

การทบทวนการศึกษาประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ไซโตโครมพี 450

กนกวรรณ จารุกัจฉา^{1*} และ ธนกร สุวรรักษ์²

¹ สำนักงานวิชาการ สาขาวิชาเภสัชศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

² นักศึกษาเภสัชศาสตร์ ชั้นปีที่ 5 สาขาวิชาเภสัชศาสตร์ (วิจัยและพัฒนาเภสัชภัณฑ์) คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

* Corresponding author: kanok_ja@kku.ac.th

บทคัดย่อ

เอนไซม์ cytochrome P450 (P450) เป็นกลุ่มเอนไซม์ภายในตับที่สำคัญต่อเมแทบอลิซึมทั้งสารภายในร่างกายและสารแปลกปลอมหรือยาที่เข้าสู่ร่างกาย การศึกษาประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ P450 ทำให้ได้ข้อมูลทำนายวิถีเมแทบอลิซึมของสารแปลกปลอมหรือยาผ่านไอโซฟอร์มย่อยของเอนไซม์ P450 ได้ เอนไซม์ P450 ที่สำคัญในการเมแทบอลิซึมได้แก่ CYP1, CYP2 และ CYP3 โดยการศึกษาประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ CYP1 ส่วนใหญ่อาศัยปฏิกิริยา dealkylation ของสับสเตรท alkoxyresorufin ในขณะที่เอนไซม์ CYP2 และ CYP3 อาศัยปฏิกิริยา dealkylation และ hydroxylation ของสับสเตรทที่แตกต่างกันไป ดังนั้น การเลือกใช้วิธีการศึกษาประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ P450 ที่เหมาะสมจะทำให้ได้ข้อมูลวิถีเมแทบอลิซึมที่ถูกต้องและมีความน่าเชื่อถือ สามารถนำไปเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการทำนายวิถีเมแทบอลิซึมในร่างกาย ตลอดจนการทำนายและแปลผลทางคลินิกทางประสิทธิผล และพิษจากยาและอันตรกิริยาระหว่างยาและยาหรือสารแปลกปลอมต่างๆ ได้ต่อไป

คำสำคัญ: ประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์, เอนไซม์ไซโตโครม พี 450, CYP1, CYP2, CYP3

ไทยเภสัชศาสตร์และวิทยาการสุขภาพ 2553;5(2):169-179[§]

บทนำ

สารต่าง ๆ ทั้งสารอาหารและสารจากมลภาวะต่าง ๆ รวมถึงสารแปลกปลอม (xenobiotics) ที่เข้าสู่ร่างกาย ล้วนต้องได้รับการเปลี่ยนแปลงภายในร่างกายทั้งสิ้น ซึ่งการเปลี่ยนแปลงสารต่าง ๆ ในร่างกายแบ่งได้เป็น 2 ระยะ หรือ phase คือ phase I ซึ่งเป็น functionalization reaction โดยเกิดปฏิกิริยาผ่านกระบวนการ oxidation, reduction และ hydrolysis ซึ่งส่วนใหญ่มักทำให้สิ่งแปลกปลอมมีความเป็นขั้วเพิ่มขึ้น แล้วถูกกำจัดออกทางไตได้ง่าย โดยเอนไซม์ cytochrome P450 (P450) เป็นกลุ่มเอนไซม์ที่สำคัญที่เปลี่ยนแปลงสารใน phase I โดยทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยา oxidation ทำให้เกิดสารใหม่ที่มีคุณสมบัติต่างไปจากเดิม ส่วนใน phase II หรือ conjugation reaction เป็นการนำสารที่มีขั้วสูงเช่น glucuronides, sulfate หรือ glutathione มารวมตัวกับสิ่งแปลกปลอม ทำให้สิ่งแปลกปลอมมีขั้วสูงตามไปด้วย ส่งผลให้การขับสิ่งแปลกปลอมเหล่านั้นผ่านออกทางไตได้ดีขึ้น¹

เอนไซม์ Cytochrome P450

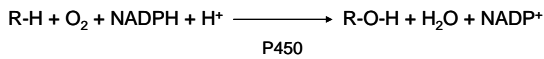
P450 เป็นเอนไซม์ที่สำคัญในกระบวนการเมแทบอลิซึม (metabolism) สารแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกาย อาทิเช่น ยาต่าง ๆ

สเตียรอยด์ และสารก่อมะเร็ง เป็นต้น เอนไซม์ชนิดนี้เมื่อถูกกระตุ้นและจับกับคาร์บอนมอนอกไซด์ (carbon monoxide) จะสามารถดูดกลืนแสงได้มากที่สุดที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ดังนั้นจึงเรียกว่า cytochrome P450 นอกจากนี้เอนไซม์ P450 ยังแบ่งเป็นหลายแฟมิลี (family) และแต่ละแฟมิลีแบ่งเป็นซับแฟมิลี ซึ่งประกอบด้วยหลายไอโซฟอร์มย่อย ๆ (isoform) เช่น CYP1A1, CYP1A2, CYP2B6, CYP2C9, CYP2D6, CYP2E1 และ CYP3A4 เป็นต้น ซึ่งการจัดเรียงอย่างเป็นระบบนี้ใช้ความคล้ายคลึงกันของลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ หากคล้ายคลึงกันมากกว่า 40 เปอร์เซ็นต์ จะจัดให้อยู่ในแฟมิลีเดียวกันซึ่งจะแสดงโดยเลขอารบิกตัวแรกเช่น CYP1, CYP2 และ CYP3 และหากคล้ายคลึงกันมากกว่า 55 เปอร์เซ็นต์จะจัดให้อยู่ใน subfamily เดียวกันซึ่งแสดงโดยตัวอักษรภาษาอังกฤษในลำดับถัดไปเช่น CYP1A และ CYP1B และตัวเลขตัวสุดท้ายคือลำดับการค้นพบเอนไซม์ใน subfamily เดียวกันเรียงจากน้อยไปมากตามลำดับการค้นพบ เช่น CYP3A4, CYP3A5, CYP3A11²

เอนไซม์ P450 เป็นเอนไซม์ที่มีเหล็ก (heme) เป็นองค์ประกอบภายในโมเลกุล (hemoprotein) ซึ่งเป็นตำแหน่งสำคัญในการเร่งให้เกิดปฏิกิริยา oxidation แต่จะไม่สามารถทำงานได้หากมีเพียงเอนไซม์เท่านั้น เนื่องจากปฏิกิริยาดังกล่าว

[§] 15th year of Srinakharinwirot Journal of Pharmaceutical Science

จำเป็นต้องอาศัยปัจจัยอื่นร่วมในการทำงานด้วย ได้แก่ nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) และ ออกซิเจน (O₂) โดย NADPH จะเป็นสารให้อิเล็กตรอนที่ใช้ในกระบวนการถ่ายทอดอิเล็กตรอนและ O₂ ในปฏิกิริยาทำให้เกิดสารตัวกลาง (intermediates) เพื่อเพิ่มความมีขั้วของสารแปลกปลอมได้^{3,4} ดังปฏิกิริยานี้



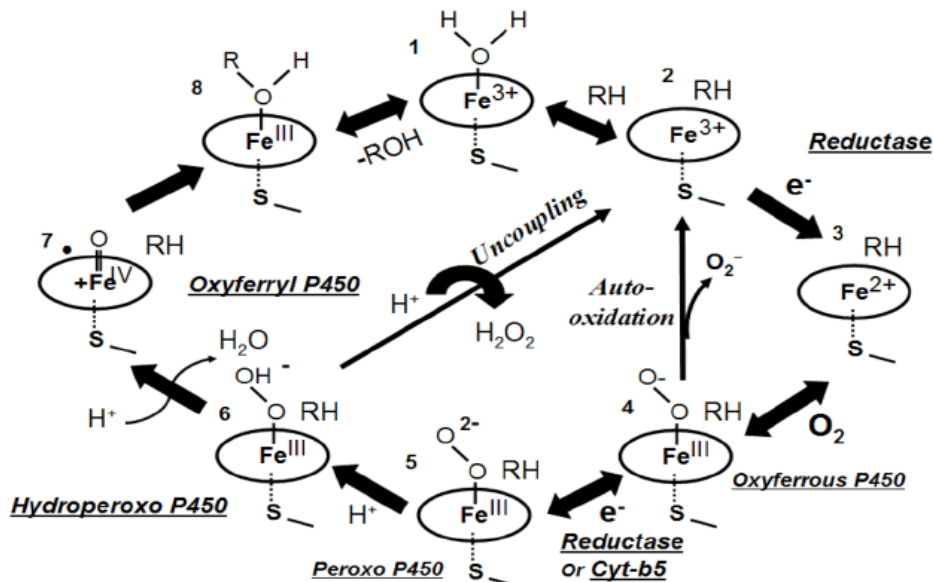
วัฏจักรการเกิดปฏิกิริยาของ P450 (รูปที่ 1)

เอนไซม์ P450 เมื่ออยู่ในระยะพักจะมีโมเลกุลน้ำมาจับด้วยพันธะเคมีอย่างหลวมๆ กับ heme ตำแหน่งที่ 6 (step 1 ในรูปที่ 1) เมื่อสารตั้งต้นเข้ามาจะแทนที่โมเลกุลของน้ำทำให้น้ำหลุดออกไป ส่งผลให้เกิดการเพิ่มศักย์ในการเกิดปฏิกิริยารีดอกซ์ (redox potential) ของ heme (step 2) โดยจะเกิดกระบวนการถ่ายทอดอิเล็กตรอนจาก NADPH ซึ่งมีเอนไซม์ reductase เป็นตัวช่วย ทำให้ ferric heme เปลี่ยนเป็น ferrous heme (step 3) ซึ่งมีความสามารถในการจับกับ O₂ ได้ดี เกิดเป็น oxyferrous-P450 (step 4) ซึ่งเป็นสารตัวกลางระหว่างการเกิดปฏิกิริยา แล้วเกิดปฏิกิริยาต่อโดยมีการถ่ายทอดอิเล็กตรอนครั้งที่ 2 เกิดเป็น peroxo-P450 (step 5) แล้ว peroxo-P450 จะถูกเติมอะตอมไฮโดรเจน (protonation) เกิดเป็น hydroperoxo-P450 (step 6) จากนั้นอิเล็กตรอนภายในโมเลกุลจะเกิดการเคลื่อนที่ เป็นเหตุให้

พันธะระหว่างออกซิเจนสองอะตอมถูกตัดออก ได้เป็นน้ำและ oxyferryl-P450 (step 7) ซึ่งมีความสามารถทำปฏิกิริยาได้สูงและเป็น form ที่ทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้น โดยใช้ออกซิเจนทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้น (R-H) เกิดเป็นคอมเพล็กซ์ (step 8) และเอนไซม์จะกลับมาอยู่ในระยะพักเช่นเดิมโดยผ่านกลไก hydrogen abstraction – oxygen rebound ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีขั้วเพิ่มขึ้นและขับออกทางไตได้ง่าย

ความสำคัญของเอนไซม์ P450 ในสิ่งมีชีวิต

สิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดมีสารพันธุกรรมที่แตกต่างกัน ทำให้เกิดความหลากหลายทางชีวภาพขึ้น P450 จัดเป็นส่วนหนึ่งในความหลากหลายทางชีวภาพนั้นเช่นกัน P450 มีหลายไอโซฟอร์ม โดยมนุษย์นั้นมี P450 ทั้งสิ้น 57 ไอโซฟอร์ม ซึ่ง 1 ใน 4 มีความสำคัญในการเมแทบอลิซึมสารแปลกปลอม ได้แก่ CYP1, CYP2 และ CYP3 (ตารางที่ 1) ส่วน P450 ในแพมิลี่อื่น ๆ มีความสำคัญในการเมแทบอลิซึมสารภายในร่างกาย (endogenous compounds) เช่น กรดไขมัน (fatty acid) สเตียรอยด์ (steroid) วิตามิน เป็นต้น⁵ ส่วนสัตว์ที่นิยมนำมาใช้เป็น model ในการทดลองได้แก่ หนู rat และหนู mice ซึ่งมี P450 จำนวน 89 และ 103 ไอโซฟอร์มตามลำดับ (แหล่งข้อมูล: http://dmlson.utm.edu/Cytochrome_P450.html, สืบค้นเมื่อ 8 พฤศจิกายน 2552) ซึ่งมีความเหมือนหรือความแตกต่างกันกับมนุษย์ในแต่ละไอโซฟอร์ม⁶ ดังแสดงในตารางที่ 2



รูปที่ 1 วัฏจักรการทำงานของ P450 (แหล่งที่มา: Hamdane et al. *Photosynth Res* 2008;98(1-3):657-666)⁴

มีรายงานการศึกษาของบางไอโซฟอร์ม เช่น CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1 ซึ่งศึกษาในสัตว์ทดลองแทนการศึกษาในมนุษย์ ทำให้ยังมีข้อโต้แย้งถึงการนำผลการศึกษาไปใช้ในมนุษย์โดยตรง ดังนั้น Bogaards และคณะ⁷ จึงศึกษาเปรียบเทียบเพื่อค้นหาแบบจำลอง (model) สัตว์ทดลองที่มีความคล้ายคลึงกับมนุษย์ โดยศึกษาจากรูปแบบการถูกยับยั้ง (inhibition pattern) ของ P450 แต่ละไอโซฟอร์ม และจลนศาสตร์ของเอนไซม์ P450 (K_m/V_{max}) ตัวอย่างเช่น การศึกษา CYP1A model สัตว์ทดลองที่คล้ายกับมนุษย์มากที่สุดคือ หนู mice เป็นต้น⁷ ดังนั้นการศึกษาแต่ละไอโซฟอร์มของ P450 นั้น ชนิดสัตว์ทดลองที่เหมาะสมในการศึกษาจึงแตกต่างกันออกไป ปัจจุบันได้มีการพัฒนาชนิดสัตว์ทดลองที่มีความคล้ายคลึงกับมนุษย์มากขึ้นหรือเป็นตัวแทนบางอวัยวะของมนุษย์ได้เช่น Chimeric mice with humanized liver ซึ่งเป็นหนูที่สามารถเจริญเติบโตด้วยการมีเซลล์ตับของมนุษย์ เป็นต้น

ตารางที่ 1 Isoforms ของ cytochrome P450 ตามการเมแทบอลิซึมสารตั้งต้น (substrate) แต่ละชนิด

Sterols	Xeno-biotics	Fatty Acids	Eico-sanoids	Vitamins	Unknown
1B1	1A1	2J2	4F2	2R1	2A7
7A1	1A2	4A11	4F3	24A1	2S1
7B1	2A6	4B1	4F8	26A1	2U1
8B1	2A13	4F12	5A1	26B1	2W1
11B1	2B6		8A1	26C1	3A43
11B1	2C8			27B1	4A22
11B2	2C9				4F11
17A1	2C18				4A22
19A1	2C19				4V2
21A2	2D6				4X1
27A1	2E1				4Z1
39A1	2F1				20A1
46A1	3A4				27C1
51A1	3A5				
	3A7				

แหล่งข้อมูล: Guengerich. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;338(1):465-469⁵

ตารางที่ 2 การเปรียบเทียบไอโซฟอร์มที่สำคัญในการเมแทบอลิซึมสารแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกาย ในมนุษย์ หนู mice และหนู rat (ดัดแปลงจาก Löfgren et al. *Xenobiotica* 2004;34(9):811-834)⁶

Family	Subfamily	สิ่งมีชีวิต		
		มนุษย์	หนู mouse	หนู rat
CYP1	A	1A1, 1A2	1A1, 1A2	1A1, 1A2
	B	1B1	1B1	1B1
CYP2	A	2A6, 2A7, 2A13, 2A18	2A4, 2A5, 2A12, 2A22	2A2, 2A3
	B	2B6, 2B7	2B9, 2B10, 2B13, 2B19, 2B20x, 2B23	2B1, 2B2, 2B3
	C	2C8, 2C9, 2C18, 2C19	2C29, 2C37, 2C38, 2C39, 2C40, 2C44, 2C50, 2C51x, 2C54, 2C55, 2C65, 2C66, 2C67, 2C68, 2C69, 2C70	2C6, 2C7, 2C11, 2C12, 2C13, 2C22, 2C23
	D	2D6	2D9, 2D10, 2D11, 2D12, 2D13, 2D22, 2D26, 2D34, 2D40	2D2, 2D3, 2D4, 2D5, 2D18
	E	2E1	2E1	2E1
CYP3	A	3A3X, 3A4, 3A5, 3A7, 3A43	3A11, 3A13, 3A16, 3A25, 3A41, 3A44, 3A57, 3A59	3A1, 3A2, 3A9, 3A18, 3A23

ปัจจุบัน การศึกษาการเหนี่ยวนำหรือยับยั้งการแสดงออกของ P450 โดยยาหรือสารต่าง ๆ ถูกนำมาใช้ในการศึกษาเพื่อประเมินความปลอดภัยในการใช้ยาหรือสารต่าง ๆ อย่างกว้างขวาง⁸ และการศึกษาการแสดงออกของ P450 ที่ระดับเอนไซม์จัดว่าเป็นการศึกษาที่ได้รับการยอมรับและใช้อย่างแพร่หลายเป็นเวลานาน หากแต่วิธีการที่แตกต่างกันอาจมีข้อดี/ข้อด้อยที่แตกต่างกัน ดังนั้นการทบทวนวรรณกรรมครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อรวบรวมวิธีการศึกษาประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ P450 (enzyme activity) แต่ละไอโซฟอร์ม ซึ่งมีหลากหลายวิธีซึ่งแตกต่างกันทั้งสารตั้งต้น ปฏิกริยาเคมี ตลอดจนเทคนิคการวิเคราะห์เพื่อ

ตรวจสอบผล โดยบทความนี้รวบรวมการศึกษาไอโซฟอร์มที่มีความสำคัญในการเมแทบอลิซึมของยาหรือสารแปลกปลอมกลุ่มหลัก ๆ เพื่อให้ได้ข้อมูลสำหรับตัดสินใจเลือกวิธีการศึกษาประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ P450 ได้อย่างถูกต้องและเหมาะสมต่อไป

วิธีการศึกษาประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ P450

วิธีการศึกษาประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ P450 มีความแตกต่างกันตามไอโซฟอร์มและชนิดสิ่งมีชีวิตที่ต้องการทดสอบ โดยวิธีการศึกษาประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์

P450 ถูกแบ่งตามไอโซฟอร์มที่สำคัญต่อการเมแทบอลิซึมสาร แปลงปลอมที่เข้าสู่ร่างกาย ดังนี้

CYP1A1

ในมนุษย์ CYP1A1 เป็นเอนไซม์หลักที่มีการแสดงออกที่ อวัยวะอื่น ๆ ที่ไม่ใช่ตับ อาทิ ปอด ลำไส้เล็ก กระเพาะอาหาร ในขณะที่การแสดงออกที่ตับพบค่อนข้างต่ำ^{9,10} เอนไซม์ชนิดนี้มีความสำคัญในการเปลี่ยนแปลงสารก่อมะเร็ง (procarcinogen) ไปเป็นสารที่ทำให้เกิดมะเร็ง (carcinogen) เช่น polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)¹¹ อีกทั้งยังสามารถถูกชักนำให้มีปริมาณเพิ่มขึ้นได้จากการได้รับสาร PAH เหล่านี้¹² หรือเขม่าควันการสูบบุหรี่¹³ เป็นผลเพิ่มความเสี่ยงต่อการเป็นโรคมะเร็ง

การศึกษาประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ชนิดนี้มีหลายวิธี ได้แก่ ethoxyresorufin-O-deethylation (EROD) ซึ่งเป็นวิธีที่ค้นพบมานาน ซึ่งทำการศึกษาในไมโครโซม (microsome) จากอวัยวะซึ่งโดยมากมักเป็นตับซึ่งเป็นแหล่งของ P450 ของสัตว์ทดลอง เช่น หนู rat หนู mice หรือมนุษย์ แต่เนื่องจาก CYP1A1 มีการแสดงออกในตับค่อนข้างน้อย จึงอาจจำเป็นต้องเหนี่ยวนำให้เพิ่มปริมาณก่อนนำมาศึกษาด้วย PAH หรือ 2,3,7,8-tetrachloro-dibenzo-*p*-dioxin (TCDD)¹⁴ โดยสารตั้งต้นหรือ สับสเตรท (substrate) สำหรับวิธี EROD คือ ethoxyresorufin และตรวจวัดผลิตภัณฑ์คือ resorufin ซึ่งเป็นเมแทบอไลต์ (metabolite) ที่มีคุณสมบัติในการดูดกลืนแสงและเรืองแสงได้ จึงสามารถตรวจวัด resorufin ที่เกิดขึ้นได้ด้วยวิธี spectrofluorometry โดยมีค่า excitation ที่ 550 nm และค่า emission ที่ 585 nm^{15,16} อย่างไรก็ตาม Radenac¹⁷ ได้เสนอค่า excitation และ emission ที่เหมาะสมที่ทำให้มีการรบกวนของสับสเตรทได้น้อยที่สุดที่ความยาวคลื่น 560 nm และ 584 nm ตามลำดับ นอกจากนี้มีบางรายงานกล่าวว่า ethoxyresorufin ไม่เฉพาะเจาะจงกับเฉพาะ CYP1A1 เท่านั้น ยังอาจสามารถถูกเมแทบอลิซึมผ่าน CYP1A2 ได้ด้วย¹⁸ ดังนั้นเพื่อแก้ข้อบกพร่องของแต่ละวิธีจึงอาจประยุกต์ใช้ recombination human P450 enzymes แทนไมโครโซมจากสิ่งมีชีวิตจริง แต่มีข้อจำกัดคือ มีราคาแพง จึงควรพิจารณาความคุ้มค่าและความแม่นยำของผลการศึกษาดังนี้

CYP1A2

เอนไซม์ CYP1A2 มีการแสดงออกภายในตับเป็นหลักคิดเป็นประมาณ 13% ของเอนไซม์ P450 ที่อยู่ภายในตับ^{19,20} ไอโซฟอร์มนี้สามารถเมแทบอไลต์สารก่อมะเร็งได้คล้ายคลึงกับ CYP1A1 เช่น PAH, nitrosamines, aromatic amides และ amines²⁰ อีกทั้งสามารถเมแทบอไลต์ยาหลายชนิด อาทิ theophylline, phenacetin, zolmitriptan, ropivacaine และ lidocaine เป็นต้น¹⁰

การศึกษาประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ CYP1A2 มีรายงานไว้หลายวิธีได้แก่ 1) EROD ซึ่งมีลักษณะคล้ายคลึงกับการศึกษาประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ CYP1A1^{16,21} 2) วิธี phenacetin O-deethylation (POD)^{22,23} ซึ่งศึกษาในไมโครโซมของมนุษย์ มี phenacetin เป็นสับสเตรทและวัดสารเมแทบอไลต์ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาคือ acetaminophen โดยเทคนิค high-performance liquid chromatography (HPLC) ซึ่งประกอบด้วย C-18 column มี butyl-*p*-aminophenol เป็น internal standard และตรวจวัดผลิตภัณฑ์ด้วย UV-spectrophotometry ที่ความยาวคลื่น 254 nm 3) วิธี methoxyresorufin O-demethylation (MROD) เป็นวิธีการศึกษาหนึ่งที่ใช้หลักการคล้ายคลึงกัน EROD เพียงแต่สับสเตรท คือ methoxyresorufin ซึ่งมีความจำเพาะเจาะจงต่อ CYP1A2 มากกว่าวิธี EROD²⁴ อย่างไรก็ตามพบรายงานที่ขัดแย้งกันกล่าวคือ Hamm และคณะ²⁵ รายงานว่า MROD เป็นวิธีที่ไม่เหมาะสมสำหรับการศึกษาประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ CYP1A2 ในหนู mice เนื่องจากสามารถพบประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ P450 เมื่อตรวจสอบโดยวิธี MROD ในหนู mice ที่ขาด CYP1A2 gene และ 4) caffeine N3-demethylation (CN3D)²¹ เป็นอีกวิธีที่ต่างจาก CYP1A1 โดยเป็นการศึกษาในไมโครโซมของมนุษย์ มี caffeine เป็นสับสเตรท ทำการตรวจวัดผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาคือ paraxanthine โดยเทคนิค HPLC ซึ่งประกอบด้วย C-18 column และ UV-detector ที่ความยาวคลื่น 280 nm โดยมีรายงานว่าการศึกษา 8-hydroxylation ของ caffeine เป็นเส้นทางหลักในการเมแทบอลิซึมในหนู rat ซึ่งผลิตภัณฑ์ที่ได้คือ 1,3,7 trimethylxanthine^{26,27} ดังนั้นจึงอาจประยุกต์ใช้ปฏิกิริยา caffeine-8-hydroxylation เพื่อศึกษาประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ CYP1A2 ในไมโครโซมของหนู rat

CYP1B1

CYP1B1 เป็นอีกหนึ่งไอโซฟอร์มที่สามารถเมแทบอไลต์สารก่อมะเร็ง ได้แก่ PAH, N-heterocyclic amines, arylamine และ amino azo dyes เป็นต้น^{14,28} ในมนุษย์เอนไซม์ชนิดนี้มีการแสดงออกในอวัยวะต่าง ๆ นอกเหนือจากตับ เช่น เซลล์เยื่อบุหลอดเลือด ปอด ไต และอวัยวะที่ผลิตสารจำพวกสเตียรอยด์ เช่น ต่อมหมวกไต รังไข่ และอัณฑะ เป็นต้น^{9,14,29} นอกจากนี้หากการพัฒนาของตัวอ่อนในครรภ์มารดามีความผิดปกติของเอนไซม์ CYP1B1 จะทำให้เกิดเป็นโรคต้อหินแต่กำเนิดได้ (buphthalmos) เนื่องจาก CYP1B1 มีบทบาทสำคัญในการเมแทบอลิซึม retinoic acid ซึ่งเป็นสารสำคัญในการพัฒนาดวงตาของทารกในครรภ์^{2,30,31}

วิธีการศึกษาประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ CYP1B1 พบว่าเป็นวิธีเดียวกันกับที่ใช้ศึกษาประสิทธิภาพการทำงานของ

เอนไซม์ CYP1A1 และ CYP1A2 คือวิธี EROD โดยศึกษาใน recombinant human P450 enzymes ซึ่งเป็นเอนไซม์ CYP1B1 ที่มีความบริสุทธิ์สูง³² แล้วตรวจวัด resorufin ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาด้วยเทคนิค spectrofluometry ที่ excitation และ emission wavelength ที่แตกต่างกัน อาทิเช่น Burke และคณะ¹⁵ ใช้ excitation และ emission wavelength ที่ 550 และ 585 ตามลำดับ ในขณะที่ Keshava และคณะ³³ ใช้ที่ 560 และ 592 nm ตามลำดับ เป็นต้น

CYP2B1/2, CYP2B9/10

CYP2B ที่พบในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมต่างชนิดกันจะมีความแตกต่างกัน โดยหนู rat และหนู mice จะมีการแสดงออกของไอโซฟอรัมที่แตกต่างกันคือ CYP2B1/2 และ CYP2B9/10 ตามลำดับ CYP2B มีการแสดงออกภายในตับเป็นหลัก แต่อาจพบการแสดงออกของ CYP2B1/2 ภายนอกตับบ้าง เช่น ลำไส้เล็ก ปอด เอนไซม์ CYP2B มีการแสดงออกแตกต่างกันระหว่างเพศ (sexual dimorphism) กล่าวคือ ในหนู mice เพศเมียจะมีการแสดงออกของเอนไซม์ CYP2B9 มากกว่าในเพศผู้ ขณะที่ CYP2B10 ในเพศเมียและเพศผู้จะมีการแสดงออกของเอนไซม์ใกล้เคียงกัน³⁴ ส่วนในหนู rat เพศเมียจะมีการแสดงออกของเอนไซม์ CYP2B1/2 มากกว่าเพศผู้³⁵ ถึงแม้ว่าไอโซฟอรัมเหล่านี้จะไม่ได้แสดงออกในมนุษย์แต่มีความสำคัญในแง่การทำงานการศึกษาประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ CYP2B6 ในมนุษย์เบื้องต้นได้ เนื่องจาก CYP2B ในหนูทั้งสองชนิดมีความคล้ายคลึงกับ CYP2B ในมนุษย์มากถึง 55%

วิธีที่นิยมในการศึกษาประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ CYP2B ในหนูทั้งสองชนิด คือ benzyloxyresorufin O-dealkylation (BROD) และ penoxyresorufin O-dealkylation (PROD) โดยมี benzyloxyresorufin และ penoxyresorufin เป็นสับสเตรทตามลำดับ ผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาคือ resorufin เช่นเดียวกันในทั้ง 2 วิธี และทำการตรวจวัดการเรืองแสงของผลิตภัณฑ์โดยเทคนิค spectrofluometry ที่ใช้ wavelength ของ excitation และ emission ที่ 530 nm และ 585 nm ตามลำดับ^{15,36}

CYP2B6

ที่ผ่านมาพบว่าเอนไซม์ CYP2B6 มีความสำคัญในการเมแทบอลิซึมสารแปลกปลอมในระดับต่ำ เนื่องจากเป็นเอนไซม์ที่มีปริมาณน้อยในตับ คือเพียงประมาณ 1 - 6% ของ P450 ทั้งหมดในตับ¹⁹ ปัจจุบันเอนไซม์ CYP2B6 มีบทบาทสำคัญในการเมแทบอลิซึมยาต่าง ๆ มากขึ้น โดยเฉพาะสารจำพวก non-planar molecule with basic grouping²⁰ เช่น artemisinin, bupropion, cyclophosphamide, efavirenz และ nicotine¹⁰

วิธีการศึกษาประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์มีปรากฏอยู่หลายวิธีได้แก่ 7-ethoxy-4-trifluoromethylcoumarin O-dealkylation (7-EFCOD)^{37,38} เป็นการศึกษาในไมโครโซมมนุษย์โดยสับสเตรทคือ 7-ethoxy-4-trifluoromethylcoumarin (7-EFC) และตรวจวัดผลิตภัณฑ์คือ 7-hydroxy-4-trifluoromethylcoumarin (7-HFC) ด้วยเทคนิค spec-trofluometry โดยมีค่า wavelength ของ excitation และ emission ที่ 410 และ 510 nm ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม มีบางรายงานกล่าวว่า 7-EFC สามารถถูกเมแทบอลิซึมผ่านไอโซฟอรัมอื่นของ P450 ได้ เช่น CYP1A2 และ CYP2E1³⁹ ดังนั้นหากต้องการใช้วิธี 7-EFCOD ซึ่งเป็นวิธีที่ง่ายและรวดเร็วในการศึกษาประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ CYP2B6 อาจประยุกต์ใช้ recombinant CYP2B6 enzyme ที่จำเพาะแทนการใช้ไมโครโซมจากสิ่งมีชีวิตจริงได้

อีกวิธีหนึ่งที่ใช้ศึกษาประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ CYP2B6 คือ bupropion hydroxylation (BPH) โดยศึกษาในไมโครโซมของมนุษย์เช่นเดียวกันกับวิธีแรก โดยมี bupropion เป็นสับสเตรท และทำการตรวจวัดผลิตภัณฑ์คือ hydroxyl-bupropion โดยเทคนิค HPLC ซึ่งประกอบด้วย C-18 column และ UV-detector ที่ความยาวคลื่น 214 nm โดยมี tripolidine³⁹ หรือ trazodone⁴⁰ เป็น internal standard วิธีนี้มีความจำเพาะต่อเอนไซม์ CYP2B6 มากกว่าวิธี 7-EFCOD เนื่องจากค่า k_m จากไมโครโซมของมนุษย์ ใกล้เคียงกับเมื่อใช้ recombinant CYP2B6 enzyme ซึ่งเป็นเอนไซม์เดี่ยว³⁹

CYP2C8

CYP2C8 เป็นเอนไซม์ที่แสดงออกในตับมากเป็นอันดับ 2 รองจาก CYP2C9 ในจำนวน CYP2C ทั้งหมด และพบว่า CYP2C8 มีความสำคัญในการเมแทบอลิซึมสารจำพวก retinol, retinoic acid, arachidonic acid, cerestatatin และกลุ่มยาเบาหวาน เช่น repaglinide, pioglitazone, rosiglitazone¹⁰ และปฏิกิริยาออกซิเดชันของ paclitaxel ซึ่งเป็นยาต้านมะเร็ง^{20,41}

วิธีการศึกษาประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ของ CYP2C8 ได้แก่ paclitaxel 6 α -hydroxylation (PX6H)^{42,43} โดยศึกษาในไมโครโซมของมนุษย์ ใช้สับสเตรทคือ paclitaxel และวัดผลิตภัณฑ์ ได้แก่ 6 α -hydroxypaclitaxel โดยเทคนิค HPLC ประกอบด้วย C-18 column ใช้ diethylstilbestrol เป็น internal standard และทำการตรวจวัด 6 α -hydroxypaclitaxel ด้วย UV-spectrophotometry ที่ความยาวคลื่น 230 nm เนื่องจากสารมาตรฐานของวิธี PX6H มีราคาแพงและความเสถียรสูงที่ก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้ทดลองได้ จึงอาจเลือกใช้วิธีหนึ่งคือ amodiaquine N-deethylation (AQND) โดยศึกษาในไมโครโซมของมนุษย์ โดยสับสเตรทคือ amodiaquine ซึ่งเป็นยาต้านมาลาเรีย

และตรวจวัดผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยา คือ N-desethylamodiaquine โดยเทคนิค HPLC-UV และ LC-MS (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry) ประกอบด้วย C-18 column และตรวจวัด N-desethylamodiaquine ซึ่งคุณภาพด้วย ion trap mass spectrometry และตรวจวัด N-desethylamodiaquine ซึ่งปริมาณด้วย diode array detector ที่ความยาวคลื่น 342 nm⁴⁴ ดังนั้นวิธีนี้อาจประยุกต์ใช้เทคนิคเพื่อวิเคราะห์ประสิทธิภาพการทำงานของ CYP2C8 ในเชิงปริมาณเพียงอย่างเดียวได้

CYP2C9

CYP2C9 เป็นเอนไซม์ที่มีการแสดงออกภายในตับมากที่สุดคือประมาณร้อยละ 60 ของเอนไซม์ CYP2C ทั้งหมด โดย CYP2C มีอยู่ประมาณร้อยละ 20 ของ P450 ที่แสดงออกภายในตับทั้งหมด^{19,20} CYP2C9 มีบทบาทสำคัญในการเมแทบอลิซึมยาหลากหลายกลุ่ม ได้แก่ ยาลดน้ำตาลในเลือด เช่น tolbutamide ยาแก้ปวด เช่น phenytoin ยาต้านการแข็งตัวของเลือด เช่น s-wafarin และยาต้านการอักเสบที่ไม่ใช่สเตียรอยด์ (NSAIDs) เช่น ibuprofen, diclofenac, mefenamic acid และ piroxicam³⁵

วิธีการศึกษาประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ CYP2C9 ได้แก่ 1) tolbutamide methyl-hydroxylation (TMH)^{21,23} ทำการศึกษาในไมโครโซมของมนุษย์โดยมี tolbutamide เป็นสับสเตรท และวัดผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาได้แก่ hydroxymethyl-tolbutamide ด้วยเทคนิค HPLC ประกอบด้วย C-18 column ใช้ chlorpropamide เป็น internal standard และตรวจวัด hydroxymethyltolbutamide ด้วย UV-spectrophotometry ที่ความยาวคลื่น 230 nm 2) วิธี diclofenac 4'-hydroxylation (D4H)^{38,45} ทำการศึกษาในไมโครโซมของมนุษย์โดยสับสเตรทคือ diclofenac และตรวจวัดผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาได้แก่ 4'-hydroxydiclofenac โดยเทคนิค HPLC ประกอบด้วย Zorbax ODS column ซึ่งเป็น reverse phase และทำการตรวจวัด 4'-hydroxydiclofenac ด้วย UV-spectrophotometry ที่ความยาวคลื่น 282 nm วิธีการศึกษาประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ CYP2C9 ทั้งสองวิธีเป็นวิธีที่ง่ายไม่ซับซ้อนมากนัก

CYP2C19

แม้ว่า CYP2C19 จะมีปริมาณต่ำประมาณร้อยละ 1 ของ CYP2C ทั้งหมด แต่เป็นไอโซฟอร์มที่มีความสำคัญในมนุษย์ CYP2C19 โดยบทบาทเมแทบอลิซึมยาหลายชนิด อาทิ proton pump inhibitor เช่น omeprazole และ tricyclic antidepressant เช่น imipramine³⁵ เป็นต้น นอกจากนี้ CYP2C19 ยังปรากฏลักษณะ polymorphism เช่น CYP2C19*2 และ CYP2C19*3

ด้วย ดังนั้นแต่ละคนชาติอาจมีระดับเมแทบอลิซึมยาผ่านวิถีเอนไซม์ CYP2C19 ที่แตกต่างกัน

วิธีการศึกษาประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ CYP2C19 ได้แก่ s-mephenytoin 4-hydroxylation (MP4H) ทำการศึกษาในไมโครโซมของมนุษย์โดยมี mephenytoin เป็นสับสเตรท และตรวจวัดผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยา ได้แก่ 4-hydroxymephenytoin โดยเทคนิค HPLC ประกอบด้วย C-18 column ใช้ tolbutamide²¹ หรือ phenobarbital⁴⁶ เป็น internal standard และตรวจวัด 4-hydroxymephenytoin ด้วย UV-spectrophotometry ที่ความยาวคลื่น 204 nm อีกวิธีหนึ่ง ได้แก่ omeprazole 5-hydroxylation (OP5H)⁴⁷⁻⁴⁹ ทำการศึกษาในไมโครโซมของมนุษย์ โดยเทคนิค normal phase HPLC ประกอบด้วย Superspher SI-60 column ซึ่งมี omeprazole เป็นสับสเตรท และตรวจวัดผลิตภัณฑ์ ได้แก่ 5-hydroxyomeprazole ด้วย UV-spectrophotometry ที่ความยาวคลื่น 302 nm

CYP2D6

ในการทำงานเดียวกับ CYP2C19 แม้ว่า CYP2D6 มีการแสดงออกภายในตับค่อนข้างน้อยประมาณร้อยละ 3 ของเอนไซม์ P450 ทั้งหมด²⁰ แต่เป็นไอโซฟอร์มที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมมาก โดยมีหลาย polymorphism เช่น CYP2D6*2, CYP2D6*3, CYP2D6*4, CYP2D6*10, CYP2D6*17, CYP2D6*29 และ CYP2D6*41⁵⁰ ส่งผลให้การเมแทบอลิซึมยาของแต่ละบุคคลแตกต่างกันได้ CYP2D6 มีความสำคัญในการเมแทบอลิซึมยาหลายกลุ่ม อาทิ antidepressant ได้แก่ desipramine กลุ่ม beta-blockers ได้แก่ propranolol กลุ่มยา antiarrhythmias ได้แก่ sparteine ยาระงับการไอ ได้แก่ dextromethorphan เป็นต้น³⁵

วิธีการศึกษาประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ CYP2D6 มีหลายวิธี ได้แก่ 1) dextromethorphan O-demethylation (DXMOM) ทำการศึกษาในไมโครโซมของมนุษย์โดยมี dextromethorphan เป็นสับสเตรท และตรวจวัดผลิตภัณฑ์คือ dextrophan โดยเทคนิค HPLC ซึ่งจะมีการตรวจวัด dextrophan 2 วิธี ได้แก่ 1.1) HPLC-UV²¹ ที่ความยาวคลื่น 280 nm โดยใช้ C-18 column 1.2) HPLC-fluorometry โดย excitation และ emission wavelength ที่ 270 nm และ 312 nm ตามลำดับ โดยใช้ C-18 column⁵¹, diphenyl column²¹ หรือ phenyl column⁵² การตรวจวัดผลิตภัณฑ์ด้วย spectrofluorometry มีความไวมากกว่า UV-spectrophotometry 2) bufuralol 1'-hydroxylation (B1H) ทำการศึกษาในไมโครโซมของมนุษย์โดยมี bufuralol เป็นสับสเตรท และตรวจวัดผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาได้แก่ 1'-hydroxybufuralol โดยเทคนิค HPLC ประกอบด้วย Spherisorb

ODS-2 column²³ หรือ phenyl column⁵² และตรวจวัด 1'-hydroxybufaralol ด้วย spectrofluorometry โดย excitation และ emission wavelength ที่ 252 nm และ 302 nm ตามลำดับ 3) debrisoquine 4-hydroxylation (DB4H)^{52,53} ทำการศึกษาในไมโครโซมของมนุษย์โดย debrisoquine เป็นสับสเตรท และตรวจวัดผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยา ได้แก่ 4'-hydroxydebrisoquine โดยเทคนิค HPLC ประกอบด้วย phenyl column และตรวจวัด 4'-hydroxydebrisoquine ด้วย spectrofluorometry ที่ excitation และ emission wavelength 208 nm และ 290 nm ตามลำดับ

CYP2E1

CYP2E1 เป็นเอนไซม์เดียวที่อยู่ในแฟมิลีนี้ มีการแสดงออกทั้งในมนุษย์ หนู rat และ หนู mice ด้วยไอโซฟอร์มเดียวกัน⁶ CYP2E1 เกี่ยวข้องกับการเมแทบอลิซึมยาค่อนข้างจำกัด ได้แก่ acetaminophen, chlorzoxazone แต่มีบทบาทในการเมแทบอลิซึมสารก่อมะเร็งค่อนข้างมาก อาทิ benzene, styrene, acrylonitril และ nitrosamine นอกจากนี้ยังมีบทบาทสำคัญในการเมแทบอลิซึม ethanol เพื่อป้องกันไม่ให้ระดับของ ethanol ในกระแสเลือดสูงเกินร่างกายรับได้และ ethanol เองยังสามารถชักนำให้ CYP2E1 เพิ่มปริมาณได้อีกด้วย³⁵ วิธีการศึกษาประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ CYP2E1 ได้แก่ chlorzoxazone 6-hydroxylation (CZ6H)^{21,23} ทำการศึกษาในไมโครโซมของมนุษย์โดยสับสเตรทคือ chlorzoxazone และตรวจวัดผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาได้แก่ 6-hydroxychlorzoxazone โดยเทคนิค HPLC ประกอบด้วย C-18 column ใช้ zoxazolamine เป็น internal standard และตรวจวัด 6-hydroxychlorzoxazone ด้วย UV-detector ที่ความยาวคลื่น 287 nm อีกวิธีหนึ่งได้แก่ *p*-nitrophenol hydroxylation (4NPH)^{6,54} ทำการศึกษาในไมโครโซมของหนู rat สับสเตรทคือ *p*-nitrophenol และตรวจวัดผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาได้แก่ 4-nitrocatechol โดยเทคนิค UV-spectrophotometry ตรวจวัด 4-nitrocatechol ภายใต้สภาวะที่เป็นต่าง ที่ความยาวคลื่น 546 nm ซึ่งในสภาวะนี้ สารเมแทบอลิท์อื่นของ *p*-nitrophenol ไม่รบกวนการตรวจวัด 4-nitrocatechol

CYP3A4/5

CYP3A4/5 มีปริมาณร้อยละ 30 ของเอนไซม์ P450 ทั้งหมดในตับ³⁵ และเป็นไอโซฟอร์มที่สำคัญที่สุดในการเมแทบอลิซึมยาที่เข้าสู่ร่างกาย โดยยาประมาณร้อยละ 50 ของยาในท้องตลาด มักถูกเมแทบอลิซึมผ่านเอนไซม์ชนิดนี้ ยาที่ถูกเมแทบอลิซึมผ่าน CYP3A4/5 ได้แก่ terfenadine ยากลุ่ม benzodiazepines, midazolam, triazolam, quinidine, lidocaine, carbamazepine, nifedipine, tacrolimus, dapsone และ erythromycin เป็นต้น

นอกจากนี้ CYP3A4/5 ยังเมแทบอลิซึมสารภายในร่างกายด้วย อาทิ steroids, bile acid เป็นต้น^{2,35} นอกจากตับแล้วยังสามารถพบเอนไซม์ชนิดนี้ในอวัยวะอื่นๆ ได้แก่ กระเพาะอาหาร ปอด ลำไส้ และไต^{9,29} วิธีการศึกษาประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ CYP3A4/5 ได้แก่ midazolam 1'-hydroxylation (MZ1H), testosterone 6 β -hydroxylation (T6BH) และ nifedipine oxidation (NFO)^{6,55,56} โดยสับสเตรทของแต่ละปฏิกิริยาได้แก่ midazolam, testosterone และ nifedipine ตามลำดับ ทำการตรวจวัดผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาได้แก่ 1'-hydroxymidazolam (1HMZ), 6 β -hydroxytestosterone (6BHT) และ oxidized nifedipine (ONF) ตามลำดับ โดยเทคนิค HPLC ประกอบด้วย C-18 column ใช้ phenacetin, androstenedione และ diazepam เป็น internal standard สำหรับ midazolam, testosterone และ nifedipine ตามลำดับ และตรวจวัด 1HMZ, 6BHT และ ONF ด้วย UV-detector ที่ความยาวคลื่น 220, 254 และ 270 nm ตามลำดับ เนื่องจาก midazolam จัดเป็นวัตถุออกฤทธิ์ต่อจิตประสาทประเภทที่ 2 ตามกฎหมายยาของประเทศไทย จึงอาจไม่สะดวกในการนำมาเป็นสารมาตรฐาน จึงอาจใช้วิธี T6BH และ NFO ซึ่งสามารถจัดหาสารมาตรฐานได้สะดวกกว่า

CYP3A11

CYP3A11 เป็นไอโซฟอร์มที่พบในหนู mice มีลำดับกรดอะมิโนคล้ายคลึงกับ CYP3A4 ของมนุษย์มากถึงร้อยละ 76 นอกจากนี้ CYP3A11 ยังมีการแสดงออกที่ลำไส้คล้ายคลึงกับ CYP3A4 ในมนุษย์ด้วย³⁵ ดังนั้นนิยมใช้ CYP3A11 ในการศึกษาเพื่อทำนายความเป็นไปได้เบื้องต้นของการเมแทบอลิซึมยาหรือสารแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกาย โดยวิธีการศึกษาประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ CYP3A11 ได้แก่ 6BHT¹⁶ ทำการศึกษาในไมโครโซมของหนู mice โดยสับสเตรทคือ testosterone และตรวจวัดผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาได้แก่ 6BHT โดยเทคนิค HPLC ประกอบด้วย C-18 column และตรวจวัด 6BHT ด้วย UV-detector ที่ความยาวคลื่น 254 nm

บทสรุป

เอนไซม์ P450 เป็นกลุ่มเอนไซม์ที่ประกอบด้วยไอโซฟอร์มย่อยหลายชนิดที่มีประสิทธิภาพการทำงานและการแสดงออกในอวัยวะต่าง ๆ แตกต่างกันไป มีบทบาทสำคัญในการเปลี่ยนแปลงสารแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกาย โดยผ่านกระบวนการเมแทบอลิซึมใน Phase I ดังนั้นการศึกษาประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ P450 ไอโซฟอร์มต่าง ๆ ต่อการทำนายกระบวนการเมแทบอลิซึมและเภสัชจลนศาสตร์ของยาจึงมีความสำคัญ ดังนั้นการเลือกวิธีการศึกษาประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ที่เหมาะสมสำหรับ-

ตารางที่ 3 วิธีการศึกษาประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ P450 แต่ละไอโซฟอร์ม

P450s	วิธีการศึกษาประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์				เอกสารอ้างอิง
	ปฏิกิริยา	สับสเตรท	ผลิตภัณฑ์	เทคนิคการตรวจวัดผลิตภัณฑ์	
CYP1A1	Ethoxyresorufin-O-deethylation (EROD)	Ethoxyresorufin	Resorufin	Spectrofluorometry (excitation 550 nm, emission 585 nm)	15, 16
CYP1A2	Ethoxyresorufin-O-deethylation (EROD)	Ethoxyresorufin	Resorufin	Spectrofluorometry (excitation 550 nm, emission 585 nm)	15, 16
	Phenacetin O-deethylation (POD)	Phenacetin	Acetaminophen	HPLC-UV (C-18 column, 254 nm)	22, 3
	Methoxyresorufin O-demethylation (MROD)	Methoxyresorufin	Resorufin	Spectrofluorometry (excitation 550 nm, emission 585 nm)	24, 5
	Caffeine N3-demethylation (CN3D)	Caffeine	Paraxanthine	HPLC-UV (C-18 column, 280 nm)	21, 26
CYP1B1	Ethoxyresorufin-O-deethylation (EROD)	Ethoxyresorufin	Resorufin	Spectrofluorometry (excitation 550 nm, emission 585 nm)	15, 32, 33
CYP2B6	7-ethoxy-4-trifluoromethyl-coumarin O-dealkylation (7-EFCOD)	7-ethoxy-4-trifluoromethylcoumarin	7-hydroxy-4-trifluoromethylcoum	Spectrofluorometry (excitation 410 nm emission 510 nm)	37, 38
	Bupropion hydroxylation (BPH)	Bupropion	Hydroxybupropion	HPLC-UV (C-18 column, 214 nm)	39, 40
CYP2B1/2, CYP2B9/10	Benzyloxyresorufin O-dealkylation (BROD)	Benzyloxyresorufin	Resorufin	Spectrofluorometry (excitation 530 nm emission 585 nm)	15, 36
	Penoxyresorufin O-dealkylation (PROD)	Penoxyresorufin	Resorufin	Spectrofluorometry (excitation 530 nm emission 585 nm)	15, 36
CYP2C8	Paclitaxel 6 α -hydroxylation (PX6H)	Paclitaxel	6 α -hydroxypaclitaxel	HPLC-UV (C-18 column, 230 nm)	42, 43
	Amodiaquine N-deethylation (AQND)	Amodiaquine	N-desethylamodiaquine	HPLC-UV (C-18 column, diode array 342nm); LC-MS (ion trap MS)	44
CYP2C9	Tolbutamide methyl-hydroxylation (TMH)	Tolbutamide	Hydroxymethyl-tolbutamide	HPLC-UV (C-18 column, 230 nm)	21, 23
	Diclofenac 4'-hydroxylation (D4H)	Diclofenac	4'-hydroxydiclofenac	HPLC-UV (C-18 column, 282 nm)	38, 45
CYP2C19	S-mephenytoin 4-hydroxylation (MP4H)	Mephenytoin	4-hydroxymephenytoin	HPLC-UV (C-18 column, 204 nm)	21, 46
	Omeprazole 5-hydroxylation (OP5H)	Omeprazole	5-hydroxyomeprazole	HPLC-UV (Superspher SI-60 column, 302 nm)	47, 48, 49
CYP2D6	Dextromethorphan O-demethylation (DXMOM)	Dextromethorphan	Dextrorphan	HPLC-UV (C-18 column, 280 nm) HPLC-SF (C-18 column, phenyl column, diphenyl column, excitation 270 nm emission 312 nm)	21, 51
	Bufuralol 1'-hydroxylation (B1H)	Bufaralol	1'-hydroxybufaralol	HPLC-SF (C-18 column, phenyl column, excitation 252 nm emission 302 nm)	23, 52
	Debrisoquine 4-hydroxylation (DB4H)	Debrisoquine	4'-hydroxydebrisoquine	HPLC-SF (phenyl column, excitation 208 nm, emission 290 nm)	52, 53
CYP2E1	Chlozoxazone 6-hydroxylation (CZ6H)	Chlozoxazone	6-hydroxychlozoxazone	HPLC-UV (C-18 column, 287 nm)	21, 23
	p-nitrophenol hydroxylation (4NPH)	p-nitrophenol	4-nitrocatechol	UV (546 nm)	6, 54
CYP3A4/5	Midazolam 1'-hydroxylation (MZ1H)	Midazolam	1'-hydroxymidazolam	HPLC-UV (C-18 column, 220 nm)	55, 56
	Testosterone 6 β -hydroxylation (T6BH)	Testosterone	6 β -hydroxytestosterone	HPLC-UV (C-18 column, 254 nm)	6, 56
	Nifedipine oxidation (NFO)	Nifedipine	Oxidized nifedipine	HPLC-UV (C-18 column, 270 nm)	56
CYP3A11	Testosterone 6 β -hydroxylation (T6BH)	Testosterone	6 β -hydroxytestosterone	HPLC-UV (C-18 column, 254 nm)	16

แต่ละไอโซฟอร์ม จะส่งผลให้ผลการทดลองมีความถูกต้องและแม่นยำมากขึ้น นำไปสู่การแปลผลทางคลินิกที่ถูกต้อง แม่นยำ และน่าเชื่อถือ

การศึกษาประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์โดยหลักการแล้ว จะเลือกใช้สับสเตรทเป็นยาที่มีจำหน่ายสู่ท้องตลาด เช่น bupropion, nifedipine, tolbutamide และ paclitaxel เป็นต้น และเป็นยาที่มีความจำเพาะกับไอโซฟอร์มที่ใช้ศึกษาค่อนข้างสูง จากนั้นตรวจวัดผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาโดยเทคนิคการวิเคราะห์ต่าง ๆ ได้แก่ UV, HPLC-UV, HPLC-SF หรือ SF เป็นต้น ขึ้นกับคุณสมบัติการดูดกลืนแสงหรือการเรืองแสงของสารผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นแตกต่างกัน

วิธีการศึกษาประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ P450 ยังต้องพัฒนาอย่างต่อเนื่องต่อไป เพื่อค้นหาสับสเตรทที่มีความจำเพาะต่อเอนไซม์ P450 แต่ละไอโซฟอร์มมากยิ่งขึ้น นอกจากนี้แล้วจะเห็นว่ายังมีอีกหลายไอโซฟอร์มที่เพิ่งค้นพบ หรือค้นพบนานแล้วแต่ยังไม่ศึกษาถึงบทบาทหรือความสำคัญของเอนไซม์ต่อวิถีเมแทบอลิซึมของร่างกาย จึงควรศึกษาเพื่อพัฒนาวิธีการตรวจวัดประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์เหล่านี้ด้วย เพื่อให้ได้ข้อมูลการเมแทบอลิซึมผ่านกลุ่มเอนไซม์ P450 ที่สมบูรณ์ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- Parkinson A. Biotransformation of xenobiotics. In: Klassen CD (ed.). *Toxicology: The basic science of poison*. New York: McGraw-Hill, Inc., 1996: p.133.
- Nebert DW, Russell DW. Clinical importance of the cytochromes P450. *Lancet* 2002;360:1155–1162.
- Denisov GI, Makris TM, Sligar SG, et al. Structure and chemistry of cytochrome P450. *Chem Rev* 2005;105(6):2253-2277.
- Hamdane D, Zhang H, Hollenberg P. Oxygen activation by cytochrome P450 monooxygenase. *Photosynth Res* 2008;98(1-3): 657–666.
- Guengerich FP, Wu Z, Bartleson CJ. Function of human cytochrome P450s: characterisation of the orphans. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;338(1):465–469.
- Löfgren S, Hagbjörk AL, Ekman S, et al. Metabolism of human cytochrome P450 marker substrates in mouse: a strain and gender comparison. *Xenobiotica* 2004;34(9):811–834.
- Bogaards JJP, Bertrand M, Jackson P, et al. Determining the best animal model for human cytochrome P450 activities: a comparison of mouse, rat, rabbit, dog, micropig, monkey and man. *Xenobiotica* 2000;30(12):1131-1152.
- Guengerich FP. Cytochrome P450 and chemical toxicology. *Chem Res Toxicol* 2008;21(1):70–83.
- Ding X, Kaminsky LS. Human extrahepatic cytochromes P450: function in xenobiotic metabolism and tissue-selective chemical toxicity in the respiratory and gastrointestinal tracts. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2003;43:149–173.
- Pelkonen O, Turpeinen M, Hakkola J, et al. Inhibition and induction of human cytochrome P450 enzymes: current status. *Arch Toxicol* 2008;82(10):667-715.
- Boobis AR, Lynch AM, Murray S, et al. CYP1A2-catalyzed conversion of dietary heterocyclic amines to their proximate carcinogens is their major route of metabolism in humans. *Cancer Res* 1994;54(1):89–94.
- Schmidt JV, Bradfield CA. Ah receptor signaling pathways. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1996;12:55–89.
- Willey JC, Coy EL, Frampton MW. Quantitative RT-PCR measurement of cytochromes P450 1A1, 1B1, and 2B7, microsomal epoxide hydrolase, and NADPH oxidoreductase expression in lung cells of smokers and nonsmokers. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997;17(1):114–124.
- Nebert DW, Dalton TP, Okey AB, et al. Role of aryl hydrocarbon receptor-mediated induction of the CYP1 enzymes in environmental toxicity and cancer. *J Biol Chem* 2004;279(23):23847–23850.
- Burke MD, Thompson S, Elcombe CR, et al. Ethoxy-, pentoxy-, and benzyloxyphenoxazones and homologues: a series of substrates to distinguish between different induced cytochromes P-450. *Biochem Pharmacol* 1985;34(18):3337–3345.
- Kleiner HE, Xia X, Sonoda J, et al. Effects of naturally occurring coumarins on hepatic drug metabolizing enzymes in mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 2008;232(2):337-350.
- Radenac G, Coteur G, Danis B, et al. Measurement of EROD activity: caution on spectral properties of standards used. *Mar Biotechnol* 2004;6(4):307–311.
- Tassaneeyakul W, Birkett DJ, Veronese ME, et al. Specificity of substrate and inhibitor probes for human cytochromes P450 1A1 and 1A2. *J Pharmacol Exp Ther* 1993;265(1):401-407.
- Shimada T, Yamazaki H, Mimura M, et al. Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. *J Pharmacol Exp Ther* 1994;270(1):414–423.
- Lewis DF. 57 Varieties: the human cytochromes P450. *Pharmacogenomics* 2004;5(3):305–318.
- Pearce RE, McIntyre CJ, Madan A, et al. Effects of freezing, thawing, and storing human liver microsomes on cytochrome P450 activity. *Arch Biochem Biophys* 1996;331(2):145–169.
- Sesardic D, Boobis AR, Edwards RJ, et al. A form of cytochrome P450 in man, orthologous to form d in the rat, catalyses the O-deethylation of phenacetin and is inducible by cigarette smoking. *Br J Clin Pharmacol* 1988;26(4):363–372.

23. Newton DJ, Wang RW, Lu AY. Cytochrome P450 inhibitors. Evaluation of specificities in the *in vitro* metabolism of therapeutic agents by human liver microsomes. *Drug Metab Dispos* 1995; 23(1):154–158.
24. Chaloupka K, Steinberg M, Santostefano M, et al. Induction of Cyp1a-1 and Cyp1a-2 gene expression by a reconstituted mixture of polynuclear aromatic hydrocarbons in B6C3F1 mice. *Chem-Biol Interact* 1995;96(3):207-221.
25. Hamm JT, Ross DG, Richardson VM, et al. Methoxyresorufin: An inappropriate substrate for CYP1A2 in the mouse. *Biochem Pharmacol* 1988;56(12):1657-1660.
26. Kot M, Daniel WA. Effect of cytochrome P450 (CYP) inducers on caffeine metabolism in the rat. *Pharmacol Rep* 2007;59(3):296-305.
27. Kot M, Daniel WA. Caffeine as a marker substrate for testing cytochrome P450 activity in human and rat. *Pharmacol Rep* 2008;60(6):789-797.
28. Guengerich FP. Metabolism of chemical carcinogens. *Carcinogenesis* 2000;21(3):345-351.
29. Pavek P, Dvorak Z. Xenobiotic-induced transcriptional regulation of xenobiotic metabolizing enzymes of the cytochrome P450 superfamily in human extrahepatic tissues. *Curr Drug Metab* 2008;9(2):129-143.
30. Stoilov I, Akarsu AN, Sarfarazi M. Identification of three different truncating mutations in cytochrome P4501B1 (*CYP1B1*) as the principal cause of primary congenital glaucoma (Buphthalmos) in families linked to the GLC3A locus on chromosome 2p21. *Hum Mol Genet* 1997;6(4):641-647.
31. Stoilov I, Akarsu AN, Alozie I, et al. Sequence analysis and homology modeling suggest that primary congenital glaucoma on 2p21 results from mutations disrupting either the hinge region or the conserved core structures of cytochrome P4501B1. *Am J Hum Genet* 1998;62(3):573-584.
32. Chun YJ, Lee SK, Kim MY. Modulation of human cytochrome P450 1B1 expression by 2,4,3',5'-tetramethoxystilbene. *Drug Metab Dispos* 2005;33(12):1771–1776.
33. Keshava C, Divi RL, Einem TL, et al. Chlorophyllin significantly reduces benzo[a]pyrene [BP]-DNA adduct formation and alters cytochrome P450 1A1 and 1B1 expression and EROD activity in normal human mammary epithelial cells (NHMECs). *Environ Mol Mutagen* 2009;50(2):134–144.
34. Jarukamjorn K, Sakuma T, Nemoto N. Sexual dimorphic expression of mouse hepatic CYP2B: Alterations during development or after hypophysectomy. *Biochem Pharmacol* 2002; 63(11):2037-2041.
35. Martignoni M, Groothuis GMM, Kanter RD. Species differences between mouse, rat, dog, monkey and human cytochrome P450-mediated drug metabolism. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2006;2(6):875-894.
36. Burke MD, Thompson S, Weaver RJ, et al. Cytochrome P450 specificities of alkoxyresorufin O-dealkylation in human and rat liver. *Biochem Pharmacol* 1994;48(5):923-936.
37. DeLuca JG, Dysart GR, Rasnick D, et al. A direct, highly sensitive assay for cytochrome P-450 catalyzed O-deethylation using a novel coumarin analog. *Biochem Pharmacol* 1988;37(9): 1731-1739.
38. Bogaards JJP, Venekamp JC, van Bladeren PJ. The biotransformation of isoprene and the two isoprene monoepoxides by human cytochrome P450 enzymes, compared to mouse and rat liver microsomes. *Chem Biol Interact* 1996;102(3): 169-182.
39. Faucette SR, Hawke RL, Lecluyse EL, et al. Validation of bupropion hydroxylation as a selective marker of human cytochrome P450 2B6 catalytic activity. *Drug Metab Dispos* 2000; 28(10):1222–1230.
40. Hesse LM, Venkatakrishnan K, Court MH, et al. CYP2B6 mediates the *in vitro* hydroxylation of bupropion: potential drug interactions with other antidepressants. *Drug Metab Dispos* 2000; 28(10):1176–1183.
41. Rahman A, Korzekwa KR, Grogan J, et al. Selective biotransformation of taxol to 6a-hydroxytaxol by human cytochrome P450 2C8. *Cancer Res* 1994;54(21):5543-5546.
42. Harris JW, Rahman A, Kim BR, et al. Metabolism of taxol by human hepatic microsomes and liver slices: Participation of cytochrome P450 3A4 and an unknown P450 enzyme. *Cancer Res* 1994;54(15):4026-4035.
43. Kerdpin O, Elliot DJ, Boye SL, et al. Differential contribution of active site residues in substrate recognition sites 1 and 5 to cytochrome P450 2C8 substrate selectivity and regioselectivity. *Biochemistry* 2004;43(24):7834-7842.
44. Li XQ, Björkman A, Andersson TB, et al. Amodiaquine clearance and its metabolism to N-desethylamodiaquine is mediated by CYP2C8: a new high affinity and turnover enzyme-specific probe substrate. *J Pharmacol Exp Ther* 2002;300(2):399–407.
45. Leemann T, Transon C, Dayer P. Cytochrome P450 TB (CYP2C): a major monooxygenase catalyzing diclofenac 4'-hydroxylation in human liver. *Life Sci* 1993;52(1):29–34.
46. Nakajima M, Inoue T, Shimada N, et al. Cytochrome P450 2C9 catalyzes indomethacin O-demethylation in human liver microsomes. *Drug Metab Dispos* 1998;26(3):261-266.
47. Andersson T, Miners JO, Veronese ME et al. Identification of human liver cytochrome P450 isoforms mediating omeprazole metabolism. *Br J Clin Pharmacol* 1993;36(6):521–530.
48. Karam WG, Goldstein JA, Lasker JM, et al. Human CYP2C19 is a major omeprazole 5-hydroxylase, as demonstrated with recombinant cytochrome P450 enzymes. *Drug Metab Dispos* 1996;24(10):1081-1087.

49. Abelö A, Andersson TB, Antonsson M, et al. Stereoselective metabolism of omeprazole by human cytochrome P450 enzymes. *Drug Metab Dispos* 2000;28(8):966–972.
50. Ingelman-Sundberg M, Sim SC, Gomez A, et al. Influence of cytochrome P450 polymorphisms on drug therapies: Pharmacogenetic, pharmacoeigenetic and clinical aspects. *Pharmacol Ther* 2007;116(3):496–526.
51. Broly F, Libersa C, Lhermitte M, et al. Effect of quinidine on the dextromethorphan O-demethylase activity of microsomal fractions from human liver. *Br J Clin Pharmacol* 1989;28(1):29–36.
52. Marcucci KA, Pearce RE, Crespi C, et al. Characterization of cytochrome P450 2D6.1 (CYP2D6.1), CYP2D6.2, and CYP2D6.17 activities toward model CYP2D6 substrates dextromethorphan, bupropion, and debrisoquine. *Drug Metab Dispos* 2002;30(5):595-601.
53. Kahn GC, Boobis AR, Murray S, et al. Assay and characterization of debrisoquine 4-hydroxylase activity of microsomal fractions of human liver. *Br J Clin Pharmacol* 1982; 13(5):637–645.
54. Kronbach T, Mathys D, Umeno M, et al. Oxidation of midazolam and triazolam by human liver cytochrome P450 IIIA4. *Mol Pharmacol* 1989;36(1):89-96.
55. Reinke LA, Moyer MJ. *p*-nitrophenol hydroxylation: A microsomal oxidation which is highly inducible by ethanol. *Drug Metab Dispos* 1985;13(5):548-552.
56. Patki KC, Von Moltke LL, Greenblatt DJ. *In vitro* metabolism of midazolam, triazolam, nifedipine, and testosterone by human liver microsomes and recombinant cytochromes P450: role of cyp3A4 and cyp3A5. *Drug Metab Dispos* 2003;31(7):938–944.

Review Article

A Review on Assessment of Cytochrome P450 Enzyme Activity

Kanokwan Jarukamjorn^{1*} and Thanakorn Suraruk²

¹ Academic Office for Pharmaceutical Sciences, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University, Thailand

² 5th year Pharmacy Student, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University, Thailand

* Corresponding author: kanok_ja@kku.ac.th

ABSTRACT

Cytochrome P450 (P450), a superfamily of heme containing monooxygenase in liver, mainly involves in metabolism of both endogenous substances and drugs or xenobiotics in Phase I metabolism. Studies on P450 enzyme activities resulted in understanding metabolic pathway or regulatory mechanism of xenobiotics or drugs related to specific P450 isoforms. Of these P450s, CYP1, CYP2, and CYP3 are P450 families commonly involved in metabolism of drugs. Of two decades of studies, dealkylation has been a common chemical reaction employed in studies of CYP1 enzyme activity whereas dealkylation and hydroxylation have been commonly used in studies of CYP2 and CYP3 activities. It is imperative to acquire precise, accurate, and reproducible information for reliable prediction of metabolic pathway of drugs and xenobiotics. This could lead to an appropriate P450 enzyme activity approach that could precisely predict drug-drug or drug-xenobiotic interactions, drug efficacy, and ultimately clinical significance.

Keywords: enzyme activity, cytochrome P450, CYP1, CYP2, CYP3

Thai Pharm Health Sci J 2010;5(2):169-179