Pharmacogenetics: Basic Concept for Pharmacists

รหัสกิจกรรม : 0001-1-000-009-09-2559
จำนวน : 2.5 หน่วยกิต
วันที่รับรอง : 1 กันยายน 2559
วันที่หมดอายุ : 31 สิงหาคม 2560
ผู้เรียบเรียง : **ดร.อ.ภก.ศุภทัต ชุมนุมวัฒน์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัย มหิดล**

วัตถุประสงค์

หลังจากการอ่านบทความฉบับนี้ผู้อ่านสามารถ:

1.ระบุความสำคัญของการใช้ข้อมูลด้าน pharmacogenetics ในทางคลินิกได้
2.เลือกใช้คำศัพท์และข้อมูลพื้นฐานในการสื่อสารด้าน pharmacogenetics อย่างเหมาะสม
3.ระบุวิธีการตรวจ genotype ที่เหมาะสมได้
4.เลือกใช้ข้อมูลด้าน pharmacogenetics อย่างเหมาะสม

บทนำ

ความรู้ด้านเภสัชพันธุศาสตร์ (pharmacogenetics หรือ pharmacogenomics) คือศาสตร์ที่ศึกษาอิทธิพลของลักษณะทางพันธุกรรมต่อการตอบสนองของยา และเป็นศาสตร์ที่มีบทบาทมากขึ้นในการเป็นส่วนหนึ่งของการดูแลผู้ป่วย โดยเฉพาะในแง่ของการคัดกรองผู้ป่วยที่มีความเหมาะต่อยาหรือมีความเสี่ยงต่อการเกิดอาการไม่พึงประสงค์จากยา ดังนั้นเภสัชกรจึงควรทราบและเข้าใจข้อมูลพื้นฐานเพื่อการต่อยอดความรู้เกี่ยวกับศาสตร์ในแขนงนี้ที่อาจเป็นส่วนหนึ่งของการบริบาลทางเภสัชกรรมในอนาคตอันใกล้

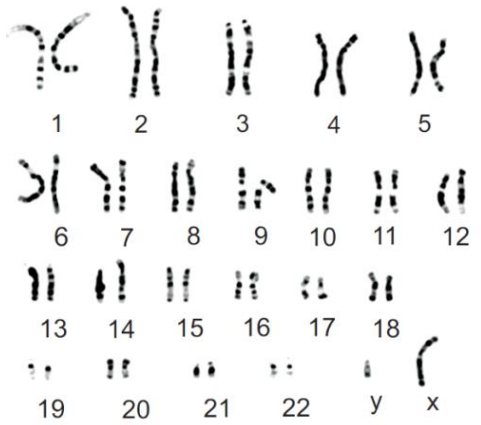
ความสำคัญและแนวคิดของการศึกษาและการใช้ข้อมูลด้าน pharmacogenetics ในทางคลินิก

ลักษณะทางพันธุกรรมเป็นสิ่งที่กำหนดลักษณะการแสดงออกของกระบวนการรูปลักษณ์ภายในและภายนอก เช่น สีผิว สีผม หรือ ลายนิ้วมือ หรือความสามารถในการกำจัดยา เป็นต้น ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางพันธุกรรมจึงอาจมีผลให้การแสดงออกเหล่านี้เปลี่ยนแปลงไป ในทางเภสัชกรรมลักษณะของการใช้ยาจะอาศัยข้อมูลจากการศึกษาจากกลุ่มตัวอย่างประชากร เช่น ขนาดการใช้ยาจากการศึกษาชนิด randomized controlled trial เป็นต้น ซึ่งอาจมีความหลากหลายด้านลักษณะทางคลินิกหรือลักษณะทางพันธุกรรมหรือไม่ก็ได้ แต่ในขณะที่ในทางปฏิบัติการใช้ยาจะมีความจำเพาะกับบุคคลเพียงคนเดียว หากบุคคลดังกล่าวมีลักษณะทางพันธุกรรมที่เหมือนกับกลุ่มประชากรเพียงส่วนหนึ่งเท่านั้นหรือแตกต่างไปจากกลุ่มตัวอย่างประชากรที่เข้าร่วมการศึกษาซึ่งเป็นที่มาของขนาดการใช้ยาที่แนะนำอย่างสิ้นเชิง โดยเฉพาะการเปลี่ยนแปลงของลักษณะทางพันธุกรรมที่มีผลกระทบต่อเภสัชจลนศาสตร์ (pharmacokinetics) หรือเภสัชพลศาสตร์ (pharmacodynamics) ของยา ซึ่งจะทำให้ขนาดยาที่ควรใช้สำหรับบุคคลดังกล่าวอาจไม่เท่ากับขนาดยาที่แนะนำได้ ดังนั้นหากแพทย์หรือเภสัชกรมีข้อมูลด้านพันธุกรรมที่อาจช่วยให้

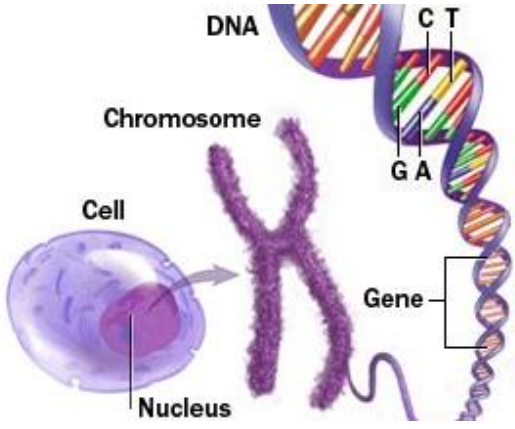
เห็นว่าผู้ป่วยมีความเสี่ยงจากการใช้ยาหรือมีความไวต่อยามากกว่าปกติ การตัดสินใจเลือกตัวยาหรือขนาดยาสำหรับผู้ป่วยรายดังกล่าวมีความเหมาะสมมากยิ่งขึ้นได้ จึงเป็นที่มาของความพยายามในการศึกษาและประยุกต์ใช้ข้อมูลจากการศึกษาด้าน pharmacogenetics ร่วมกับการใช้ข้อมูลทางคลินิกอื่นๆ เช่น อายุ เพศ น้ำหนักตัว ค่าการทำงานของไต/ตับซึ่งมีการใช้อยู่แล้วเป็นปกติในทางปฏิบัติเพื่อประกอบการตัดสินใจในการใช้ยาสำหรับแต่ละบุคคล โดยวิธีการดูแลผู้ป่วยที่มีการประยุกต์ใช้ข้อมูลจากการศึกษาด้าน pharmacogenetics ร่วมด้วยมีชื่อเรียกว่า “การแพทย์เฉพาะบุคคล” (personalized medicine) ที่เริ่มจะมีบทบาทเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ โดยเฉพาะความรู้ในด้านการตอบสนองต่อยาซึ่งเภสัชกรเป็นกลุ่มบุคลากรทางการแพทย์ที่มีความเกี่ยวข้องโดยตรง

ความรู้พื้นฐานที่เป็นประโยชน์ต่อการศึกษาข้อมูลด้าน pharmacogenetics[1]

ในแต่ละเซลล์ของร่างกายมนุษย์จะมีนิวเคลียสซึ่งมีข้อมูลทางพันธุกรรมบรรจุอยู่ โดยชุดข้อมูลดังกล่าวเรียกว่า “โครโมโซม” (chromosome) ซึ่งมีลักษณะเป็นแท่ง มีทั้งสิ้น 46 แท่ง หรือ 23 คู่ แบ่งเป็นออโตโซม (autosome) 22 คู่ และโครโมโซมเพศ (sex chromosome) 1 คู่ (Y และ X chromosome) ดังรูปที่ 1A[2] โดยครึ่งหนึ่งของโครโมโซมแต่ละคู่ของมนุษย์ได้รับมาจากพ่อ (23 แท่ง) และอีกครึ่งหนึ่งได้รับจากแม่ โครงสร้างของโครโมโซมโดยแท้จริงแล้วคือสาย deoxyribonucleic acid (DNA) ที่ขดรวมตัวกันแน่นโดยมีสารโปรตีน เช่น histone เป็นแกนหลักในการขดสาย DNA ให้มีรูปร่างเป็นแท่งของโครโมโซม (รูปที่ 1B) สาย DNA โดยแท้จริงแล้วจะมี 2 สายเชื่อมต่อกันอยู่และบิดเป็นเกลียว (double-stranded helix) ดังรูปที่ 2A โดย DNA แต่ละสายจะประกอบขึ้นจากนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) ที่ประกอบขึ้นจาก 3 ส่วนย่อย ได้แก่ 1) หมู่น้ำตาลดีออกซีไรโบส (five-carbon sugar) 2) หมู่ฟอสเฟต และ 3) เบสที่มีส่วนประกอบของไนโตรเจน (nitrogenous base) ซึ่งมี 4 ชนิด ได้แก่ adenine (A), thymine (T), cytosine (C) และ guanine (G) ดังรูปที่ 2B โดยโมเลกุลของ nucleotide ทั้งหมดจะถูกเชื่อมต่อกันด้วยพันธะฟอสโฟไดเอสเทอเรส (phosphodiesterase bond) ได้เป็นสายยาวของ DNA 1 สาย ส่วนการเชื่อมต่อระหว่างสาย DNA ทั้งสองใน double-stranded helix นั้นจะอาศัยพันธะไฮโดรเจนที่จับระหว่างเบสของแต่ละสายโดย ลักษณะการจับของเบสระหว่างสาย DNA (คู่เบส) จะมีรูปแบบที่จำเพาะ คือ A จับกับ T และ C จับกับ G ซึ่งบนคู่สาย DNA นั้นคาดว่าจะประกอบด้วยคู่เบสประมาณ $3x10^9$ คู่[3]



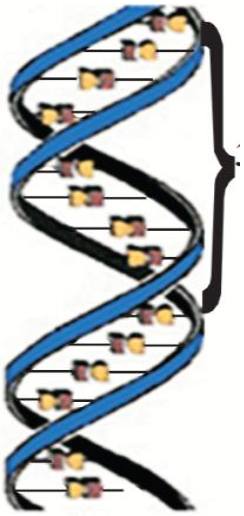
A.

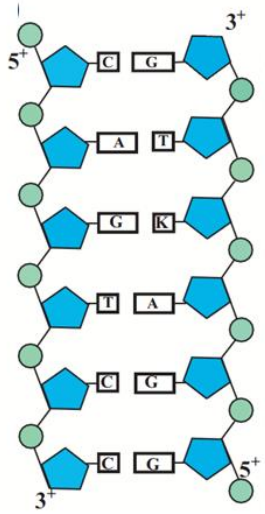


B.

รูปที่ 1 ลักษณะโครโมโซมของมนุษย์[2, 4, 5]

A.





B.

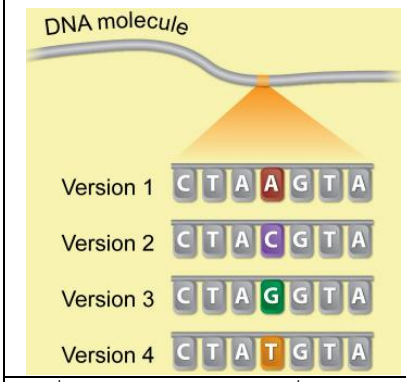
รูปที่ 2 สาย deoxyribonucleic acid (DNA); รูป A คือ ลักษณะของ double-stranded helix; รูป B คือโครงสร้างของสาย DNA ที่ประกอบด้วย หมู่น้ำตาลดีออกซีไรโบส (ห้าเหลี่ยม) หมู่ฟอสเฟต (วงกลม) และไนโตรจีนัสเบส (A,T,C, และ G)

DNA มีความสำคัญในแง่ที่อาจเปรียบเทียบได้กับหนังสือคู่มือการสั่งใช้งานร่างกายมนุษย์ โดยส่วนย่อย (segment) ที่ตำแหน่งต่างๆ บนสาย DNA หรือที่รู้จักกันดีในชื่อ “ยีน” (gene) ดังรูปที่ 1B จะมีชุดข้อมูลที่จำเพาะกับการสังเคราะห์โปรตีนสำหรับกระบวนการทำงานที่ร่างกายต้องการ เช่น ที่ตำแหน่ง q21.1 บนสาย DNA ของโครโมโซมคู่ที่ 7 เป็นยีนที่เป็นชุดข้อมูลสำหรับการสร้างโปรตีน cytochrome P450 (CYP) 3A4 ซึ่งเป็นเอนไซม์ตับกลุ่มหลักที่มีหน้าที่ metabolize ยาในร่างกายมนุษย์เป็นต้น[6] ดังนั้นจากโครโมโซม 23 คู่ ร่างกายมนุษย์จะมียีนหรือชุดข้อมูลสำหรับสั่งการของร่างกายอยู่เป็นจำนวนมากและมีจำนวนคู่เบสที่แตกต่างกันในแต่ละยีน ซึ่งข้อมูลในปัจจุบันพบว่ามีจำนวนยีนอย่างน้อยประมาณ 21,000 ยีนที่เกี่ยวข้องในกระบวนการของร่างกาย (protein-coding genes)[7] ซึ่งเซลล์ในแต่ละส่วนของร่างกายแม้จะมีโครโมโซมแบบเดียวกัน แต่การแสดงออกของยีน (gene expression) ในเซลล์ที่ต่างกันจะมีความแตกต่างกันไปตามความสำคัญของหน้าที่และกระบวนการที่จำเป็นของแต่ละอวัยวะในร่างกาย เช่น ยีน *MDR1* ซึ่งรับผิดชอบในการสังเคราะห์ P-glycoprotein (P-gp) ซึ่งเป็นตัวพาของยา (drug transporter) ที่สำคัญในการขับยาออกจากเซลล์ จะมีการแสดงออกของยีนในเซลล์ตับ ไต และลำไส้ มากกว่าในเซลล์อื่นๆ ของร่างกาย[8] เป็นต้น

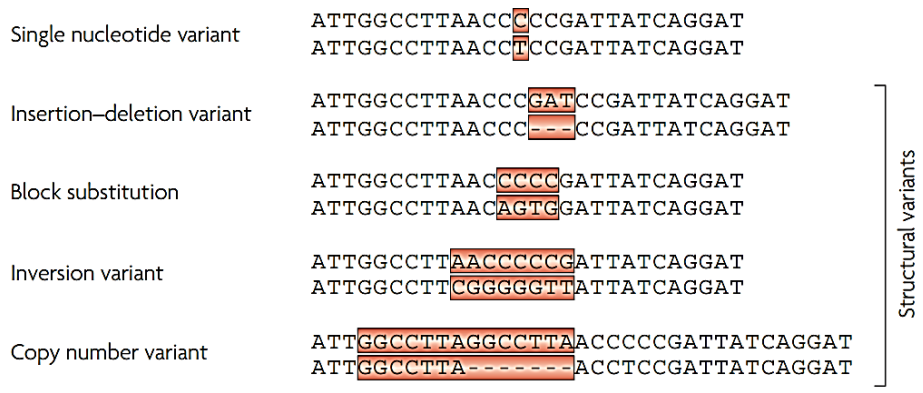
นอกจากความรู้พื้นฐานข้างต้น คำศัพท์ที่พบได้บ่อยในบทความเกี่ยวกับการศึกษาด้าน pharmacogenetics มีดังนี้

- **Locus** คือ ตำแหน่งของยีนหรือ DNA ใดๆ บนโครโมโซม หากเป็นการกล่าวถึงตำแหน่งบนโครโมโซมมากกว่าหนึ่งตำแหน่งจะใช้คำพหูพจน์แทนคือคำว่า loci
- **Allele** คือ คำแทนของชนิดเบสบน nucleotide ที่ locus ที่สนใจบนสาย DNA เนื่องจากในมนุษย์มีเบส 4 ชนิด ดังนั้นจึงมี allele 4 ชนิด คือ allele A, allele C, allele G และ allele T ดังรูปที่ 3A ในกลุ่มประชากรหนึ่งๆ โดยทั่วไปมักมีความถี่ของ allele แต่ละชนิดที่คงที่ โดย allele ที่มีความถี่ของการพบมากที่สุดในกลุ่มประชากรจะเรียกว่า major allele และ allele ที่พบน้อยกว่าจะเรียกว่า minor allele[2]

- **Genotype คือ ส่วนผสมของคู่ allele ที่ locus ที่สนใจบนโครโมโซม การเขียนสัญลักษณ์ของ genotype ของยีนมักเขียนโดยใช้ชนิด allele ที่ locus ที่สนใจของแต่ละแท่งโครโมโซม เช่น G/G (หรือ GG), G/A (หรือ GA) หรือ A/A (หรือ AA) เป็นต้น โดย genotype ที่มีความถี่มากที่สุดอาจเรียกว่า wild-type genotype ได้ ซึ่งลักษณะของ genotype จะ**เป็นตัวกำหนดการแสดงออกทางร่างกายหรือที่เรียกว่า ฟีโนไทป์ (phenotype) อีกทอดหนึ่ง ดังนั้นหากบุคคลมี genotype ที่แตกต่างกัน บุคคลนั้นมักจะมี phenotype ที่แตกต่างกันไปด้วยเช่นกัน เช่น ผู้ที่มี genotype ของยีน *VKORC1* ที่มีหน้าที่สำหรับการสร้างโปรตีนชื่อ vitamin K epoxide reductase complex1 (VKORC1) เป็น A/G หรือ A/A จะมีความไวต่อยา warfarin (ความไวต่อยาในที่นี้คือ phenotype) เพิ่มมากขึ้นกว่าผู้ที่มี genotype เป็น G/G เป็นต้น[9]
- **Heterozygous/homozygous** คือ ลักษณะยีนที่สนใจที่อธิบายด้วยลักษณะของ genotype โดย homozygous gene คือ ยีนซึ่งมี genotype ที่ locus ใดๆ ที่มีคู่ allele เป็นเบสชนิดเดียวกัน เช่น A/A หรือ G/G เป็นต้น ในขณะที่ genotype ที่คู่ allele เป็นเบสต่างชนิดกัน เช่น A/G หรือ C/T จะเรียกว่า heterozygous gene
- **Haplotype**[10] คือ คำเรียกลักษณะของ segment ของสาย DNA หรือยีนที่มีกลุ่มของ alleles ที่สนใจ (ตั้งแต่ 2 allele ขึ้นไป) ในตำแหน่งที่ต่างกัน โดย allele เหล่านั้นมักจะถูกถ่ายทอดทางพันธุกรรมไปด้วยกันและมักมีผลต่อการแสดงออกของ phenotype ตัวอย่างเช่น allele A ที่ตำแหน่ง 3673 (หรือ -1639) และ allele T ที่ตำแหน่ง 6484 ของยีน *VKORC1* มักจะมีการถ่ายทอดไปด้วยกันและมีผลต่อความไวต่อยา warfarin เหมือนกัน (รูปที่ 3B)[9] โดย haplotype ของยีนหรือ segment หนึ่งๆ ของสาย DNA อาจมีได้มากกว่า 1 รูปแบบหากมีการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมที่บริเวณดังกล่าว
- **Linkage disequilibrium (LD)**[10, 11] คือ คำเรียกความสัมพันธ์ระหว่าง alleles ที่ 2 locus (หรือมากกว่านั้น) บน haplotype เดียวกันหรือบน segment เดียวกันของสาย DNA หรือกล่าวได้ว่า allele เหล่านั้นมักจะถูกถ่ายทอดไปด้วยกันจากรุ่นพ่อแม่สู่รุ่นลูก ซึ่งความสัมพันธ์ระหว่าง allele ที่มี linkage disequilibrium นี้จัดเป็นความสัมพันธ์แบบไม่สุ่ม (non-random association) และมักเป็นผลมาจากการที่คู่ allele ทั้งสองนั้นอยู่ใกล้ชิดกันมากและไม่ถูกแบ่งออกจากกันในช่วง crossing over ของกระบวนการ meiosis ดังนั้นหากทราบว่า allele ใดบ้างที่มี LD จะช่วยให้การตรวจ genotype ง่ายขึ้นเนื่องจากสามารถเลือกตรวจ genotype เพียงบางส่วนก็เพียงพอที่จะทำให้ทราบลักษณะของ allele ที่เหลือบน haplotype
- **Hardy-Weinberg equilibrium (HWE)** คือ สภาวะสมดุลของสัดส่วนความถี่ของ allele ในประชากรหนึ่งๆ ภายใต้เงื่อนไขต่อไปนี้ ได้แก่ 1.) ประชากรต้องมีขนาดใหญ่ 2.) การผสมพันธุ์ต้องเป็นแบบสุ่ม 3.) ไม่มีการอพยพเข้าและออก 4.) การเกิด mutation มีน้อยมาก และ 5.) ไม่มีการคัดเลือกตามธรรมชาติ โดยความถี่ของ allele จะเป็นตัวกำหนดสัดส่วนของ genotype และสัดส่วนของ genotype จะยังคงที่เสมอในรุ่นต่อๆ ไปหากกลุ่มประชากรนั้นยังอยู่ในสภาวะ HWE



รูปที่ 3: A) ตัวอย่างลักษณะที่แตกต่างกันของลำดับเบสของยีนหนึ่งๆ บนสาย DNA[12] B) ตัวอย่าง haplotype ของยีน *VKORC1* ซึ่งคู่ allele ที่ตำแหน่ง 3673 และ 6484 มักถูกถ่ายทอดไปด้วยกัน



รูปที่ 4 Genetic variation ประเภทต่างๆ แบ่งตามลักษณะการเปลี่ยนแปลงที่เกิดกับลำดับเบสของยีนใดๆ[13]

การเปลี่ยนแปลงของลักษณะทางพันธุกรรม[13]

การเปลี่ยนแปลงลักษณะทางพันธุกรรม (genetic variation) สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภทตามความถี่ของ allele ที่เกิดการเปลี่ยนแปลงไปจากกลุ่มคนส่วนใหญ่ ได้แก่ 1) common allelic variation คือ allele ที่มีความถี่ของการพบอย่างน้อย 1% ของประชากรทั้งหมด ซึ่ง common allelic variation มีอีกชื่อเรียกหนึ่งคือ polymorphisms และ 2) rare alleleic variation คือ allele ที่มีความถี่ของการพบน้อยกว่า 1% ของประชากรทั้งหมด ซึ่งตำราวิชาการบางฉบับเรียก genetic variation ชนิดนี้ว่า “mutation”

นอกจากการแบ่งประเภทของ genetic variation ข้างต้น การแบ่งประเภทของ genetic variation ที่พบบ่อยในเอกสารทางวิชาการด้าน pharmacogenetics คือ การแบ่งตามลักษณะการเปลี่ยนแปลงของเบสบนโครโมโซม (รูปที่ 4) ได้แก่

1. Single nucleotide variations จัดเป็น genetic variation ที่พบบ่อยที่สุด โดยจะเกิดการเปลี่ยนแปลงของเบสเพียง locus เดียวของยีนใดๆ การเปลี่ยนแปลงชนิดนี้มีชื่อเรียกเฉพาะว่า “single nucleotide polymorphisms” (SNPs) ซึ่งในมนุษย์มีรายงานการค้นพบ อย่างน้อย 11 ล้าน SNPs โดย 7 ล้าน SNPs มีความถี่ของการพบมากกว่า 5% และ SNPs ที่เหลือมีความถี่ระหว่าง 1-5% ของจำนวนประชากร[14] และเนื่อง SNP เป็น genetic variation ที่พบได้ค่อนข้างบ่อยนี้เองทำให้ความสนใจในการศึกษาทาง pharmacogenetics เกี่ยวกับผลกระทบของ SNPs ต่อการทำงานของร่างกาย โดยเฉพาะการตอบสนองต่อยาหรือความเสี่ยงจากการใช้ยามีเป็นจำนวนมากและเริ่มที่จะสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการดูแลผู้ป่วยในทางปฏิบัติได้มากขึ้น
2. Structural variation เป็นการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมอีกรูปแบบหนึ่งที่มีความสำคัญ ซึ่ง structural variation จะเป็นการเปลี่ยนแปลงของเบสที่มากกว่า 1 ตำแหน่ง โดยรูปแบบที่พบได้ในปัจจุบันมี 4 ชนิด คือ insertion–deletions variation (indels), block substitutions variation, inversions variation และ copy number variation (CNV)

แม้การเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมจะมีอยู่มากมาย แต่บ่อยครั้งกลับพบว่าความเปลี่ยนแปลงดังกล่าวไม่ส่งผลทำให้เกิดความเปลี่ยนแปลงของ phenotype อย่างมีนัยสำคัญ สาเหตุที่เป็นเช่นนั้นเนื่องจาก phenotype บางชนิดถูกควบคุมด้วยหลายปัจจัย (complex phenotypic traits) เช่น พันธุกรรม สิ่งแวดล้อม หรือปฏิกิริยาระหว่างพันธุกรรมและสิ่งแวดล้อม ซึ่งปัจจัยแต่ละประเภทอาจมีอิทธิพลต่อ phenotype ที่แตกต่างกันเช่นกัน สำหรับปัจจัยทางพันธุกรรม phenotype บางชนิดอาจถูกควบคุมโดยยีนมากกว่า 1 ชนิด เช่น การเกิดโรค cystic fibrosis หรือ เบาหวานชนิดที่ 2 ทำให้เมื่อเกิดการเปลี่ยนแปลงของยีนเพียงหนึ่งชนิดไม่อาจส่งผลมากพอต่อการทำให้ phenotype เปลี่ยนแปลงได้ ด้วยเหตุนี้เองจึงทำให้มีความพยายามในการศึกษาเพื่อหายีนที่มีความสัมพันธ์และมีอิทธิพลมากต่อการแสดงออกของ phenotype เช่น การเกิดโรค ความสามารถในการกำจัดยา หรือการแพ้ยาที่พบได้บ่อยในทางคลินิก เป็นต้น โดยหนึ่งในวิธีการศึกษาดังกล่าวมีชื่อว่า Genome-wide association study (GWAS) ซึ่งเป็นการอาศัยแนวคิดเกี่ยวกับ linkage disequilibrium ร่วมกับการวิเคราะห์ทางสถิติเพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่าง allele ต่างๆ บนโครโมโซมและ phenotype (triat) จากกลุ่มตัวอย่างของประชากรที่สนใจ โดยข้อมูลล่าสุดในเดือนมิถุนายน พ.ศ. 2559 พบว่ามีการศึกษา GWAS ทั้งหมด 2457 ฉบับ และมีการพบความสัมพันธ์ระหว่าง SNP และ trait รวมทั้งหมด 21941 คู่[15] โดยเฉพาะ trait ที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อยาและความเสี่ยงต่อการเกิดอาการไม่พึงประสงค์จากยาซึ่งมีความสำคัญเป็นอย่างมากในทางเภสัชกรรม เช่น *HLA-B*1502, HLA-B3101* และการเกิด hypersensitivity reaction จากการใช้ยา carbamazepine หรือ *SLCO1B1* และความเสี่ยงต่อการเกิดอาการไม่พึงประสงค์ด้านกล้ามเนื้อจากยา simvastatin เป็นต้น[16]

การตรวจ genotype (genotyping) ในมนุษย์

เทคโนโลยีด้านการตรวจ genotype มีการพัฒนาไปอย่างต่อเนื่อง ทำให้ประสิทธิภาพ ความแม่นยำและความรวดเร็วของการตรวจ genotype มีสูงขึ้นกว่าสมัยก่อน ประกอบการแข่งขันทางการตลาดที่เริ่มสูงขึ้น ทำให้ราคาในการตรวจ genotype เริ่มลดลงตามลำดับ สำหรับการตรวจ genotype นั้นโดยทั่วไปจำเป็นต้องประกอบไปด้วยสิ่งจำเป็น 2 อย่าง ได้แก่

1. ตัวอย่าง DNA ที่สกัดได้จากสิ่งส่งตรวจ เช่น เลือด น้ำลาย หรือเนื้อเยื่อ

การเก็บตัวอย่างจากเลือดเป็นที่นิยมมากที่สุดในทางคลินิกเนื่องจากเป็นสิ่งที่บุคลากรทางสาธารณสุขมีความคุ้นเคยและมีเครื่องมือค่อนข้างพร้อม อย่างไรก็ดีการเก็บตัวอย่าง DNA จากน้ำลายเริ่มเป็นที่นิยมมากขึ้นเนื่องจากความสะดวกและความคงตัวของตัวอย่างที่อุณหภูมิห้อง[17] การสกัด DNA จากสิ่งส่งตรวจประกอบด้วยกระบวนการหลัก ได้แก่ การทำให้เซลล์แตก (cell lysis) ด้วยการใช้สารละลายที่เป็นด่าง การกำจัดโปรตีนที่ไม่เกี่ยวข้อง และการเก็บตัวอย่าง DNA ด้วยเอธานอล[18] จากนั้นตัวอย่าง DNA บางส่วนจะถูกนำไปใช้ตรวจ genotype และส่วนที่เหลือสามารถเก็บรักษาไว้ในที่อุณหภูมิ –70 องศาเซลเซียสเพื่อใช้ในคราวถัดไปได้หากมีความจำเป็น

2. เครื่องมือตรวจ genotype จากตัวอย่าง DNA ที่สกัดได้

วิธีการตรวจ genotype (genotyping technique) ในปัจจุบันมีหลายวิธี เช่น restriction fragment length polymorphism (RFLP), differential hybridization (TaqMan), allele-specific primer extension (SNaPshot, SNPstream, pyrosequencing), allele-specific oligonucleotide ligation (Applied Biosystems SNPlex), allele-specific extension (Illumina Omni Whole-Genome Arrays) และ single-base extension (Affymetrix 6.0) เป็นต้น โดยวิธีการเหล่านี้มีความเหมาะสมแตกต่างกันไปตามจำนวน SNPs ที่ต้องการตรวจในแต่ละครั้ง (ตารางที่1) ซึ่งปัจจุบันมีเครื่องมือ (platform) ที่อาศัยวิธีการตรวจ genotype ข้างต้นสำหรับ SNPs ของยีนต่างๆ เช่น *CYP2D6, CYP2C19, CYP2C9 และ VKORC1* ที่ได้รับการรับรองจากองค์การอาหารและยาประเทศสหรัฐอเมริกา (US FDA) แล้วอยู่หลายชนิด[19] ดังตารางที่ 2

หลังจากการตรวจ genotype แล้วการแปลผลตรวจเป็นอีกสิ่งหนึ่งที่จำเป็นซึ่งลักษณะการแปลผล genotype จะขึ้นกับลักษณะของการใช้ยาและปัญหาที่เกี่ยวข้องกับยา โดยเภสัชกรเป็นหนึ่งในผู้ที่มีความสามารถเหมาะสมที่จะเป็นผู้แปลผล genotype โดยเฉพาะการประยุกต์ใช้ที่เกี่ยวข้องกับยา ซึ่งในปัจจุบันมีงานบริการด้าน pharmacogenetics ในหลายๆ ที่ที่มีเภสัชกรเป็นแกนหลักของงานบริการที่ทำงานร่วมกับบุคลากรทางสาธารณสุขอื่นๆ ซึ่งเป็นการสร้างบทบาทของวิชาชีพเภสัชกรรมได้อย่างชัดเจน[19-21]

ตารางที่ 1 ความเหมาะสมของการตรวจหา SNPs ด้วยวิธีการ genotype ต่างๆ[2]

จำนวน SNPs ที่ต้องการตรวจ genotype	**วิธีการ genotype**
1 - 10	• TaqMan • LightTyper • Pyrosequencing
1 - 500	• SNaPshot • SNPlex • Sequenom MassARRAY • Illumina Golden Gate with BeadXpress readout
384 – 3,072	• Illumina Golden Gate with iScan readout
6,000 – 70,000	• Illumina Infinium iSelec Custom Beadchip
500,000 – 4,800,000	• Illumina Omni Whole-Genome Array • Affymetrix 6.0 Array

ตารางที่2 ตัวอย่างรายชื่อเครื่องมือสำหรับตรวจ genotype ที่ได้รับการอนุมัติจากองค์การอาหารและยาประเทศสหรัฐอเมริกา	
Gene	**Platform**
CYP2D6	• xTAG CYP2D6 Kit v3 • Roche AmpliChip CYP450 microarray
CYP2C19	• Spartan RX CYP2C19 Test System • Verigene CYP2C19 Nucleic Acid Test • INFINITI CYP2C19 Assay • Roche AmpliChip CYP450 microarray
CYP2C9 และ *VKORC1*	• eSensor Warfarin Sensitivity Test and XT-8 Instrument • eQ-PCR LC Warfarin Genotyping kit • Gentris Rapid Genotyping Assay - CYP2C9 & VKORC1 • INFINITI 2C9 & VKORC1 Multiplex Assay for Warfarin • Verigene Warfarin Metabolism Nucleic Acid Test and Verigene System

หลักการประยุกต์ใช้ความรู้ด้าน pharmacogenetics ในทางคลินิก

ในปัจจุบันข้อมูลความสัมพันธ์ระหว่าง genetic variation โดยเฉพาะ SNP และการตอบสนองต่อยามีเพิ่มขึ้นมากและเพียงพอที่จะนำมาประยุกต์ใช้ในการดูแลผู้ป่วย ซึ่งแนวทางการประยุกต์ใช้ข้อมูลอาจสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 รูปแบบ ได้แก่

1. การใช้ข้อมูลเพื่อคัดกรองผู้ป่วยที่มีความเสี่ยงต่อการเกิดอาการไม่พึงประสงค์จากการใช้ยา
2. การใช้ข้อมูลเพื่อช่วยเลือกในการตัดสินใจเลือกชนิดยาที่เหมาะสมต่อการรักษาผู้ป่วย
3. การใช้ข้อมูลเพื่อช่วยในการตัดสินใจเลือกขนาดยาที่เหมาะสมสำหรับผู้ป่วย

ตัวอย่างของยาที่มีการนำความรู้ด้าน pharmacogenetics มาประยุกต์ใช้ในทางคลินิกแสดงอยู่ในตารางที่ 3 ซึ่งในปัจจุบันข้อมูลจากเว็บไซต์ Pharmacogenomics Knowledgebase (PharmGKB) (https://www.pharmgkb.org/) ที่จัดทำโดยมหาวิทยาลัย Stanford ร่วมกับ Pharmacogenomics Research Network พบว่ามีแนวทางสำหรับการประยุกต์ใช้ข้อมูลด้าน pharmacogenetics ในทางคลินิกชื่อว่า Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) สำหรับคู่ยีนและยา (gene-drug pair) ต่างๆ ที่ได้รับการตีพิมพ์รวมทั้งสิ้น 33 ฉบับ โดย CPIC guideline บางส่วนถูกนำมาใช้จริงในการดูแลรักษาผู้ป่วยแล้ว เช่น คู่ยีน *CYP2C19* และยา clopidogrel[22] หรือ คู่ยีน *CYP2C9, VKORC1* และยา warfarin[20] เป็นต้น ซึ่งข้อมูลจากงานบริการด้าน pharmacogenetics ดังกล่าวแสดงให้เห็นถึงประโยชน์ในทางคลินิกรวมถึงประโยชน์ในด้านเศรษฐศาสตร์ที่มีโอกาสเป็นไปได้จริงด้วยเช่นกัน[23, 24]

ลักษณะการประยุกต์ใช้ข้อมูล	ยีน	ยา	เหตุผลและคำแนะนำเบื้องต้น
อาการไม่พึงประสงค์จากยา	*HLA-B*58:01*	Allopurinol[25]	หลีกเลี่ยงการใช้ allopurinol ในผู้ที่มี *HLA-B*58:01* allele เนื่องจากเพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิด severe cutaneous adverse reactions (SCARS)
	SLCO1B1	Simvastatin[26]	ผู้ที่มี SNP ของยีน *SLCO1B1* มีความเสี่ยงต่อการเกิดความเป็นพิษต่อกล้ามเนื้อจากการใช้ simvastatin จึงอาจจำเป็นต้องเปลี่ยนไปใช้ยา hydrophilic statin หรือลดขนาดยา simvastatin ลง
การเลือกชนิดยาที่เหมาะสม	*CYP2C19*	Clopidogrel[27]	หากมี loss-of-function allele ของยีน *CYP2C19* อาจทำให้ปริมาณ clopidogrel ในรูปที่ออกฤทธิ์ได้ลดลง ซึ่งอาจลดประสิทธิภาพในการป้องกันการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดและอาจจำเป็นต้องใช้ยาต้านการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดอื่นแทน เช่น prasugrel หรือ ticagrelor
	CYP2D6	Codeine[28]	Polymorphism ของยีน *CYP2D6* ทำให้การทำงานของเอนไซม์ CYP2D6 ซึ่งมีหน้าที่เปลี่ยนยา codeine โดยอาจทำให้ประสิทธิภาพลดลงหรือถูกเปลี่ยนเป็น morphine มากขึ้น และเสี่ยงต่อการเกิดอาการข้างเคียง ทำให้อาจจำเป็นต้องเปลี่ยนไปใช้ยากลุ่ม opioids ชนิดอื่นๆ
การเลือกขนาดยาที่เหมาะสม	*CYP3A5*	Tacrolimus[29]	Polymorphism ของยีน *CYP3A5* สามารถเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ CYP3A5 และอาจส่งผลให้ประสิทธิภาพในการกดภูมิของยา tacrolimus ลดลง โดยมีคำแนะนำให้เพิ่มขนาดยาเริ่มต้นเป็น 1.5 – 2 เท่าของขนาดยาปกติ แต่ไม่ควรเกิน 0.3 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมต่อวัน
	CYP2C9 *VKORC1*	Warfarin[30]	Polymorphism ของยีน *CYP2C9* และ *VKORC1* ส่งผลให้ความต้องการของขนาดยา warfarin ลดลง และผู้ป่วยมีความไวต่อยา warfarin เพิ่มขึ้น ตามลำดับ การใช้ข้อมูล genotype ร่วมกับข้อมูลทางคลินิกอื่นๆ มีส่วนช่วยให้การประมาณขนาดยา warfarin ที่ทำให้ค่า INR อยู่ในช่วงของการรักษามีความถูกต้องมากขึ้น

จากข้อมูลข้างต้นจะเห็นได้ว่ามีคู่ยีนและยาจำนวนมากที่มีประโยชน์ในการประยุกต์ใช้สำหรับการดูแลรักษาผู้ป่วย ดังนั้นหากมีข้อมูล genotype สำหรับผู้ป่วยที่พร้อมสำหรับการแปลผลก่อนเริ่มการรักษาด้วยยาต่างๆ น่าจะช่วยการรักษามีประสิทธิภาพและปลอดภัยมากขึ้น แต่ในความเป็นจริงการตรวจ genotype โดยส่วนใหญ่มักจะเป็นการสั่งตรวจภายหลังจากที่มีการตัดสินใจเริ่มยาไปแล้วซึ่งอาจทำให้การปรับขนาดยาหรือเปลี่ยนตัวยามีความล่าช้ากว่าจะทราบผล genotype โดยเฉพาะในกรณีที่ต้องส่งสิ่งส่งตรวจไปยังห้องปฏิบัติการภายนอกสถานพยาบาลเพื่อนำมาประกอบการตัดสินใจใช้ยาหรือปรับขนาดยาเริ่มต้น จึงทำให้มีแนวคิดในการตรวจ genotype สำหรับยีนหลายๆ ชนิดที่มักจะเกี่ยวข้องกับการใช้ยาส่วนใหญ่ไว้ล่วงหน้าในคราวเดียวเพื่อให้มีข้อมูล genotype ที่พร้อมหากจำเป็นต้องพิจารณาคัดเลือกหรือปรับขนาดยา แต่อย่างไรก็ดี แม้วิธีการตรวจ genotype ล่วงหน้า (pre-emptive genotyping approach) นี้จะช่วยให้มีความสะดวกรวดเร็วขึ้นเมื่อต้องการใช้ข้อมูล แต่ราคาสำหรับการตรวจใน

ปัจจุบันยังคงสูงอยู่ และในบางรายอาจไม่จำเป็นต้องได้รับยาที่เกี่ยวข้องกับยีนที่ทำการ genotype เลยตลอดชีวิตซึ่งอาจทำให้เกิดความสิ้นเปลืองโดยไม่จำเป็น ทำให้การตรวจ genotype ภายหลังจากทราบว่าผู้ป่วยจำเป็นต้องใช้ยา (reactive genotyping approach) จึงยังเป็นที่นิยมในทางคลินิก

สรุป

การประยุกต์ใช้ข้อมูลด้าน pharmacogenetics ในการดูแลผู้ป่วยเริ่มมีบทบาทมากขึ้นในการเป็นข้อมูลสนับสนุนการตัดสินใจใช้ยาและเลือกขนาดยาที่เหมาะสมสำหรับผู้ป่วย การทำความเข้าใจความรู้พื้นฐานด้าน pharmacogenetics จะช่วยให้การต่อยอดความรู้ของเภสัชกรเป็นไปอย่างสะดวกและรวดเร็ว อีกทั้งยังเป็นการเพิ่มโอกาสในการสร้างบทบาทของวิชาชีพเภสัชกรรมในศาสตร์แขนงนี้เช่นกัน โดยเฉพาะในแง่ของการเป็นผู้ให้ความรู้เกี่ยวกับ pharmacogenetics แก่ผู้ป่วย (patient education) และบุคลากรทางการแพทย์อื่นๆ รวมถึงบทบาทที่สำคัญ คือ การนำความรู้และข้อมูลการศึกษาด้าน pharmacogenetics มาประยุกต์ใช้ในการดูแลผู้ป่วยเพื่อให้การทำงานแบบสหวิชาชีพเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพและช่วยเพิ่มความเหมาะสมและความปลอดภัยในการดูแลรักษาผู้ป่วย

เอกสารอ้างอิง

1. Bull L. Genetics M, and Polymorphisms. In: Madame Curie Bioscience Database [Internet]. Austin (TX): Landes Bioscience; 2000-2013. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6475/]. Accessed on June 20, 2016.
2. Li A, Meyre D. Jumping on the Train of Personalized Medicine: A Primer for Non-Geneticist Clinicians: Part 1. Fundamental Concepts in Molecular Genetics. Curr Psychiatry Rev 2014;10(2):91-100.
3. Jorde LB, Wooding SP. Genetic variation, classification and 'race'. Nat Genet 2004;36(11 Suppl):S28-33.
4. The National Human Genome Research Institute. Basic of Chromosomes. Available at: https://geneed.nlm.nih.gov/topic_subtopic.php?tid=15&sid=17. Access date: June 12, 2016.
5. http://www.mayoclinic.org/tests-procedures/genetic-testing/multimedia/genetic-disorders/sls-20076216. Accessed on June 20, 2016 MFfMEaRHgdaioAa.
6. Molowa DT, Schuetz EG, Wrighton SA, et al. Complete cDNA sequence of a cytochrome P-450 inducible by glucocorticoids in human liver. Proc Natl Acad Sci U S A 1986;83(14):5311-5.
7. Pennisi E. Genomics. ENCODE project writes eulogy for junk DNA. Science 2012;337(6099):1159, 61.
8. Gu L, Tsark WM, Brown DA, Blanchard S, Synold TW, Kane SE. A new model for studying tissue-specific mdr1a gene expression in vivo by live imaging. Proc Natl Acad Sci U S A 2009;106(13):5394-9.
9. Owen RP, Gong L, Sagreiya H, Klein TE, Altman RB. VKORC1 pharmacogenomics summary. Pharmacogenet Genomics 2010;20(10):642-4.
10. Wall JD, Pritchard JK. Haplotype blocks and linkage disequilibrium in the human genome. Nat Rev Genet 2003;4(8):587-97.

11. Kato M, Sekine A, Ohnishi Y, et al. Linkage disequilibrium of evolutionarily conserved regions in the human genome. BMC Genomics 2006;7:326.
12. Genetic Science Learning Center. Making SNPs Make Sense. Learn.Genetics. Available at: http://learn.genetics.utah.edu/content/pharma/snips/. Accessed June 20.
13. Frazer KA, Murray SS, Schork NJ, Topol EJ. Human genetic variation and its contribution to complex traits. Nat Rev Genet 2009;10(4):241-51.
14. Kruglyak L, Nickerson DA. Variation is the spice of life. Nat Genet 2001;27(3):234-6.
15. Welter D MJ, Morales J, Burdett T, Hall P, Junkins H, Klemm A, Flicek P, Manolio T, Hindorff L, and Parkinson H. The NHGRI GWAS Catalog, a curated resource of SNP-trait associations. Nucleic Acids Research, 2014, Vol. 42 (Database issue): D1001-D1006.
16. Meyer UA, Zanger UM, Schwab M. Omics and drug response. Annu Rev Pharmacol Toxicol 2013;53:475-502.
17. Li A, Meyre D. Jumping on the Train of Personalized Medicine: A Primer for Non-Geneticist Clinicians: Part 2. Fundamental Concepts in Genetic Epidemiology. Curr Psychiatry Rev 2014;10(2):101-17.
18. Visvikis S, Schlenck A, Maurice M. DNA extraction and stability for epidemiological studies. Clin Chem Lab Med 1998;36(8):551-5.
19. Arwood MJ, Chumnumwat S, Cavallari LH, Nutescu EA, Duarte JD. Implementing Pharmacogenomics at Your Institution: Establishment and Overcoming Implementation Challenges. Clin Transl Sci 2016. doi:10.1111/cts.12404.
20. Nutescu EA, Drozda K, Bress AP, et al. Feasibility of implementing a comprehensive warfarin pharmacogenetics service. Pharmacotherapy 2013;33(11):1156-64.
21. Crews KR, Cross SJ, McCormick JN, et al. Development and implementation of a pharmacist-managed clinical pharmacogenetics service. Am J Health Syst Pharm 2011;68(2):143-50.
22. Owusu-Obeng A, Weitzel KW, Hatton RC, et al. Emerging roles for pharmacists in clinical implementation of pharmacogenomics. Pharmacotherapy 2014;34(10):1102-12.
23. Nutescu EA DJ, Cheng W, et al. Novel Genotype Guided Personalized Warfarin Service Improves Outcomes in an Ethnically Diverse Population. Abstract published in: Circulation 2014;130:A16119.
24. Gor D, Kim K, Chumnumwat S, et al. Cost-Effectiveness Of A Novel Pharmacist Guided Warfarin Pharmacogenetic Service. Value Health 2015;18(7):A390.
25. Saito Y, Stamp LK, Caudle KE, et al. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) guidelines for human leukocyte antigen B (HLA-B) genotype and allopurinol dosing: 2015 update. Clin Pharmacol Ther 2016;99(1):36-7.
26. Wilke RA, Ramsey LB, Johnson SG, et al. The clinical pharmacogenomics implementation consortium: CPIC guideline for SLCO1B1 and simvastatin-induced myopathy. Clin Pharmacol Ther 2012;92(1):112-7.
27. Scott SA, Sangkuhl K, Stein CM, et al. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium guidelines for CYP2C19 genotype and clopidogrel therapy: 2013 update. Clin Pharmacol Ther 2013;94(3):317-23.
28. Crews KR, Gaedigk A, Dunnenberger HM, et al. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium guidelines for cytochrome P450 2D6 genotype and codeine therapy: 2014 update. Clin Pharmacol Ther 2014;95(4):376-82.

29. Birdwell KA, Decker B, Barbarino JM, et al. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) Guidelines for CYP3A5 Genotype and Tacrolimus Dosing. Clin Pharmacol Ther 2015;98(1):19-24.
30. Johnson JA, Gong L, Whirl-Carrillo M, et al. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium Guidelines for CYP2C9 and VKORC1 genotypes and warfarin dosing. Clin Pharmacol Ther 2011;90(4):625-9.