study, the phenotype and genotype of CYP2C19 was investigated in Thai population using the omeprazole hydroxylation index and polymerase chain reaction-Restriction fragment length polymorphism, respectively.

Although the omeprazole hydroxylation index (HI) at 2 or 3 hr after the drug administration has been proposed as the index for assessing CYP2C19 enzyme activity *in vivo*. Results from the present study suggest that HI at 3 hr after the drug administration appear to be the most suitable index for assessing CYP2C19 activity in a Thai population. HI value at 2 hr after omeprazole administration could not be determined in 2.7 % of subjects participated in this study due to the fact that the level of both omeprazole and 5-hydroxyomeprazole in plasma were lower than the detection limit because of slower absorption rate in these subjects.

The distribution of HI values at 3 hr after omeprazole in 107 Thai subjects was bimodally. Seven of these subjects (6.54 %, 95% CI 1.86-11.22%) were identified as poor metabolizers (PM) of CYP2C19 with HI values higher than 7 (8.31-29.59). Analysis of CYP2C19 genotypes in these 107 subjects reveal that 51 (47.66 %) were homozygous *CYP2C19*1*, 47 (43.93 %) were *CYP2C19*1/*2*, 3 (2.80 %) were *CYP2C19*1/*3*, 5 (4.67 %) were homozygous *CYP2C19*2* and 1 (0.93 %) were homozygous *CYP2C19*3*. It is noteworthy that there was a case of nonaccordance between phenotype and genotype in one of the PMs. Screening for other known mutant alleles, all of the intron-exon boundaries as well as 1.5 kb of the promoter and 3'-untranslated regions of *CYP2C19* gene in this outlier detected no mutation.

Large scale analysis of *CYP2C19* polymorphism in Thai population were conducted in the North-eastern (n = 220), Native Northern (n = 180), Southern (n = 162) and Central Thais (n = 212). Results from genotype analysis revealed that the allele frequencies of *CYP2C19*1*, *CYP2C19*2* and *CYP2C19*3* in the North-eastern Thais were 0.704 (95% CI 0.659-0.747), 0.264 (95% CI 0.223-0.307) and 0.032 (95% CI 0.017-0.053), respectively while those of the Northern Thai population were 0.636 (95% CI 0.584-0.886), 0.317 (95% CI 0.269-0.367) and 0.047 (95% CI 0.028-0.074). In addition, the allele frequencies of *CYP2C19*1*, *CYP2C19*2* and *CYP2C19*3* in the central Thai population were 0.653 (95% CI 0.606-0.699), 0.311 (95% CI 0.267-0.358) and 0.036 (95% CI 0.020-0.058), respectively and those of the Southern Thai population were 0.713 (95% CI 0.660-0.720), 0.272 (95% CI 0.224-0.323), 0.015 (95% CI 0.005-0.036), respectively. The prevalence of PM estimated from genotype data in the North-eastern, Northern, Central and Southern Thai populations were 6.82 % (95% CI 3.87-11.00%), 10.50% (95% CI 6.48-16.00%), 11.32% (95% CI 7.39-16.37%) and 8.02% (95% CI 4.34-13.53%), respectively. However, there was no statistical significant difference in the PM phenotype and the frequencies of *CYP2C19* alleles in these Thai populations. When combining the *CYP2C19* genotype data of these Thai populations, it was found that the allele frequencies of *CYP2C19*1*, *CYP2C19*2* and *CYP2C19*3* were 0.676 (95% CI 0.652-0.700), 0.291 (95% CI 0.268-0.314) and 0.033 (95% CI 0.025-0.043), respectively and the prevalence of PM was 9.2% (95% CI 7.2-11.4%). It should be noted that the PM phenotype and the frequencies of *CYP2C19* defective alleles in Thai population particularly *CYP2C19*3*, were lower than those previously reported in other Asian populations.

The pharmacokinetics of omeprazole and its metabolites were analyzed in Thai subjects with different *CYP2C19* genotype patterns. C_{max} , $T_{1/2}$, AUC and Clearance of omeprazole in homozygous PMs were significant higher than those of heterozygous and homozygous EMs. Moreover, the AUC ratio of omeprazole/5-hydroxyomeprazole in homozygous PMs was 8.18 and 14.61 fold higher than those of heterozygous EMs and homozygous EMs, respectively. This results suggest that the rate of omeprazole metabolism was correlated with the *CYP2C19* genotype. Therefore knowing of *CYP2C19* polymorphism status in individual patient will be useful for predicting the pharmacokinetics of drugs which are substrates of this enzyme.

บทคัดย่อ

เอนไซม์ CYP2C19 เป็นเอนไซม์กลุ่มไซโตโครมพี 450 ชนิดหนึ่งซึ่งพบว่ามีความสามารถในการทำงานที่แตกต่างกันได้มากในบุคคลแต่ละบุคคล เอนไซม์ชนิดนี้มีบทบาทสำคัญในการเปลี่ยนแปลงยารักษาโรคที่ใช้ทางคลินิกหลายชนิด ได้แก่ ยาออกฤทธิ์ต่อระบบประสาทกลาง กลุ่มบาร์บิทูเรต และ ไดอะซีแพม ยาด้านมาเลเรีย โปรทิวนิล และยารักษาโรคแผลในทางเดินอาหารกลุ่มที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ proton pump นอกจากนี้ยังพบว่าความชุกของลักษณะพันธุกรรมของจีนที่ควบคุมการทำสังเคราะห์เอนไซม์ CYP2C19 จะแตกต่างกันอย่างชัดเจนระหว่างประชากรแต่ละเชื้อชาติ โดยความชุกของผู้ที่มีความบกพร่องในการทำงานของเอนไซม์ CYP2C19 (poor metabolizer, PM) ในชาวคอเคเซียนพบประมาณ 2-5% ขณะที่ในชาวเอเชียพบได้ระหว่าง 9-23% สำหรับโครงการวิจัยนี้ผู้วิจัยมุ่งศึกษาการแสดงออกและลักษณะทางพันธุกรรมของจีน CYP2C19 ในประชากรไทย โดยการตรวจประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ CYP2C19 ซึ่งวัดจากค่าดัชนีการเปลี่ยนรูปยาโอเมพราโซล (omeprazole) แบบไฮดรอกซิเลชัน (hydroxylation index, HI) และเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสร่วมกับวิธีวิเคราะห์ขนาดสารพันธุกรรมที่แตกต่างกัน (polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP)

แม้ในรายงานที่มีผู้ศึกษาในต่างประเทศก่อนหน้านี้ได้เสนอว่า วิธีตรวจวัดประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ CYP2C19 โดยใช้ค่า HI ของยาโอเมพราโซล สามารถเลือกวัดได้ที่ 2 ช่วงเวลา คือ หลังการรับประทานยาไปแล้ว 2 และ 3 ชั่วโมง แต่ผลการศึกษาค้นคว้าวิจัยพบว่าวิธีที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวัดในประชากรไทยควรเป็นในช่วงเวลา 3 ชั่วโมงหลังการรับประทานยา เนื่องจากมีอาสาสมัครจำนวนหนึ่ง (2.7%) ที่ดูดซึมยาเข้าสู่ร่างกายได้ช้าทำให้ไม่สามารถตรวจวัดระดับยาโอเมพราโซล และ 5-ไฮดรอกซิโอเมพราโซลซึ่งเป็นสารเมตาบอไลต์ในพลาสมาได้อย่างถูกต้องในช่วงเวลา 2 ชั่วโมงหลังการรับประทานยา ทั้งนี้เนื่องจากระดับของสารทั้งสองตัวนี้ในพลาสมามีค่าต่ำเกินกว่าที่จะตรวจวัดได้

ผลการศึกษาค่า HI ที่ช่วงเวลา 3 ชั่วโมงหลังการรับประทานยาโอเมพราโซลในประชากรไทยจำนวน 107 ราย พบว่ามีลักษณะการแจกแจงเป็น 2 กลุ่ม (bimodality) โดยมีอาสาสมัคร 7 ราย (6.54%, 95% CI 1.86-11.22) มีการทำงานของเอนไซม์ CYP2C19 ได้น้อยหรือจัดเป็นแบบ PM โดยมีค่า HI ที่ตรวจวัดได้มากกว่า 7 (8.73-29.59) และเมื่อตรวจลักษณะทางพันธุกรรมของจีน CYP2C19 ในประชากรไทยจำนวน 107 รายนี้พบว่าผู้ที่มีพันธุกรรมแบบ homozygous ของคู่จีน CYP2C19*1 (CYP2C19*1/*1) มีจำนวน 51 ราย (47.66%) แบบ heterozygous คือแบบ CYP2C19*1/*2 มี 47 ราย (43.93%) และแบบ CYP2C19*1/*3 มี 3 ราย (2.80%) ขณะที่พันธุกรรมแบบ homozygous ของของคู่จีน CYP2C19*2 (CYP2C19*2/*2) มี 5 ราย (4.67%) และแบบ CYP2C19*3/*3 มีเพียง 1 ราย (0.93%) อย่างไรก็ตามมีข้อสังเกตว่าได้ตรวจพบการ

ขัดกันระหว่างลักษณะทางพันธุกรรมของจีน (genotype) กับลักษณะการแสดงออก (phenotype) ในอาสาสมัครจำนวน 1 รายที่ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม PM ซึ่งเมื่อวิเคราะห์ลำดับเบสของจีน *CYP2C19* ของอาสาสมัครรายนี้อย่างละเอียด ไม่พบว่ามี การกลายพันธุ์ (mutant) ชนิดที่เคยมีผู้รายงานไว้ ก่อนแล้วทั้งหมด รวมทั้งเมื่อตรวจวิเคราะห์ลำดับเบสในส่วน intron-exon ทั้งหมดของจีน รวมทั้ง ลักษณะของ promoter ในช่วง 1.5 kb และช่วงท้ายของจีนที่ไม่มีการแปลสัญญาณ (3'-untranslated) ก็ไม่พบการกลายพันธุ์ที่สามารถอธิบายการขัดกันนี้ได้

ผู้วิจัยได้สุ่มตรวจวิเคราะห์ลักษณะของจีน *CYP2C19* ของประชากรไทยทั้งประเทศซึ่ง ประกอบด้วยผู้ที่มีพื้นเพภูมิลำเนาอยู่ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือจำนวน 220 ราย ภาคเหนือ จำนวน 180 ราย ภาคกลางจำนวน 212 ราย และภาคใต้จำนวน 162 ราย ผลการศึกษาพบว่า สำหรับประชากรที่มีภูมิลำเนาในภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีการกระจายของยีนแบบ *CYP2C19*1*, *CYP2C19*2* และ *CYP2C19*3* เท่ากับ 0.704 (95% CI 0.659-0.747), 0.264 (95% CI 0.223-0.307) และ 0.032 (95% CI 0.017-0.053) ตามลำดับ สำหรับประชากรที่มีภูมิลำเนา ในภาคเหนือมีการกระจายของจีนทั้ง 3 แบบ เท่ากับ 0.636 (95% CI 0.584-0.886), 0.317 (95% CI 0.269-0.367) และ 0.047 (95% CI 0.028-0.074) ตามลำดับ ส่วนประชากรที่มี ภูมิลำเนาในภาคกลางมีการกระจายของจีนทั้ง 3 แบบ เท่ากับ 0.653 (95% CI 0.606-0.699), 0.311 (95% CI 0.267-0.358) และ 0.036 (95% CI 0.020-0.058) ตามลำดับ และประชากร ที่มีภูมิลำเนาในภาคใต้มีการกระจายของจีนทั้ง 3 แบบ เท่ากับ 0.713 (95% CI 0.660-0.720), 0.272 (95% CI 0.224-0.323) และ 0.015 (95% CI 0.005-0.036) ตามลำดับ เมื่อใช้ข้อมูลจากลักษณะทางพันธุกรรมที่ตรวจวิเคราะห์ได้เหล่านี้ไปประมาณค่าความชุกของประชากรที่จัดเป็นกลุ่ม PM จะพบว่าในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคเหนือ ภาคกลาง และภาคใต้ น่าจะมีสัดส่วนประชากรกลุ่ม PM เท่ากับ 6.82% (95% CI 3.87-11.00), 10.50% (95% CI 6.48-16.00), 11.32% (95% CI 7.39-16.37) และ 8.02% (95% CI 4.34-13.53) ตามลำดับ อย่างไรก็ตามผลการวิจัยไม่พบความแตกต่างของความถี่ของคู่จีน *CYP2C19* ระหว่างประชากรใน ภูมิภาคเหล่านี้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อทดสอบทางสถิติ เมื่อรวมผลการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรม ของประชากรไทยทั้งประเทศพบว่าการกระจายของจีนแบบ *CYP2C19*1*, *CYP2C19*2* และ *CYP2C19*3* เท่ากับ 0.676 (95% CI 0.652-0.700), 0.291 (95% CI 0.268-0.314) และ 0.033 (95% CI 0.025-0.043) ตามลำดับ และความชุกของประชากร PM ในคนไทยโดยรวม เท่ากับ 9.2% (95% CI 7.20-11.4) ซึ่งมีข้อสังเกตว่าจำนวนประชากร PM และความถี่ของการ ตรวจพบคู่จีนของ *CYP2C19* ที่เกิดการกลายพันธุ์แบบต่าง ๆ โดยเฉพาะชนิด *CYP2C19*3* ที่ ตรวจพบจากการศึกษาในประชากรไทยครั้งนี้มีค่าต่ำกว่าที่มีผู้รายงานการศึกษาในประชากรชาวเอเชียอื่น ๆ มาก

เมื่อศึกษาเภสัชจลนศาสตร์ของยาโอมิพราโซลในประชากรไทยที่มีลักษณะจีน *CYP2C19* แบบต่าง ๆ พบว่าค่าพารามิเตอร์ทางเภสัชจลนศาสตร์ที่สำคัญคือ ความเข้มข้นสูงสุดในเลือด (C_{max})

ค่าครึ่งชีวิต ($T_{1/2}$) และพื้นที่ใต้กราฟความสัมพันธ์ระหว่างระดับยากับช่วงเวลา (AUC) ที่คำนวณได้จากประชากรที่มีลักษณะทางพันธุกรรมแบบ homozygous PM มีค่ามากกว่ากลุ่มที่มีลักษณะพันธุกรรมแบบ heterozygous และ homozygous EM อย่างมีนัยสำคัญ ขณะที่ค่าอัตราการกำจัดยาออกจากร่างกาย (Clearance) ต่ำกว่า นอกจากนี้ยังพบว่าค่าสัดส่วน AUC ระหว่าง ยาโอมิพราโซล กับ ๖-ฮัยดรอกซีโอมิพราโซลที่คำนวณได้จากประชากรกลุ่ม homozygous PM มีค่าสูงกว่าที่ตรวจพบในประชากรที่มีพันธุกรรมแบบ heterozygous และ homozygous EM มากถึง 8.18 และ 14.61 เท่าตามลำดับ ผลการวิเคราะห์เหล่านี้บ่งชี้ว่าอัตราการเปลี่ยนแปลงยาโอมิพราโซลมีความสัมพันธ์กับลักษณะทางพันธุกรรมของยีน *CYP2C19* อย่างชัดเจน ดังนั้นการทราบข้อมูลลักษณะทางพันธุกรรมของเอนไซม์ชนิดนี้ในผู้ป่วยแต่ละรายจึงมีประโยชน์ต่อการคาดคะเนตัวแปรทางเภสัชจลนศาสตร์ของยาที่ต้องอาศัยเอนไซม์ชนิดนี้เป็นตัวเปลี่ยนรูปภายในร่างกายได้

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยชิ้นนี้ได้รับการสนับสนุนจากทุนพัฒนานักวิจัย สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) และทุนสนับสนุนการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น รวมทั้งฝ่ายวิจัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ผู้วิจัยใคร่ขอกราบขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร. อำนวย ธิฐาพันธ์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ และ Professor John Miners, Department of Clinical Pharmacology, Flinders Medical Centre, South Australia, Australia ที่ได้ให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์ต่อการวิจัย ขอขอบคุณ Dr. Joyce Goldstein, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, USA ที่ให้ความร่วมมือในการศึกษาลำดับเบสของยีน CYP2C19 ขอขอบคุณ Dr. Kjell Andersson และ Dr. Tommy Andersson, AstraZeneca, Mölndal, Sweden ที่ได้เอื้อเฟื้อสารมาตรฐาน omeprazole, omeprazole sulfone และ 5-hydroxyomeprazole รวมทั้งบริษัท AstraZeneca แห่งประเทศไทย ที่ได้เอื้อเฟื้อยา omeprazole (Losec®) ที่ใช้เป็นตัววัดการแสดงออกของเอนไซม์ CYP2C19 .

ท้ายนี้คณะผู้วิจัยใคร่ขอบคุณอาสาสมัครทุกท่านที่ให้ความร่วมมือในการวิจัยครั้งนี้

คณะผู้วิจัย

กุมภาพันธ์ 2547

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 CYP2C19 allelic variants ที่มีการรายงานในปัจจุบัน	7
ตารางที่ 2 ลักษณะทางพันธุกรรมของจีน <i>CYP2C19</i> ในประชากรไทยอีสาน	19
ตารางที่ 3 ลักษณะทางพันธุกรรมของจีน <i>CYP2C19</i> ในประชากรไทยภาคเหนือ	19
ตารางที่ 4 ลักษณะทางพันธุกรรมของจีน <i>CYP2C19</i> ในประชากรไทยภาคใต้	20
ตารางที่ 5 ลักษณะทางพันธุกรรมของจีน <i>CYP2C19</i> ในประชากรไทยภาคกลาง	20
ตารางที่ 6 เปรียบเทียบความถี่ ของ <i>CYP2C19</i> alleles ในประชากรไทยที่มีภูมิลำเนาใน ภูมิภาคต่าง ๆ	21
ตารางที่ 7 เปรียบเทียบความถี่ของ PM และ ความถี่ ของ <i>CYP 2C19</i> allele ของประชากรไทยและประชากรเชื้อชาติอื่น ๆ	23
ตารางที่ 8 ค่าพารามิเตอร์ทางเภสัชจลนศาสตร์ของ omeprazole และ metabolites ในอาสาสมัครที่มีลักษณะทางพันธุกรรมของ <i>CYP2C19</i> แบบต่าง ๆ	26

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1 แสดงการกระจายตัวและ probit plot ของ omeprazole hydroxylation index ในอาสาสมัครชาวไทยอีสาน	17
ภาพที่ 2 ตัวอย่างผลการวิเคราะห์ลักษณะทางพันธุกรรมของจีน <i>CYP2C19</i> แบบต่าง ๆ โดยใช้เทคนิค PCR-RFLP	18
ภาพที่ 3 เกสซ์จลนศาสตร์ของ omeprazole และ metabolites ในอาสาสมัครที่มีลักษณะทางพันธุกรรมของจีน <i>CYP2C19</i> แบบต่าง ๆ	25

สารบัญ

	หน้า
รายนามคณะผู้วิจัย	i
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ii
บทคัดย่อภาษาไทย	iv
กิตติกรรมประกาศ	vii
สารบัญตาราง	viii
สารบัญภาพ	ix
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ความสำคัญ และที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการ	2
1.3 ขอบเขตการวิจัย	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากโครงการวิจัย	3
บทที่ 2 วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	4
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	
3.1 สารเคมีใช้ในการทดลอง	10
3.2 การศึกษาลักษณะการแสดงออก (phenotype) ของ CYP2C19	10
3.2.1 อาสาสมัคร	10
3.2.2 แผนการทดลอง	11
3.2.3 การวิเคราะห์ความเข้มข้นของ omeprazole และ metabolites ในพลาสมา	12
3.4 การศึกษาลักษณะทางพันธุกรรม (genotype) ของ CYP2C19	12
3.4.1 อาสาสมัคร	12
3.4.2 การเตรียม genomic DNA	13
3.4.3 การตรวจวินิจฉัยลักษณะทางพันธุกรรมของ CYP2C19 โดยใช้ เทคนิค PCR-RFLP	13
3.5 การศึกษาเภสัชจลนศาสตร์ของยา omeprazole ในประชากรไทยซึ่งมีเภสัชพันธุกรรมของยีน CYP2C19 แบบต่าง ๆ	14
3.6 การวิเคราะห์ข้อมูลและสถิติ	15
บทที่ 4 ผลการทดลอง	
4.1 การศึกษาลักษณะการแสดงออกของ CYP2C19 ในประชากรชาวไทย	16
4. 2 การศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของยีน CYP2C19 ในประชากรชาวไทย	18

4.3 การศึกษาเภสัชจลนศาสตร์ของยา omeprazole ในอาสาสมัครที่มีลักษณะ ทางพันธุกรรมของ <i>CYP2C19</i> ที่แตกต่างกัน	24
บทที่ 5 วิจัยและสรุปผลการวิจัย	27
เอกสารอ้างอิง	30
ภาคผนวก	33

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญ และที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

การตอบสนองต่อยาของผู้ป่วยแต่ละรายขึ้นกับปัจจัยที่สำคัญต่าง ๆ หลายด้าน โดยเฉพาะความสามารถในการกำจัดยา ซึ่งจะส่งผลต่อประสิทธิภาพการรักษาโรคและการเกิดพิษของยาได้มาก ยาส่วนใหญ่เมื่อเข้าสู่ร่างกายจะต้องถูกเปลี่ยนแปลง (metabolism) โดยเอนไซม์ เพื่อเร่งการขับยาออกจากร่างกาย ซึ่งการทำงานของเอนไซม์เหล่านี้บางชนิดอาจแตกต่างกันในแต่ละบุคคล เนื่องจากถูกควบคุมโดยอิทธิพลต่าง ๆ รวมทั้งพันธุกรรม ดังนั้นความแปรปรวนหรือความผิดแผกทางพันธุกรรมของยีน (gene) ที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เปลี่ยนแปลงยาจึงมีอิทธิพลต่อประสิทธิภาพในการเปลี่ยนรูปยา การเกิดพิษ และอาการไม่พึงประสงค์ของยาได้มากมายหลายชนิด ความผิดแผกทางพันธุกรรมที่มีผลต่อการออกฤทธิ์ของยาเหล่านี้เรียกว่าผลทางเภสัชพันธุศาสตร์ (pharmacogenetics) ซึ่งจะแตกต่างจากความผิดแผกทางพันธุกรรมของระบบเมตาบอลิซึมชนิดอื่น ๆ โดยผู้ที่มีความผิดแผกทางพันธุกรรมชนิดนี้จะไม่แสดงอาการผิดปกติใด ๆ จนกว่าจะได้รับยาที่ถูกเปลี่ยนรูปโดยเอนไซมนั้น ๆ ซึ่งในบางกรณีอาจก่อให้เกิดอาการข้างเคียงหรืออาการพิษของยาอย่างรุนแรงถึงแก่ชีวิตได้

Cytochromes P450 (CYP) เป็นกลุ่มเอนไซม์ที่สำคัญชนิดหนึ่ง ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวเร่ง (catalyze) การเปลี่ยนแปลงของสารเคมีต่าง ๆ ทั้งที่เป็นสารเคมีที่มีอยู่ภายในร่างกายเอง (เช่น fatty acids, bile acid, biogenic amines, eicosanoids และ steroid hormones) และสารที่ได้รับจากภายนอก (xenobiotics) เช่น ยา สารเคมีต่าง ๆ จากสิ่งแวดล้อม สารก่อมะเร็ง และสารพิษจากพืชและสัตว์ (Guengerich, 1993) ปัจจุบันพบว่า CYP ในสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ มีอยู่มากมายหลายชนิด ซึ่งสามารถแยกเป็นตระกูล (family) ได้ไม่น้อยกว่า 265 families เฉพาะในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมขณะนี้ผู้ค้นพบและรายงาน CYP ไว้แล้วมากถึง 18 families (<http://dnrmelson.utm.edu/famcount.html>) สำหรับ CYP ในมนุษย์ซึ่งทำหน้าที่เปลี่ยนแปลงยาและ xenobiotics ส่วนมากจะอยู่ใน family ที่ 1 ถึง family ที่ 3 โดยความสามารถในการทำงานของ CYP เหล่านี้มีโอกาสแตกต่างกันได้ในแต่ละบุคคล ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับอิทธิพลทางสิ่งแวดล้อมและลักษณะทางพันธุกรรมของยีนที่ทำหน้าที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ เป็นผลให้อัตราการเปลี่ยนแปลงหรือทำลายยาในแต่ละบุคคลแตกต่างกัน และส่งผลให้เกิดความแตกต่างของประสิทธิภาพในการรักษา รวมทั้งโอกาสที่จะเกิดอาการข้างเคียง และอาการพิษจากการใช้ยาบางชนิดด้วย (Daly, 1995; Guengerich et al., 1987; Meyer and Zanger, 1997)

โครงการการวิจัยนี้มุ่งศึกษาเฉพาะความผิดแผกทางพันธุกรรมของ CYP2C19 เนื่องจากความสามารถของเอนไซม์ชนิดนี้มีโอกาสแตกต่างกันได้มากในแต่ละบุคคล (Kupfer and Preisig, 1984a)

โดยที่บางคนอาจมีการผ่าเหล่าของยีน *CYP2C19* ทำให้ไม่สามารถสังเคราะห์เอนไซม์ชนิดนี้ได้ หรือเป็นผลให้เอนไซม์ที่สังเคราะห์ขึ้นมาบกพร่องไม่สามารถทำหน้าที่ได้เท่าที่ควร ส่งผลให้การกำจัดยาออกจากร่างกายของบุคคลนั้นช้ากว่าปกติ จึงนิยมเรียกบุคคลกลุ่มนี้ว่าเป็น Poor Metabolizer (PM) ซึ่งตรงข้ามกับบุคคลที่มีระดับเอนไซม์ปกติสามารถกำจัดยาได้เร็ว (Extensive Metabolizer, EM) ความผิดปกติของยีน *CYP2C19* นี้อาจตรวจวินิจฉัยได้จากลักษณะยีนของแต่ละบุคคล (genotyping) (Goldstein and Blaisdell, 1996) เท่าที่ผู้วิจัยทราบยังไม่มีการศึกษาวิจัยอย่างละเอียดและถูกต้องในประเทศไทยจำนวนที่มากพอถึงลักษณะการกระจายตัวของความผิดปกติทางพันธุกรรมของยีน *CYP2C19* มีเพียงข้อมูลการศึกษาในชนชาติอื่นเช่น ชาวยุโรป อเมริกา จีน หรือญี่ปุ่น ดังนั้นการวิจัยครั้งนี้จึงมุ่งศึกษาถึงชนิดและความถี่ของลักษณะทางพันธุกรรม (mutant alleles) ของยีน *CYP2C19* แบบต่างๆ เพื่อคาดคะเนอัตราความชุกของ PM ในประชากรไทย ซึ่งข้อมูลที่ได้น่าจะช่วยให้บุคลากรทางการแพทย์สามารถวางแผนบริหารการใช้ยาในผู้ป่วยชาวไทยได้อย่างมีประสิทธิภาพ และปลอดภัยยิ่งขึ้น นอกจากนี้ยังเป็นการพัฒนาความร่วมมือในวิธีการตรวจวินิจฉัยระดับยีน ซึ่งในอนาคตจะมีบทบาทในทางการแพทย์มากยิ่งขึ้น

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. เพื่อศึกษาลักษณะทางพันธุกรรม (genotype) ของยีน *CYP2C19* ในเชิงชนิดและการกระจายตัวของ allele ต่าง ๆ ประชากรไทยในแต่ละภูมิภาคต่าง ๆ ของประเทศ
2. เพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะทางพันธุกรรม (genotype) และลักษณะการแสดงออก (phenotype) ของเอนไซม์ *CYP2C19* ในประชากรไทย
3. เพื่อค้นหาลักษณะการกลายพันธุ์ของยีน *CYP2C19* ในประชากรไทยชนิดต่าง ๆ รวมทั้งชนิดใหม่ ที่ยังไม่มีผู้รายงานในเอกสารตีพิมพ์ทางวิชาการใด ๆ มาก่อน
4. เพื่อเสนอแนวทางการปรับใช้ขนาดยาบางชนิด (เช่น omeprazole) ที่ถูกเปลี่ยนรูปโดยเอนไซม์ *CYP2C19* สำหรับผู้ป่วยชาวไทยที่มีลักษณะทางเภสัชพันธุกรรมแตกต่างกัน

1.3 ขอบเขตการวิจัย

การวิจัยนี้มุ่งศึกษาเฉพาะลักษณะทางพันธุกรรมของยีน *CYP2C19* ในอาสาสมัครชาวไทยทั้งในระดับภูมิภาค และระดับประเทศ เพื่อประมาณความชุกของยีน *CYP2C19* แบบต่างๆ โดยเฉพาะ *CYP2C19*2* และ *CYP2C19*3* ซึ่งเป็น mutant allele ที่พบมากในประชากรเชื้อชาติต่างๆ และค้นหาลักษณะพันธุกรรมของ *CYP2C19* ที่อาจเป็นแบบใหม่ในชาวไทย โดยเทคนิคเชิงอนุชีววิทยา รวมทั้งมุ่งศึกษาการแสดงออกของเอนไซม์ *CYP2C19* ในประชากรไทย โดยการใช้ยา omeprazole เป็นตัววัดเพื่อเชื่อมโยงความรู้จากศาสตร์พื้นฐานกับการนำไปใช้ประโยชน์ในทางคลินิก

การวิจัยนี้ได้รับความเห็นชอบจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น (HE 44090)

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากโครงการวิจัย

1. ทำให้ทราบข้อมูลความถี่ในการกระจายตัวของ PM ในประชากรไทยซึ่งข้อมูลที่ได้นี้แพทย์สามารถใช้เป็นแนวทางเลือกใช้ยา และปรับขนาดการใช้ยาบางชนิดสำหรับประชากรไทยได้อย่างเหมาะสมและมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น
2. ทำให้ทราบถึงชนิดและความถี่ของความผิดปกติของ *CYP2C19* allele แบบต่างๆในประชากรไทยแต่ละภาค
3. ทำให้ทราบความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะทางพันธุกรรมของยีน *CYP2C19* และเภสัชจลนศาสตร์ของยาที่เป็น substrate ของเอนไซม์นี้ เพื่อใช้เป็นแนวทางในการปรับขนาดยาในผู้ป่วยที่มีลักษณะทางพันธุกรรมของยีน *CYP2C19* แบบต่างๆ ข้อมูลที่ได้จะมีส่วนช่วยให้แพทย์สามารถเลือกใช้ยา รวมทั้งปรับขนาดของยาในผู้ป่วยเพื่อหลีกเลี่ยงอาการพิษหรืออาการข้างเคียงของยารวมทั้งเพื่อให้การใช้ยาเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพ
4. เพื่อเป็นการพัฒนานักวิจัยให้มีความชำนาญในการศึกษาและวิจัยด้านเภสัชพันธุศาสตร์เพื่อนำไปสู่การวิจัยทางเภสัชพันธุศาสตร์อื่นๆ ซึ่งจะมีส่วนช่วยให้การเลือกใช้ยาในประชากรไทยเป็นไปอย่างถูกต้องและมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้นในอนาคต

บทที่ 2

วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

เอนไซม์ CYP2C19 เดิมมีชื่อเรียกว่า *S-mephenytoin hydroxylase* เนื่องจากพบว่าเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เปลี่ยนรูปยา mephenytoin ซึ่งขณะนั้นนิยมใช้เป็นยากันชัก ยาชนิดนี้ในทางเคมีจะอยู่ในรูปผสมระหว่าง *S-* และ *R-enantiomer* โดยยาที่อยู่ในรูป *S-enantiomer* จะถูกเปลี่ยนแปลงภายในร่างกายโดยปฏิกิริยา hydroxylation ที่ตำแหน่ง para ขณะที่รูปของ *R-enantiomer* จะถูกเปลี่ยนแปลงโดยปฏิกิริยา *N-demethylation* ต่อมาเอนไซม์ชนิดนี้ได้รับความสนใจเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากพบว่าประสิทธิภาพของเอนไซม์ *S-mephenytoin hydroxylase* ในบุคคลแต่ละบุคคลมีโอกาสดกต่างกันได้มาก (Kupfer and Preisig, 1984a) เนื่องจากความผิดแผกทางพันธุกรรมของจีนที่ควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ โดยชาวคอเคเซียน เช่น ในยุโรป และอเมริกา ประมาณร้อยละ 3-5 และในชาวญี่ปุ่นและจีน ร้อยละ 9-23 ของประชากรจะมีความบกพร่องของปฏิกิริยา *p-hydroxylation* ทำให้ไม่สามารถกำจัด *S-mephenytoin* ออกจากร่างกายได้ดีเท่าที่ควร (จัดเป็นประชากร PM) (Jurima et al., 1985) ทำให้บุคคลกลุ่มนี้มีโอกาสสะสมยา mephenytoin ในร่างกายได้มาก ทำให้มีโอกาสเกิดพิษของยาได้มากกว่าคนส่วนใหญ่ที่กำจัดยาได้ดีในอัตราปกติ การศึกษาต่อมาทำให้ทราบว่าความผิดแผกทางพันธุกรรมชนิดนี้สามารถถ่ายทอดไปสู่ทายาทรุ่นต่อ ๆ ไปได้แบบ autosomal recessive (Kupfer and Preisig, 1984)

ในปัจจุบัน mephenytoin เป็นยาที่ไม่นิยมใช้แล้วในทางคลินิก เนื่องจากให้ผลการรักษาไม่น่าเชื่อถือ รวมทั้งมีอาการข้างเคียงค่อนข้างสูง แต่เอนไซม์ *S-mephenytoin hydroxylase* หรือ CYP2C19 นี้ก็ยังคงได้รับความสนใจศึกษาต่อเนื่องกันมา เนื่องจากมีผู้พบว่าเป็นเอนไซม์หลักที่ทำหน้าที่เปลี่ยนแปลงยาที่ใช้ในทางคลินิกชนิดอื่นๆ อีกหลายชนิดเช่น citalopram, carisoprodol, diazepam, hexobarbital, imipramine, lansoprazole, mephobarbital, omeprazole, propranolol, proguanil และ pantoprazole (Andersson, 1996; Meyer and Zanger, 1997) ดังนั้นความแตกต่างทางพันธุกรรมของเอนไซม์นี้จึงมีผลต่อการตอบสนองในการรักษาของยาเหล่านี้ รวมทั้งมีโอกาสเกิดอาการข้างเคียงหรืออาการพิษจากยาเหล่านี้ได้แตกต่างกันด้วย ตัวอย่างเช่น ผู้ป่วยกลุ่ม PM มีโอกาสเกิดอาการข้างเคียงจากยา mephenytoin, mephobarbital และ hexobarbital เพิ่มมากกว่าผู้ที่เป็น EM (Kupfer and Preisig, 1984a) รายงานการวิจัยเมื่อไม่นานมานี้ยังพบว่า omeprazole สามารถลดกรดในกระเพาะอาหาร รวมทั้งเพิ่มปริมาณ gastrin ในพลาสมาของอาสาสมัครที่เป็น PM ได้ดีกว่าผู้ที่เป็น EM (Furata et al., 1999) และพบว่าอัตราในการกำจัดเชื้อ *H. pylori* โดยการใช้ omeprazole ร่วมกับ amoxicillin ในผู้ป่วยกลุ่มที่เป็น PM จะสูงกว่าผู้ป่วยกลุ่ม EM (Furata et al., 1998) นอกจากนี้แล้วยังมีผู้เสนอว่า

ยาป้องกันมาลาเรีย proguanil อาจใช้ไม่ได้ผลในผู้ป่วยที่เป็น PM เนื่องจากบุคคลเหล่านี้ไม่สามารถเปลี่ยน proguanil ให้อยู่ในรูป active metabolite ที่มีฤทธิ์ป้องกันมาลาเรียได้ และการใช้ยานี้ในผู้ป่วย PM อาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เชื้อ *Plasmodium falciparum* เกิดการดื้อยาเพิ่มขึ้น (Watkins et al., 1987) และยังมีงานวิจัยบางรายงานพบว่าผู้ที่ เป็น PM ของ CYP2C19 มีโอกาสเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งบางชนิดเพิ่มขึ้นด้วย (Chen, 1991)

แม้ว่าความแตกต่างทางพันธุกรรมของเอนไซม์ S-mephenytoin hydroxylase ได้รับการศึกษา มาตั้งแต่ทศวรรษ 1980s แต่การค้นพบว่าเอนไซม์ชนิดนี้เป็นสมาชิกตัวหนึ่งในกลุ่ม CYP2C subfamily ที่มีชื่อว่า CYP2C19 เพิ่งถูกรายงานเมื่อไม่นานมานี้ (Goldstein et al., 1994; Wrighton et al., 1993) โดยจีน CYP2C19 ประกอบด้วย 9 exons และสร้างเอนไซม์ซึ่งเป็นโปรตีนประกอบด้วย amino acid จำนวน 490 ตัว จากการวิเคราะห์ลักษณะทางพันธุกรรมของจีน CYP2C19 ในผู้ที่ เป็น PM มักพบว่าการผ่าเหล่าของ nucleic acid เกิดขึ้นบนบางตำแหน่งของจีนเป็นผลให้ไม่มีการสร้างเอนไซม์ CYP2C19 หรือเอนไซม์ CYP2C19 ที่สร้างขึ้นมามีความผิดปกติและไม่สามารถทำงานได้ ลักษณะความผิดปกติทางพันธุกรรมของจีน CYP2C19 เท่าที่มีรายงานจนถึงขณะนี้ใน ประชากรต่างๆ มีอยู่ประมาณ 11 allelic variants (ดังแสดงในตารางที่ 1) และรายละเอียดโดยสังเขปของ CYP2C19 allelic variants ที่สำคัญดังต่อไปนี้

CYP2C19*1A และ CYP2C19*1B เป็น wild-type allele ของ CYP2C19 ที่สามารถทำงานได้ปกติ CYP2C19*1B ต่างจาก CYP2C19*1A ตรงที่มีการผ่าเหล่า (mutation) ของ nucleic acid ใน exon 1 ที่ตำแหน่ง 99 จาก C เป็น T (C99T) แต่การผ่าเหล่านี้เป็น silent mutation จึงไม่มีผลกระทบต่อการสร้างเอนไซม์

CYP2C19*2 (m1) เป็น allelic variant ที่เกิดจากการผ่าเหล่าใน exon 5 ที่ตำแหน่ง 681 (G681A) ของ CYP2C19 จาก G เป็น A ทำให้เกิด aberrant splice site และเกิด premature stop codon ดังนั้นเอนไซม์ CYP2C19 ที่ถูกสร้างขึ้นมามีขนาดสั้นเพียง 234 amino acid และไม่มีส่วนที่เป็น heme binding region ทำให้เอนไซม์ทำงานไม่ได้ (de Morais et al., 1994b)

CYP2C19*3 (m2) มีการผ่าเหล่าใน exon 4 ที่ตำแหน่ง 636 จาก G เป็น A (G636A) ทำให้เกิด premature stop codon (de Morais et al., 1994a)

CYP2C19*4 (m3) มีการผ่าเหล่าของ initiation codon ของ CYP2C19 จาก ATG กลายเป็น GTG ทำให้ไม่สามารถสร้างเอนไซม์ขึ้นมาได้ (Ferguson et al., 1998)

CYP2C19*5 (m4) มีการผ่าเหล่าของ CYP2C19 ใน exon 9 ที่ตำแหน่ง 1297 จาก C เป็น T (C1297T) ทำให้มีการเปลี่ยน amino acid ที่ตำแหน่ง 433 ซึ่งเป็นส่วนของ heme binding region จาก Arg เป็น Trp ส่งผลให้เอนไซม์ที่สร้างขึ้นมามีการทำงานไม่ได้ (Ibeanu et al., 1998a)

CYP2C19*6 (m5) เป็น mutant allele ที่ค้นพบใน PM ชาวสวิส โดยมีการผ่าเหล่าของใน exon 3 ที่ตำแหน่ง 395 จาก G เป็น A (G395A) ทำให้ amino acid ที่ตำแหน่ง 132 เปลี่ยนจาก Arg เป็น Gln ส่งผลให้เอนไซม์ที่ถูกสร้างขึ้นมามีการทำงานไม่ได้ (Ibeanu et al., 1998b)

CYP2C19*7 (m6) เป็น mutant allele ที่พบใน PM ชาวเดนมาร์ก โดยมีการผ่าเหล่าจาก T เป็น A ที่ 5' donor splice site ของ intron 5 ทำให้เกิด splicing error ไม่สามารถสร้างเอนไซม์ได้ (Ibeanu et al., 1999)

CYP2C19*8 mutant allele ชนิดนี้ ถูกค้นพบใน PM ชาวฝรั่งเศส โดยมีการผ่าเหล่าใน exon 3 ที่ตำแหน่ง 358 จาก T เป็น C (T358C) ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของ amino acid ที่ตำแหน่ง 120 จาก Trp เป็น Arg (Ibeanu et al., 1999)

CYP2C19*9 mutant allele ชนิดนี้ ถูกค้นพบในชาวแอฟริกัน โดยมีการผ่าเหล่าที่ตำแหน่ง 431 จาก G เป็น A (G431A) ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของ amino acid ที่ตำแหน่ง 144 จาก Arg เป็น His (Blaisdell et al., 2002)

CYP2C19*10 mutant allele ชนิดนี้ ถูกค้นพบในชาวแอฟริกัน โดยมีการผ่าเหล่าที่ตำแหน่ง 680 จาก C เป็น T (C680T) ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของ amino acid ที่ตำแหน่ง 227 จาก Pro เป็น Leu (Blaisdell et al., 2002)

CYP2C19*11 mutant allele ชนิดนี้มีการผ่าเหล่าที่ตำแหน่ง 449 จาก G เป็น A (G449A) ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของ amino acid ที่ตำแหน่ง 150 จาก Arg เป็น His (Blaisdell et al., 2002)

CYP2C19*12 mutant allele ชนิดนี้ถูกค้นพบในชาวแอฟริกัน โดยมีการผ่าเหล่าที่ตำแหน่ง 1473 จาก A เป็น C (A1473C) ส่งผลให้เอนไซม์ที่สังเคราะห์ขึ้นมามีจำนวน amino acid (Cys) เพิ่มขึ้นอีกหนึ่งตัว (Blaisdell et al., 2002)

CYP2C19*13 mutant allele ชนิดนี้มีการผ่าเหล่าที่ตำแหน่ง 1228 จาก C เป็น T (C1228T) ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของ amino acid ที่ตำแหน่ง 410 จาก Arg เป็น Cys (Blaisdell et al., 2002)

CYP2C19*14 mutant allele ชนิดนี้มีการผ่าเหล่าที่ตำแหน่ง 50 จาก T เป็น C (T50C) ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของ amino acid ที่ตำแหน่ง 17 จาก Leu เป็น Pro (Blaisdell et al., 2002)

CYP2C19*15 mutant allele ชนิดนี้มีการผ่าเหล่าที่ตำแหน่ง 55 จาก A เป็น C (T55C) ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของ amino acid ที่ตำแหน่ง 19 จาก Ile เป็น Leu (Blaisdell et al., 2002)

ตารางที่ 1 CYP2C19 allelic variants ที่มีรายงานในปัจจุบัน

Allele	Protein	Nucleotide changes	Trivial name	Effect	Enzyme activity	
					In vivo	In vitro
CYP2C19*1A	CYP2C19.1A	None	wt1		Normal	Normal
CYP2C19*1B	CYP2C19.1B	99C>T; 991A>G	wt2	I331V	Normal	
CYP2C19*1C	CYP2C19.1B	991A>G		I331V	Normal	
CYP2C19*2A		99C>T; 681G>A; 990C>T; 991A>G	m1; m1A	splicing defect	None	
CYP2C19*2B		99C>T; 276G>C; 681G>A; 990C>T; 991A>G	m1B	splicing defect; E92D	None	
CYP2C19*3		636G>A; 991A>G; 1251A>C	m2	stop codon	None	
CYP2C19*4		1A>G; 99C>T, 991A>G	m3	GTG initiation codon	None	
CYP2C19*5A	CYP2C19.5A	1297C>T	m4	R433W	None	None
CYP2C19*5B	CYP2C19.5B	99C>T; 991A>G; 1297C>T		I331V; R433W	None	
CYP2C19*6	CYP2C19.6	99C>T; 395G>A; 991A>G	m5	R132Q; I331V	None	None
CYP2C19*7		IVS5+2T>A		splicing defect	None	
CYP2C19*8	CYP2C19.8	358T>C		W120R	None	Decrease
CYP2C19*9	CYP2C19.9	99C>T; 431G>A; 991A>G		R144H; I331V		Decrease
CYP2C19*10	CYP2C19.10	99C>T; 680C>T; 991A>G		P227L; I331V		Decrease
CYP2C19*11	CYP2C19.11	99C>T; 449G>A; 991A>G		R150H; I331V		
CYP2C19*12	CYP2C19.12	99C>T; 991A>G; 1473A>C		I331V; X491C; 26 extra amino acid		Unstable
CYP2C19*13	CYP2C19.13	991A>G; 1228C>T		I331V; R410C		
CYP2C19*14	CYP2C19.14	50T>C; 99C>T; 991A>G		L17P; I331V		
CYP2C19*15	CYP2C19.15	55A>C; 991A>G;		I19L; I331V		

แหล่งที่มา : <http://www.imm.ki.se/CYPalleles/cyp2c19.htm>

การทบทวนงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่า 75-80% ของชาวจีน, ญี่ปุ่น และ เกาหลี ที่เป็น PM เป็นผลมาจากความผิดปกติของยีน *CYP2C19* แบบ *CYP2C19*2* (m1) ส่วนที่เหลืออีก 20-25% เป็น PM จะเป็นผลจากพันธุกรรมแบบ *CYP2C19*3* (m2) (Brosen et al., 1995; de Morais et al., 1995; de Morais et al., 1994a; Goldstein et al., 1997) เป็นที่น่าสังเกตว่าขณะที่ส่วนใหญ่ของชาวเอเชียตะวันออกไกลที่เป็น PM เกิดจากความผิดปกติของยีน *CYP2C19* แบบ *CYP2C19*2* และ *CYP2C19*3* แต่ mutant alleles ทั้งสองชนิดนี้พบเพียง 86-87% ในชาวมิซาวาคเคเซียนที่เป็น PM (Goldstein et al., 1997) โดยการวิจัยเมื่อเร็วๆ นี้รายงานว่า PM ชาวยุโรปเกิดจากมี *CYP2C19* gene เป็นแบบ *CYP2C19*4* (m3) ประมาณ 3% (Ferguson et al., 1998) และเป็นแบบ *CYP2C19*5B* อีกประมาณ 1-5% (Ferguson et al., 1998; Ibeanu et al., 1998a) สำหรับ *CYP2C19*5A* ซึ่งคล้ายคลึงกับ *CYP2C19*5B* พบเฉพาะในชนกลุ่มน้อยของจีนเผ่า Bai แต่ไม่พบในประชากรจีนเผ่า Han ซึ่งเป็นประชากรหลักของประเทศจีน อย่างไรก็ตาม variant allele ชนิดนี้มีค่า allele frequency ต่ำมาก (0.25%) (Xiao et al., 1997)

ส่วน allelic variant ของ *CYP2C19* ชนิดอื่นๆ ที่เหลือนักพบน้อยค่อนข้างน้อย ดังนั้นจึงเห็นได้ว่าความผิดปกติทางพันธุกรรมของยีน *CYP2C19* เท่าที่ค้นพบในปัจจุบันสามารถทำนายลักษณะการแสดงออก (phenotype) ของ *CYP2C19* ในชาวเกาหลี จีน และ ญี่ปุ่น เกือบ 100% แต่จะครอบคลุมเพียง 93% เท่านั้นในชาวมิซาวาคเคเซียน (Ibeanu et al., 1999) แสดงให้เห็นว่าน่าจะมีความผิดปกติที่ตำแหน่งอื่นๆ ของยีน *CYP2C19* ที่ส่งผลทำให้เกิดความบกพร่องในการทำงานของเอนไซม์ *CYP2C19* ซึ่งจะต้องศึกษาค้นคว้าต่อไปอีก

สำหรับความแตกต่างทางพันธุกรรมของ *CYP2C19* ในประชากรไทยยังมีข้อมูลน้อยมากและไม่ชัดเจน เท่าที่ทราบมีเพียงรายงานการวิจัยของ Edstein และคณะ ในปี ค.ศ.1994 ที่ได้ศึกษาลักษณะการแสดงออก (phenotype) ของเอนไซม์ *CYP2C19* ในอาสาสมัครที่เป็นทหารเรือไทยที่อาศัยในภาคกลางของประเทศ โดยใช้ proguanil/cycloguanil ratio เป็นดัชนีในการวัด และพบประชากรที่เป็น PM ประมาณ 18 % มีข้อสังเกตว่าในการศึกษาของ Edstein และคณะนั้นลักษณะความถี่ของค่า proguanil/cycloguanil ratio ในพลาสมาของประชากรที่ศึกษามีการกระจายตัวเป็นแบบ unimodal ไม่ใช่ bimodal และผู้วิจัยคณะนี้ได้คำนวณสัดส่วนของประชากรที่เป็น PM โดยอาศัยค่า cut point ที่มากกว่า 10 ตามที่เคยมีผู้เสนอมา

คณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษาสำรวจถึงลักษณะการแสดงออก (phenotype) รวมทั้งลักษณะทางพันธุกรรม (genotype) ของ *CYP2C19* ในประชากรไทยอีสาน จำนวน 55 คน (Tawalee et al., 1999) พบว่าการกระจายความถี่ของค่า omeprazole metabolic ratio (MR) ซึ่งเป็นดัชนีที่ใช้วัดความสามารถในการทำงานของ *CYP2C19* มีลักษณะเป็น bimodal โดยมีสัดส่วนของ PM ประมาณ 7.3% จากการคำนวณยังพบว่าความถี่ของ *CYP2C19*1* และ *CYP2C19*2* allele มีค่าประมาณ 0.73 และ 0.23 ตามลำดับ ซึ่งใกล้เคียงกับที่มีผู้เคยรายงานไว้ในประชากรญี่ปุ่น แต่มีค่าสูงกว่าที่พบในชาวยุโรป และอเมริกัน (Goldstein et al., 1997) ส่วนความถี่ของ *CYP2C19*3* allele พบประมาณ 0.03 ซึ่งต่ำกว่าที่มีผู้เคยรายงานไว้ในประชากรเอเชียอื่นๆ นอกจากนี้ยังพบว่าอาจมีความ

ผิแตกของจีน *CYP2C19* ชนิดใหม่ ซึ่งอาจเป็นชนิดที่ยังไม่มีผู้ค้นพบที่เป็นสาเหตุให้การทำงานของเอนไซม์บกพร่องในประชากรกลุ่มนี้

ซึ่งความแตกต่างของความผิแตกของ *CYP2C19* ในประชากรไทยที่ศึกษาโดยกลุ่มของ Edstein (Edstein et al., 1994) และกลุ่มของผู้วิจัยอาจเป็นผลเนื่องมาจากประชากรไทยในแต่ละภูมิภาคอาจมีความชุกของ *CYP2C19* PM ที่แตกต่างกัน หรือเกิดจากความไม่เหมาะสมของการใช้สัดส่วน proguanil/ cycloguanil ในพลาสมาในการเป็นดรรชนีชี้วัดการทำงานของเอนไซม์ *CYP2C19* ในร่างกาย ทั้งนี้เนื่องจากมีผู้รายงานว่าการใช้ค่าสัดส่วน proguanil/cycloguanil เป็นดรรชนีวัดการแสดงออกของ *CYP2C19* อาจทำให้เกิดความผิดพลาดในการแยกกลุ่มระหว่าง heterozygous EM และ PM เนื่องจากการคาบเกี่ยวกันของค่า proguanil/cycloguanil ratio (Kaneko et al., 1997) ดังนั้นถึงแม้ว่าค่า proguanil/cycloguanil ratio ที่คำนวณได้จะมีค่ามากกว่า 10 แต่บางคนอาจไม่ได้เป็น PM จึงทำให้สัดส่วนของ PM ที่ผู้วิจัยกลุ่ม Edstein คำนวณได้สูงกว่าที่ควรจะเป็น ในทางตรงข้ามสัดส่วนของ 5-hydroxyomeprazole/omeprazole ในพลาสมาจะเป็นดรรชนีชี้วัดการทำงานของเอนไซม์นี้ที่ได้รับความนิยมมากในปัจจุบัน

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 สารเคมีใช้ในการทดลอง

Absolute ethanol, dichloromethane, isoamyl alcohol, isobutanol, methanol จาก Merck, Darmstadt, Germany Acetonitrile, boric acid จาก BDH Chemicals Ltd, Poole, England Agarose, ethidium bromide, ethylenediamine tetraacetic acid, glucose-6-phosphate dehydrogenase, β - nicotinamide adeninedinucleotide phosphate, proteinase K, phenacetin จาก Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA Chloroform, sodium chloride, disodium hydrogen orthophosphate, sodium dihydrogen orthophosphate จาก Farmitalia Carlo Erba, Italy Restriction enzymes (SmaI, BamHI) จาก New England Biolabs Inc., Beverly, MA, U.S.A สำหรับ Phenol, 100 bp DNA Ladder และ Taq Polymerase จาก Gibco BRL[®], Life Technologies, NY, U.S.A

5-Hydroxyomeprazole, omeprazole, omeprazole sulfone ได้รับการเอื้อเฟื้อจาก Dr. Kjell Andersson, Dr. Tommy Andersson. Astra Zeneca, Molndal, Sweden และ omeprazole capsules (Losec[®] 20 mg) ได้รับการสนับสนุนจาก AstraZeneca co. Ltd , Thailand

3.2 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

Autosampler (Intelligent sampler 851-AS) : Jusco Corporation, Tokyo, Japan

HPLC equipments (HPLC pump ;Waters 510, Multiwavelength programmable

detector; Waters 490 E, Integrator ;Waters 746): Millipore, Milford MA, USA

Thermocycler (Robocycler gradient 40): Stratagene[®], La Jolla, CA, U.S.A

Electrophoresis apparatus (power supply model 200/20): BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA

UV Light source (Electronic DuallightTM Transilluminator): Stuart Scientific Co. Ltd, UK

3.3 การศึกษาลักษณะการแสดงออก (phenotype) ของ CYP2C19

3.3.1 อาสาสมัคร

ในการศึกษาลักษณะการแสดงออกของ CYP2C19 อาสาสมัครจะต้องได้รับยา omeprazole โดยการรับประทานและจะต้องเก็บตัวอย่างเลือดเพื่อนำมาตรวจวัดปริมาณของยาและเมแทบอไลต์ ดังนั้นเพื่อความสะดวกในการเก็บตัวอย่างผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาลักษณะการแสดงออกของ CYP2C19 เฉพาะในประชากรชาวไทยอีสานเท่านั้น โดยมีเกณฑ์การรับเข้า (inclusion) และเกณฑ์การคัดออก (exclusion) ของอาสาสมัครดังต่อไปนี้

เกณฑ์การรับเข้า

- (a) มีเชื้อชาติและสัญชาติไทย รวมทั้งมีบรรพบุรุษเป็นชาวไทยอีสาน (อย่างน้อย 2 ชั่วอายุ)
- (b) มีอายุระหว่าง 17-60 ปี
- (c) มีสุขภาพดีตามเกณฑ์การวินิจฉัยของแพทย์ จากประวัติความเจ็บป่วย (medical history) การตรวจสมรรถภาพทางกาย (physical examination) และการตรวจทางห้องปฏิบัติการ (laboratory profile)
- (d) ต้องไม่มีประวัติ หรือเป็นโรคเกี่ยวข้องกับโรคตับ, ไต, ไวรัสตับอักเสบบ และต้องไม่มีประวัติแพ้ยา omeprazole หรือยาชนิดอื่นในกลุ่มเดียวกัน
- (e) ต้องไม่เป็นโรคพิษสุราเรื้อรัง ติดสารเสพติด หรือกำลังใช้ยากุมกำเนิด
- (f) ต้องไม่ได้รับ หรือใช้ยาชนิดใด ๆ ก่อนเข้าร่วมการทดลองไม่น้อยกว่า 14 วัน รวมทั้งในระหว่างการทดลอง เว้นแต่ยา หรือสารชนิดซึ่งผู้วิจัยเห็นว่าไม่มีผลต่อการทดลอง

เกณฑ์การคัดออก

- (a) ไม่สามารถปฏิบัติตามตัวควบคุมตามเงื่อนไขของการทดลอง
- (b) ไม่ยินยอมเข้าร่วมการทดลอง หรือขอยกเลิกกลางคันไม่ว่าจะด้วยเหตุผลใด ๆ

3.3.2 แผนการทดลอง

อาสาสมัครทุกคนจะต้องงดอาหารทุกชนิดหลังเที่ยงคืนก่อนวันทำการทดลอง ในเช้าของวันที่ทำการทดลอง อาสาสมัครจะได้รับการเก็บเลือดจากหลอดเลือดดำบริเวณแขน ประมาณ 5 -10 ml หลังจากนั้นอาสาสมัครแต่ละคนจะได้รับยา omeprazole 20 mg (Losec[®]) โดยรับประทานจำนวน 1 แคปซูล พร้อมทั้งดื่มน้ำตาม 1 แก้ว (200 ml) หลังจากนั้นทำการเก็บเลือด (5 -10 ml) จากหลอดเลือดดำที่แขน ที่เวลา 2 และ 3 ชั่วโมงหลังจากการรับประทานยา เลือดที่ได้จะถูกเก็บไว้ในหลอดทดลองที่มีสาร ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) เคลือบอยู่เพื่อป้องกันการแข็งตัวของเลือด จากนั้นนำไปปั่นแยกเม็ดเลือด และพลาสมาที่ความเร็ว 3000 rpm เป็นเวลา 15 นาที แยกพลาสมาเก็บไว้ที่ -20° C (เพื่อนำไปวัดความเข้มข้นของ omeprazole และ metabolites) ส่วนเม็ดเลือดขาวแยกเก็บที่ -80° C เพื่อนำไปสกัด gDNA (เพื่อนำไปศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของยีน CYP2C19)

ลักษณะการแสดงออก (phenotype) ของจีน *CYP2C19* ประเมินได้จากความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ในการเปลี่ยนรูปยา omeprazole ในอาสาสมัครแต่ละคน โดยอาศัยค่า hydroxylation index (HI) ซึ่งคำนวณได้จากอัตราส่วนความเข้มข้นของ omeprazole และความเข้มข้นของ metabolite คือ 5-hydroxyomeprazole ในพลาสมาของอาสาสมัคร ดังสูตรข้างล่างนี้

$$HI = \frac{[\text{Omeprazole}]}{[5\text{-hydroxyomeprazole}]}$$

3.3.3 การวิเคราะห์ความเข้มข้นของ omeprazole และ metabolites ในพลาสมา

การวิเคราะห์ความเข้มข้นของ omeprazole และ metabolites หลักทั้ง 2 ตัว คือ 5-hydroxyomeprazole และ omeprazole sulfone ในพลาสมาจะใช้เทคนิค high performance liquid chromatography (HPLC) ตามที่คณะผู้วิจัยได้เคยรายงานไว้ (Tassaneeyakul et al., 2000) คือ ปิเปตพลาสมา 1 ml ใส่ในหลอดทดลองที่มีฝาปิด หลังจากนั้น เติม 0.5 M sodium potassium phosphate buffer, pH 8.5 จำนวน 1 ml, phenacetin (0.1 mg/ml) จำนวน 80 μ l และ sodium chloride จำนวน 0.5 g ลงไป จากนั้นเติม dichloromethane : butanol (99 : 1) จำนวน 8 ml และเขย่าโดยใช้เครื่อง rotary mixture (Stuart Scientific Co. Ltd, UK) เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็ว 3000 rpm เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกชั้น organic และ aqueous phase ออกจากกัน ปิเปตเอาเฉพาะส่วนของ organic phase (ประมาณ 6 ml) ใส่ในหลอดทดลองหลอดใหม่ และนำไปประเหยให้แห้งภายใต้ก๊าซไนโตรเจนที่อุณหภูมิ 40°C นำสารตัวอย่างที่ได้ภายหลังจากการระเหยแห้งไปละลายด้วย mobile phase (50 mM phosphate buffer, pH 8.5: acetonitrile (80 : 20 , v/v) จำนวน 200 μ l และเขย่าโดยใช้ vortex mixer เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง เพื่อแยกตะกอนในสารละลายตัวอย่างที่ความเร็ว 10,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที นำสารละลายตัวอย่างส่วนที่ใสปริมาณ 50 μ l ฉีดเข้า HPLC column (Capcell Pak C18, Shiseido , Tokyo, Japan) ขนาด 3.9 $\times$ 300 mm โดย อัตราการไหล (flow rate) ของ mobile phase ที่ใช้คือ 1.0 ml/min วัดการดูดกลืนช่วงแสงของสารตัวอย่างที่ 303 nm โดยใช้ UV-Visible Spectrophotometer Detector (Waters 490E , Millipore, USA) ภายใต้สภาวะของโครมาโตกราฟที่กล่าวข้างต้น 5-hydroxy omeprazole, phenacetin (internal standard), omeprazole sulfone และ omeprazole จะมี retention time ที่ 9.1, 13.5, 15.9 และ 27.8 นาทีตามลำดับ

3.4 การศึกษาลักษณะทางพันธุกรรม (genotype) ของ *CYP2C19*

3.4.1 อาสาสมัคร

อาสาสมัครจะต้องมีเชื้อชาติและสัญชาติไทยที่มีภูมิลำเนาอยู่ในภาคเหนือ, ภาคกลาง, ภาคใต้ หรือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (ยกเว้น ชนกลุ่มน้อย เช่น ผู้ไท ไทยโซ่ง ไทยภูเขา ฯลฯ) โดยจะต้องมีบรรพบุรุษเป็นชาวไทยภูมิลำเนาที่นั่น ๆ อย่างน้อย 2ชั่วอายุ มีสุขภาพดีตามเกณฑ์การวินิจฉัยของ

แพทย์ จากประวัติความเจ็บป่วย (medical history) หรือการตรวจสภาพทางกาย (physical examination) และต้องเข้าร่วมการวิจัยครั้งนี้โดยสมัครใจ

3.4.2 การเตรียม genomic DNA

เม็ดเลือดขาวที่แยกได้จากเลือดของอาสาสมัครแต่ละคน จะถูกนำไปสกัด genomic DNA (gDNA) โดยมีรายละเอียดของวิธีการดังนี้คือ นำเม็ดเลือดขาวที่แยกได้ ใส่ในหลอดทดลองที่มีฝาปิด จากนั้นเติม Red cell lysis buffer (RCLB: 10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 5 mM MgCl₂; 10 mM NaCl) จำนวน 5 ml เขย่าแรงๆ ให้เข้ากันด้วยมือ แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที ขณะตั้งทิ้งไว้ ทำการกลับหลอดทดลอง 3 - 5 ครั้ง เพื่อให้เม็ดเลือดแดงถูกทำลายอย่างสมบูรณ์ จากนั้นนำไปปั่นด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็ว 3000 rpm เป็นเวลา 5 นาที เติสสารละลายใสชั้นบน (supernatant) ทิ้ง เหลือไว้เฉพาะชั้นตะกอน (pellet) หลังจากนั้นเติม RCLB อีกครั้ง จำนวน 3 ml และเขย่าให้เข้ากันด้วยมือ แล้วนำไปปั่นให้แยกชั้น เก็บเฉพาะชั้นตะกอนเพื่อนำไปสกัดต่อ โดยการเติม White cell lysis buffer (WCLB : 100 mM NaCl; 10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 25 mM EDTA; 0.5% SDS; 0.1 mg/ml proteinase K) จำนวน 1 ml ผสมให้เข้ากันโดยการปิเปตขึ้น-ลง จากนั้นนำไปวางในอ่างน้ำที่สามารถเขย่าได้ที่อุณหภูมิ 50°C ทิ้งไว้ข้ามคืนหรือจนกระทั่งเม็ดเลือดขาวถูกย่อยจนสมบูรณ์ จากนั้นเติม phenol : chloroform : isoamyl alcohol (25 : 24 : 1) จำนวน 1 ml ลงไปในหลอดทดลอง เขย่าให้เข้ากันด้วยมือ หลังจากนั้นนำไปปั่นให้แยกชั้นที่ความเร็ว 3000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ทำการดูดสารละลายใสชั้นบนใส่ในหลอดทดลองหลอดใหม่ เติม chloroform/isoamyl alcohol (24:1) จำนวน 1 ml ลงไปเขย่าให้เข้ากันด้วยมือ นำไปปั่นให้แยกชั้น หลังจากนั้นดูดเอาเฉพาะชั้นบนที่ใสใส่หลอดทดลองใหม่ เติม 7.5 M ammonium acetate จำนวน 200 µl และทำการตกตะกอน DNA โดยการเติม absolute ethanol ที่เย็นจัด (-20°C) จำนวน 2 ml ลงไป แล้วทำการปั่นแยกตะกอน gDNA ที่อุณหภูมิ 4°C, 12,000 rpm เป็นเวลา 30 นาที เติสสารละลายใสชั้นบนทิ้งไป เหลือแต่ตะกอน gDNA สีขาวที่ก้นหลอดทดลอง ล้าง gDNA ที่ได้โดยการเติม 70% ethanol ที่เย็นจัด จำนวน 1 ml นำตะกอน gDNA ที่ได้ ไปทำให้แห้งโดยการวางหลอดทดลองไว้บนแท่นเหล็กที่ควบคุมอุณหภูมิ (heatblock) ที่ 50°C gDNA ที่ได้จะถูกนำมาละลายด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ (sterile water) ปริมาณ 50 - 100 µl และ เก็บรักษาไว้ที่ -20°C เพื่อใช้เป็น template ในการตรวจวินิจฉัยลักษณะทางพันธุกรรมของ CYP2C19 โดยเทคนิค polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) ต่อไป

3.4.3 การตรวจวินิจฉัยลักษณะทางพันธุกรรมของ CYP2C19 โดยใช้เทคนิค PCR-RFLP

ลักษณะทางพันธุกรรมของ CYP2C19 gene ทั้ง 3 ชนิดคือ CYP2C19*1, CYP2C19* 2 และ CYP2C19*3 สามารถตรวจวินิจฉัยได้โดยใช้ เทคนิค PCR-based restriction analysis ตามวิธีการของ Goldstein และ Blaisdell (1996) โดยใช้ 5'- CAGAGCTTGGCATATTGTATC-3', 5'-GTAAACACACAAGTAGTCAATG- 3' และ 5'-AAATTGTTTCCAATCATTAGCT-3',

5'-ACTTCAGGGCTTGGTCAATA-3' สำหรับการตรวจวินิจฉัย *CYP2C19*2* และ *CYP2C19*3*, ตามลำดับ

PCR buffer สำหรับการตรวจวินิจฉัย *CYP2C19*2* (25 μ l) จะประกอบด้วย gDNA 200 ng; dATP, dCTP, dGTP และ dTTP อย่างละ 200 μ M; forward และ reverse primers ที่ specific กับ *CYP2C19*2* mutant allele อย่างละ 0.25 μ M; Taq DNA polymerase 1.25 unit; 10 mM Tris-HCl (pH 8.3); 50 mM KCl; 1.5 mM MgCl₂ จากนั้นนำหลอดทดลองที่บรรจุ PCR buffer นี้ไปใส่ในเครื่อง Thermocycler (Robocycler Stratagene[®], USA) ควบคุมเวลาและอุณหภูมิดังนี้คือ initial denaturation ที่ 94[°] C เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นตามด้วย denaturation ที่ 94[°] C เป็นเวลา 45 วินาที, annealing ที่ 53[°] C เป็นเวลา 45 วินาที และ extension ที่ 72[°] C เป็นเวลา 45 วินาที ติดต่อกัน จำนวน 37 รอบ ในช่วงสุดท้ายหลังจากครบ 37 รอบแล้วจะเพิ่มเวลาในขั้นตอน extension ขั้นสุดท้าย (final extention) ที่ 72[°] C ต่ออีก 5 นาที หลังจากนั้นนำ PCR product ที่ได้จำนวน 10 μ l มาใส่ในหลอดทดลองอันใหม่ที่บรรจุ 5 mM potassium acetate; 2 mM Tris acetate; 1 mM magnesium acetate; 0.1 mM DTT, pH 7.9 และ SmaI restriction enzyme จำนวน 10 unit ปริมาตรรวมเท่ากับ 20 μ l นำหลอดทดลองไปแช่ที่อุณหภูมิ 37[°] C ทิ้งไว้ข้ามคืน หลังจากนั้นนำ digestion product ที่ได้ไปวิเคราะห์แยกขนาดของ DNA fragment โดยใช้ 3% agarose gel

การตรวจวินิจฉัย *CYP2C19*3* จะทำเช่นเดียวกับการตรวจวินิจฉัย *CYP2C19*2* ทุกขั้นตอน ยกเว้นจะใช้ primer ซึ่ง specific กับ *CYP2C19*3* allele แทน และ PCR product จำนวน 10 μ l จะถูกนำมาใส่ในหลอดทดลองอันใหม่ที่บรรจุ 1 mM Tris-HCl, pH 8.0; 0.7 mM MgCl₂; 10 mM NaCl; 0.2 mM 2-mercaptoethanol; 0.001BSA และ Bam HI จำนวน 12 unit นำหลอดทดลองไปแช่ที่อุณหภูมิ 37[°] C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำ digestion products ที่ได้ไปวิเคราะห์ขนาดของ DNA fragments โดยใช้ 3% agarose gel โดยการเปรียบเทียบกับ 100 bp DNA marker ทำการบันทึกภาพ gel ที่ได้โดยใช้เครื่องบันทึกภาพ (Electronic Duallight[™] Transilluminator, Ultralum, Inc, USA)

3.5 การศึกษาเภสัชจลนศาสตร์ของยา omeprazole ในประชากรไทยซึ่งมีเภสัชพันธุกรรมของ *CYP2C19* gene แบบต่างๆ

อาสาสมัครที่เข้าร่วมการทดลองนี้จะจำแนกตาม *CYP2C19* genotype โดยมีเกณฑ์การรับเข้าและคัดออกดังข้อ 3.3.1 โดยอาสาสมัครแต่ละคนจะได้รับยา omeprazole ขนาด 20 mg โดยการรับประทานหลังจากอดอาหารหลังเที่ยงคืน เก็บเลือดจากหลอดเลือดดำที่แขนเป็นเวลา 0, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 12 ชั่วโมงหลังรับประทานยา ครั้งละ 5-10 ml ในหลอดเลือดดำที่มี EDTA เคลือบอยู่เพื่อป้องกันการแข็งตัวของเลือด จากนั้นนำไปปั่นแยกเม็ดเลือด และพลาสมาที่ความเร็ว 3000 rpm เป็นเวลา 15 นาที แยกพลาสมาเก็บไว้ที่ -20[°] C เพื่อนำไปวัดความเข้มข้นของ omeprazole และ metabolites

ข้อมูลปริมาณความเข้มข้นของ omeprazole และ metabolites ในเลือดที่ตรวจวัดได้จะถูกนำไปคำนวณค่าพารามิเตอร์ (parameters) ต่างๆ ทางเภสัชจลนศาสตร์ที่สำคัญของยาเช่น อัตราเร็วในการ

กำจัดยาออกจากร่างกาย (clearance) ค่าครึ่งชีวิต (half-life) ค่า area under the concentration-time curve (AUC) จากนั้นวิเคราะห์เปรียบเทียบพารามิเตอร์เหล่านี้ในอาสาสมัครแต่ละกลุ่มที่มีลักษณะทางพันธุกรรมของ *CYP2C19* ที่แตกต่างกัน

3.6 การวิเคราะห์ข้อมูลและสถิติ

ข้อมูลระดับยา omeprazole, 5-hydroxyomeprazole และ omeprazole sulfone ในพลาสมาที่เวลาต่าง ๆ จะถูกนำมาคำนวณพารามิเตอร์ทางเภสัชจลนศาสตร์ดังต่อไปนี้

- พื้นที่ใต้เส้นกราฟระหว่างความเข้มข้นของยาในพลาสมากับเวลาตั้งแต่เริ่มได้รับยา ถึง 12 ชม (AUC₀₋₁₂) คำนวณโดยใช้ Trapezoidal rule
- ระดับยาสูงสุดในพลาสมา (C_{max}) และ เวลาที่พบระดับยาสูงสุดในพลาสมา (T_{max}) วัดจากค่าจริงในพลาสมา
- T_{1/2} หรือ ค่าครึ่งชีวิตของยาในพลาสมา คำนวณโดยใช้ Kinetic r-strip program
- อัตราเร็วในการกำจัดยาออกจากร่างกาย (Cl, Clearance)

$$\text{คำนวณจากสูตร } Cl = \text{Dose} / \text{AUC}_{0-12}$$

สำหรับการคำนวณความถี่ของจีน *CYP2C19* (allele frequency) แต่ละแบบจะสามารถคำนวณได้จากอัตราส่วนระหว่างจำนวน allele แต่ละ allele ที่ตรวจพบในอาสาสมัครและจำนวน allele ทั้งหมดของจีน *CYP2C19* ของอาสาสมัครที่เข้าร่วมการทดลอง (หรือเท่ากับ 2 เท่าของจำนวนอาสาสมัครที่เข้าร่วมการทดลอง) ทั้งนี้เนื่องจากลักษณะทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตจะถูกควบคุมโดยจีนที่อยู่บนโครโมโซมซึ่งจะอยู่กันเป็นคู่ ๆ (allele)

การทดสอบ normality ของการกระจายของค่า HI ในประชากรที่ทำการศึกษาก็จะใช้ Shapiro-Wilk test สำหรับ Probit plot จะใช้เพื่อยืนยันว่าการกระจายของข้อมูลเป็น bimodal การทดสอบว่า observed และ estimated genotype frequency เป็นไปตาม Hardy-Weinberg equilibrium หรือไม่จะใช้ Chi-square test และ Z-test จะใช้สำหรับการเปรียบเทียบ Allele frequency ในประชากรแต่ละเชื้อชาติ การทดสอบความแตกต่างของค่าพารามิเตอร์ทางเภสัชจลนศาสตร์ในอาสาสมัครที่มีลักษณะทางพันธุกรรมของ *CYP2C19* แบบต่างๆจะใช้ ANOVA ซึ่งการทดสอบทางสถิติดังกล่าวจะใช้ Stata statistical software package (version 6, Stata Corp, TX, USA)

บทที่ 4

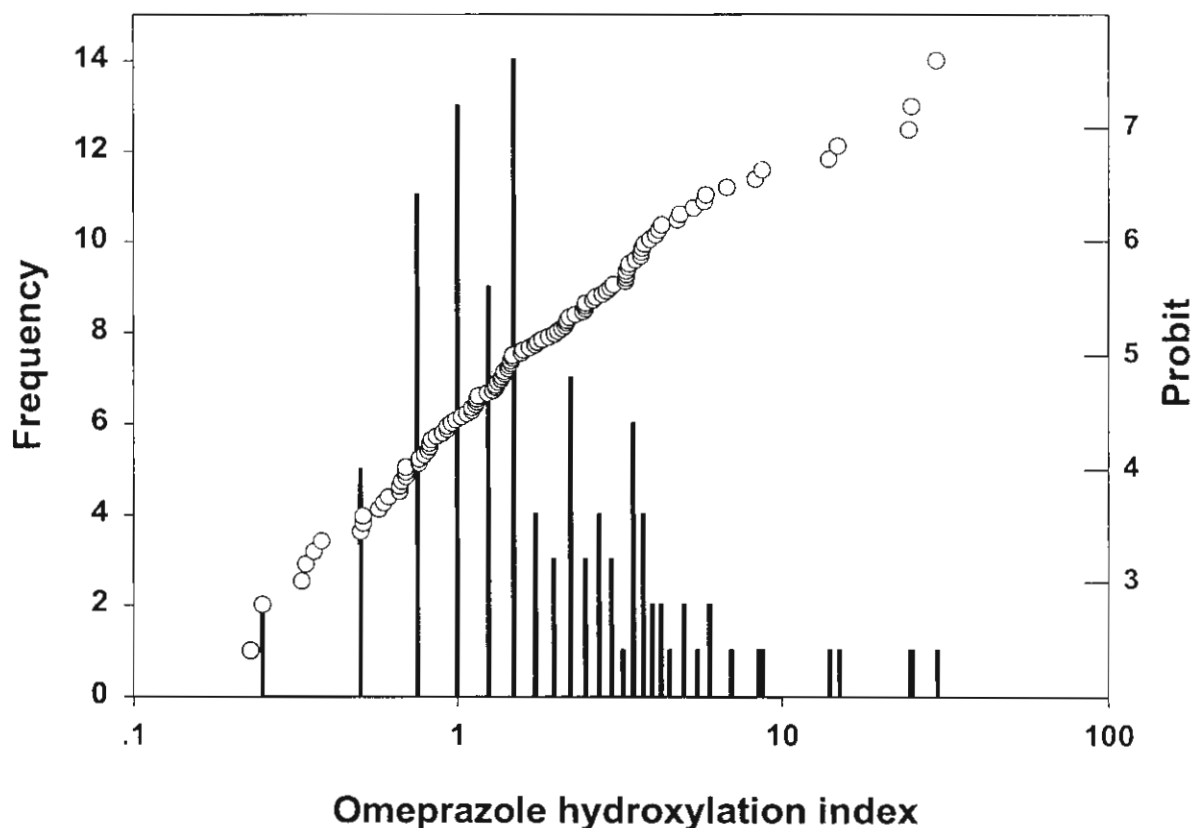
ผลการทดลอง

4.1 การศึกษาลักษณะการแสดงออกของ CYP2C19 ในประชากรชาวไทย

จากการศึกษาพบว่าที่เวลา 3 ชั่วโมงหลังรับประทานยา omeprazole น่าจะเป็นเวลาที่เหมาะสมที่สุดในการเก็บตัวอย่างเลือดเพื่อใช้ในการคำนวณค่า HI ทั้งนี้เนื่องจากอาสาสมัครบางคน (ประมาณ 2.7 % ของจำนวนอาสาสมัครที่เข้าร่วมการวิจัย) จะมีปัญหาในการดูดซึมยาที่ค่อนข้างช้ากว่าปกติ ทำให้ไม่สามารถวัดระดับของ omeprazole และ 5-hydroxyomeprazole ที่เวลา 2 ชั่วโมงหลังรับประทานยาได้

จากอาสาสมัครชาวไทยอีสานทั้งหมด 110 คน ที่เข้าร่วมการวิจัย ไม่พบว่ามีอาสาสมัครรายใดเกิดอาการข้างเคียงหลังจากได้รับยา omeprazole อย่างไรก็ตามพบว่าระดับของ omeprazole และ 5-hydroxyomeprazole ในพลาสมาที่เก็บที่เวลา 3 ชม. หลังจากรับประทานยาในอาสาสมัครจำนวน 3 คนมีค่าต่ำกว่าระดับที่สามารถตรวจวัดได้ (detection limit) ผู้วิจัยจึงได้คัดข้อมูลของอาสาสมัครกลุ่มนี้ออกจากการวิจัย ดังนั้นจึงเหลืออาสาสมัครที่เข้าร่วมการศึกษาลักษณะการแสดงออกและลักษณะทางพันธุกรรมของยีน CYP2C19 ทั้งหมดเพียง 107 คน

ภาพที่ 1 แสดงการกระจายความถี่ของค่า HI ในอาสาสมัครทั้งหมดที่เข้าร่วมการวิจัย จากการทดสอบการกระจายตัวของข้อมูลโดยใช้ Shapiro-Wilk test พบว่า การกระจายตัวของค่า HI ในประชากรกลุ่มนี้ มีการเบี่ยงเบนไปจากแบบโค้งปกติ (normal distribution) และผลจากการวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้ probit plot (ภาพที่ 1) แสดงให้เห็นชัดเจนว่า การกระจายตัวของค่า HI ในประชากรกลุ่มนี้เป็นแบบ biomodal distribution โดยอาจจัดแบ่งประชากรออกได้เป็น 2 กลุ่ม ได้แก่กลุ่มที่มีค่า HI ≥ 7.0 ซึ่งจะจัดเป็น PMs ส่วนกลุ่มที่มีค่า HI < 7.0 จะจัดเป็น EMs จากการศึกษาลักษณะการแสดงออกของ CYP2C19 โดยใช้ HI เป็นดัชนีในการวัดความสามารถของเอนไซม์ CYP2C19 ในอาสาสมัครทั้งหมด 107 คนนี้ พบว่า มีอาสาสมัครจำนวน 100 คน ที่จัดเป็น EMs เนื่องจากมีค่า HI ตั้งแต่ 0.23 ถึง 6.81 ส่วนที่เหลือ 7 คนซึ่งมีค่า HI ตั้งแต่ 8.73-29.59 จะจัดเป็น PMs จากการคำนวณพบว่าความถี่ (prevalence) ของ PM ในประชากรไทยอีสานจะมีค่าเท่ากับ 6.54% (95% CI, 1.86-11.22%)



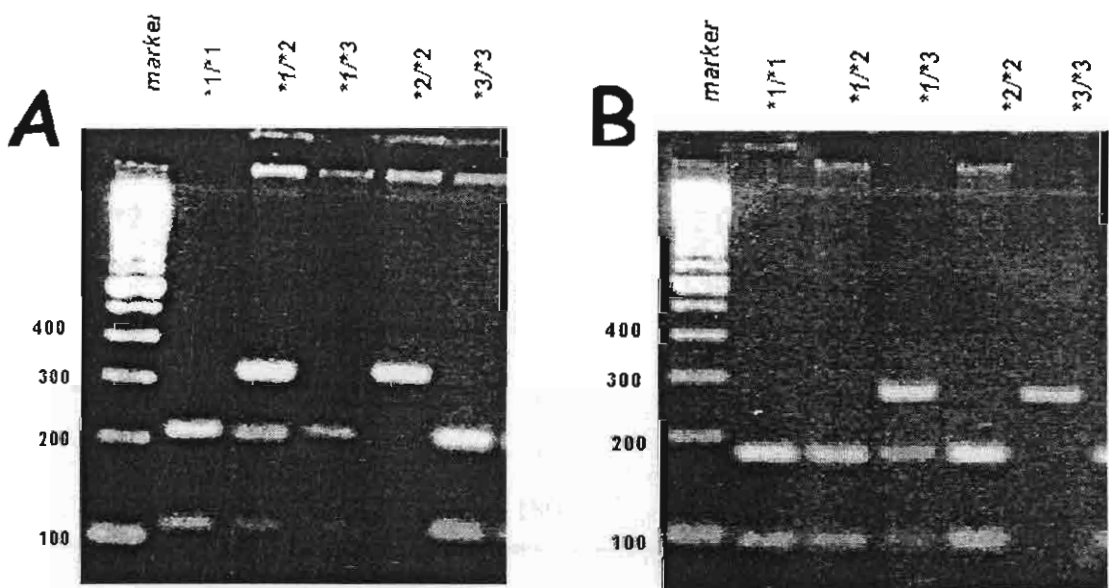
ภาพที่ 1 แสดงการกระจายตัวและ probit plot ของ omeprazole hydroxylation index ในอาสาสมัครชาวไทยอีสาน

จากการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของยีน *CYP2C19* ในอาสาสมัครจำนวน 107 คน (ตารางที่ 1) พบว่าในอาสาสมัครกลุ่มที่มีการแสดงออกของยีนนี้เป็นแบบ EMs จะมีลักษณะทางพันธุกรรมเป็นแบบ homozygous *CYP2C19*1* จำนวน 50 คน heterozygous *CYP2C19*2* จำนวน 47 คน และ heterozygous *CYP2C19*3* และ จำนวน 3 คน สำหรับอาสาสมัครกลุ่มที่มีการแสดงออกของยีน *CYP2C19* เป็นแบบ PM นั้นพบว่ามีลักษณะทางพันธุกรรมเป็นแบบ homozygous *CYP2C19*2* และ homozygous *CYP2C19*3* จำนวน 5 และ 1 คน ตามลำดับ เป็นที่น่าสังเกตว่าอาสาสมัครที่เหลือในกลุ่ม PMs อีก 1 คน ที่มีค่า HI ประมาณ 13.9 นั้นจะมีลักษณะทางพันธุกรรมของยีน *CYP2C19* เป็นแบบ homozygous *CYP2C19*1* จากการศึกษาเภสัชจลนศาสตร์ของ omeprazole พบว่า ค่าครึ่งชีวิตของ omeprazole ในอาสาสมัครรายนี้จะสูงกว่าค่าครึ่งชีวิตเฉลี่ยที่คำนวณได้จากอาสาสมัครกลุ่มที่เป็น homozygous EMs (0.54 ± 0.29 ชม., $n=9$) นอกจากนี้ยังพบว่าอัตราส่วน AUC ของ omeprazole และ 5-hydroxyomeprazole ในอาสาสมัครรายนี้ (14.9) จะมีค่าสูงกว่า

ค่าเฉลี่ยของอัตราส่วน AUC ของ omeprazole และ 5-hydroxyomeprazole ที่คำนวณได้จากอาสาสมัครกลุ่มที่เป็น homozygous EMs (0.89 ± 0.41 , $n=9$) ถึง 16.7 เท่า ผู้วิจัยได้ตรวจวิเคราะห์ลักษณะการแสดงออกของยีน CYP2C19 ในอาสาสมัครรายนี้อีกครั้ง (ห่างจากการตรวจครั้งแรก 6 เดือน) พบว่าค่า HI ที่วัดได้ในอาสาสมัครรายนี้ มีค่าใกล้เคียงกับค่าที่ตรวจวัดได้ครั้งแรกคือประมาณ 13.1 การที่ลักษณะการแสดงออกและลักษณะทางพันธุกรรมของยีน CYP2C19 ไม่สอดคล้องกันอาจเป็นไปได้ว่าอาสาสมัครรายดังกล่าวมีความผิดปกติของยีน CYP2C19 ที่ตำแหน่งอื่น ๆ ที่นอกเหนือจาก exon 4 หรือ exon 5 ที่อาจมีผลต่อการสังเคราะห์ หรือการทำงานของเอนไซม์ CYP2C19 ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้ทำการตรวจลักษณะทางพันธุกรรมของยีน CYP2C19 ชนิดอื่น ๆ ทุกชนิดที่มีผู้รายงานในปัจจุบันคือ CYP2C19*4-CYP2C19*8 และหาลำดับ nucleic acid ของ exon และ intron-exon boundary รวมทั้งในส่วน promoter และ 3'-untranslated region ของยีน CYP2C19 ในอาสาสมัครรายนี้ อย่างไรก็ตามจากผลการวิเคราะห์ลำดับ nucleic acid ของ CYP2C19 ที่ตำแหน่งต่าง ๆ ดังนี้กล่าวข้างต้น ไม่พบว่ามีความผิดปกติทางพันธุกรรม ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าลักษณะทางพันธุกรรมของยีน CYP2C19 ของอาสาสมัครรายนี้เป็นชนิดใหม่ที่ยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน

4. 2 การศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของยีน CYP2C19 ในประชากรชาวไทย

จากการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของยีนในอาสาสมัครชาวไทยอีสาน ($n= 220$) ภาคเหนือ ($n= 180$) ภาคกลาง ($n = 212$) และ ภาคใต้ ($n= 162$) โดยใช้เทคนิค PCR-RFLP (ดังแสดงในภาพที่ 2) พบว่ามีลักษณะทางพันธุกรรมของยีน CYP2C19 ดังแสดงในตารางที่ 2-5



ภาพที่ 2 ตัวอย่างผลการวิเคราะห์ลักษณะทางพันธุกรรมของยีน CYP2C19 แบบต่าง ๆ โดยใช้เทคนิค PCR-RFLP; (A) CYP2C19*2 และ (B) CYP2C19*3

ตารางที่ 2 ลักษณะทางพันธุกรรมของจีน CYP2C19 ในประชากรไทยอีสาน

Genotype	Predicted phenotype	Number of subjects	Observed frequency (%)	Predicted frequency (%)
*1/*1	EM	105	47.7 (41.0-54.5)	49.5
*1/*2	EM	91	41.4 (34.8-48.2)	37.2
*1/*3	EM	9	4.1 (1.9-7.6)	4.5
*2/*2	PM	11	5.0 (2.5-8.8)	7.0
*2/*3	PM	3	1.4 (0.3-3.9)	1.7
*3/*3	PM	1	0.4 (0.0-2.5)	0.1
Total		220		

ตารางที่ 3 ลักษณะทางพันธุกรรมของจีน CYP2C19 ในประชากรไทยภาคเหนือ

Genotype	Predicted phenotype	Number of subjects	Observed frequency (%)	Predicted frequency (%)
*1/*1	EM	68	37.8 (30.7-45.3)	40.5
*1/*2	EM	85	47.2 (39.7-54.8)	40.3
*1/*3	EM	8	4.4 (1.9-8.6)	6.0
*2/*2	PM	11	6.1 (3.1-10.7)	10.0
*2/*3	PM	7	3.9 (1.6-7.8)	3.0
*3/*3	PM	1	0.6 (0.0-3.1)	0.2
Total		180		

ตารางที่ 4 ลักษณะทางพันธุกรรมของยีน CYP2C19 ในประชากรไทยภาคใต้

Genotype	Predicted phenotype	Number of subjects	Observed frequency (%)	Predicted frequency (%)
*1/*1	EM	82	50.6 (42.7-58.5)	50.8
*1/*2	EM	65	40.1 (32.5-48.1)	38.8
*1/*3	EM	2	1.2 (0.1-4.4)	2.2
*2/*2	PM	10	6.2 (3.0-11.1)	7.4
*2/*3	PM	3	1.9 (0.4-5.3)	0.8
*3/*3	PM	0	0.0	0.0
Total		162		

ตารางที่ 5 ลักษณะทางพันธุกรรมของยีน CYP2C19 ในประชากรไทยภาคกลาง

Genotype	Predicted phenotype	Number of subjects	Observed frequency (%)	Predicted frequency (%)
*1/*1	EM	89	42.0 (35.3-48.9)	42.7
*1/*2	EM	89	42.0 (35.3-48.9)	40.6
*1/*3	EM	10	4.7 (2.3-8.5)	4.7
*2/*2	PM	20	9.4 (5.9-14.2)	9.7
*2/*3	PM	3	1.4 (0.3-4.1)	2.2
*3/*3	PM	1	0.5 (0.0-2.6)	0.1
Total		212		

จากการคำนวณค่า allele frequency ของ CYP2C19 ในประชากรไทยแต่ละภูมิภาคของประเทศพบว่า allele frequency ของ CYP2C19*1, CYP2C19*2 และ CYP2C19*3 ของประชากรไทยอีสานมีค่า 0.704 (95% CI 0.659-0.747), 0.264 (95% CI 0.223-0.307) และ 0.032 (95% CI 0.017-0.053), ตามลำดับ ส่วน allele frequency ของ CYP2C19*1, CYP2C19*2 และ CYP2C19*3 ในประชากรไทยภาคเหนือมีค่า 0.636 (95% CI 0.584-0.686), 0.317 (95% CI 0.269-0.367) และ 0.047 (95% CI 0.028-0.074), ตามลำดับ allele frequency ของ CYP2C19*1, CYP2C19*2 และ CYP2C19*3 ของประชากรไทยภาคกลางมีค่า 0.653 (95% CI 0.606-0.699), 0.311 (95% CI 0.267-0.358) และ 0.036 (95% CI 0.020-0.058), ตามลำดับ สำหรับ allele frequency ของ CYP2C19*1, CYP2C19*2 และ CYP2C19*3 ของประชากรไทยภาคใต้พบว่ามีค่า 0.713 (95% CI 0.660-0.762), 0.272 (95% CI 0.224-0.323) และ 0.015 (95% CI 0.005-0.036), ตามลำดับ และเมื่อนำค่า allele frequency มาคำนวณค่าความชุกของ PM พบว่าความชุกของ PM ในประชากรไทยอีสาน, ไทยภาคเหนือ, ภาคกลาง และภาคใต้ มีค่า 6.82% (95% CI 3.87-11.00), 10.50% (95% CI 6.48-16.00), 11.32% (95% CI 7.39-16.37) และ 8.02% (95% CI 4.34-13.33), ตามลำดับ ซึ่งทั้งค่า allele frequency และค่าความชุกของ PM ของประชากรไทยภูมิภาคต่างๆมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ดังแสดงในตารางที่ 6) นอกจากนี้ยังพบว่าค่าความถี่ของ CYP2C19 genotype แบบต่างๆ ในประชากรเหล่านี้ที่คำนวณได้จากการวิจัยครั้งนี้จะมีค่าใกล้เคียงจากค่าที่ประเมินได้จาก Hardy-Weinberg equilibrium (ตารางที่ 2-5)

ตารางที่ 6 เปรียบเทียบความถี่ ของ CYP2C19 alleles ของประชากรไทยที่มีภูมิลำเนาในภูมิภาคต่างๆ

Population	% PM ^a	Allele frequency		
		*1	*2	*3
North-eastern Thai	6.82 (3.87-11.00)	0.704 (0.659-0.747)	0.264 (0.223-0.307)	0.032 (0.017-0.053)
Northern Thai	10.50 (6.48-16.00)	0.636 (0.584-0.686)	0.317 (0.269-0.367)	0.047 (0.028-0.074)
Central Thai	11.32 (7.39-16.37)	0.653 (0.606-0.699)	0.311 (0.267-0.358)	0.036 (0.020-0.058)
Southern Thai	8.02 (4.34-13.33)	0.713 (0.660-0.762)	0.272 (0.224-0.323)	0.015 (0.005-0.036)

^a Percentage of poor metabolizer calculated from frequency of CYP2C19 allele

เมื่อนำข้อมูลลักษณะทางพันธุกรรมของจีน *CYP2C19* ในประชากรไทยทั้งหมดมารวมกันพบว่าความถี่ของ allele frequency ของ *CYP2C19*1*, *CYP2C19*2* และ *CYP2C19*3* มีค่า 0.676 (95% CI 0.652-0.700), 0.291 (95% CI 0.268-0.314) และ 0.033 (95% CI 0.025-0.043), ตามลำดับ (ตารางที่ 7) ความชุกของ *CYP2C19* PM ที่ทำนายจากลักษณะทางพันธุกรรมของจีนมีค่า 9.2% (95% CI 7.2-11.4) เมื่อเปรียบเทียบกับประชากรเอเชียอื่น ๆ เช่น จีนเผ่า Han และ จีนเผ่า Bai ญี่ปุ่น เกาหลี ฟิลิปปินส์ อินโดนีเซีย เวียดนาม (ตารางที่ 8) พบว่าในประชากรไทยจะมีความชุกของ PM และ ความถี่ของจีน *CYP2C19* ที่บกพร่องโดยเฉพาะ *CYP2C19*3* จะมีค่าต่ำกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เป็นที่น่าสังเกตว่าค่าความชุกของ PM และ ความถี่ของจีน *CYP2C19* ทั้ง *CYP2C19*1*, *CYP2C19*2* และ *CYP2C19*3* ที่มีรายงานในประชากรชาวจีนกลุ่มน้อยเผ่า Dai และเผ่า Bai จะมีค่าใกล้เคียงกับที่พบในประชากรไทยมาก นอกจากนี้แล้วยังพบว่าความชุกของ PM และความถี่ของจีน *CYP2C19*2* และ *CYP2C19*3* ในประชากรไทยจะมีค่าสูงกว่าที่มีรายงานในชาวคอเคเซียน อัฟริกัน-อเมริกัน อัฟริกัน และชาวฮิสแปนิก อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 7 เปรียบเทียบความถี่ของ PM และ ความถี่ ของ CYP 2C19 allele ของประชากรไทยและประชากรเชื้อชาติอื่นๆ

Population	Numbe r of subjects	PM (%)	*1	*2	*3	Ref
Thai	774	9.2 (7.2-11.4)	0.676 (0.652-0.700)	0.291 (0.268-0.314)	0.033 (0.025-0.043)	Present study
European-American	105	2.0	0.87**	0.13**	0*	(Goldstein et al., 1997)
African-American	108	7.0	0.75*	0.25	0*	(Goldstein et al., 1997)
Saudi-Arabian	97	2.1	0.85**	0.15**	0*	(Goldstein et al., 1997)
Tanzanian	251	2.9	0.815**	0.179**	0.006*	(Herrlin et al., 1998)
Chinese-Han	101	19.8	0.559**	0.366*	0.074*	(Xiao et al., 1997)
Chinese-Bai	202	13.4	0.688	0.257	0.052	(Xiao et al., 1997)
Chinese-Dai	193	9.3	0.663	0.303	0.034	(He et al., 2002)
Japanese	186	18.8	0.589*	0.288	0.123**	(Kubota et al., 1996)
Korean	103	12.6	0.675	0.209*	0.117**	(Roh et al., 1996)
Fillipino	52	22.6	0.54*	0.39*	0.077*	(Goldstein et al., 1997)
Vietnamese	90	20.0	0.625	0.236	0.139**	(Yamada et al., 2001)
Indonesian	104	15.4	nd	nd	nd	(Setiabudy et al., 1994)

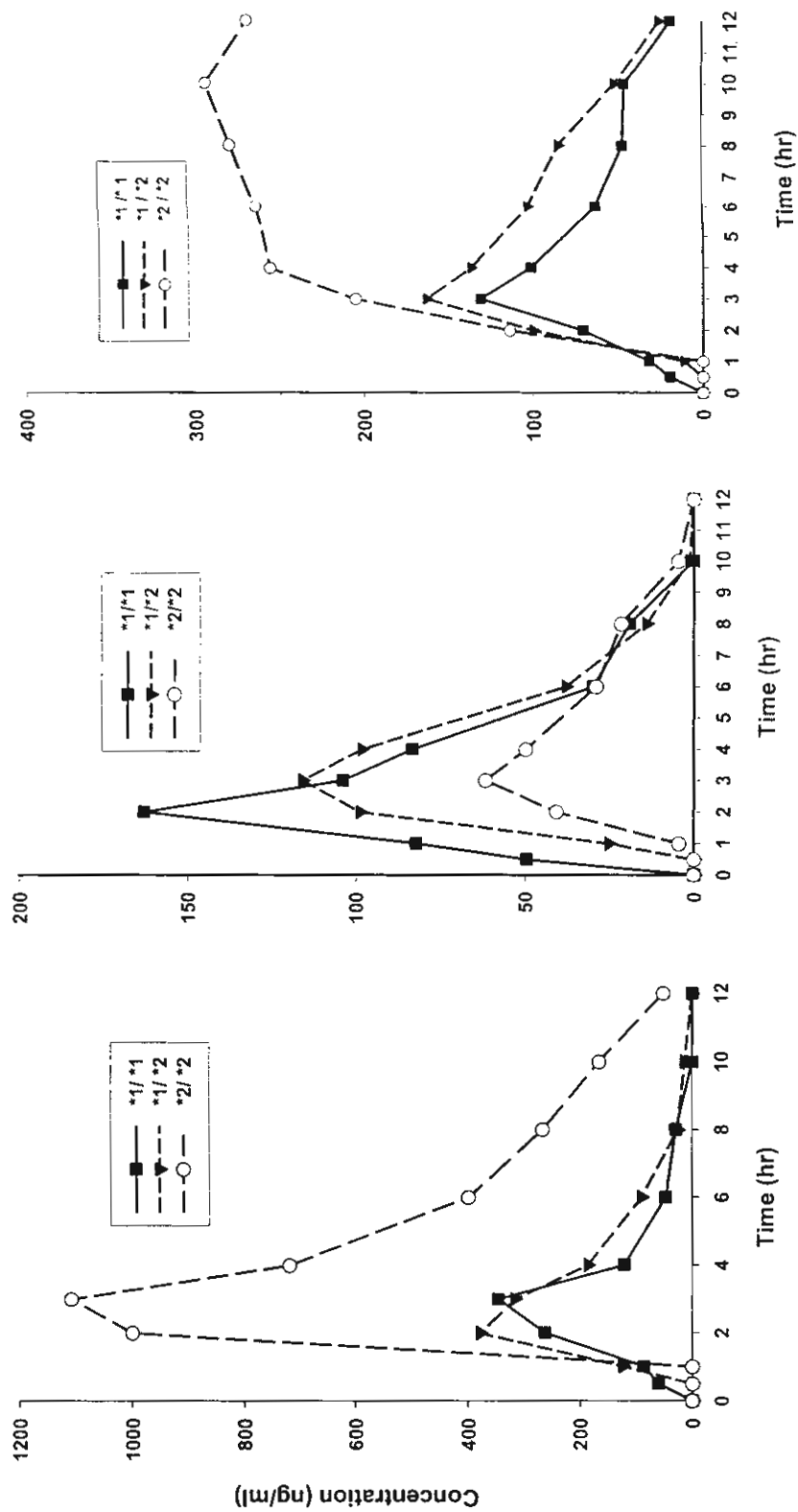
Frequency of PM based on genotype data except for Indonesian population which calculated based on phenotype data

* Significantly different from a Thai population with $p \leq 0.05$.

** Significantly different from a Thai population with $p \leq 0.001$.

4.3 การศึกษาเภสัชจลนศาสตร์ของยา omeprazole ในอาสาสมัครที่มีลักษณะทางพันธุกรรมของ *CYP2C19* ที่แตกต่างกัน

จากการศึกษาเภสัชจลนศาสตร์ของยา omeprazole รวมทั้ง 5-hydroxyomeprazole และ omeprazole sulfone ในอาสาสมัครที่มีลักษณะทางพันธุกรรมแบบ homozygous EMs (*CYP2C19**1/*1) จำนวน 10 คน heterozygous EMs *CYP2C19**1/*2 จำนวน 10 คน และ Homozygous PMs (*CYP2C19**2/*2) จำนวน 2 คน (ภาพที่ 3) พบว่าอาสาสมัครที่มีลักษณะทางพันธุกรรมเป็นแบบ homozygous PMs จะมีค่า area under the curve (AUC) และ half-life ของ omeprazole และ omeprazole sulphone สูงกว่าอาสาสมัครกลุ่มที่มีลักษณะทางพันธุกรรมแบบ homozygous EMs หรือ heterozygous EMs อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในทางตรงกันข้ามอาสาสมัครกลุ่ม homozygous EMs จะมีค่า AUC ของ 5-hydroxyomeprazole สูงกว่ากลุ่ม homozygous PMs นอกจากนี้ยังพบว่าอาสาสมัครกลุ่มที่มีลักษณะทางพันธุกรรมเป็นแบบ homozygous PMs จะมีค่า half-life และ ค่า AUC ของ omeprazole sulfone มากกว่าอาสาสมัครกลุ่มที่มีลักษณะทางพันธุกรรมแบบ homozygous หรือ heterozygous EMs อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังแสดงในตารางที่ 8



ภาพที่ 3 เกล็ดจลนศาสตร์ของ omeprazole และ metabolites ในอาสาสมัครที่มีลักษณะทางพันธุกรรมของยีน CYP2C19 แบบต่าง ๆ

ตารางที่ 8 ค่าพารามิเตอร์ทางเภสัชจลนศาสตร์ของ omeprazole และ metabolites ในอาสาสมัครที่มีลักษณะทางพันธุกรรมของยีน CYP2C19 แบบต่าง ๆ

	CYP2C19 genotype		
	*1/*1	*1/*2	*2/*2
Omeprazole			
C _{max} (ng/ml)	399 ± 67	400 ± 61	1,193 ± 47*
T _{max} (hr)	2.20 ± 0.29	2.33 ± 0.37	2.50 ± 0.24
T _{1/2} (hr)	1.17 ± 0.26	1.26 ± 0.15	2.52 ± 0.14*
AUC (ng/ml*hr)	830 ± 128	1,021 ± 169	5,235 ± 403*
Cl (L/hr)	31.60 ± 6.44	23.43 ± 3.09	3.92 ± 0.30*
5-Hydroxyomeprazole			
C _{max} (ng/ml)	239 ± 43	167 ± 24**	61 ± 23*
T _{max} (hr)	2.30 ± 0.26	2.80 ± 0.29	3.00 ± 0.01
T _{1/2} (hr)	2.14 ± 0.40	1.97 ± 0.33	3.06 ± 0.97
AUC (ng/ml*hr)	739 ± 109	508 ± 52**	320 ± 114*
Omeprazole sulfone			
C _{max} (ng/ml)	191 ± 52	173 ± 25	118 ± 90
T _{max} (hr)	320 ± 0.47	3.60 ± 0.45	3.86 ± 2.69
T _{1/2} (hr)	3.43 ± 0.46	3.63 ± 0.44	54.79 ± 92.10*
AUC (ng/ml*hr)	914 ± 218	1,204 ± 262	26,294 ± 46,150*

* p<0.001; **p< 0.05

บทที่ 5

วิจารณ์และสรุปผลการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้มุ่งศึกษาถึงลักษณะการแสดงออกและลักษณะทางพันธุกรรมของยีน *CYP2C19* ในประชากรไทย ซึ่งจากผลการวิจัยพบว่าความชุก (prevalence) ของ PM และความถี่ของอัลลีล (allele frequency) ที่บกพร่อง โดยเฉพาะ *CYP2C19*3* ในประชากรไทยจะต่ำกว่าที่เคยมีรายงานในประชากรเอเชียอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้แล้วยังพบว่าเภสัชจลนศาสตร์ของ omeprazole และ omeprazole metabolites จะขึ้นอยู่กับลักษณะทางพันธุกรรมของยีน *CYP2C19* รวมทั้งสัมพันธ์กับขนาดของยีน *CYP2C19* ของอาสาสมัครด้วย

ผลจากการวิจัยครั้งนี้พบว่า omeprazole มีความเหมาะสมที่ใช้เป็นตัววัดความสามารถในการทำงานของยีน *CYP2C19* ในประชากรไทย ทั้งนี้เนื่องมีความปลอดภัยค่อนข้างสูงและสามารถวัดระดับของ omeprazole และ 5-hydroxyomeprazole ในพลาสมาเพื่อนำมาคำนวณค่า HI ได้ง่าย ไม่ยุ่งยากซับซ้อน จากจำนวนอาสาสมัครที่เข้าร่วมการวิจัยจำนวนทั้งหมด 110 คน ไม่พบว่าอาสาสมัครรายใดได้รับผลข้างเคียงจากการใช้ยา แต่อย่างไรก็ตามพบว่ามีอาสาสมัครจำนวน 3 คนที่มีระดับของ omeprazole และ 5-hydroxyomeprazole ในพลาสมาต่ำที่เวลา 3 ชม. หลังจากรับประทานยาต่ำกว่าขีดจำกัดที่สามารถวิเคราะห์ได้ (detection limit) ทั้งนี้อาจเป็นผลเนื่องมาจากอาสาสมัครกลุ่มนี้ดูดซึมยาจากทางเดินอาหารได้ต่ำกว่าปกติ ซึ่งรายงานการวิจัยที่ผ่านมาพบว่า omeprazole เป็นยาที่มีค่าชีวปริมาณออกฤทธิ์เมื่อให้โดยการรับประทาน (oral bioavailability) ค่อนข้างต่ำ (Balian et al., 1995) (Marinac et al., 1996) ดังนั้นจึงไม่สามารถคำนวณค่า HI ของอาสาสมัครทั้ง 3 นี้ได้ เป็นผลให้ต้องคัดข้อมูลของอาสาสมัครกลุ่มนี้ออกจากการวิจัย

เมื่อศึกษาการกระจายตัวของค่า HI ของอาสาสมัครที่เข้าร่วมการวิจัยทั้งหมด 107 คน พบว่ามีโค้งของการกระจายตัวเป็นแบบ biomodal ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ที่ได้จาก probit plot (รูปที่ 1) โดยมีค่าจุดแบ่ง (antimode) ประมาณ 7 ความชุกของ PM ที่คำนวณได้จากการวิจัยครั้งนี้มีค่า 6.54% ซึ่งต่ำกว่าที่มีรายงานในประชากรเอเชียตะวันออก (เช่น ฟิลิปปินส์ และอินโดนีเซีย) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เท่าที่ทราบข้อมูลเกี่ยวกับความผิดแผกทางพันธุกรรมของยีน *CYP2C19* ในประชากรไทยมีค่อนข้างจำกัด และมีรายงานการวิจัยเพียงชิ้นเดียวที่ตีพิมพ์โดย Edstein และ คณะ (Edstein et al, 1994) ที่รายงานว่า การกระจายตัวของอัตราส่วนของระดับ proguanil และ cycloguanil (PG/CG) ratio ของอาสาสมัครที่เป็นทหารไทยค่อนข้างจะเบี่ยงเบนไปจากโค้งปกติ แต่ก็ไม่ชัดเจนว่าอัตราส่วนของ PG/CG จะมีการกระจายตัวแบบ biomodal แต่ Edstein และคณะได้คำนวณค่าความชุกของ *CYP2C19* PM ในประชากรกลุ่มนี้ โดยถือว่า PM คืออาสาสมัครที่มีค่าอัตราส่วนของ PG/CG มากกว่าหรือเท่ากับ 10 ซึ่งพบว่าความชุกของ PM มีค่าประมาณ 18% สำหรับ

proguanil นั้น ถึงแม้จะถูกนำมาใช้เป็นตัววัด (probe) การทำงานของเอนไซม์ CYP2C19 ในมนุษย์ แต่การใช้งานอย่างมีข้อจำกัดหลายข้อด้วยกัน ตัวอย่างเช่น นอกเหนือจาก CYP2C19 ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สำคัญที่รับผิดชอบการเปลี่ยนแปลงของ proguanil ให้กลายเป็น cycloguanil แล้ว (Ward et al., 1991) (Brosen et al., 1993) พบว่าเอนไซม์ CYP3A4 ยังเป็นเอนไซม์อีกชนิดหนึ่งที่มีบทบาทสำคัญในการเปลี่ยนแปลงยานี้ด้วย (Birkett et al., 1994) นอกจากนี้แล้วยังพบว่าอัตราส่วนของ PG/CG ในพลาสมาจะไม่มีความสัมพันธ์กับ mephenytoin hydroxylation index ซึ่งเป็นดรรชนีที่นิยมใช้ในการวัดความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ CYP2C19 (Brosen et al., 1993) (Partovian et al., 1995) [จากรายงานการวิจัยเมื่อเร็ว ๆ นี้พบว่า อัตราส่วนของ PG/CG ในพลาสมาที่วัดได้ในอาสาสมัครที่มีลักษณะทางพันธุกรรมของ CYP2C19 (CYP2C19 genotype) ที่แตกต่างกันจะมีความคาบเกี่ยว (overlapping) กันค่อนข้างมาก ซึ่งจากเหตุผลที่ยกมาเหล่านี้จะเห็นว่าข้อมูลความชุกของ CYP2C19 PM ในประชากรไทยที่รายงานโดย Edstein และคณะ (Edstein et al., 1994) นั้นยังไม่ชัดเจนเท่าใดนัก นอกจากนี้แล้ว Edstein และคณะยังไม่ได้ระบุแน่ชัดว่าอาสาสมัครที่เข้าร่วมในการวิจัยเป็นประชากรไทยกลุ่มใด แต่สำหรับอาสาสมัครทั้งหมดที่เข้าร่วมการวิจัยของเราครั้งนี้เป็นชาวไทยอีสาน

จากการศึกษาลักษณะการแสดงออกร่วมกับลักษณะทางพันธุกรรมของ CYP2C19 ทำให้ผู้วิจัยค้นพบอาสาสมัครที่เป็น PM หนึ่งรายที่ไม่ได้มีความบกพร่องของยีน CYP2C19 เป็นชนิดที่เคยมีรายงานมาก่อน ผู้วิจัยได้ร่วมมือกับ Dr. Goldstein, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, USA เพื่อทำการศึกษายีน CYP2C19 ในอาสาสมัครรายนี้ แต่จากผลการศึกษาในส่วน exon, promoter region (1.5 kb), 3'untranslated region (1.5 kb) รวมทั้งในส่วน intron-exon junction ของอาสาสมัครรายนี้ไม่พบที่มีความผิดปกติทางพันธุกรรมใดๆ เนื่องจากยีนนี้มีขนาดใหญ่ถึง 90 kb เป็นไปได้ว่าอาสาสมัครรายนี้อาจมีความผิดปกติของยีน CYP2C19 ที่ตำแหน่งอื่นๆ ผู้วิจัยกำลังดำเนินการเพื่อที่จะศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของยีนนี้ในอาสาสมัครรายนี้ต่อไปในอนาคต

จากการวิจัยพบว่าความถี่ของ CYP2C19 mutant allele และความชุกของ PM ในประชากรไทยที่มีภูมิลำเนาในภูมิภาคต่างๆ มีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อคำนวณความชุกของ PM และความถี่ของ CYP2C19 mutant allele (โดยเฉพาะ CYP2C19*3 ซึ่งเป็น mutant allele ที่พบเฉพาะในประชากรเอเชียตะวันออกเฉียงใต้) ในประชากรไทยทั้งหมดพบว่ามีความต่ำกว่าที่เคยมีรายงานในประชากรชาวเอเชียอื่นๆ เช่น ญี่ปุ่น จีนแผ่นดินใหญ่ (Han) อินโดนีเซีย เวียดนาม และฟิลิปปินส์อย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ยังเป็นที่น่าสนใจที่ค่าความถี่ของยีน CYP2C19 และค่าความชุกของ PM ที่พบในประชากรไทยที่ได้จากการวิจัยครั้งนี้มีค่าใกล้เคียงกันมากกับค่าที่มีรายงานในประชากรที่เป็นชนกลุ่มน้อยของจีน เช่น เผ่า Bai และ เผ่า Dai (ตารางที่ 8) จากหลักฐานทางประวัติศาสตร์พบว่าชาวจีนเผ่า Dai นี้จะมีวัฒนธรรมและความเป็นอยู่คล้ายคลึงกับไทยมาก

ผลจากการศึกษาเภสัชจลนศาสตร์ของ omeprazole ในอาสาสมัครที่มีลักษณะทางพันธุกรรมของ CYP2C19 แบบต่างๆ พบว่าค่าพารามิเตอร์ทางเภสัชจลนศาสตร์ของ omeprazole เช่น C_{max} ,

$T_{1/2}$, AUC_{0-12} และ CI ในกลุ่ม homozygous EMs และ heterozygous EMs จะแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับค่าที่คำนวณได้จากกลุ่ม homozygous PMs โดยที่ AUC_{0-12} และ $T_{1/2}$ ในกลุ่ม homozygous EMs จะมีค่าน้อยกว่าที่คำนวณได้จากกลุ่ม homozygous PMs ประมาณ 6.3 และ 2 เท่า, ตามลำดับ และเมื่อเทียบกับค่าที่คำนวณได้จากกลุ่ม heterozygous EMs จะมีค่าน้อยกว่าประมาณ 5 และ 2 เท่า, ตามลำดับ ขณะเดียวกันค่า CI ในกลุ่ม heterozygous EMs และ homozygous EMs จะมีค่ามากกว่าที่คำนวณได้จาก homozygous PMs ถึง 6 และ 8 เท่า, ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่า AUC_{0-12} ของ 5-hydroxyomeprazole ในอาสาสมัครกลุ่มที่เป็น homozygous PMs จะมีค่าต่ำกว่าค่าที่คำนวณได้จากกลุ่ม homozygous และ heterozygous EMs ประมาณ 2.3 และ 1.6 เท่า, ตามลำดับ และค่า AUC ratio ของ omeprazole และ 5-hydroxyomeprazole ของ homozygous PMs จะมีค่าสูงกว่า heterozygous ประมาณ 8.18 เท่า และ มีค่าสูงกว่า homozygous EMs ประมาณ 14.61 เท่า ซึ่งผลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้จะสอดคล้องกับผลการศึกษาที่ศึกษาในประชากรญี่ปุ่น (Ieiri et al., 1996) จากผลการทดลองข้างต้นแสดงให้เห็นว่าความสามารถในการเปลี่ยน omeprazole ไปเป็น 5-hydroxyomeprazole ในแต่ละบุคคลจะขึ้นอยู่กับลักษณะทางพันธุกรรมของยีน *CYP2C19* โดยบุคคลที่มีลักษณะทางพันธุกรรมของ *CYP2C19* เป็นแบบ homozygous PMs จะมีความบกพร่องของปฏิกิริยา omeprazole 5-hydroxylation ทำให้ทำลายยา omeprazole ได้ช้ากว่ากลุ่ม heterozygous EMs และ homozygous EMs ซึ่งความบกพร่องนี้จะสัมพันธ์กับขนาดของยีน *CYP2C19* ของแต่ละบุคคล

ผลจากการทดลองครั้งนี้ยังได้แสดงให้เห็นว่า เกล็ดซัลฟอนาส์ของ omeprazole sulfone ซึ่งเป็น metabolite ที่สำคัญตัวหนึ่ง ของ omeprazole ที่ตรวจพบในพลาสมา จะมีความสัมพันธ์กับลักษณะทางพันธุกรรมของยีน *CYP2C19* เช่นเดียวกับตัวยา omeprazole เอง โดยพบว่าค่า AUC_{0-12} ของอาสาสมัครที่เป็น homozygous PMs จะมีค่ามากกว่าค่าที่คำนวณได้จาก homozygous EMs และ heterozygous EMs ถึง 22-28 เท่า ส่วนค่า $T_{1/2}$ ของ homozygous PMs จะมีค่ามากกว่า homozygous และ heterozygous EMs ถึง 15 - 16 เท่า นอกจากนี้แล้วยังพบว่า AUC ratio ของ omeprazole และ omeprazole sulfone ในอาสาสมัครกลุ่ม homozygous PMs จะมีค่าต่ำกว่า heterozygous และ homozygous EMs ถึง 4 เท่า ซึ่งผลการทดลองที่ได้ยืนยันว่าการเปลี่ยนแปลง omeprazole sulfone ไปเป็น secondary metabolite (5-hydroxyomeprazole sulfone) น่าจะอาศัยเอนไซม์ *CYP2C19* เช่นเดียวกับการเปลี่ยนแปลง omeprazole ไปเป็น 5-hydroxyomeprazole ซึ่งสอดคล้องกับที่เคยมีรายงานไว้ในประชากรยุโรปและญี่ปุ่น (Ieiri et al., 1996) (Andersson et al., 1992)

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าค่าเกล็ดซัลฟอนาส์ของ omeprazole และ metabolites ที่คำนวณได้ในประชากรไทยจะมีค่าค่อนข้างใกล้เคียงกับที่เคยมีรายงานไว้ในประชากรชาวญี่ปุ่น, จีน, เกาหลีและยุโรปที่มีลักษณะทางพันธุกรรมแบบเดียวกัน (Ieiri et al., 1996) (Andersson et al., 1992) (Sohn et al., 1992) แสดงให้เห็นชัดว่าเกล็ดซัลฟอนาส์ของยานี้จะขึ้นกับลักษณะทางพันธุกรรมของยีน *CYP2C19* ในแต่ละบุคคลเป็นสำคัญ