



วารสาร ไทยโกชัยนิพนธ์

ปีที่ 1 ฉบับที่ 5 พฤศจิกายน 2547 (หน้า 15-26)

บทความพิเศษวิชาการ สำหรับการศึกษาต่อเนื่องทางเภสัชศาสตร์ (on-line)



## ความสำคัญของการศึกษาการเมแทบอลิซึมยาโดยใช้จุลินทรีย์ (Importance of Drug Metabolism Study Using Microbial Models)

รหัส 1-000-SPU-000-0411-02

จำนวน 1.5 หน่วยกิตการศึกษาต่อเนื่อง

วันที่รับรอง 1 พฤศจิกายน พ.ศ. 2547

วันที่หมดอายุ 1 พฤศจิกายน พ.ศ. 2549

ภญ.ผศ.ดร.ปนัดดา ไยภักดี

ภญ.ดร.คนาวรรณ พจนาคม

ภาควิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร

วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์ อ.เมือง จ.นครปฐม 73000

### วัตถุประสงค์เชิงพฤติกรรม

1. เพื่อทบทวนความหมาย ความสำคัญและวิธีการแปรสภาพยาในร่างกาย
2. เพื่อทราบถึงศักยภาพของการใช้จุลินทรีย์ในการนำมาศึกษาการเมแทบอลิซึมยา
3. เพื่อทราบถึงความสำคัญของการศึกษาการเมแทบอลิซึมยาโดยใช้จุลินทรีย์

### บทคัดย่อ

การเมแทบอลิซึมยาในร่างกายทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเคมีจัดเป็นกระบวนการหนึ่งที่สำคัญในการกำจัดยา และมีผลต่อฤทธิ์ทางการรักษา ผลข้างเคียง ระยะเวลาและความแรงในการออกฤทธิ์ การศึกษาการเมแทบอลิซึมยามีความสำคัญและทำให้ได้ข้อมูลด้านเภสัชพลศาสตร์และเภสัชจลนศาสตร์ของยานั้น การศึกษาโดยใช้จุลินทรีย์เป็นวิธีการหนึ่งที่ยอมรับโดยเฉพาะอย่างยิ่งในการศึกษาเบื้องต้น เนื่องจากวิธีการแปรสภาพยาในจุลินทรีย์บางสายพันธุ์มีความคล้ายคลึงกับที่พบในคน วิธีการศึกษาไม่ยุ่งยากซับซ้อนและได้สารเมแทบอไลต์ในปริมาณมากพอสำหรับการแยกสกัดให้บริสุทธิ์เพื่อการพิสูจน์โครงสร้างและนำมาศึกษาทางด้านเภสัชวิทยา ข้อมูลเบื้องต้นเกี่ยวกับวิธีการแปรสภาพและโครงสร้างของสารเมแทบอไลต์ที่ได้ยังอาจใช้เป็นข้อมูลเปรียบเทียบกับการศึกษาโดยวิธีอื่นๆ ต่อไป

คำสำคัญ : การเมแทบอลิซึมยา จุลินทรีย์

## ความสำคัญของการศึกษาการเมแทบอลิซึมยาโดยใช้จุลินทรีย์ (Importance of Drug Metabolism Study Using Microbial Models)

### บทนำ

การเมแทบอลิซึมยา (drug metabolism) จัดเป็นกระบวนการหนึ่งที่สำคัญในการกำจัดยาออกจากร่างกาย โดยเกิดกระบวนการแปรสภาพและเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางเคมีของยาโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ต่างๆ ที่เกี่ยวข้องได้เป็นสารเมแทบอไลต์ที่มีโครงสร้างทางเคมีแตกต่างไปจากเดิม ขึ้นอยู่กับชนิดของปฏิกิริยาเคมีที่เร่งให้เกิดขึ้นได้โดยเอนไซม์ในกลุ่มต่าง ๆ

โดยทั่วไปแล้วการเมแทบอลิซึมยามักทำให้เกิดสารเมแทบอไลต์ที่ไม่มีฤทธิ์ทางการรักษา มีคุณสมบัติความเป็นพิษสูงขึ้นและขจัดออกจากร่างกายได้ง่ายขึ้น อย่างไรก็ตามมีหลายกรณีที่พบว่าสารเมแทบอไลต์ของยาบางชนิดยังคงแสดงฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาอยู่ หรือบางชนิดกลับปรากฏความเป็นพิษขึ้น<sup>1,2</sup>

การเมแทบอลิซึมยาในร่างกายจึงมีบทบาทสำคัญทั้งต่อคุณสมบัติด้านเภสัชพลศาสตร์ (pharmacodynamics) และด้านเภสัชจลนศาสตร์ (pharmacokinetics) ของยานั้น<sup>3</sup> สารเมแทบอไลต์ที่มีโครงสร้างทางเคมีเปลี่ยนไปย่อมส่งผลกระทบต่อการศึกษาและการเกิดผลข้างเคียงที่ไม่พึงประสงค์ รวมทั้งยังมีผลต่อระยะเวลาและความแรงในการออกฤทธิ์ โดยเฉพาะเมื่อยาหนึ่ง ๆ เกิดการเมแทบอลิซึมได้อย่างรวดเร็วกลายเป็นสารเมแทบอไลต์ที่ไม่มีฤทธิ์

นอกจากนี้ยังพบได้ว่าอันตรกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างยาบางชนิดอาจเป็นผลเกี่ยวเนื่องกับการเมแทบอลิซึมยา ยาที่สามารถยับยั้งหรือเหนี่ยวนำการทำงานของเอนไซม์กลุ่มต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการเมแทบอลิซึมของยาอีกชนิดส่งผลให้อัตราการเมแทบอลิซึมของยานั้นช้าลงหรือเร็วขึ้นได้ เกิดการเปลี่ยนแปลงผลทางการรักษาหรือก่อให้เกิดความเป็นพิษที่ต่างไปจากการได้รับยาเพียงชนิดเดียว

ความรู้ความเข้าใจที่ดีเกี่ยวกับการเมแทบอลิซึมยาในร่างกายจะช่วยให้การคัดเลือกยาในผู้ป่วยแต่ละรายเป็นไปได้อย่างเหมาะสม รวมทั้งยังมีความสำคัญในการศึกษาวิจัยพัฒนาเพื่อการค้นหายาใหม่ ทั้งนี้เพราะสารเมแทบอไลต์ชนิดต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นในระหว่างวิถีการแปรสภาพมักมีคุณสมบัติทางเคมีกายภาพที่ต่างไปจากเดิม ทำให้มีผลต่อประสิทธิภาพทางการรักษาของยานั้น ยาใหม่เป็นจำนวนมากที่ได้จากการค้นคว้าวิจัยเมื่อนำมาทดสอบในระยะคลินิกลบให้ผลการรักษาไม่เป็นที่น่าพอใจ ส่วนหนึ่งเป็นผลมาจากปัญหาการเมแทบอลิซึมยาในร่างกายได้เป็นสารเมแทบอไลต์ที่มีคุณสมบัติทางเคมีกายภาพไม่เหมาะสมต่อการออกฤทธิ์นั่นเอง

งานวิจัยจำนวนมากที่มุ่งพัฒนาหาวิธีการที่เหมาะสมสำหรับการศึกษา ติดตามและทำนายผลของการเมแทบอลิซึมยาในร่างกาย<sup>4-6</sup> วิธีการที่รู้จักกันดีที่นำมาใช้ในการศึกษาการเมแทบอลิซึมยา ได้แก่ การศึกษาโดยใช้แบบจำลองในสัตว์ทดลอง (*in vivo* animal models) แบบจำลองในหลอดทดลอง (*in vitro* models) โดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยง (*in vitro* cell cultures) โดยใช้เอนไซม์ (*in vitro* enzyme system)<sup>5,6</sup> และแบบจำลองโดยใช้จุลินทรีย์ (microbial models)

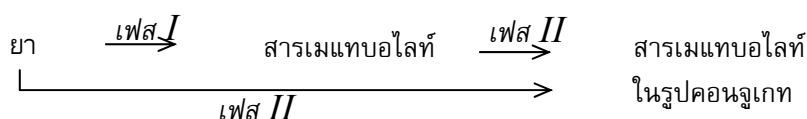
การศึกษาการเมแทบอลิซึมยาโดยใช้จุลินทรีย์เป็นแบบจำลองเพื่อดูวิธีการแปรสภาพและการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางเคมีของยาเป็นวิธีการหนึ่งที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย<sup>7,8</sup> โดยเฉพาะในการศึกษาวิจัยระยะเริ่มต้น เนื่องจากสามารถช่วยลดการใช้สัตว์ทดลอง มีวิธีการศึกษาที่ค่อนข้างสะดวก ไม่ต้องใช้ประสบการณ์ความเชี่ยวชาญสูง การลงทุนไม่มากเท่ากับวิธีการใช้เซลล์เพาะเลี้ยงหรือการใช้เอนไซม์ และเนื่องจากวิธีการแปรสภาพยาส่วนใหญ่ทั้งในคนและในสัตว์มักเกิดโดยปฏิกิริยาออกซิเดชันประเภทต่าง ๆ (oxidative metabolism) ซึ่งอาศัยการทำงานของเอนไซม์ในกลุ่มไซโทโครมพี 450 โมโนออกซีจีเนส หรือที่นิยมเรียกสั้น ๆ ว่า CYP (cytochrome P450 monooxygenases) เอนไซม์กลุ่มนี้มิได้ปรากฏแต่เฉพาะในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมเท่านั้น แต่ยังสามารถพบได้ในจุลินทรีย์หลายสายพันธุ์ ด้วยเหตุนี้จึงได้มีการนำจุลินทรีย์มาใช้เป็นเครื่องมือในการศึกษาการเมแทบอลิซึมยามีรายงานการใช้จุลินทรีย์ในการศึกษาการเมแทบอลิซึมยาชนิดต่าง ๆ<sup>7-9</sup> เช่น โพรพานอลอล (propanolol) เฟนอะเซทิน (phenacetin) คาร์บามาเซปีน (carbamazepine) ทามอกซิเฟน (tamoxifen) และธีโอฟิลลีน (theophylline) เป็นต้น

บทความนี้กล่าวถึงความสำคัญของการศึกษาการเมแทบอลิซึมยาโดยใช้จุลินทรีย์ โดยเนื้อหาในส่วนต้นเป็นการทบทวนความรู้เกี่ยวกับวิธีการแปรสภาพยาในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม จากนั้นจะกล่าวถึงการเมแทบอลิซึมยาในจุลินทรีย์และวิธีการศึกษาโดยสังเขป พร้อมทั้งแสดงตัวอย่างการศึกษาการเมแทบอลิซึมยาชนิดต่าง ๆ โดยใช้จุลินทรีย์เปรียบเทียบกับการใช้สัตว์ทดลอง และในส่วนท้ายของบทความจะกล่าวถึงข้อดีข้อด้อยของการใช้แบบจำลองโดยใช้จุลินทรีย์เพื่อให้เห็นถึงความสำคัญและประโยชน์ของการศึกษาดังกล่าว

## การเมแทบอลิซึมยา

### การเมแทบอลิซึมยาในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (mammalian metabolism)

การเมแทบอลิซึมยาหรือวิธีการแปรสภาพยาในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมแบ่งออกได้เป็นสองเฟส (phase) หลักคือ เฟส I (phase I หรือ functionalization) และเฟส II (phase II หรือ conjugation)<sup>10</sup> ดังแสดงในรูปที่ 1



รูปที่ 1 วิธีการแปรสภาพยา

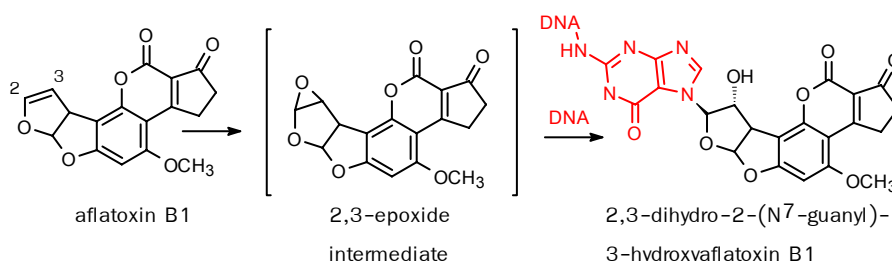
วิธีการแปรสภาพยาเฟส I ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางเคมีของยาได้โดยอาศัยปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation) รีดักชัน (reduction) และไฮโดรไลซิส (hydrolysis) ในขณะที่วิธีการแปรสภาพยาเฟส II เกี่ยวข้องกับการเกิดปฏิกิริยาคอนจูเกชันระหว่างยาหรือสารเมแทบอลไลต์ที่ได้จากเฟส I กับสารต่าง ๆ ที่มีอยู่ในร่างกาย เช่น กลูคูโรนิกแอซิด (glucuronic acid) ซัลเฟต (sulfate)

และไกลซีน (glycine) เป็นต้น สารเมแทบอลิท์ในรูปคอนจูเกตส่วนใหญ่มักมีคุณสมบัติการละลายน้ำสูงขึ้น ทำให้ขจัดออกทางไตได้ง่าย

การเมแทบอลิซึมยาอาจเกิดขึ้นได้โดยปฏิกิริยาต่าง ๆ ในเฟส I และ II ขึ้นอยู่กับโครงสร้างทางเคมีของยาดังสรุปในตารางที่ 1 โดยทั่วไปยาส่วนใหญ่มักเกิดการแปรสภาพในเฟส I โดยปฏิกิริยาออกซิเดชันประเภทต่าง ๆ เช่น ปฏิกิริยาไฮดรอกซิเลชัน (hydroxylation) อีพอกซิเดชัน (epoxidation) เอ็น-ดีอัลคิเลชัน (N-dealkylation) และ เอ็น-ออกซิเดชัน (N-oxidation) เป็นต้น สารเมแทบอลิท์ที่ได้ อาจไม่มีฤทธิ์และเข้าสู่การเมแทบอลิซึมในเฟส II แล้วขจัดออกจากร่างกายต่อไป หรือบางตัวอาจมีฤทธิ์หรือความเป็นพิษมากขึ้น ขึ้นอยู่กับโครงสร้างทางเคมีของสารเมแทบอลิท์ที่ได้

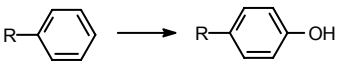
ตัวอย่างที่น่าสนใจได้แก่ การเมแทบอลิซึมยาโดยการเกิดปฏิกิริยาอีพอกซิเดชันที่บริเวณพันธะคู่ได้เป็นสารเมแทบอลิท์ที่มีหมู่อีพอกไซด์ (epoxide) ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นอิเล็กโตรไฟล์ (electrophile) และมีความไวสูงในการเกิดปฏิกิริยาต่อไป โดยทั่วไปแล้วหมู่อีพอกไซด์มักเกิดปฏิกิริยาต่อเนื่องเปลี่ยนไปเป็นหมู่ไฮดรอกซีและตามด้วยการเกิดปฏิกิริยาคอนจูเกชันในเฟส II ขจัดออกจากร่างกายต่อไป

อย่างไรก็ตามมีรายงานการศึกษาพบความเป็นพิษก่อให้เกิดมะเร็งของสารกลุ่มนี้บางตัว เนื่องจากสารเมแทบอลิท์อีพอกไซด์ที่เกิดขึ้นกลับไปทำปฏิกิริยาจับกับแมโครโมเลกุล เช่น ดีเอ็นเอหรือโปรตีนในร่างกาย ทำให้เกิดการแบ่งตัวของเซลล์ที่ผิดปกติไปและก่อให้เกิดมะเร็ง<sup>1,2</sup> ตัวอย่างเช่น การเมแทบอลิซึมสารอะฟลาทอกซินได้เป็นสารเมแทบอลิท์อีพอกไซด์ที่ไปทำปฏิกิริยาจับกับส่วนเบสของสายดีเอ็นเอก่อให้เกิดมะเร็งได้ที่ตับ ดังแสดงในรูปที่ 2



รูปที่ 2 การเมแทบอลิซึมของสารอะฟลาทอกซิน บีหนึ่ง และสารเมแทบอลิท์ที่มีผลก่อมะเร็ง

ตารางที่ 1 ตารางสรุปวิธีการแปรสภาพยาเฟส I และ II และปฏิกิริยาที่เกี่ยวข้อง<sup>9-11</sup>

| Reaction type                    | Substrate type                                                                                                                                                                   | Enzyme involved                         | Examples                                                                                                                                                                       |
|----------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1 Phase I<br>(functionalization) |                                                                                                                                                                                  |                                         |                                                                                                                                                                                |
| 1.1 Oxidations                   |                                                                                                                                                                                  |                                         |                                                                                                                                                                                |
| 1.1.1 hydroxylation              | <ul style="list-style-type: none"> <li>aromatic, allylic, benzylic cpds.</li> <li>aliphatic, alicyclic cpds.</li> <li>carbonyl, imine cpd. with <math>\alpha</math>-C</li> </ul> | CYP                                     | <br>$R-CH_3 \longrightarrow R-CH_2OH$<br>$R-CH_2-C(=O)-R' \longrightarrow R-CH(OH)-C(=O)-R'$ |
| 1.1.2 epoxidation                | <ul style="list-style-type: none"> <li>aromatic, allylic cpds.</li> </ul>                                                                                                        | CYP                                     |                                                                                              |
| 1.1.3 N-, O-, S-dealkylation     | <ul style="list-style-type: none"> <li>N-, O-, S-alkyl drvs.</li> </ul>                                                                                                          | CYP                                     | $R-O-CH_3 \longrightarrow [R-O-CH_2OH] \longrightarrow R-OH + CH_2O$                                                                                                           |
| 1.1.4 N-, S-oxidation            | <ul style="list-style-type: none"> <li>2°, 3° amines</li> <li>S-alkyl drvs.</li> </ul>                                                                                           | CYP, FMO                                | $(CH_3)_3-N \longrightarrow [(CH_3)_3-N-OH] \longrightarrow (CH_3)_3-NO + H^+$                                                                                                 |
| 1.1.5 deamination                | <ul style="list-style-type: none"> <li>amines</li> </ul>                                                                                                                         | CYP, MAO                                | $R-CH_2-NH_2 \xrightarrow{MAO} RCHO + NH_4$<br>$R-\underset{\substack{  \\ NH_2}}{CH}-CH_3 \xrightarrow{CYP} RCOCH_3 + CH_2O$                                                  |
| 1.1.6 oxidation                  | <ul style="list-style-type: none"> <li>alcohol, aldehydes</li> </ul>                                                                                                             | Dehydrogenase                           | $CH_3-CH_2-OH \longrightarrow CH_3-CHO$                                                                                                                                        |
| 1.2 Reductions                   | <ul style="list-style-type: none"> <li>aldehydes, ketones</li> <li>azo, nitro</li> </ul>                                                                                         | Reductase                               | $R-\overset{\overset{O}{  }}{C}-H \longrightarrow R-\underset{\underset{OH}{ }}{C}-H$                                                                                          |
| 1.3 Hydrolysis                   | <ul style="list-style-type: none"> <li>ester</li> <li>amides</li> <li>epoxides</li> </ul>                                                                                        | Esterase<br>Amidase<br>Epoxide hydrases | $R-\overset{\overset{O}{  }}{C}-OR' \longrightarrow R-\overset{\overset{O}{  }}{C}-OH$                                                                                         |

| Reaction type                    | Substrate type                                                                                                                | Enzyme involved            | Examples                          |
|----------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------|-----------------------------------|
| 2 Phase II<br>(Conjugation)      |                                                                                                                               |                            |                                   |
| 2.1 Glucuronidation              | <ul style="list-style-type: none"> <li>alcohols, phenols</li> <li>carboxylic acids</li> <li>amines</li> <li>thiols</li> </ul> | UDP-glucuronyl transferase | <p>(O-glucuronide metabolite)</p> |
| 2.2 Sulfation                    | <ul style="list-style-type: none"> <li>phenols, alcohols</li> <li>aromatic amines</li> <li>N-hydroxy cpds.</li> </ul>         | Sulfotransferase           |                                   |
| 2.3 Conjugation with amino acids | <ul style="list-style-type: none"> <li>carboxylic acids</li> </ul>                                                            | N-acyltransferase          |                                   |
| 2.4 Glutathione conjugation      | <ul style="list-style-type: none"> <li>epoxides</li> <li>reactive electron-deficient cpds.</li> </ul>                         | Glutathione-S-transferase  | Glutathione adduct                |
| 2.5 Acetylation                  | <ul style="list-style-type: none"> <li>1° amines</li> <li>sulfonamides</li> <li>hydrazines, hydrazides</li> </ul>             | Acetyltransferase          |                                   |
| 2.6 Methylation                  | <ul style="list-style-type: none"> <li>phenols</li> </ul>                                                                     | Methyltransferase          |                                   |

CYP = cytochrome P450 monooxygenase, FMO = flavin-containing monooxygenase, MAO = monoamine oxidase

การเมแทบอลิซึมยาในเฟส I โดยปฏิกิริยาประเภทออกซิเดชัน จึงถือได้ว่าเป็นกลไกสำคัญในการแสดงฤทธิ์หรือความเป็นพิษของยา รวมทั้งการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางเคมีของยาเพื่อเอื้อต่อการแปรสภาพในเฟส II และการขจัดออกจากร่างกายต่อไป เอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญในการเร่งปฏิกิริยาประเภทนี้ในร่างกายคือ เอนไซม์กลุ่ม CYP ซึ่งพบได้มากที่บริเวณตับ และอาจพบได้ในอวัยวะอื่น เช่น ไต ปอด และลำไส้ เป็นต้น

เอนไซม์กลุ่ม CYP ที่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาออกซิเดชันของยากกลุ่มต่าง ๆ ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมมีอยู่สามตระกูล (family) หลักคือ ตระกูล I-III โดยเฉพาะตระกูลย่อย (subfamily) ซึ่งได้แก่ CYP2C CYP2D CYP2E และ CYP3A4 สำหรับ CYP ที่อยู่ในตระกูล IV-XXIV จะเกี่ยวข้องกับการเมแทบอลิซึมสารที่มีอยู่แล้วในร่างกาย เช่น ฮอร์โมนต่าง ๆ และไม่พบว่ามีความเกี่ยวข้องกับการเมแทบอลิซึมยาหรือสารเคมีที่ร่างกายได้รับจากภายนอก<sup>11</sup>

### การเมแทบอลิซึมยาในจุลินทรีย์ (microbial metabolism)

มีรายงานการค้นพบเอนไซม์กลุ่ม CYP ในแบคทีเรีย ซึ่งไม่ได้เป็นเอนไซม์แบบชนิดที่ฝังตัวอยู่ในเมมเบรน (membrane-bound enzyme) ดังที่พบในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม<sup>11</sup> ตัวอย่างเช่น การค้นพบเอนไซม์ CYP101 จาก *Pseudomonas putida* และ CYP102 จาก *Bacillus megaterium* อย่างไรก็ตามเอนไซม์เหล่านี้ค่อนข้างมีความจำเพาะสูงต่อโครงสร้างทางเคมีของสารตั้งต้น สามารถเร่งปฏิกิริยาการแปรสภาพได้เฉพาะสารบางกลุ่มเท่านั้น เช่น CYP102 เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันได้เฉพาะสารกลุ่มกรดไขมัน<sup>12</sup> เนื่องจากข้อจำกัดของเอนไซม์ CYP จากแบคทีเรียในการทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้นเฉพาะกลุ่ม ทำให้แบคทีเรียไม่เป็นที่นิยมนำมาใช้ในการศึกษาการเมแทบอลิซึมยา

สำหรับเราถึงแม้ว่าจะยังไม่มีรายงานการแยกเอนไซม์ CYP ได้ชัดเจนเช่นแบคทีเรีย แต่กลับพบรายงานการศึกษาเป็นจำนวนมากที่แสดงถึงศักยภาพของราในการเมแทบอลิซึมยาและสารในกลุ่มต่าง ๆ<sup>7-9,13</sup> จึงเป็นไปได้ว่าราซึ่งเป็นเซลล์ยูคาริโอต (eukaryote) เช่นกันน่าจะมีเอนไซม์ที่มีหน้าที่ทำงานคล้ายกับเอนไซม์กลุ่ม CYP ที่พบในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม และจากการศึกษาโดย Smith และ Rosazza<sup>14</sup> ที่เกี่ยวข้องกับการเมแทบอลิซึมยาโดยใช้ราบางสายพันธุ์พบว่ามียาที่มีการแปรสภาพที่คล้ายคลึงกับที่พบได้ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม จึงทำให้ราเป็นที่นิยมใช้ในการนำมาศึกษาการเมแทบอลิซึมยาเพื่อให้ได้ข้อมูลเบื้องต้นอันมีประโยชน์ต่อการทำนายวิถีการแปรสภาพยาที่อาจเกิดขึ้นได้ในคน

### การศึกษาการเมแทบอลิซึมยาโดยใช้จุลินทรีย์

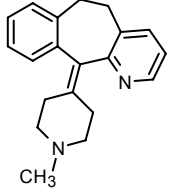
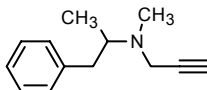
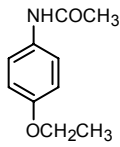
ดังที่ได้กล่าวไว้แล้วข้างต้น วิธีการศึกษาการเมแทบอลิซึมยามีได้หลายวิธี เช่น การศึกษาในสัตว์ทดลองหรือการใช้เซลล์เพาะเลี้ยง แต่วิธีการเหล่านี้ค่อนข้างมีค่าใช้จ่ายสูง ปัญหาเรื่องจริยธรรมของการใช้สัตว์ทดลอง และความยากในการพิสูจน์ทราบโครงสร้างของสารเมแทบอไลต์ที่มีปริมาณเพียงเล็กน้อยโดยเฉพาะเมื่อทำการศึกษาโดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยง อย่างไรก็ตามการใช้เครื่องมือและเทคนิคในการวิเคราะห์ขั้นสูง เช่น การใช้ระบบ LC-MS (Liquid Column–Mass Spectroscopy) และ LC-NMR (Liquid Column–Nuclear Magnetic Resonance) อาจสามารถนำมาใช้ในการพิสูจน์หา

โครงสร้างของสารที่มีปริมาณเพียงเล็กน้อยได้ แต่ข้อเสียที่สำคัญคือเครื่องมือราคาสูงและการบำรุงรักษาที่ต้องการใช้ความรู้ความชำนาญมาก

ที่ผ่านมาได้มีการใช้จุลินทรีย์เป็นแบบจำลองในการศึกษาการเมแทบอลิซึมของยาหลายกลุ่ม โดยการศึกษาส่วนใหญ่นิยมใช้เชื้อรามากกว่าแบคทีเรียเนื่องจากข้อจำกัดของการใช้เชื้อแบคทีเรียดังกล่าวข้างต้น การศึกษาการเมแทบอลิซึมยาหลายกลุ่มโดยใช้เชื้อราพบว่าสามารถทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางเคมีโดยปฏิกิริยาออกซิเดชันประเภทต่างๆ เช่นเดียวกับที่พบได้ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม<sup>7-9,14</sup> ราสายพันธุ์ที่นิยมนำมาใช้ในการศึกษาการเมแทบอลิซึมยาและให้ผลการศึกษาที่น่าสนใจ ได้แก่ ราในกลุ่ม *Cunninghamella* เช่น *C. elegans* *C. echinulata* และ *C. blakesleeana* เป็นต้น มีรายงานเป็นจำนวนมากพบว่าราดังกล่าวทำให้เกิดการแปรสภาพยาได้โดยอาศัยปฏิกิริยาออกซิเดชันประเภทต่าง ๆ ได้เป็นสารเมแทบอลิท์ที่มีโครงสร้างเช่นเดียวกับที่ได้จากการเมแทบอลิซึมในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม<sup>9,15-18</sup>

การศึกษาการเมแทบอลิซึมโดยราสายพันธุ์ *Cunninghamella*<sup>9</sup> ของยากลุ่มแก้ซึมเศร้าหลายชนิด เช่น อะมิทริปไทลีน (amitryptiline) โดเซพิน (doxepin) และอิมิพรามิน (imipramine) พบว่าสามารถเกิดการแปรสภาพโดยปฏิกิริยาเอ็น-ดีอัลคิเลชัน นอกจากนี้การเมแทบอลิซึมของยาแก้แพ้หลายชนิด เช่น ไซโปรเฮปทาดีน (cyproheptadine) บรอมเฟนิรามีน (bromphemiramine) และ คลอเฟนิรามีน (chlorpheniramine) สามารถเกิดปฏิกิริยาเอ็น-ดีอัลคิเลชันในราสายพันธุ์ดังกล่าวเช่นเดียวกับในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม นอกจากนี้ยังมีตัวอย่างอื่น ๆ อีกดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ตัวอย่างการศึกษาการเมแทบอลิซึมยาโดยใช้ *C. elegans*<sup>9,15,16</sup>

| ยา                                                                                                                             | การแปรสภาพยาที่เกิดขึ้น<br>ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม                                   | การแปรสภาพยาที่เกิดขึ้น<br>ใน <i>C. elegans</i>       |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
| Azatadine (antihistamine) <sup>15</sup><br> | Hydroxylation<br>N-demethylation<br>Methylhydroxylation                             | N-oxidation<br>N-demethylation<br>Methylhydroxylation |
| Deprenyl (antidepressant) <sup>9</sup><br>  | N-demethylation                                                                     | N-demethylation                                       |
| Phenacetin (analgesic) <sup>16</sup><br>    | O-dealkylation<br>N-hydroxylation<br>Arene oxide formation<br>Glutathione conjugate | O-dealkylation                                        |

นอกจากการใช้รากลุ่ม *Cunninghamella* ในการศึกษาการเมแทบอลิซึมยาแล้ว ยังมีการใช้รากลุ่มอื่น ๆ อีก<sup>7-9,13-14</sup> ได้แก่ รากลุ่ม *Aspergillus* สายพันธุ์ต่าง ๆ เช่น *A. niger* *A. terreus* *A. oryzae* และ *A. alliaceus* ราสายพันธุ์ *Gliocladium deliquescens* และ *Rhizopus nigricans* รวมทั้ง *Penicillium* บางสายพันธุ์ เช่น *P. chrysogenum* และ *P. notatum*

อย่างไรก็ตาม การศึกษาการเมแทบอลิซึมยาโดยใช้จุลินทรีย์เพียงหนึ่งสายพันธุ์อาจไม่ได้สารเมแทบอลิท์ทั้งหมดหรือเหมือนกับที่เกิดขึ้นในสัตว์ ในทางปฏิบัติแล้วควรใช้จุลินทรีย์หลายสายพันธุ์เพื่อนำมาทำการศึกษาเพื่อให้สามารถครอบคลุมการเกิดปฏิกิริยาต่าง ๆ ที่อาจเกิดขึ้นได้กับยานั้น

วิธีการศึกษาการเมแทบอลิซึมยาโดยใช้จุลินทรีย์ได้รับการพัฒนาขึ้นโดย Smith and Rosazza<sup>14</sup> มีแนวทางโดยสรุปคือ เริ่มจากการเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์ โดยอาจคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีรายงานการศึกษามาก่อนแล้วหรืออาจทำการทดสอบศักยภาพเพื่อหาสายพันธุ์ใหม่ อย่างไรก็ตาม การศึกษาส่วนใหญ่นิยมใช้สายพันธุ์มาตรฐานเพื่อลดความยุ่งยากในการพิสูจน์ทราบชนิดของสายพันธุ์

ในการทดสอบเบื้องต้นควรทำการศึกษาโดยใช้จุลินทรีย์หลายสายพันธุ์ เพื่อให้มีโอกาสมากขึ้นในการค้นพบเชื้อสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพตามต้องการ ดังนั้นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้จึงต้องมีความหลากหลาย อย่างไรก็ตามในการศึกษาเบื้องต้น อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้มักเป็นชนิดเหลวที่อุดมด้วยสารอาหารเพื่อให้มีการเจริญของเชื้อได้ดีทั่วกัน โดยหากเป็นเชื้อราอาหารเลี้ยงเชื้อที่นิยมใช้เช่น PDB (Potato Dextrose Broth) และอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Nutrient Broth สำหรับการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย

ในขั้นตอนการเพาะเลี้ยง วิธีการ Two-stage fermentation เป็นวิธีที่นิยมใช้ในการศึกษา<sup>19</sup> เริ่มจากการเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ประมาณ 120-150 รอบต่อนาที เป็นเวลาประมาณ 48-72 ชั่วโมง เพื่อให้มีปริมาณเชื้อเจริญพอเหมาะ จากนั้นจึงเปลี่ยนถ่ายเชื้อสู่การเพาะเลี้ยงในระยะที่สอง (stage II) เพาะเลี้ยงต่อไปอีกเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จึงเติมสารละลายตัวอย่างยาที่ต้องการศึกษาลงไป โดยตัวทำละลายที่นิยมใช้ ได้แก่ เอทานอล (ethanol) ไดเมทิลฟอร์มาไมด์ (dimethylformamide) หรือ ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (dimethylsulfoxide) หากตัวยามีปัญหาด้านการละลายอาจใช้ ทวิน 80 (Tween 80) 0.1% ช่วยได้

ในการศึกษาเบื้องต้น ปริมาณยาที่ใช้ในการศึกษาอยู่ที่ประมาณ 0.1-0.5 มิลลิกรัม ต่อเชื้อปริมาณ 1 มิลลิลิตร โดยหลังจากการเติมสารละลายยาแล้ว จะทำการเพาะเลี้ยงต่อไปอีกเป็นเวลาประมาณ 24-72 ชั่วโมง (อาจมีการเก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง เพื่อดูการเปลี่ยนแปลงของยา) แล้วจึงทำการวิเคราะห์ดูว่าเกิดการแปรสภาพยาอย่างไร ซึ่งทำได้โดยการสกัดแยกด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ที่เหมาะสมจากนั้นจึงทำการวิเคราะห์หาปริมาณและพิสูจน์ทราบโครงสร้างโดยใช้เทคนิคอื่น ๆ ต่อไป เช่น TLC (Thin Layer Chromatography) GC (Gas Chromatography) HPLC (High Performance Liquid Chromatography) และ NMR (Nuclear Magnetic Resonance) เป็นต้น

## บทสรุป

การศึกษาการเมแทบอลิซึมยาโดยใช้จุลินทรีย์มีข้อดีอยู่หลายประการ ได้แก่ ค่าใช้จ่ายในการลงทุนไม่สูงมาก เครื่องมือ วัสดุและอุปกรณ์สามารถจัดหาหรือเตรียมได้โดยง่าย วิธีการไม่ยุ่งยากซับซ้อน ปริมาณยาที่ใช้ในการศึกษาสามารถใช้ได้ในปริมาณมากกว่าในการศึกษาโดยวิธีอื่น ๆ ทำให้ได้สารเมแทบอลิท์ในปริมาณมากพอสำหรับการแยกสกัดเพื่อพิสูจน์ทราบโครงสร้าง ทดสอบฤทธิ์ หรือการศึกษาอื่น ๆ ต่อไปได้

การศึกษาการเมแทบอลิซึมยาโดยใช้จุลินทรีย์มีปฏิกริยาการแปรสภาพของยาหลายชนิดใกล้เคียงกับที่เกิดขึ้นในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม วิธีการนี้จึงเหมาะสำหรับใช้ในการศึกษาการเมแทบอลิซึมยาในเบื้องต้นและยังเป็นการช่วยลดปริมาณการใช้สัตว์ทดลองลงได้บ้าง นอกจากนี้จุลินทรีย์บางสายพันธุ์มีความจำเพาะต่อปฏิกริยาที่เกิดขึ้น ได้สารเมแทบอลิท์เพียงชนิดใดชนิดหนึ่งในปริมาณสูง ซึ่งจะมีประโยชน์ในแง่การสกัดแยกและนำมาพิสูจน์ทราบโครงสร้างได้ง่ายขึ้น เพื่อนำมาใช้เป็นสารมาตรฐานสำหรับอ้างอิงในการศึกษาโดยวิธีอื่น ๆ ต่อไป

อย่างไรก็ตาม การศึกษาการเมแทบอลิซึมยาโดยใช้จุลินทรีย์อาจไม่ครอบคลุมการเกิดวิถีการแปรสภาพหรือปฏิกริยาทั้งหมดที่อาจเกิดขึ้นได้ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม สารเมแทบอลิท์หลักที่พบในคนอาจเป็นชนิดที่เกิดขึ้นเพียงเล็กน้อยในจุลินทรีย์ รวมทั้งความแตกต่างในแง่ความจำเพาะเจาะจงต่อโครงสร้างยาของเอนไซม์ CYP ที่พบในคนและในจุลินทรีย์ จัดเป็นข้อจำกัดสำคัญที่ทำให้การศึกษาการเมแทบอลิซึมยาโดยใช้จุลินทรีย์ไม่สามารถนำมาทดแทนการใช้ข้อมูลการศึกษาการเมแทบอลิซึมยาโดยวิธีอื่น ๆ เพื่อการทำนายข้อมูลยาทางด้านเภสัชพลศาสตร์และเภสัชจลนศาสตร์ที่อาจเกิดขึ้นในการศึกษาการเมแทบอลิซึมยาในสัตว์ทดลอง รวมทั้งการศึกษาในระยะคลินิกยังคงมีความจำเป็นเพื่อให้ได้ข้อมูลที่ถูกต้องแม่นยำเกี่ยวกับวิถีการแปรสภาพยาที่เกิดขึ้นได้ในคน

ข้อดีที่สำคัญของการศึกษาการเมแทบอลิซึมยาโดยใช้จุลินทรีย์คือ การได้มาซึ่งสารเมแทบอลิท์ในปริมาณที่มากพอสำหรับการนำมาพิสูจน์ทราบโครงสร้าง และใช้ประโยชน์เพื่อการศึกษาทางด้านเภสัชวิทยาและพิษวิทยา รวมทั้งยังใช้เป็นสารมาตรฐานอ้างอิงเพื่อการศึกษาการเมแทบอลิซึมยาโดยวิธีอื่น ๆ ได้ต่อไป โดยเฉพาะเมื่อการสังเคราะห์ทางเคมีของสารนั้นทำได้ยาก เช่น สารเมแทบอลิท์ที่มีสเตอริโอเคมี (stereochemistry) ซับซ้อน นอกจากนี้แล้วการศึกษาเบื้องต้นโดยใช้จุลินทรีย์เพื่อดูการเมแทบอลิซึมของยาใหม่ที่อยู่ในขั้นตอนการวิจัย อาจได้ข้อมูลวิถีการแปรสภาพและโครงสร้างของสารเมแทบอลิท์ของยานั้น ซึ่งสามารถนำมาใช้เป็นข้อมูลประกอบเปรียบเทียบกับการศึกษาในสัตว์ทดลอง และอาจทำให้การศึกษาการเมแทบอลิซึมยาเป็นไปได้อย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพมากขึ้น

## เอกสารอ้างอิง

1. Low LK. Metabolic changes of drugs and related organic compounds, In: Delgado JN, Remers WA (ed) Wilson and Gisvold's textbook of organic medicinal and pharmaceutical chemistry, 10<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1998: 43-122.
2. Williams DA. Drug metabolism, In: Williams DA, Lemke TL (ed) Foye's principles of medicinal chemistry, 5<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2002: 174-233.
3. Testa B, Mayer J. Molecular toxicology and the medicinal chemist. II Farmaco 1998; 53: 287-291.
4. Bugrim A, Nikolskaya T, Nikolsky Y. Early prediction of drug metabolism and toxicity: systems biology approach and modeling. DDT 2004; 9(3): 127-135.
5. Friedberg T. Recombinant *in vitro* tool to predict drug metabolism and safety. PSTT 2000; 3(3): 99-105.
6. Ekins s, Ring BJ, Grace J, et al. Present and future in vitro approaches for drug metabolism. Journal of Pharmacological and Toxicological Methods 2000; 44: 313-324.
7. Aborashed EA, Clark AM, Hufford CD. Microbial models of mammalian metabolism of xenobiotics: an updated review. Current Medicinal Chemistry 1999; 6(5): 359-374.
8. Azerad R. Microbial models for drug metabolism. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology 1999; 63: 169-218.
9. Srisilam K, Veeresham C. Biotransformation of drugs by microbial cultures for predicting mammalian drug metabolism. Biotechnology 2003; 21: 3-39.
10. Magdalou J, Fournel-Gigleux S, Testa B, Ouzzine M. Biotransformation reactions, In: Wermuth CG (ed) The Practice of Medicinal Chemistry, 2<sup>nd</sup> ed. London: Academic Press, 2003: 517-544.
11. Jezequel SG. Microbial models of mammalian metabolism: uses and misuses. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 1998; 5: 371-7.
12. Fulco AJ. P450BM-3 and other inducible bacterial P450 cytochromes: biochemistry and regulation. Annual Review of Pharmacology and Toxicology 1991; 31: 177-203.
13. Faber K (ed) Biotransformations in organic chemistry. New York: Springer-Verlag, 1992.
14. Smith RV, Rosazza JP. Microbial models of mammalian metabolism. Journal of Pharmaceutical Sciences 1975; 64(11): 1737-1759.

15. Zhang D, Hansen EB, Deck J, Heinze TM, Sutherland JB, Cerniglia CE. Fungal biotransformation of the antihistamine azatadine by *Cunninghamella elegans*. Applied and Environmental Microbiology 1996; 62(9): 3477-3479.
16. Reddy CS, Acosta D, Davis PJ. Microbial models of mammalian metabolism: biotransformations of phenacetin and its O-alkyl homologues with *Cunninghamella* species. Xenobiotica 1990; 20(12): 1281-1297.
17. Sun L, Huang HH, Liu L, Zhong DF. Transformation of verapamil by *Cunninghamella blakesleeana*. Applied and Environmental Microbiology 2004; 70(5): 2722-2727.
18. Zhong D, Sun L, Liu L, Huang HH. Microbial transformation of naproxen by *Cunninghamella* species. Acta Pharmacologica Sinica 2003; 24(5): 442-447.
19. ปันดดา ไยภักดี การค้นพบยาจากเชื้อจุลินทรีย์ วารสารมหาวิทยาลัยศิลปากร 2543; 19-20(2): 1-26.