การศึกษาความเป็นพิษของ FRC 001

(The Study on the Toxicilogy of FRC 001 (China No.1 Tian Xian Liquid))

บทคัดย่อ

จากดัชนีของการประเมินค่า รายละเอียดและวิธีการของการศึกษาความเป็นพิษ ผู้วิจัยได้ศึกษาหัวข้อการทดสอบความเป็นพิษแบบเฉียบพลัน การทดสอบความเป็นพิษแบบสะสม การทดสอบการติดสีของนิวเคลียสของเม็ดเลือดแดงของหนู การทดสอบความผิดปกติของสเปิร์มและการทดสอบแบบ Ames ของยา FRC 001 ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า การทดสอบความเป็นพิษแบบเฉียบพลัน การทดสอบความเป็นพิษแบบสะสม และการทดสอบแบบ Ames ของ FRC 001 ให้ผลปกติ ขณะที่อัตราการเกิดนิวเคลียสเล็กๆของเม็ดเลือดแดง และอัตราความผิดปกติของสเปิร์ม โดย FRC 001 สูงกว่ากลุ่มควบคุม ซึ่งผลที่ได้บ่งชี้ให้เห็นถึงระดับความปลอดภัยของ Edfrann และขนาดของยาที่ใช้และวิธีการให้ยาในการใช้ยา FRC 001

ที่มา

พิษวิทยา เป็นการศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างความเป็นพิษของยา และส่วนประกอบของยา และคุณสมบัติทางเคมีฟิสิกส์ กลไกการดูดซึม การกระจายตัว การเปลี่ยนแปลง การสะสมและการขับออกของยา การทดสอบความเป็นพิษแบ่งออกเป็น 2 แบบ คือ ภายนอกสิ่งมีชีวิตและภายในสิ่งมีชีวิต

การทดสอบภายนอกสิ่งมีชีวิต ได้แก่ การทดสอบความเป็นพิษแบบเฉียบพลัน การทดสอบความเป็นพิษแบบสะสม การทดสอบความผิดปกติ การทดสอบการกลายพันธุ์ในหนูทั้งหมด ขณะที่การทดสอบภายในสิ่งมีชีวิต จะรวมถึงการทดสอบการกลายพันธุ์ในจุลชีพ

เพื่อที่จะประเมินความเป็นพิษของ FRC001 ในการใช้ทางคลีนิก จึงได้ทดสอบความเป็นพิษของ FRC001

สาร อุปกรณ์และวิธีการ

1. สารและอุปกรณ์

1.1 ตัวยาศึกษา : FRC 001 จาก บริษัท ไชน่า-เจแปน เฟยดา ยูเนียน จำกัด

1.2 หนูทดลอง

1.2.1 หนูตะเภาพันธุ์คุนหมิง ลักษณะสมบูรณ์ อายุ 2-3 เดือน เพศผู้และเพศเมีย

1.2.2 หนูขาว พันธุ์ไวสตาร์ ลักษณะสมบูรณ์ อายุ 3-4 เดือน หนักประมาณ 180-200 กรัม เพศผู้และเพศเมีย ทั้งหนูตะเภาและหนูขาว ได้จาก ศูนย์สัตว์ทดลองของมหาวิทยาลัยการแพทย์ท่งจิ

1.2.3 เชื้อที่ใช้ทดสอบ : Salmonella typhimurium TA98, TA100 และ TA102 จากห้องปฏิบัติการ Ames แคลิฟอร์เนีย

2. วิธีการ

2.1 การทดสอบความเป็นพิษแบบเฉียบพลัน

โดยวิธีการทาง Horn หนูตะเภาจำนวน 50 ตัว ถูกแบ่งกลุ่มเป็น 5 กลุ่ม 1 กลุ่มสำหรับเป็นกลุ่มควบคุม และอีก 4 กลุ่มสำหรับทดสอบยา 4 ขนาด (21.5, 10.0, 4.64 และ 2.15 กรัม ต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม ในหนูแต่ละกลุ่ม

จะมีหนูขาวจำนวน 10 ตัว รวมอยู่ด้วย เพศผู้และเพศเมียอย่างละครึ่ง FRC 001 ถูกเจือจางด้วยน้ำกลั่น และให้หนูโดยการทานวันละครั้ง ติดต่อกัน 2 สัปดาห์

2.2 วิธีการเพิ่มขนาดยา

หนูขาว 32 ตัวถูกแบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบ ในแต่และกลุ่มมี 16 ตัวที่เป็นตัวผู้และตัวเมียอย่างละครึ่ง หนูกลุ่มทดสอบจะได้รับ FRC 001 โดยการทาน เริ่มต้นจาก 3.0 กรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม จากนั้นเพิ่มขนาดของยาทุกวันจนถึง 5.26 LD_{50} ติดต่อกัน 30 วัน หนูกลุ่มควบคุมถูกเลี้ยงด้วยน้ำเกลือโดยวิธีเดียวกันกับกลุ่มทดสอบ

2.3 การทดสอบจุลนิวเคลียส

หนูจำนวน 50 ตัวถูกแบ่งเป็น 5 กลุ่ม โดยกลุ่มหนึ่งเป็นกลุ่มควบคุมลบ อีกกลุ่มหนึ่งเป็นกลุ่มควบคุมบวก อีก 3 กลุ่มเป็นกลุ่มทดสอบของยาทั้ง 3 ขนาดคือ 4.3, 10.8, 21.5 กรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม ในแต่ละกลุ่มจะมีหนู 10 ตัว ที่เป็นเพศผู้และเพศเมีย อย่างละครึ่ง หนูกลุ่มด้านลบถูกเลี้ยงด้วยน้ำกลั่น 5 กรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม โดยการทาน ขณะที่หนูกลุ่มควบคุมด้านบวกจะได้รับ cyclophosphamide โดยการฉีดเข้าท้องจำนวน 100 มิลลิลิตรต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม และจะถูกฆ่าภายหลังได้รับยา 30 ชั่วโมง หนูกลุ่มทดลองที่เหลืออีก 3 กลุ่ม ถูกเลี้ยงด้วยยาวันละ 1 ครั้งโดยการทานติดต่อกัน 4 วัน และถูกฆ่าในวันที่ 5 ของการทดลอง โดยการแยกเอากระดูกสันอกออกและนำมาบดสำหรับทำ smear ของเม็ดเลือดแดงจากไขกระดูก และคำนวณจำนวนเซลล์ของ polychromatic erythrocytes และ micronucleus

2.4 การทดสอบความผิดปกติของสเปิร์ม

หนูตัวผู้จำนวน 40 ตัว ถูกสุ่มแบ่งเป็น 5 กลุ่ม ดังนี้ กลุ่มควบคุมลบ ,กลุ่มควบคุมบวก และกลุ่มทดลอง (4.3, 10.8, 21.5 กรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม) ในแต่ละกลุ่มจะมีหนูกลุ่มละ 8 ตัว หนูกลุ่มควบคุมด้านลบ ถูกเลี้ยงด้วยน้ำกลั่น 21.5 กรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมโดยการรับประทาน หนูกลุ่มควบคุมบวกจะได้รับ cyclophosphamide 21.5 กรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม และหนูกลุ่มทดลองจะได้รับ FRC 001 หนูทุกตัวจะได้รับการเลี้ยงด้วยน้ำกลั่น cyclophosphamide 21.5 หรือ FRC 001 วันละครั้งติดต่อกัน 5 วัน และเลี้ยงด้วยอาหารปกติอีก 30 วัน ก่อนถูกฆ่าเพื่อแยกเอา epididymides ใส่ในน้ำเกลือ 5 มิลลิลิตร ตัดเป็นชิ้นและแช่ในน้ำอุ่น 36.5 °C นาน 15 านที จากนั้นนับจำนวนสเปิร์มทั้งหมดและสเปิร์มที่ยังทำงานอยู่ต่อจำนวนสเปิร์ม 200 ตัว อัตราความผิดปกติของสเปิร์มคำนวณจากการทำแผ่นเคลือบบางย้อมสี

2.5 การทดสอบแบบ Ames

FRC 001 ถูกเจือจางใน DMSO เป็น 5 ความเข้มข้น คือ 1:50, 1:200, 1:500, 1:2000,และ 1:5000 โดยมี DMSO เป็นสารควบคุมด้านลบขณะที่ Dexon และ 2, 7-diaminofluoroene เป็นตัวควบคุมด้านบวก Dexon ถูกใช้เพื่อเป็นสารทำให้กลายพันธุ์โดยตรงและ 2, 7-diaminofluoroene เป็นสารก่อให้กลายพันธุ์ทางอ้อม ตาม reference 4

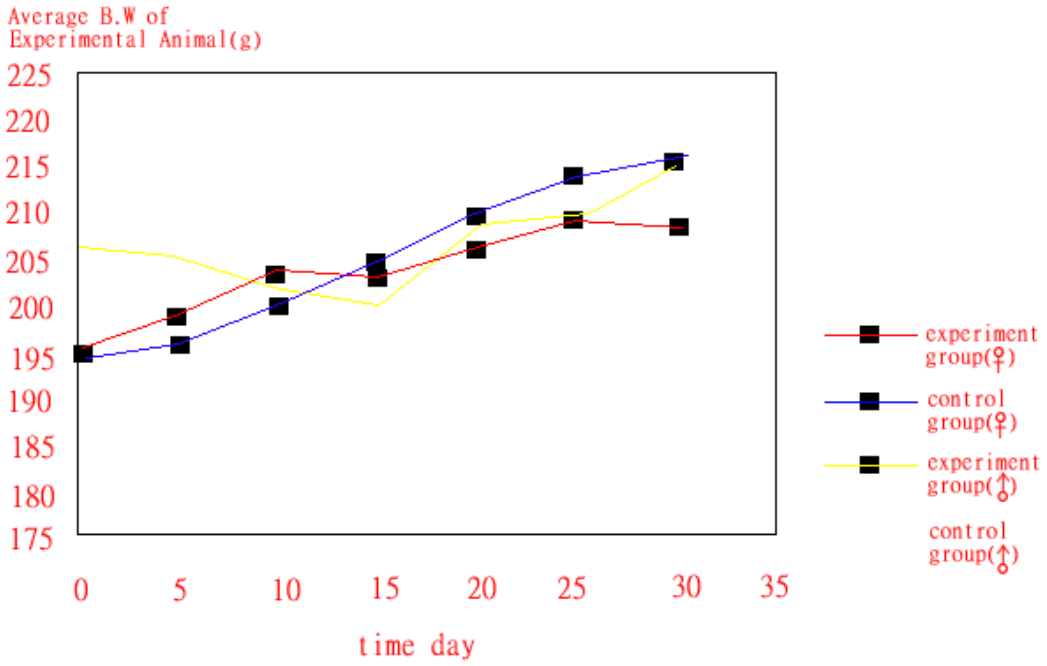
ผลและอภิปราย

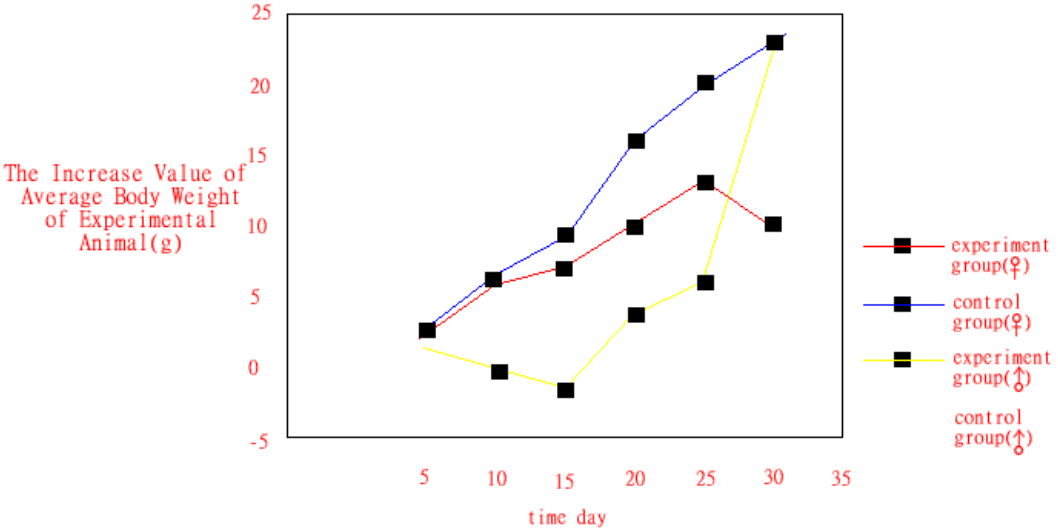
1. การทดสอบความเป็นพิษแบบเฉียบพลันของ FRC 001

หนูจะถูกสังเกตอาหารเป็นเวลา 2 สัปดาห์ ซึ่งพบว่าหนูที่ได้รับ FRC 001 ทุกตัวไม่มีความผิดปกติอย่างเห็นได้ชัด ยังคงรับน้ำและอาหารตามปกติ น้ำหนักตัวของหนูไม่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างผิดสังเกต และไม่มีหนูเสียชีวิตในช่วงเวลาที่ทำการทดลอง LD_{50} ของ FRC 001 โดยการทานมีค่ามากกว่า 21.5 กรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม

2. การทดสอบความเป็นพิษแบบสะสม

2.1 อิทธิพลที่มีต่อน้ำหนักตัวของหนู (รูปที่ 1, 2)





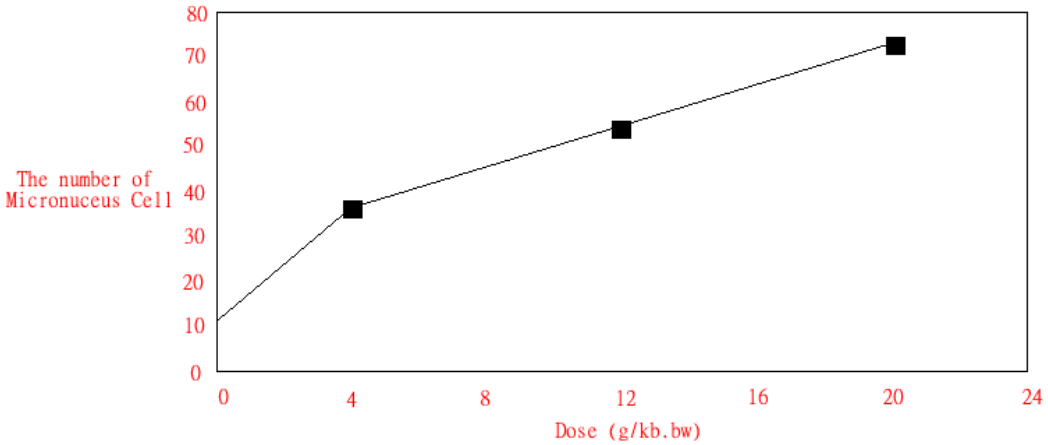
2.2 อิทธิพลที่มีต่ออวัยวะภายในหลักๆของหนู (ตารางที่ 1)

กลุ่ม จำนวน	สัมประสิทธิ์อวัยวะ (X±SD)				
	หัวใจ	ตับ	ม้าม	ปอด	ไต
ควบคุม 16	0.45±0.04	3.96±0.60	0.38±0.07	0.96±0.30	0.85±0.08
ทดสอบ 16	0.44±0.05	4.14±0.39	0.46±0.16	1.03±0.26	0.88±0.06

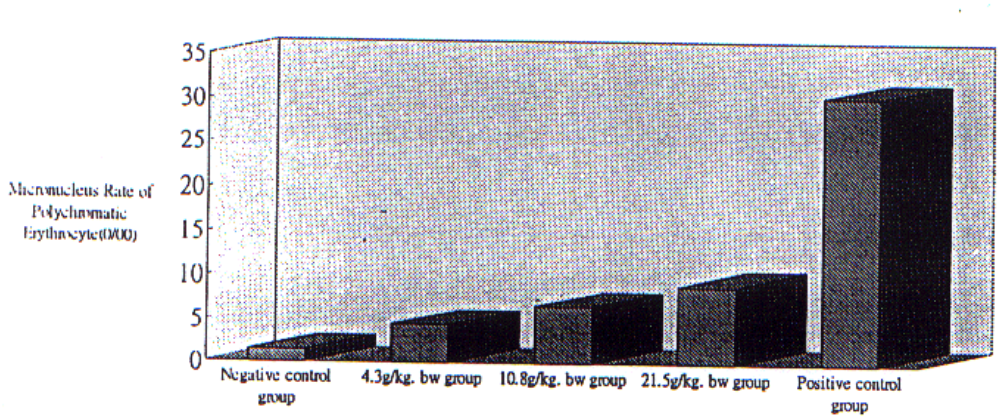
ความแตกต่างระหว่าง 2 กลุ่มไม่มีนัยสำคัญ ($P<0.05$)

จากตารางที่ 1 และรูปที่ 1, 2 FRC 001 ไม่มีผลอย่างเด่นชัดต่อน้ำหนักตัวและการเพิ่มค่าเฉลี่ยของน้ำหนักตัว เมื่อให้เป็นเวลา 30 วัน การรับอาหารและดำเนินชีวิตของหนูเป็นปกติ ไม่มีอาการเป็นพิษเกิดขึ้น อวัยวะภายในปกติ ความแตกต่างของหนูกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองไม่มีนัยสำคัญ ($P>0.05$) และขนาดของยาที่สะสมสูงถึง 5.26 LD_{50} ใน 30 วัน โดยที่ไม่ทำให้หนูเสียชีวิต ผลจากการทดลองนี้ แสดงให้เห็นว่า FRC 001 ไม่มีพิษสะสมอย่างเห็นได้ชัด

3. อิทธิพลของ FRC 001 ต่ออัตราการเกิดเซลล์แบบ micronucleus ของไขกระดูกในหนู (รูปที่ 3, 4)



รูปที่ 3 ความสัมพันธ์ระหว่างขนาดของยา FRC 001 ที่ใช้และจำนวนของเซลล์ micronucleus



รูปที่ 4 อัตราการเกิด micronucleus ในทุกกลุ่ม

โดยทั่วไปในการทดสอบ micronucleus test อัตราของ micronucleus ของ cyclophosphamide (ในกลุ่มควบคุมแบบบวก) คือ 0-3% ขณะที่อัตราของ micronucleus ในกลุ่มควบคุมแบบลบต่ำกว่า 3%

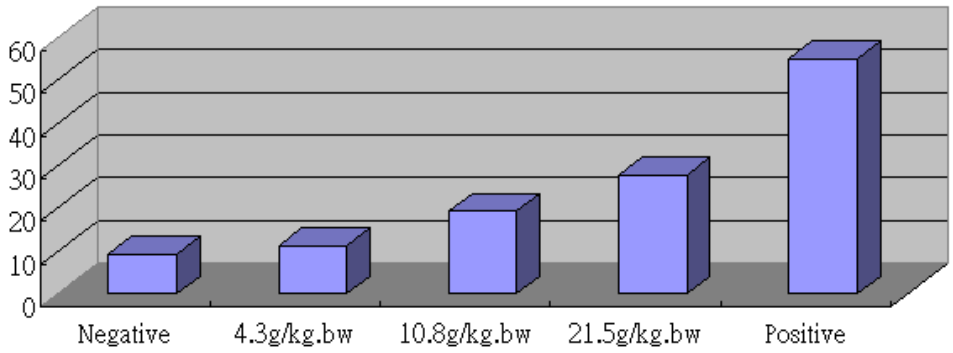
จากรูปที่ 3 และ 4 อัตราของ micronucleus ของกลุ่มควบคุมแบบบวกและแบบลบคือ 30.3% และ 1.4% ตามลำดับ ผลจากการทดลองนี้แสดงว่าการทดสอบไม่เป็นอิสระ โดยอัตราของ micronucleus ที่ระดับขนาดยา FRC 001 ต่ำ ปานกลาง และสูง มีค่าเท่ากับ 4.5% ,6.6% และ 9.0% ตามลำดับ

ความแตกต่างระหว่างกลุ่ม Edfrann และกลุ่มควบคุมแบบลบเป็นไปอย่างมีนัยสำคัญ และผลจากการทดลองนี้บ่งชี้ว่า FRC 001 มีฤทธิ์ทำให้กลายพันธุ์

4. อิทธิพลของ FRC 001 ต่อความผิดปกติของสเปิร์มในหนูทดลอง (รูปที่ 5 และตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 อิทธิพลของ FRC 001 ต่ออัตราความผิดปกติของสเปิร์มในหนู

กลุ่ม	จำนวน	จำนวนของสเปิร์ม	จำนวนของสเปิร์มที่ยังทำงานอยู่	อัตราของความผิดปกติของสเปิร์ม
ลบ	8	237.1	158.9	9.3
4.3 กรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม	8	156.3	109.7	11.3
10.8 กรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม	8	253	177.5	19.4
21.5 กรัมต่อน้ำหนักตัว1กิโลกรัม	8	212	139.2	27.9
บวก	8	378.9	263.1	55.1



รูปที่ 5 อิทธิพลของ FRC 001 ต่ออัตราความผิดปกติของสเปิร์มในหนู

ผลจากตารางที่ 2 จะเห็นว่าอัตราความผิดปกติของสเปิร์มที่ขนาดของยา FRC 001 3 ขนาด และในกลุ่มควบคุมแบบบวก มีค่าสูงกว่าในกลุ่มควบคุมแบบลบ และค่าโดยทั่วไปจะเป็น 2 เท่า ของกลุ่มควบคุมแบบลบ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าอัตราความผิดปกติของสเปิร์มมีค่าเป็นบวก ในการทดลองนี้ค่าอัตราความผิดปกติของสเปิร์มของกลุ่มควบคุมแบบบวกมีค่าเป็น 6 เท่าของกลุ่มควบคุมแบบลบ ขณะที่ FRC 001 ในขนาดต่ำ ปานกลางและสูง มีค่าเท่ากับ 1.2, 2.1และ 3 เท่าของกลุ่ม

ควบคุมแบบลบ โดยมีค่าความแตกต่างแบบนัยสำคัญ (P<0.05, P<0.01) ซึ่งผลจากการทดลองนี้แสดงว่า FRC 001 มีอันตรายและเป็นพิษต่อเซลล์ด้านสืบพันธุ์ได้

5. การทดสอบแบบ Ames ของ FRC 001 (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ผลของการทดสอบแบบ Ames ของ FRC 001

ความเข้มข้นของ FRC 001 (ไมโครกรัม)	อัตราการกลายพันธุ์ (Rt / RC)							
	TA 97		TA 98		TA 100		TA 102	
	+S-9	– S-9	+S-9	– S-9	+S-9	– S-9	+S-9	– S-9
1/50	1.02	0.08	0.78	1.26	0.96	1.04	0.94	0.90
1/260	1.18	0.85	1.00	1.24	0.91	1.14	1.16	1.00
1/500	1.02	0.86	1.12	1.04	1.00	1.09	1.12	0.86
1/2000	1.08	1.02	1.25	1.13	1.02	1.13	1.29	1.26
1/5000	1.11	1.03	1.60	1.10	1.07	1.08	1.18	1.13
Dexon (5 ไมโครกรัม)	--	11.30	--	15.70	--	4.33	--	3.53
2 - AF	3.35	--	5.32	--	5.07	--	2.10	--
DMSO	--	1.14	--	0.74	--	0.96	--	0.84

จากตารางที่ 3 ซึ่งใช้เป็นวิธีแบบรวมเข้าด้วยกันในการทดสอบแบบ Ames ของ FRC 001 จะได้อัตราการกลายพันธุ์ (MR) ของกลุ่มที่กลายพันธุ์ %(Rt) ต่อกลุ่มที่คืนสภาพเองภายหลังกลายพันธุ์ (RC) มีค่าต่ำกว่า 2 ซึ่งแสดงให้เห็นว่า FRC 001 ไม่มีผลโดยตรงตอการกลายพันธุ์ ขณะที่อัตราการกลายพันธุ์ของ Dexon และ 2,7- diaminofluoroene มีค่าสูงกว่า 2 ซึ่งแสดงการทดสอบแบบ Ames นี้ให้ผลบวก และสาร 2 ตัวนี้ที่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ได้ สำหรับอัตราการกลายพันธุ์ของ DMSO ซึ่งมีค่าต่ำกว่า 2 แสดงว่า DMSO ไมมีผลทำให้กลายพันธุ์ ซึ่งผลจากการทดลองยังแสดงว่าการทดสอบไม่เป็นอิสระ

สรุปโดยรวมแล้ว ในการทดสอบความเป็นพิษของ FRC001 พบว่าความเป็นพิษแบบเฉียบพลัน ความเป็นพิษแบบสะสมและการทดสอบการกลายพันธุ์ ให้ค่าที่ปกติ ขณะที่การทดสอบด้าน micronucleus และความผิดปกติของสเปิร์มให้ผลไม่ปกติ ซึ่งโดยทั่วไปคาดว่า การเกิด micronucleus ในระยะ interphase เกิดจากสารก่อให้ เกิดการกลายพันธุ์ เช่น การที่ micronucleus เป็นส่วนของโครโมโซมหลังจากการออกฤทธิ์ ของสารกลายพันธุ์

อัตราของการเกิด micronucleus มีความสัมพันธ์อย่างใกล้ชิดกับความผิดปกติของโครโมโซม FRC001 เหนี่ยวนำให้อัตราความผิดปกติของสเปิร์มสูงขึ้นในหนู แสดงว่า อาจมีผลกระทบต่อเซลล์สืบพันธุ์แบบเพศชายได้

จากข้อกำหนดของสำนักงานอาหารและยาในหัวข้อ ความเป็นพิษของสารระบุว่า สารนั้นไม่สามารถใช้เป็นอาหารและยาได้ ถ้ามีผลการทดลองด้านบวกของความเป็นพิษต่อระบบสืบพันธุ์ 2 การทดสอบขึ้นไป และถ้ามีผลของความเป็นพิษ ปรากฏชัดเจนในกรณีได้รับสารในระยะสั้น และถ้าผลการทดลองด้านระยะสั้นมีแนวโน้มด้านบวก ต้องพิจารณาถึงความเป็นพิษโดยดูจากความจำเป็นและความเสี่ยงในการได้รับยาของผู้ใช้ การทดสอบด้าน micronucleus และความผิดปกติของสเปิร์มที่ให้ผลบวกนั้นอาจเกี่ยวข้องกับ สารสำคัญ , ปฏิกิริยาระหว่างสารสำคัญและ / หรือ การสร้างผลิตภัณฑ์ใหม่ระหว่างการเตรียม FRC 001 ขณะที่ใช้ทางคลินิก ซึ่งความเป็นพิษของ FRC 001 อาจควบคุมได้โดย การลดขนาดการใช้ หรือใช้ในปริมาณน้อย และการใช้ช้า ๆ โดยจะได้ศึกษาต่อไป