

药物安全性评价中实验动物临床检验指标的综合分析

梁金强, 付新录, 郭芬芬, 邱玉文, 黄芝瑛

中山大学实验动物中心, 广东 广州 510006

摘要: 相对于药物安全性评价的临床研究, 实验动物的临床检验指标存在一定的特殊性, 应结合受试药物、动物表现、其他实验结果及其他检测结果进行综合分析。结合相关理论及笔者的实践经验对这个问题进行简要分析与讨论, 主要内容包括建立实验室的正常参考值、如何排除非受试物因素对检验结果的影响、对结果的统计分析等综合分析的前提、综合分析的总体思路与方法、如何对血液学指标、血液生化学指标及凝血指标进行具体分析。

关键词: 药物安全性评价; 实验动物; 临床检验; 综合分析

中图分类号: R965.3

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376(2014)06-0538-03

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2014.06.015

Comprehensive analysis on clinical pathological parameters of experimental animals in drug safety evaluation

LIANG Jin-qiang, FU Xin-lu, GUO Fen-fen, QIU Yu-wen, HUANG Zhi-ying

Laboratory Animal Center of SUN YAT-SEN University, Guangzhou 510006, China

Abstract: There is a certain particularity in animal examinations comparing with clinical examinations. We should analyse comprehensively combining article, symptoms and signs of animal, the result of other test and determination. In this paper, we discuss this issue by combining the theory and our experience in clinical pathology. The main content is to establish the animal's normal reference values, how to exclude the effect of other factor on the clinical examination. On the statistic analysis of result, specific analysis idea and method of hematology, blood biochemistry, and blood clotting are reviewed.

Key words: drug safety evaluation; experimental animals; clinical examination; comprehensive analysis

相对于药物安全性评价的临床研究, 实验动物临床检验存在一定的特殊性, 应结合受试药物、动物表现、其他实验结果及其他检测结果进行综合分析。药物安全性评价中实验动物临床检验包括了血常规、血液生化、血凝、尿液、骨髓和免疫学等检测指标。目前在药物临床前安全性评价中, 特别是在长期毒性试验中, 有比较多的实验报告只是把临床检验结果简单地罗列上去, 有些只进行单个指标的分析, 而没有进行综合分析, 致使得出误导性或错误的结论, 在药物技术审评中引起很大困难。因此对于实验动物临床检验指标有必要进行综合性、正确的分析, 以排除非药物因素引起的异常情况。

1 综合分析的基础

1.1 检测指标的正常参考值范围

建立机构内的每个指标各种动物每个性别不同年龄段的正常参考值范围^[1-3], 得以在动物个体分析中判断是否超出正常参考值范围, 是判断指标异常

的重要依据。

1.2 非受试物作用的因素排除

1.2.1 动物应激 即时的应激可引起白细胞、丙氨酸氨基转移酶(ALT)和肌酸激酶(CK)等指标的升高, 长期的应激可使纤维蛋白原(FBG)等指标升高^[4]。

1.2.2 年龄因素的影响 随着年龄的增长, 大鼠血液红细胞数(RBC)、血红蛋白量(HGB)及红细胞压积(HCT)值升高, 而血清ALT、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)及总蛋白(TP)值也升高, 而血清碱性磷酸酶(ALP)、血糖(GLU)值降低^[3, 5-6]。

1.2.3 采样方法、采样时间、样本制备等因素的影响 实验动物不同的采样部位、动物采样的麻醉及深度^[7]、动物保定方法、采样顺畅度及采样周围环境、尿液和粪便收集方法都对多个检测指标有明显的影响^[8]。动物禁食时间、一天内不同时间采血对多个检测指标也有明显的影响^[9]。样本制备过程中,

收稿日期: 2014-06-20

作者简介: 梁金强(1972—), 男, 高级工程师, 研究方向为药理及毒理学评价。Tel: (020)39943402 E-mail: Ljqtotoxic@21cn.com

抗凝剂的选择和量、离心条件、溶血情况^[10]等对较多的检测指标有影响。

1.2.4 样本保存的影响^[11] 采血过程中样本的保存应消除不同组别血样保存时间的差异,清楚各种样本的保存时间对检测结果的影响,如不同保存条件和保存时间对血液学的多项指标有不同的影响,血样离心前时间过长可引起血糖等指标的改变,血清保存时间过长会使一些酶类活性降低,血浆在不同条件下的保存时间对凝血指标也有明显影响^[12]。

1.2.5 检测过程的影响 检测过程中,试剂、质控方法和标准物质的存放条件和时间,检测的外周环境也会对检测结果造成一定的影响^[13]。

1.2.6 其他影响因素 血液学检测应使用有相关动物参数的血液分析仪。粪便潜血检测应排除喂饲食物的影响。

1.3 数据处理对分析的影响

非受试物产生的异常数据处理,可通过一般观察、动物个体数据分析,动物给药前后的比较等方法排除非受试物产生的异常数据,以排除这些异常数据的干扰。数据的统计分析中,应选择合理的统计方法,特别是一些半定量数据。

2 综合分析的思路

药物非临床安全性评价中临床检验指标的分析主要分析检测指标异常的原因,这些指标的异常反映了什么毒性或哪些组织器官的损伤,这种异常是否由药物引起的,这种作用是否对临床有参考意义。

2.1 指标的升高

检测指标的升高有以下3种原因,应分别对待。(1)生成增加:自身调节的作用(如贫血引起网织红细胞增高),药物的直接作用,如促红细胞生成素(EPO)引起红细胞(RBC)的升高,体内成分的降解或分解引起降解产物的增加;(2)相对增加:血液的浓缩使部分临床检验指标的升高,细胞内物质溢出(如细胞内的酶溢出)等;(3)检测成分的降解或分解减少、排出减少。

2.2 指标的降低

检测指标的降低有以下5种原因,应分别对待。(1)生成减少:药物的抑制作用,如对骨髓的抑制使外周血细胞减少;(2)生成原料不足:如缺铁性贫血,维生素(Vit)K引起的部分凝血因子减少;(3)生成器官的损伤,如肝脏损伤引起的白蛋白和部分凝血因子的减少;(4)药物的直接破坏作用,如溶血作用;(5)检测成分的降解或分解增加、排

出增加。

2.3 实验动物的个体分析和整体分析

在药物安全性评价中,个别动物出现毒性也应得到重视,因此个别动物出现检验指标的异常,应结合本动物的其他结果进行综合分析,判断该异常是否为受试物的作用。特别是在体型较大动物实验中,因为动物数量少,动物个体数据分析显得更为重要。在临床检验数据的整体分析中,注意统计学意义和生理学意义的关系,是否有生理学意义要关注正常参考范围,是否有其他相关指标或动物表现的支持,这些指标异常对临床是否有参考意义。

2.4 结合药物的特点分析

注意药物的药理作用的放大,同类药物或结构相似药物的毒性作用特点。

2.5 结合动物的临床表现分析

很多临床检验指标的异常可被一般观察指标给予验证或排除其生物学意义。如动物黏膜颜色与贫血,皮肤黏膜观察与过敏指标,动物活动与组织器官损伤指标等。又如动物产生局部感染而引起白细胞的升高,而这种感染是否是受试物的作用;如果不是,则白细胞升高不是药物的作用。受试物引起动物呕吐、腹泻,则由呕吐、腹泻而产生的电解质紊乱也为药物作用所致。

2.6 结合病理及其他检查结果分析

组织病理学从组织器官的形态学方面进行评价,而临床病理学从功能方面进行评价,和临床病理学间存在互相验证的关系;但两者不存在必然的因果关系。因为有组织病理学损伤的器官有不同的代偿作用,而临床病理学检测物质较多有较快的代谢或排出,药物安全性评价试验中动物组织病理学一般损伤较慢,需要较长的恢复期,因此组织病理学损伤和临床病理学异常,在很多情况下可观察到结果不同步。

2.7 结合其他实验分析

药物代谢和毒物代谢结果、刺激性和过敏性结果也对实验动物临床检验指标有影响。因为药物的靶向分布与该器官组织的异常指标可相互支持。药物的血药浓度参数、蛋白结合率和蓄积性对临床检验指标的分析也起重要的作用。刺激性和致敏性可引起动物应激及一些组织器官的损伤,使部分指标升高。

3 血液学指标的综合分析

血液学指标包括红细胞系和白细胞系及其分

类,红细胞系包括数量及形态的检测。红细胞系的数量参数有 RBC、血红蛋白(HGB)、平均血红蛋白量(MCH)、平均血红蛋白浓度(MCHC)、血小板数(PLT)、网织红细胞数(RET)等,而形态指标有平均红细胞体积(MCV)和红细胞分布宽度(RDW)等指标。

进行血液学分析时要注意以下3个方面。(1)红细胞系通过数量参数与形态参数结合进行分析,白细胞结合数量及其分类情况进行分析。(2)结合参数图进行分析,以清楚RBC是否干扰PLT的计数,白细胞分类图中各群细胞是否有重叠,特别是受试物对血液学有毒性时,必要时应对白细胞进行人工分类。(3)清楚各种动物血细胞产生的动力学和寿命。各种细胞生成和成熟的组织器官,在正常生理或病理条件下的寿命,以红细胞的寿命为例,犬100~120 d、大鼠45~68 d、小鼠20~45 d^[14]。

4 血生化指标的综合分析

血液生化学指标包括了血清酶类,蛋白、血脂、血糖、酸碱平衡类和代谢物类共3大类,通过这些指标的检测能推测组织器官的损伤或功能异常。

(1)ALT、AST、ALP、CK等血清酶指标,分析时注意各组织器官中各种酶的量,升高或降低的原因,酶代谢的快慢,各种酶对组织损伤的敏感性和特异性。(2)TP、白蛋白(ALB)、三酰甘油(TG)、总胆固醇(TCHO)、GLU、K⁺、Na⁺、Cl⁻等蛋白、血脂、血糖、酸碱平衡类指标,分析时要清楚其代谢过程,包括吸收、生成或合成、代谢部位及代谢途径。(3)肌肝(CR)和尿素氮(BUN)等代谢物指标,分析时要清楚其产生原因、主要排出途径,用以检测肾脏的敏感性。

5 血凝筛选指标的综合分析

血凝筛选指标包括PT、APTT、TT、FBG及凝血因子^[15]。分析时要清楚凝血过程和检测原理,凝血因子的生成和代谢、生成原料、生成部位。通过凝血功能的检测,以发现其减少或增加,并分析其改变的原因。受试物是否直接作用于凝血因子、生成部位或原料不足(如VitK)。FBG为急性时相反反应蛋白,炎症应激等可升高,常有消耗性降低。

6 结语

本文结合笔者多年从事动物实验工作的经验,简要论述了药物安全性评价中实验动物临床检验指标综合分析的基础,包括建立分析背景数据、保证

数据的可靠可信和科学统计,综合分析的总体思路,并以血液学、血液生化和血凝为例说明分析的注意事项和具体分析思路,以期更加客观地分析实验结果,提高药物安全性评价的研究水平,

参考文献

- [1] 刘运忠,龚宝勇,罗甜仪,等. Beagle 犬的基础数据[J]. 实验动物与比较医学, 2009, 19(3): 60-63.
- [2] 庞伟,吕龙宝,王芸,等. 北平顶猴(*Macaca leonina*)血液学和血液生化指标参考值的测定与分析[J]. 动物学研究, 2013, 34(2): 89-96.
- [3] 潘东升,刘芳,苗玉发,等. Beagle犬和食蟹猴血清生化和血液学指标的测定[J]. 药物评价研究, 2011, 34(1): 19-21.
- [4] 桑传兰,王萧,董浩然,等. 光照和噪声对实验小鼠血液指标及肝肾功能的影响[J]. 动物医学进展, 2012, 33(5): 64-68.
- [5] 陈华,李春海,贺苏兰,等. 年龄因素对Wistar大鼠部分血液学血液生化指标及脏器系数的影响[J]. 实验动物科学与管理, 1996, 13(2): 9-13.
- [6] Vajdovich P, Gaál I T, Szilágyi A, et al. Changes in some red blood cell and clinical laboratory parameters in young and old Beagle dogs[J]. *Vet Res Commun*, 1997, 21(7): 463-470.
- [7] 陈秋生,梁泽华,林春燕,等. 水合氯醛、异丙酚、氯胺酮麻醉对小鼠血液学指标的影响[J]. 实验动物科学, 2013, 30(3): 16-18.
- [8] 吴剑平,杨斐,胡樱. 常规实验操作对Wistar大鼠的影响[J]. 中国实验动物学报, 2010, 18(4): 312-317.
- [9] 梁金强,黄芝瑛,赖俊青,等. Beagle犬一天内血液学和血液生化指标的波动[J]. 实验动物与比较医学, 2005, 25(4): 230-232.
- [10] 程树军,黄韧,梁金强,等. 实验动物血液检验中溶血因素的干扰和影响[J]. 中国实验动物学杂志, 2002, 12(1): 1-3.
- [11] 梁金强,卜泉,黄芝瑛. 比格狗血液的采集与分析前处理[J]. 中国药理学学会通讯, 2001, 18(3): 43-44.
- [12] 林慧君,吴茅,刘建栋,等. 不同时间和温度对血凝质控物与正常混合血浆凝血指标的影响[J]. 浙江医学, 2002, 24(2): 125-126.
- [13] 郑宏图. 血凝试验的影响因素分析[J]. 中国当代医药, 2014, 21(13): 137-139.
- [14] 刘芳,范玉明,顾坚忠. 毒理学安全性评价骨髓细胞学研究程序与图谱[M]. 成都: 电子科技大学出版社, 2011.
- [15] 宋茜. 2型糖尿病凝血指标分析及其预防血管并发症的临床意义[J]. 中外医学研究, 2013, 11(19): 74-75.