



กระทรวงศึกษาธิการ

ปี 1 ฉบับที่ 1000-SPU-000-0411-02

การขอรับใบอนุญาตประกอบวิชาชีพ (on-line)



ความสำคัญของการศึกษาการเมแทบอลิซึมยาโดยใช้จุลินทรีย์ (Importance of Drug Metabolism Study Using Microbial Models)

ภญ.ผศ.ดร.ปนัดดา โยงศักดิ์ และ ภญ.อ.ดร.คนาวรรณ พจนาคม

ภาควิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร

วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์ อ.เมือง จ.นครปฐม 73000

รหัส 1-000-SPU-000-0411-02

จำนวน 1.5 หน่วยกิตการศึกษาต่อเนื่อง

วันที่รับรอง 1 พฤศจิกายน พ.ศ. 2547

วันที่หมดอายุ 1 พฤศจิกายน พ.ศ. 2549

วัตถุประสงค์เชิงพฤติกรรม

1. เพื่อทบทวนความหมาย ความสำคัญและวิธีการแปรสภาพยาในร่างกาย
2. เพื่อทราบถึงศักยภาพของการใช้จุลินทรีย์ในการนำมาศึกษาการเมแทบอลิซึมยา
3. เพื่อทราบถึงความสำคัญของการศึกษาการเมแทบอลิซึมยาโดยใช้จุลินทรีย์

บทคัดย่อ

การเมแทบอลิซึมยาในร่างกายทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเคมีจัดเป็นกระบวนการหนึ่งที่สำคัญในการกำจัดยา และมีผลต่อฤทธิ์ทางการรักษา ผลข้างเคียง ระยะเวลาและความแรงในการออกฤทธิ์ การศึกษาการเมแทบอลิซึมยามีความสำคัญและทำให้ได้ข้อมูลด้านเภสัชพลศาสตร์และเภสัชจลนศาสตร์ของยานั้น การศึกษาโดยใช้จุลินทรีย์เป็นวิธีการหนึ่งที่ยอมรับโดยเฉพาะอย่างยิ่งในการศึกษาเบื้องต้น เนื่องจากวิธีการแปรสภาพยาในจุลินทรีย์บางสายพันธุ์มีความคล้ายคลึงกับที่พบในคน วิธีการศึกษาไม่ยุ่งยากซับซ้อนและได้สารเมแทบอไลต์ในปริมาณมากพอสำหรับการแยกสกัดให้บริสุทธิ์เพื่อการพิสูจน์โครงสร้างและนำมาศึกษาทางด้านเภสัชวิทยา ข้อมูลเบื้องต้นเกี่ยวกับวิธีการแปรสภาพและโครงสร้างของสารเมแทบอไลต์ที่ได้ยังอาจใช้เป็นข้อมูลเปรียบเทียบกับการศึกษาโดยวิธีอื่นๆต่อไป

คำสำคัญ

การเมแทบอลิซึมยา จุลินทรีย์

บทนำ

การเมแทบอลิซึมยา (drug metabolism) จัดเป็นกระบวนการหนึ่งที่สำคัญในการกำจัดยาออกจากร่างกาย โดยเกิดกระบวนการแปรสภาพและเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางเคมีของยาโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้อง ได้เป็นสารเมแทบอลิต์ที่มีโครงสร้างทางเคมีแตกต่างไปจากเดิม ขึ้นอยู่กับชนิดของปฏิกิริยาเคมีที่เร่งให้เกิดขึ้นได้โดยเอนไซม์ในกลุ่มต่าง ๆ

โดยทั่วไปแล้วการเมแทบอลิซึมยามักทำให้เกิดสารเมแทบอลิต์ที่ไม่มีฤทธิ์ทางการรักษา มีคุณสมบัติความเป็นขั้วสูงขึ้นและขจัดออกจากร่างกายได้ง่ายขึ้นอย่างไรก็ตามมีหลายกรณีที่พบว่าสารเมแทบอลิต์ของยาบางชนิดยังคงแสดงฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาอยู่ หรือบางชนิดกลับปรากฏความเป็นพิษขึ้น^{1,2}

การเมแทบอลิซึมยาในร่างกายจึงมีบทบาทสำคัญทั้งต่อคุณสมบัติด้านเภสัชพลศาสตร์ (pharmacodynamics) และด้านเภสัชจลนศาสตร์ (pharmacokinetics) ของยานั้น³ สารเมแทบอลิต์ที่มีโครงสร้างทางเคมีเปลี่ยนไปย่อมส่งผลกระทบต่อกระบวนการเปลี่ยนแปลงฤทธิ์ทางการรักษาและการเกิดผลข้างเคียงที่ไม่พึงประสงค์ รวมทั้งยังมีผลต่อระยะเวลาและความแรงในการออกฤทธิ์ โดยเฉพาะเมื่อยาหนึ่ง ๆ เกิดการเมแทบอลิซึมได้อย่างรวดเร็วกลายเป็นสารเมแทบอลิต์ที่ไม่มีฤทธิ์ นอกจากนี้ยังพบได้ว่าอันตรกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างยาบางชนิดอาจเป็นผลเกี่ยวเนื่องกับการเมแทบอลิซึมยาที่สามารถยับยั้งหรือเหนี่ยวนำการทำงานของเอนไซม์กลุ่มต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการเมแทบอลิซึมของยาอีกชนิด ส่งผลให้อัตราการเมแทบอลิซึมของยานั้นช้าลงหรือเร็วขึ้นได้ เกิดการเปลี่ยนแปลงผลทางการรักษาหรือก่อให้เกิดความเป็นพิษที่ต่างไปจากการได้รับยาเพียงชนิดเดียว

ความรู้ความเข้าใจที่ดีเกี่ยวกับการเมแทบอลิซึมยาในร่างกายจะช่วยให้การคัดเลือกยาในผู้ป่วยแต่ละรายเป็นไปได้อย่างเหมาะสม รวมทั้งยังมีความสำคัญในการศึกษาวิจัยพัฒนาเพื่อการค้นหายาใหม่ ทั้งนี้เพราะสารเมแทบอลิต์ชนิดต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นในระหว่างวิถีการแปรสภาพมักมีคุณสมบัติทางเคมีกายภาพที่ต่างไปจากเดิม ทำให้มีผลต่อประสิทธิภาพทางการรักษาของยานั้น ยาใหม่เป็นจำนวนมากที่ได้จากการค้นคว้าวิจัยเมื่อนำมาทดสอบในระยะคลินิกกลับให้ผลการรักษาไม่เป็นที่น่าพอใจ ส่วนหนึ่งเป็นผลมาจากปัญหาการเมแทบอลิซึมยาในร่างกายได้เป็นสารเมแทบอลิต์ที่มีคุณสมบัติทางเคมีกายภาพไม่เหมาะสมต่อการออกฤทธิ์นั่นเอง

งานวิจัยจำนวนมากที่มุ่งพัฒนาหาวิธีการที่เหมาะสมสำหรับการศึกษา ติดตามและทำนายผลของการเมแทบอลิซึมยาในร่างกาย⁴⁻⁶ วิธีการที่รู้จักกันดีที่นำมาใช้ในการศึกษาการเมแทบอลิซึมยา ได้แก่ การศึกษาโดยใช้แบบจำลองในสัตว์ทดลอง (*in vivo* animal models) แบบจำลองในหลอดทดลอง (*in vitro* models) โดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยง (*in vitro* cell cultures) โดยใช้เอนไซม์ (*in vitro* enzyme system)^{5,6} และแบบจำลองโดยใช้จุลินทรีย์ (microbial models)

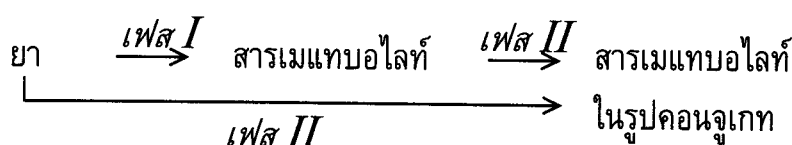
การศึกษาการเมแทบอลิซึมยาโดยใช้จุลินทรีย์เป็นแบบจำลองเพื่อดูวิถีการแปรสภาพและการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางเคมีของยาเป็นวิธีการหนึ่งที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย^{7,8} โดยเฉพาะในการศึกษาวิจัยระยะเริ่มต้น เนื่องจากสามารถช่วยลดการใช้สัตว์ทดลอง มีวิธีการศึกษาที่ค่อนข้างสะดวก ไม่ต้องใช้ประสบการณ์ความเชี่ยวชาญสูง การลงทุนไม่มาก เท่ากับวิธีการใช้เซลล์เพาะเลี้ยงหรือการใช้เอนไซม์ และเนื่องจากวิถีการแปรสภาพยาส่วนใหญ่ทั้งในคนและในสัตว์มักเกิดโดยปฏิกิริยาออกซิเดชันประเภทต่าง ๆ (oxidative metabolism) ซึ่งอาศัยการทำงานของเอนไซม์ในกลุ่มไซโทโครม พี 450 โมโนออกซิจีเนส หรือที่นิยมเรียกสั้น ๆ ว่า CYP (cytochrome P450 monooxygenases) เอนไซม์กลุ่มนี้มิได้ปรากฏแต่เฉพาะในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมเท่านั้น แต่ยังสามารถพบได้ในจุลินทรีย์หลายสายพันธุ์ด้วยเหตุนี้จึงได้มีการนำจุลินทรีย์มาใช้เป็นเครื่องมือในการศึกษาการเมแทบอลิซึมยามีรายงานการใช้จุลินทรีย์ในการศึกษาการเมแทบอลิซึมยาชนิดต่าง ๆ⁷⁻⁹ เช่น โพรพานอลอล (propanolol) เฟนอะเซทิน (phenacetin) คาร์บามาเซปีน (carbamazepine) ทามอกซิเฟน (tamoxifen) และธีโอฟิลลีน (theophylline) เป็นต้น

บทความนี้กล่าวถึงความสำคัญของการศึกษาการเมแทบอลิซึมยาโดยใช้จุลินทรีย์ โดยเนื้อหาในส่วนต้นเป็นการทบทวนความรู้เกี่ยวกับวิธีการแปรสภาพยาในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม จากนั้นจะกล่าวถึงการเมแทบอลิซึมยาในจุลินทรีย์และวิธีการศึกษาโดยสังเขป พร้อมทั้งแสดงตัวอย่างการศึกษาการเมแทบอลิซึมยารชนิดต่างๆ โดยใช้จุลินทรีย์เปรียบเทียบกับการใช้สัตว์ทดลอง และในส่วนท้ายของบทความจะกล่าวถึงข้อดีข้อด้อยของการใช้แบบจำลองโดยใช้จุลินทรีย์เพื่อให้เห็นถึงความสำคัญและประโยชน์ของการศึกษาดังกล่าว

การเมแทบอลิซึมยา

การเมแทบอลิซึมยาในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (mammalian metabolism)

การเมแทบอลิซึมยาหรือวิธีการแปรสภาพยาในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมแบ่งออกได้เป็นสองเฟส (phase) หลักคือเฟส I (phase I หรือ functionalization) และเฟส II (phase II หรือ conjugation)¹⁰ ดังแสดงในรูปที่ 1



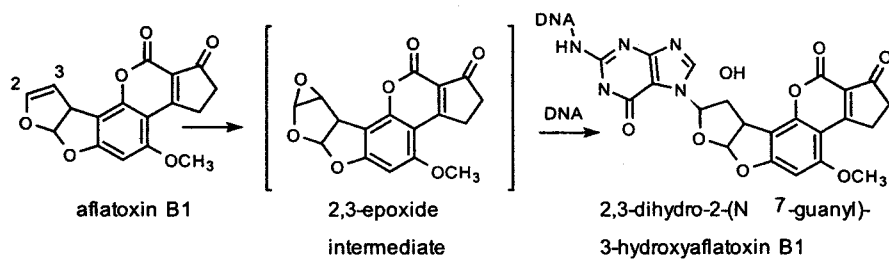
รูปที่ 1 วิธีการแปรสภาพยา

วิธีการแปรสภาพยาเฟส I ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางเคมีของยาได้โดยอาศัยปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation) รีดักชัน (reduction) และไฮโดรไลซิส (hydrolysis) ในขณะที่วิธีการแปรสภาพยาเฟส II เกี่ยวข้องกับการเกิดปฏิกิริยาคอนจูเกชันระหว่างยาหรือสารเมแทบอลิท์ที่ได้จากเฟส I กับสารต่าง ๆ ที่มีอยู่ในร่างกาย เช่น กลูคูโรนิกแอซิด (glucuronic acid) ซัลเฟต (sulfate) และไกลซีน (glycine) เป็นต้น สารเมแทบอลิท์ในรูปคอนจูเกทส่วนใหญ่มักมีคุณสมบัติการละลายน้ำสูงขึ้น 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 สารเมแทบอลิท์ที่ได้อาจไม่มีฤทธิ์และเข้าสู่การเมแทบอลิซึมในเฟส II แล้วขจัดออกจากร่างกายต่อไป หรือบางตัวอาจมีฤทธิ์หรือความเป็นพิษมากขึ้น ขึ้นอยู่กับโครงสร้างทางเคมีของสารเมแทบอลิท์ที่ได้

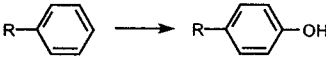
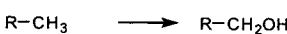
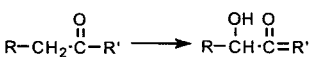
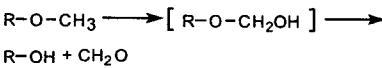
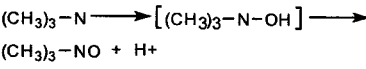
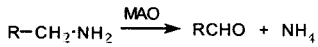
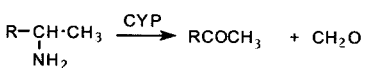
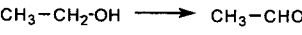
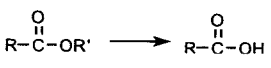
ตัวอย่างที่น่าสนใจ ได้แก่ การเมแทบอลิซึมยาโดยการเกิดปฏิกิริยาอีพอกซิเดชันที่บริเวณพันธะคู่ได้เป็นสารเมแทบอลิท์ที่มีหมู่อีพอกไซด์ (epoxide) ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นอิเล็กโตรไฟล์ (electrophile) และมีความไวสูงในการเกิดปฏิกิริยาต่อไป โดยทั่วไปแล้วหมู่อีพอกไซด์มักเกิดปฏิกิริยาต่อเนื่องเปลี่ยนไปเป็นหมู่ไฮดรอกซีและตามด้วยการเกิดปฏิกิริยาคอนจูเกชันในเฟส II ขจัดออกจากร่างกายต่อไป

อย่างไรก็ตามมีรายงานการศึกษาพบความเป็นพิษก่อให้เกิดมะเร็งของสารกลุ่มนี้บางตัว เนื่องจากสารเมแทบอลิท์อีพอกไซด์ที่เกิดขึ้นกลับไปทำปฏิกิริยากับกับแมโครโมเลกุล เช่น ดีเอ็นเอหรือโปรตีนในร่างกาย ทำให้เกิดการแบ่งตัวของเซลล์ที่ผิดปกติไปและก่อให้เกิดมะเร็ง^{1,2} ตัวอย่างเช่น การเมแทบอลิซึมสารอะฟลาทอกซินได้เป็นสารเมแทบอลิท์อีพอกไซด์ที่ไปทำปฏิกิริยากับส่วนเบสของสายดีเอ็นเอก่อให้เกิดมะเร็งได้ที่ตับ ดังแสดงในรูปที่ 2



รูปที่ 2 การเมแทบอลิซึมของสารอะฟลาทอกซิน บีหนึ่ง และสารเมแทบอไลต์ที่มีผลก่อมะเร็ง

ตารางที่ 1 ตารางสรุปวิธีการแปรสภาพยาเฟส I และ II และปฏิกิริยาที่เกี่ยวข้อง⁹⁻¹¹

Reaction type	Substrate type	Enzyme involved	Examples
1 Phase I			
(functionalization)			
1.1 Oxidations			
1.1.1 hydroxylation			
	• aromatic, allylic, benzylic cpds. • aliphatic, alicyclic cpds. • carbonyl, imine cpd. with α-C	CYP	  
1.1.2 epoxidation	• aromatic, allylic cpds.	CYP	
1.1.3 N-, O-, S-dealkylation	• N-, O-, S-alkyl drvs.	CYP	
1.1.4 N-, S-oxidation	• 2°, 3° amines • S-alkyl drvs.	CYP, FMO	
1.1.5 deamination	• amines	CYP, MAO	 
1.1.6 oxidation	• alcohol, aldehydes	Dehydrogenase	
1.2 Reductions	• aldehydes, ketones • azo, nitro	Reductase	
1.3 Hydrolysis	• ester • amides • epoxides	Esterase Amidase Epoxide hydrases	

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 และไม่พบว่ามีเกี่ยวข้องกับการเมแทบอลิซึมยาหรือสารเคมีที่ร่างกายได้รับจากภายนอก¹¹

การเมแทบอลิซึมยาในจุลินทรีย์ (microbial metabolism)

มีรายงานการค้นพบเอนไซม์กลุ่ม CYP ในแบคทีเรีย ซึ่งไม่ได้เป็นเอนไซม์แบบชนิดที่ฝังตัวอยู่ในเมมเบรน (membrane-bound enzyme) ดังที่พบในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม¹¹ ตัวอย่างเช่น การค้นพบเอนไซม์ CYP101 จาก *Pseudomonas putida* และ CYP102 จาก *Bacillus megaterium* อย่างไรก็ตามเอนไซม์เหล่านี้ค่อนข้างมีความจำเพาะสูงต่อโครงสร้างทางเคมีของสารตั้งต้น สามารถเร่งปฏิกิริยาการแปรสภาพได้เฉพาะสารบางกลุ่มเท่านั้น เช่น CYP102 เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันได้เฉพาะสารกลุ่มกรดไขมัน¹² เนื่องจากข้อจำกัดของเอนไซม์ CYP จากแบคทีเรียในการทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้นเฉพาะกลุ่ม ทำให้แบคทีเรียไม่เป็นที่นิยมนำมาใช้ในการศึกษาการเมแทบอลิซึมยา

สำหรับเราถึงแม้ว่าจะยังไม่มีรายงานการแยกเอนไซม์ CYP ได้ชัดเจนเช่นแบคทีเรีย แต่กลับพบรายงานการศึกษาเป็นจำนวนมากที่แสดงถึงศักยภาพของราในการเมแทบอลิซึมยาและสารในกลุ่มต่าง ๆ^{7-9,13} จึงเป็นไปได้ว่าราซึ่งเป็นเซลล์ยูคาริโอท (eukaryote) เช่นกันน่าจะมีเอนไซม์ที่มีหน้าที่ทำงานคล้ายกับเอนไซม์กลุ่ม CYP ที่พบในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม และจากการศึกษาโดย Smith และ Rosazza¹⁴ ที่เกี่ยวข้องกับการเมแทบอลิซึมยาโดยใช้ราบางสายพันธุ์พบว่ามีการแปรสภาพที่คล้ายคลึงกับที่พบได้ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม จึงทำให้ราเป็นที่นิยมใช้ในการนำมาศึกษาการเมแทบอลิซึมยาเพื่อให้ได้ข้อมูลเบื้องต้นอันมีประโยชน์ต่อการทำนายวิธีการแปรสภาพยาที่อาจเกิดขึ้นได้ในคน

การศึกษาการเมแทบอลิซึมยาโดยใช้จุลินทรีย์

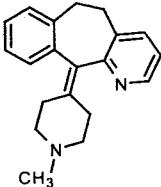
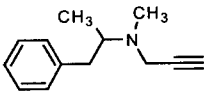
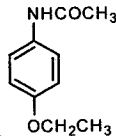
ดังที่ได้กล่าวไว้แล้วข้างต้น วิธีการศึกษาการเมแทบอลิซึมยามีได้หลายวิธี เช่น การศึกษาในสัตว์ทดลองหรือการใช้เซลล์เพาะเลี้ยง แต่วิธีการเหล่านี้ค่อนข้างมีค่าใช้จ่ายสูง ปัญหาเรื่องจริยธรรมของการใช้สัตว์ทดลอง และความยากในการพิสูจน์ทราบโครงสร้างของสารเมแทบอไลต์ที่มีปริมาณเพียงเล็กน้อยโดยเฉพาะเมื่อทำการศึกษาโดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยง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

ที่ผ่านมาได้มีการใช้จุลินทรีย์เป็นแบบจำลองในการศึกษาการเมแทบอลิซึมของยาหลายกลุ่ม โดยการศึกษาส่วนใหญ่นิยมใช้เชื้อรามากกว่าแบคทีเรียเนื่องจากข้อจำกัดของการใช้เชื้อแบคทีเรียดังกล่าวข้างต้น การศึกษาการเมแทบอลิซึมยาหลายกลุ่มโดยใช้เชื้อราพบว่าสามารถทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางเคมีโดยปฏิกิริยาออกซิเดชันประเภทต่าง ๆ เช่นเดียวกับที่พบได้ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม^{7-9,14} ราสายพันธุ์ที่นิยมนำมาใช้ในการศึกษาการเมแทบอลิซึมยาและให้ผลการศึกษที่น่าสนใจ ได้แก่ ราในกลุ่ม *Cunninghamella* เช่น *C. elegans* *C. echinulata* และ *C. blakesleeana* เป็นต้น มีรายงานเป็นจำนวนมากพบว่าราดังกล่าวทำให้เกิดการแปรสภาพยาได้โดยอาศัยปฏิกิริยาออกซิเดชันประเภทต่าง ๆ ได้เป็นสารเมแทบอไลต์ที่มีโครงสร้างเช่นเดียวกับที่ได้จากการเมแทบอลิซึมในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม^{9,15-18}

การศึกษาการเมแทบอลิซึมโดยราสายพันธุ์ *Cunninghamella*⁹ ของยากกลุ่มแก้ซึมเศร้าหลายชนิด เช่น อะมิทริปไทลีน (amitryptilline) โดเซปิน (doxepin) และอิมิพรามิน (imipramine) พบว่าสามารถเกิดการแปรสภาพโดยปฏิกิริยาเอ็น-ดีอัลคิเลชัน นอกจากนี้การเมแทบอลิซึมของยาแก้แพ้หลายชนิด เช่น ไฮโปรเฮปทาดีน (cyproheptadine) บรอมเฟนิรามีน (bromphemiramine) และ คลอเฟนิรามีน (chlorpheniramine) สามารถเกิดปฏิกิริยาเอ็น-ดีอัลคิเลชันในรา

สายพันธุ์ดังกล่าวเช่นเดียวกับในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม นอกจากนี้ยังมีตัวอย่างอื่น ๆ อีกดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ตัวอย่างการศึกษาการเมแทบอลิซึมยาโดยใช้ *C. elegans*^{9,15,16}

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

นอกจากการใช้รากกลุ่ม *Cunninghamella* ในการศึกษาการเมแทบอลิซึมยาแล้ว ยังมีการใช้รากกลุ่มอื่นๆ อีก^{7-9,13-14} ได้แก่ รากกลุ่ม *Aspergillus* สายพันธุ์ต่าง ๆ เช่น *A. niger* *A. terreus* *A. orchareus* และ *A. alliaceus* ราสายพันธุ์ *Gliocardium deliquescens* และ *Rhizopus nigricans* รวมทั้ง *Penicillium* บางสายพันธุ์ เช่น *P. chrysogenum* และ *P. notatum*

อย่างไรก็ตาม การศึกษาการเมแทบอลิซึมยาโดยใช้จุลินทรีย์เพียงหนึ่งสายพันธุ์อาจไม่ได้สารเมแทบอไลต์ทั้งหมดหรือเหมือนกับที่เกิดขึ้นในสัตว์ ในทางปฏิบัติแล้วควรใช้จุลินทรีย์หลายสายพันธุ์เพื่อนำมาทำการการศึกษาเพื่อให้สามารถครอบคลุมการเกิดปฏิกิริยาต่าง ๆ ที่อาจเกิดขึ้นได้กับยานั้น

วิธีการศึกษาการเมแทบอลิซึมยาโดยใช้จุลินทรีย์ได้รับการพัฒนาขึ้นโดย Smith and Rosazza¹⁴ มีแนวทางโดยสรุปคือ เริ่มจากการเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์ โดยอาจคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีรายงานการศึกษามาก่อนแล้วหรืออาจทำการทดสอบศักยภาพเพื่อหาสายพันธุ์ใหม่ อย่างไรก็ตามการศึกษาส่วนใหญ่นิยมใช้สายพันธุ์มาตรฐานเพื่อลดความยุ่งยากในการพิสูจน์ทราบชนิดของสายพันธุ์

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

ในขั้นตอนการเพาะเลี้ยง วิธีการ Two-stage fermentation เป็นวิธีที่นิยมใช้ในการศึกษา¹⁹ เริ่มจากการเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ประมาณ 120-150 รอบต่อนาที เป็นเวลาประมาณ 48-72 ชั่วโมง เพื่อให้มีปริมาณเชื้อเจริญพอเหมาะ จากนั้นจึงเปลี่ยนถ่ายเชื้อสู่การเพาะเลี้ยงในระยะที่สอง (stage II) เพาะเลี้ยงต่อไปอีกเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จึงเติมสาร

ละลายตัวอย่างยาที่ต้องการศึกษาลงไป โดยตัวทำละลายที่นิยมใช้ ได้แก่ เอทานอล (ethanol) ไดเมทิลฟอร์มาไมด์ (dimethylformamide) หรือ ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (dimethylsulfoxide) หากตัวยามีปัญหาด้านการละลายอาจใช้ ทวิน 80 (Tween 80) 0.1% ช่วยได้

ในการศึกษาเบื้องต้น ปริมาณยาที่ใช้ในการศึกษาอยู่ที่ประมาณ 0.1-0.5 มิลลิกรัมต่อเชื้อปริมาณ 1 มิลลิลิตร โดยหลังจากการเติมสารละลายยาละลายไปแล้ว จะทำการเพาะเลี้ยงต่อไปอีกเป็นเวลาประมาณ 24-72 ชั่วโมง (อาจมีการเก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง เพื่อดูการเปลี่ยนแปลงของยา) แล้วจึงทำการวิเคราะห์เพื่อดูว่าเกิดการแปรสภาพยาอย่างไร 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 ต่อไป

การศึกษาการเมแทบอลิซึมยาโดยใช้จุลินทรีย์มีปฏิริยาการแปรสภาพของยาหลายชนิดใกล้เคียงกับที่เกิดขึ้นในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม วิธีการนี้จึงเหมาะสำหรับใช้ในการศึกษาการเมแทบอลิซึมยาในเบื้องต้นและยังเป็นการช่วยลดปริมาณการใช้สัตว์ทดลองลงได้บ้าง นอกจากนี้จุลินทรีย์บางสายพันธุ์มีความจำเพาะต่อปฏิริยาที่เกิดขึ้น ได้สารเมแทบอลิท์เพียงชนิดใดชนิดหนึ่งในปริมาณสูง ซึ่งจะมีประโยชน์ในการสกัดแยกและนำมาพิสูจน์ทราบโครงสร้างได้ง่ายขึ้น เพื่อนำมาใช้เป็นสารมาตรฐานสำหรับอ้างอิงในการศึกษาโดยวิธีอื่น ๆ ต่อไป

อย่างไรก็ตาม การศึกษาการเมแทบอลิซึมยาโดยใช้จุลินทรีย์อาจไม่ครอบคลุมการเกิดวิถีการแปรสภาพหรือปฏิริยาทั้งหมดที่อาจเกิดขึ้นได้ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม สารเมแทบอลิท์หลักที่พบในคนอาจเป็นชนิดที่เกิดขึ้นเพียงเล็กน้อยในจุลินทรีย์ รวมทั้งความแตกต่างในแง่ความจำเพาะเจาะจงต่อโครงสร้างยาของเอนไซม์ CYP ที่พบในคนและในจุลินทรีย์ จัดเป็นข้อจำกัดสำคัญที่ทำให้การศึกษาการเมแทบอลิซึมยาโดยใช้จุลินทรีย์ไม่สามารถนำมาทดแทนการใช้ข้อมูลการศึกษาการเมแทบอลิซึมยาโดยวิธีอื่น ๆ เพื่อการทำนายข้อมูลยาทางด้านเภสัชพลศาสตร์และเภสัชจลนศาสตร์ที่อาจเกิดขึ้น การศึกษาการเมแทบอลิซึมยาในสัตว์ทดลอง รวมทั้งการศึกษาในระยะคลินิกยังคงมีความจำเป็นเพื่อให้ได้ข้อมูลที่ถูกต้องแม่นยำเกี่ยวกับวิถีการแปรสภาพยาที่เกิดขึ้นได้ในคน

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

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, 10th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1998: 43-122.
2. Williams DA. Drug metabolism, In: Williams DA, Lemke TL (ed) Foye's principles of medicinal chemistry, 5th 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, 2nd 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.

คำถาม

1. การเมแทบอลิซึมยาในร่างกายทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของยาในด้านใด
 1. ความแรงในการออกฤทธิ์
 2. ระยะเวลาในการออกฤทธิ์
 3. คุณสมบัติทางเคมีกายภาพ
 4. การละลายน้ำ
 5. ถูกทุกข้อ
2. ข้อใดผิดเกี่ยวกับการเมแทบอลิซึมยาในร่างกาย
 1. เป็นกระบวนการสำคัญในการกำจัดยาออกจากร่างกาย
 2. ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางเคมีของยาในร่างกาย
 3. การเมแทบอลิซึมยาในร่างกายเกิดขึ้นได้ที่ตับเท่านั้น
 4. สารเมแทบอลิท์ที่ได้มักมีความเป็นขั้วสูงขึ้นและขจัดออกจากร่างกายได้มากขึ้น
 5. มีความเกี่ยวข้องกับการเกิดอันตรกิริยาระหว่างยาบางชนิด
3. ข้อใดเป็นวิธีศึกษาการเมแทบอลิซึมยา
 1. in vitro cell cultures
 2. in vitro enzyme system
 3. in vivo animal models
 4. microbial models
 5. ถูกทุกข้อ
4. ยาส่วนใหญ่เกิดการแปรสภาพโดยอาศัยปฏิกิริยาใด
 1. รีดักชัน
 2. ไฮโดรไลซิส
 3. คอนจูเกชัน
 4. ออกซิเดชัน
 5. อีพอกซิเดชัน
5. เอนไซม์กลุ่มใดที่เกี่ยวข้องกับขบวนการ oxidative metabolism ในร่างกายเป็นหลัก
 1. cytochrome P450
 2. cytochrome P450 monooxygenase (CYP)
 3. reductase
 4. esterase
 5. dehydrogenase
6. ปฏิกิริยาใดเกิดขึ้นได้ในวิถีการแปรสภาพยาเฟส I
 1. ออกซิเดชัน
 2. รีดักชัน
 3. ไฮโดรไลซิส
 4. คอนจูเกชัน
 5. ข้อ 1., 2. และ 3.

7. ข้อใดถูกต้องเกี่ยวกับการเมแทบอลิซึมยาโดยใช้จุลินทรีย์

1. เอ็นไซม์กลุ่ม CYP ในแบคทีเรียมีลักษณะคล้ายคลึงกับที่พบในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม
2. การศึกษาเมแทบอลิซึมยาโดยใช้จุลินทรีย์มักนิยมใช้แบคทีเรียมากกว่ารา
3. ราวาสายพันธุ์มีศักยภาพในการแปรสภาพยากคล้ายคลึงกับที่พบในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม
4. ข้อ 1. และ 3.
5. ข้อ 2. และ 3.

8. ยาในกลุ่มต้านอาการซึมเศร้า เช่น อะมิทริปไทลีน โดเซพีน สามารถเกิดการแปรสภาพในรา Cunninghamella ได้โดยอาศัยปฏิกิริยาใด

1. เอ็น-ดีอัลคิเลชัน
2. ไฮโดรไลซิส
3. ไฮดรอกซิเลชัน
4. รีดักชัน
5. คอนจูเกชัน

9. ข้อใดคือข้อด้อยของการศึกษาเมแทบอลิซึมโดยจุลินทรีย์

1. ไม่สามารถครอบคลุมการเกิดปฏิกิริยาทั้งหมดที่อาจเกิดขึ้นในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม
2. ความจำเพาะเจาะจงต่อโครงสร้างยาของเอ็นไซม์ CYP ที่แตกต่างกันระหว่างคน และจุลินทรีย์
3. ไม่สามารถนำข้อมูลที่ได้มาทดแทนการใช้ข้อมูลการศึกษาเมแทบอลิซึมยาโดยวิธีอื่นๆ
4. ข้อ 1. และ 2.
5. ข้อ 1., 2. และ 3.

10. ข้อใดเป็นประโยชน์ของการศึกษาเมแทบอลิซึมยาโดยใช้จุลินทรีย์

1. ค่าใช้จ่ายในการลงทุนไม่มาก
2. ได้สารเมแทบอไลต์ในปริมาณมากพอสำหรับการแยกสกัด
3. ปฏิกิริยาการแปรสภาพของยาหลายชนิดใกล้เคียงกับที่เกิดขึ้นในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม
4. เหมาะสำหรับใช้ในการศึกษาเมแทบอลิซึมยาเบื้องต้น
5. ถูกทุกข้อ