

บทที่ 6

สรุปผลการวิจัย

1. การผลิตอาหารสัตว์ทดลองเสริมซีรีซิน

ตัวอย่างสูตรอาหารหนูที่เตรียมได้จัดเป็นอาหารประเภทที่มีความชื้นต่ำ มีลักษณะเป็นรูปทรงสี่เหลี่ยมจัตุรัส สีน้ำตาล และมีลักษณะเนื้ออาหารแน่น และแข็งกว่าอาหารหนูทางคำที่ผลิตด้วยเครื่อง Extruder การผลิตตัวอย่างอาหารหนูสูตรเสริมซีรีซินโดยใช้ปริมาณน้ำในสูตรร้อยละ 50 และทำแห้งที่อุณหภูมิ 70°C เป็นสภาวะที่เหมาะสมซึ่งให้อัตราเร็วของการทำแห้งเร็วที่สุดโดยไม่มีผลกระทบต่อกระบวนการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางเคมีหลักและลักษณะทางกายภาพของตัวอย่างอาหารหนูมากนัก อย่างไรก็ตาม การทำแห้งที่อุณหภูมิ 60°C สามารถลดความแปรปรวนขององค์ประกอบทางเคมีระหว่างสูตรอาหารได้ทำให้ปริมาณองค์ประกอบทางเคมีของอาหารแต่ละสูตรไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยมีอัตราเร็วของการทำแห้งใกล้เคียงกับการทำแห้งที่อุณหภูมิ 70°C ดังนั้นในการผลิตตัวอย่างอาหารหนูเพื่อการศึกษาแบบ *in vivo* จึงเลือกใช้สภาวะการทำแห้งที่อุณหภูมิ 60°C สำหรับการปรับสูตรตัวอย่างอาหารหนูเสริมซีรีซินเพื่อใช้ในการศึกษาประสิทธิภาพการป้องกันโรคมะเร็งลำไส้และโรคหลอดเลือดนั้น ทำโดยใช้ปริมาณอาหารสูตรพื้นเท่ากัน เพื่อให้องค์ประกอบพื้นฐานมีค่าใกล้เคียงกันมากที่สุด ส่วนสภาวะการเก็บตัวอย่างอาหารหนูที่เหมาะสม โดยการควบคุมอุณหภูมิการเก็บตัวอย่างอาหารหนูหลังบรรจุ ที่ -20 °C และเก็บรักษาตัวอย่างอาหารหนูสูตรที่ใช้ระหว่างการศึกษที่อุณหภูมิ -20 หรือ 4 °C เพื่อชะลอการเปลี่ยนแปลงคุณภาพทั้งทางด้านจุลชีววิทยาและเคมีกายภาพ

2. การทดสอบฤทธิ์ของซีรีซินในการป้องกันมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก

ในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยได้เลือกใช้โปรตีนซีรีซินที่มีขนาด 76 – 132 kDa ที่ได้จากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี เนื่องจากมีรายงานการวิจัยพบว่า ซีรีซินที่มีขนาด 5 - 100 kDa มีผลในการกระตุ้นให้เซลล์เพิ่มจำนวนดีใน cell culture กว่าโปรตีนซีรีซินที่มีขนาด 50–200 kDa (Tatsuta, et al., 2005) จากผลการวิจัยพบว่า ซีรีซินมีผลต่อการลดจำนวนการเกิด ACF และช่วยชะลอกระบวนการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่

จากการศึกษาเป็นระยะเวลา 5 เดือน พบว่า หนูทดลองทั้ง 3 กลุ่มที่ได้รับ DMH มีการเกิด ACF จำนวนมาก และหนูที่กินอาหารที่มี casein เป็นองค์ประกอบ (G3) ACF มีการพัฒนาจนเกิดเป็นก้อนเนื้องอกในลำไส้ใหญ่ของหนูทดลองจำนวน 2 ตัว ซึ่งแสดงถึงการดำเนินไปของโรคมีความก้าวหน้า (progression) ของการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ที่มีความรุนแรงเพิ่มขึ้น ในขณะที่หนูที่กินอาหารที่มี sericin เป็นองค์ประกอบ (G4 และ G5) ไม่พบเหตุการณ์ดังกล่าวนี้ จากการที่หนูกลุ่มที่ได้รับซีรีซินไม่พบ ACF ที่ลำไส้ใหญ่ส่วนต้น และไม่พบลักษณะของการพัฒนาเป็นก้อนเนื้อ อาจเป็นผลเนื่องมาจากซีรีซินมีฤทธิ์ชะลอกระบวนการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ได้

จากนั้นทำการวิเคราะห์จำนวนของ ACF ที่เกิดขึ้นในลำไส้ใหญ่ของหนูแต่ละกลุ่ม พบว่าจำนวน ACF ของหนูกลุ่มที่ได้รับชิริชิน (G4 และ G5) มีปริมาณลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม แม้ว่าจะไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เนื่องมาจากมีความแปรปรวนในแต่ละกลุ่มสูง ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการเกิดมะเร็งมีความเฉพาะตัว ไม่อาจคาดการณ์ให้หนูแต่ละตัวเกิดมะเร็งในอัตราที่มีความรุนแรงที่เท่าๆกันได้ แม้จะใช้สาร DMH ในขนาดที่เท่ากัน จึงเป็นข้อจำกัดหนึ่งของการเหนี่ยวนำให้เป็นมะเร็งในหนูทดลอง

นอกจากจำนวน ACF แล้ว การประเมินความรุนแรงของกระบวนการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ อาจทำได้โดยการวิเคราะห์ขนาดของ ACF ที่เกิดขึ้น ซึ่งในการทดลองนี้ ขนาดของ ACF ถูกแบ่งออกเป็น 5 ประเภท ขึ้นกับจำนวนของ crypt ที่พบในแต่ละ ACF โดยแบ่งเป็น 1, 2, 3, 4 และ ≥ 5 crypt/ACF ซึ่งถ้าพบ ACF ที่มีขนาดใหญ่ในสัดส่วนที่มากกว่า ก็แสดงถึงความรุนแรงหรือการดำเนินไปของโรคมะเร็งมากกว่า จากการทดลองนี้ ชิริชินไม่มีผลเปลี่ยนแปลง ACF ขนาดเล็ก (1-4 crypt/ACF) แต่มีแนวโน้มที่จะลดจำนวนของ ACF ขนาดใหญ่ที่มี ≥ 5 crypt/ACF ซึ่งแสดงให้เห็นว่า ชิริชินอาจมีผลในการชะลอการดำเนินไปของการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ได้ และผู้วิจัยได้ทำการวิเคราะห์ ACF ขนาดใหญ่ (ที่มี ≥ 5 crypt/ACF) เพิ่มเติม โดยการวัดพื้นที่ของแต่ละ ACF ซึ่งผลการทดลอง พบว่า หนูกลุ่มที่ได้รับชิริชิน (กลุ่ม 4) มีพื้นที่ของ ACF ต่ำกว่ากลุ่มควบคุม (กลุ่ม 3) อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งจากการทดลองครั้งนี้อาจจะกล่าวได้ว่า การได้รับอาหารที่มีชิริชินน่าจะมีผลในการชะลอความก้าวหน้าหรือการดำเนินไปของเกิดเป็นมะเร็งลำไส้ใหญ่ในหนูทดลองได้

เนื่องจาก ACF ขนาดใหญ่ (ที่มี ≥ 5 crypt/ACF) นี้ยังมีความแตกต่างกัน เนื่องมาจากปริมาณ crypt ภายใน ACF ที่อาจมีอยู่ระหว่าง 5-10 crypt/ACF หรือมากกว่าซึ่งยากต่อการนับให้ได้ค่าที่ถูกต้อง ผู้วิจัยจึงได้ทำการวิเคราะห์ ACF กลุ่มนี้เพิ่มเติม โดยการวัดพื้นที่ของแต่ละ ACF ซึ่งผลการทดลอง พบว่า หนูกลุ่มที่ได้รับชิริชิน (กลุ่ม 4) มีพื้นที่ของ ACF ต่ำกว่ากลุ่มควบคุม (กลุ่ม 3) อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งจากการทดลองครั้งนี้อาจจะกล่าวได้ว่า การได้รับอาหารที่มีชิริชินน่าจะมีผลในการชะลอความก้าวหน้าหรือการดำเนินไปของเกิดเป็นมะเร็งลำไส้ใหญ่ในหนูทดลองได้ ซึ่งนักวิทยาศาสตร์ชาวญี่ปุ่นได้เคยรายงานถึงฤทธิ์ของชิริชินในการยับยั้งการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ทั้งในหนู rat และ mice (Zhaorigetu, et al., 2001) โดยการทดลองในหนู mice ใช้หนูเป็นจำนวนมาก กลุ่มละ 40 ตัว และอัตราการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่คิดเป็น 37.5 % ซึ่งชิริชินสามารถลดอัตราการเกิดลงเหลือ 12.5% และหนูกลุ่มนี้มีความรุนแรงที่ต่ำกว่าหนูกลุ่มที่ไม่ได้รับชิริชิน (Zhaorigetu, et al., 2001) ส่วนการทดลองในหนู rat ทำการฉีด DMH ครั้งเดียวและระยะเวลาทดลอง 28 วัน ซึ่งพบว่า ชิริชินสามารถลดจำนวนของ ACF ได้ 36% (Zhaorigetu, et al., 2001) แม้ว่าการเหนี่ยวนำให้เกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ด้วย DMH จะมีความแตกต่างกันทั้งระยะเวลาและขนาดของ DMH ที่ใช้ในการทดลอง รวมทั้งจำนวน/ชนิดของสัตว์ทดลองที่ใช้ จึงอาจทำให้ผลที่ได้มีความแตกต่างกันบ้าง ซึ่งในโครงการวิจัยนี้ ยังได้ทำการวิเคราะห์ในรายละเอียดเพิ่มเติม ทั้งขนาดและการกระจายตัวเพื่อประเมินความรุนแรงในการดำเนินไปของโรค แต่อย่างไรก็ตามผลการทดลองนี้ยังมีแนวโน้มไปในทางเดียวกันกับนักวิทยาศาสตร์ชาวญี่ปุ่น คือ ชิริชินสามารถลดความรุนแรงหรือการดำเนินไปของกระบวนการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ได้

ในกระบวนการของ tumorigenesis ระยะ hyperplasia เป็นระยะที่เซลล์มีการแบ่งตัวและเพิ่มจำนวนขึ้นมาก จากการดำเนินไปของโรคระยะ hyperplasia อาจมีการพัฒนาและเปลี่ยนแปลงไปเป็นระยะของ dysplasia ที่เซลล์จะมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง จำนวนเซลล์อาจลดลง crypt จะมีลักษณะที่ผิดปกติไป (Bouzourene, et al., 1999; Cheng and Lai, 2003) จากการวิเคราะห์ลักษณะของ crypt ในหนูกลุ่มที่ได้รับ DMH และกินอาหารที่มีชิริชินพบว่า ที่ผนังลำไส้ ไม่พบลักษณะของ dysplastic crypt แต่ยังพบลักษณะของ hyperplasia และความหนาแน่นของเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีน Ki67 ก็มากกว่ากลุ่มที่กินเคซีน (G3) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการเกิด tumorigenesis นี้ อยู่ในระยะของ hyperplasia หรือการเพิ่มจำนวนเซลล์เป็นส่วนใหญ่ จึงอาจเป็นไปได้ที่กระบวนการ tumorigenesis ของหนูกลุ่มนี้อยู่ในระยะต้นกว่ากลุ่มที่กินเคซีน หรืออาจกล่าวได้ว่ากระบวนการ tumorigenesis ในหนูที่กินชิริชินดำเนินไปได้ช้ากว่า นอกจากนี้ ในการวิเคราะห์ระดับของเอนไซม์ในเลือดที่บ่งบอกถึงการทำการของตับและไตของหนูทดลอง พบว่าหนูกลุ่มที่กินชิริชินแม้จะได้รับ DMH และมีการพบ ACF ซึ่งเป็นสัญญาณของการเริ่มต้น tumorigenesis แต่การทำงานของตับและไตมีค่าใกล้เคียงกว่าปกติมากกว่าหนูที่กินเคซีน

การศึกษาเกี่ยวกับระบบของภูมิคุ้มกันจะเห็นได้ว่า มีการทำงานของ T cell และ T cell ที่ได้รับการกระตุ้นเพิ่มมากขึ้น จากการที่ย้อมติด CD3 และ CD25 เพิ่มขึ้นและขนาดของ ACF ลดลงในหนูกลุ่มที่เป็นมะเร็งลำไส้ใหญ่ที่กินอาหารที่มีชิริชิน ซึ่งอาจจะกล่าวได้ว่า ชิริชินอาจจะมีผลในการกระตุ้นการทำงานของ T cell ในสถานะที่มีการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ขึ้น และอาจส่งผลในการชะลอความรุนแรงของโรคได้

โดยสรุป ผลการศึกษาและวิเคราะห์จากโครงการวิจัยนี้ พบว่า ชิริซินมีฤทธิ์ในการชะลอกระบวนการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ในหนูทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยสารก่อมะเร็งลำไส้ใหญ่ได้ โดยฤทธิ์นี้พบได้จากการกินชิริซินทั้งก่อนและหลังจากได้รับสารก่อมะเร็ง ซึ่งการรับประทานอาหารที่มีชิริชิน มีแนวโน้มที่จะช่วยชะลอกระบวนการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ได้ในช่วงระยะแรกของกระบวนการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ (initiation and promotion stage) ดังนั้น ชิริซินจึงเป็นโปรตีนที่น่าสนใจที่จะนำมาพัฒนาเป็นอาหารเสริมที่มีส่วนช่วยลดความเสี่ยงต่อโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ได้

3. การทดสอบฤทธิ์ลดการดูดซึมโคเลสเตอรอลในเซลล์ลำไส้เพาะเลี้ยงและในสัตว์ทดลอง

สำหรับการทดลองนี้ ได้ทำการทดสอบผลของชิริซิน 3 ชนิด ได้แก่ ชิริซิน A, B และ C ต่อการนำเข้าของโคเลสเตอรอล โดยชิริซิน A, B และ C มีความแตกต่างกันที่ขนาดของโมเลกุล ชิริซิน A (MW 191-339 kDa) ชิริซิน B (MW 76-132 kDa) ชิริซิน C (MW 61-113 kDa) ซึ่งจากผลการทดลองพบว่า ชิริซินทั้งสามชนิด มีผลในการลดการนำเข้าของโคเลสเตอรอลเข้าสู่เซลล์ Caco-2 เมื่อใช้ชิริซินที่ความเข้มข้นต่ำ ในที่นี้ คือ 25 และ 50 $\mu\text{g/ml}$ เมื่อทดสอบที่ความเข้มข้นสูงขึ้น 100, 500 และ 1000 $\mu\text{g/ml}$ ฤทธิ์ยับยั้งการนำโคเลสเตอรอลเข้าเซลล์จะ

ลดลง และที่ความเข้มข้นสูงสุด (1000 $\mu\text{g/ml}$) กลับพบว่าไม่ผลเพิ่มการนำเข้าของโคเลสเตอรอลได้ ซึ่งเป็นลักษณะของ inverse dose-dependent effect คือฤทธิ์ยับยั้งการดูดซึมลดลงเมื่อความเข้มข้นเพิ่มขึ้น

สำหรับ ผลการทดสอบฤทธิ์ของชิริซินในการลดโคเลสเตอรอลในหนูทดลอง ที่ได้รับอาหารที่มีโคเลสเตอรอลสูงเป็นเวลา 5 เดือน พบว่า ชิริซินไม่แสดงผลในการเปลี่ยนแปลงค่าของโคเลสเตอรอลในเลือด แต่อย่างไรก็ตาม จากการทดลองนี้ ระดับโคเลสเตอรอลในเลือดของหนูกลุ่มที่กินอาหารที่มีโคเลสเตอรอลสูง มีค่าเพิ่มขึ้นในอัตราที่ไม่สูงนัก และต่ำกว่าที่คาดไว้ จากระยะเวลาที่ใช้ในการทดลองนานถึง 5 เดือน ซึ่งคาดว่าอาจเป็นผลมาจากการดูดซึมโคเลสเตอรอลจากอาหารที่ให้ไม่ดีเท่าที่ควร เนื่องจากไม่มีกรดน้ำดี (bile acids) ในสูตรอาหาร ทำให้ระดับของโคเลสเตอรอลในเลือดของหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีโคเลสเตอรอลสูง เพิ่มขึ้นไม่มากนัก และการที่ไม่เห็นผลลดโคเลสเตอรอลของชิริซินอาจเนื่องมาจากความคงตัวของชิริซินที่ผสมอยู่ในอาหาร สัตว์ทดลองนั้น หรือการได้รับชิริซินที่อยู่ในรูปอาหารแห้งอาจส่งผลต่อการละลายหรือการออกฤทธิ์ในระบบทางเดินอาหารได้

จากการบันทึกน้ำหนักและปริมาณอาหารที่หนูทดลองที่ได้รับอาหารที่มีโคเลสเตอรอลสูงเป็นเวลา 5 เดือน พบว่ากลุ่มที่กินอาหารที่มีโคเลสเตอรอลสูงจะกินอาหารมากกว่ากลุ่มที่กินอาหารปกติ แต่ที่น่าสนใจคือ เมื่อเปรียบเทียบในกลุ่มที่กินอาหารประเภทเดียวกัน (อาหารปกติหรืออาหารที่มีโคเลสเตอรอลสูง) แต่ถ้ากินชิริซินร่วมด้วย จะมีอัตราการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัวที่ต่ำกว่า แม้ว่า จะกินอาหารในปริมาณที่เท่าๆกัน ดังนั้น ชิริซินอาจมีผลต่อการควบคุมกระบวนการของร่างกายที่เกี่ยวข้องกับน้ำหนัก

แต่เมื่อปรับวิธีการทดลอง โดยการทดสอบการดูดซึมโคเลสเตอรอลเมื่อให้โคเลสเตอรอลร่วมกับกรดน้ำดีและชิริซินโดยตรง ในรูปของ lipid emulsion ด้วยการป้อนหรือให้ทาง gastric tube วันละ 1 ครั้ง เป็นเวลา 14 วันติดต่อกัน และทำการวัดระดับโคเลสเตอรอลในเลือดเป็นระยะๆ ซึ่งผลการทดลองในเบื้องต้น พบว่าระดับโคเลสเตอรอลในเลือดของหนูที่ได้รับ โคเลสเตอรอลอย่างเดียว (ไม่มีชิริซิน) มีค่าเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องเป็นที่น่าสนใจในระยะเวลา 14 วัน จากผลการทดลองพบว่าชิริซินที่ขนาด 10, 100 และ 1000 mg/kg/day สามารถยับยั้งการเพิ่มขึ้นของระดับของ total cholesterol และ non-HDL cholesterol ที่เกิดจากการให้ high-cholesterol diet อย่างมีนัยสำคัญ

การศึกษาพบความสัมพันธ์ระหว่าง ระดับของโคเลสเตอรอลในเลือดที่สูงและการกินอาหารโปรตีนที่มี methionine และ methionine:glycine ratio สูง ดังนั้นจึงคาดว่า ฤทธิ์ลดโคเลสเตอรอลของโปรตีนหลายชนิด เช่น โปรตีนจาก ถั่วเหลือง มันฝรั่ง และข้าว เป็นผลมาจากการที่มีระดับ methionine ต่ำ (Morita, et al., 1997) ความเข้มข้นของ methionine และ glycine ในโปรตีนเหล่านี้มีค่าอยู่ระหว่าง 1-2 และ 3-4.5 % w/w ตามลำดับ (Morita, et al., 1997; Nagaoka, et al., 1999) ชิริซินเป็นโปรตีนชนิดหนึ่งที่มี methionine ต่ำ คือ ต่ำกว่า 0.05 mol % (Zhaorigetu, et al., 2001; Li, et al., 2008) ส่วนชิริซินที่ใช้ในการทดลองนี้มี methionine 0.04% และ glycine 13.5% w/w ทำให้สัดส่วนของ methionine:glycine ratio เป็น 0.003 ซึ่งถ้าเปรียบเทียบกับโปรตีนจากอาหารที่กล่าวมาข้างต้น จะพบว่าชิริซินมีปริมาณ methionine ที่ต่ำกว่าและ glycine ที่สูงกว่ามาก ทำให้สัดส่วนของ

กรดอะมิโนทั้งสองยิ่งต่ำลง แม้ว่าในปัจจุบันจะยังไม่ทราบแน่ชัดว่า low-methionine protein ส่งผลต่อการลดระดับโคเลสเตอรอลได้อย่างไร แต่จากหลายการศึกษาวิจัย ก็พบความเกี่ยวข้องดังกล่าว และอาจเป็นเหตุผลหนึ่งที่ทำให้ซิริชินมีฤทธิ์ลดโคเลสเตอรอลได้

ซิริชินเป็นโปรตีนที่กินได้ และพบว่าสามารถทนต่อเอนไซม์ในระบบทางเดินอาหารได้ดี คือ มี low digestibility (Sasaki, et al., 2000) ดังนั้น จึงเชื่อว่าซิริชินที่ไม่ถูกย่อยและยังคงอยู่ในระบบทางเดินอาหารมีบทบาทในการป้องกันการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ (Zhaorigetu, et al., 2007) จากข้อมูลดังกล่าว จึงเป็นไปได้ที่ซิริชินที่ไม่ถูกย่อยนี้อาจมีผลต่อการดูดซึมสารอาหารในระบบทางเดินอาหารได้ มีรายงานว่าซิริชินเพิ่มการดูดซึมของแร่ธาตุ เช่น เหล็ก สังกะสี แมกนีเซียม และแคลเซียม ในหนูทดลองได้ (Sasaki, et al., 2000) การรบกวนการดูดซึมโคเลสเตอรอลในทางเดินอาหารก็อาจเป็นกลไกหนึ่งของซิริชินในการลดระดับโคเลสเตอรอลในเลือดได้ อย่างไรก็ตาม การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการดูดซึมโคเลสเตอรอลในสัตว์ทดลองเป็นไปได้ยาก ผู้วิจัยจึงทำการทดสอบในเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2

จากการศึกษานี้ พบว่า การกินซิริชินร่วมกับอาหารที่มีโคเลสเตอรอลสูง จะช่วยยับยั้งการเพิ่มขึ้นของระดับ total cholesterol และ non-HDL cholesterol ได้ ซึ่งกลไกดังกล่าวอาจเกิดมาจากฤทธิ์ในการยับยั้งการดูดซึมโคเลสเตอรอลจากระบบทางเดินอาหาร เนื่องจากซิริชินเป็นโปรตีนที่กินได้ และพบว่าสามารถทนต่อเอนไซม์ในระบบทางเดินอาหารได้ดี คือ มี low digestibility (Sasaki, et al., 2000) ดังนั้นจึงเชื่อว่าซิริชินที่ไม่ถูกย่อยและยังคงอยู่ในระบบทางเดินอาหารมีบทบาทในการป้องกันการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ (Zhaorigetu, et al., 2007) โดยการรบกวนการดูดซึมโคเลสเตอรอลในทางเดินอาหาร

ส่วนการทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลัน (Acute Toxicity) และพิษเรื้อรัง (Chronic toxicity) ของซิริชินนั้น เนื่องจากซิริชินเป็นสารที่ได้จากธรรมชาติที่มีข้อมูลการนำไปศึกษาในสัตว์ทดลอง รวมทั้งมีการผลิตเพื่อใช้เป็นอาหารเสริมแล้ว ความเป็นพิษจึงน่าจะจัดอยู่ในกลุ่มสารที่เป็นพิษต่ำ แต่อย่างไรก็ตาม เพื่อให้ได้ข้อมูลความเป็นพิษเฉียบพลันของซิริชินที่สกัดขึ้นและใช้ในโครงการวิจัยนี้ ผู้วิจัยจึงทำการทดสอบพิษของซิริชินที่ขนาดสูง 5 g/kg ของน้ำหนักตัวหนู (คิดเป็น 48 g ขนาดรับประทานของคนที่มีน้ำหนัก 60 กิโลกรัม) ซึ่งโดยทั่วไปการทดสอบโดยใช้ปริมาณสารมากถึง 5 g/kg จะพิจารณาทดสอบเฉพาะกับสารที่อยู่ในกลุ่มที่มีความปลอดภัยสูง แต่ผลการทดสอบที่ขนาดสูงยังมีความจำเป็นต่อความปลอดภัยของมนุษย์ เนื่องจาก ซิริชินเป็นสารที่คาดว่ามีความปลอดภัยสูง และมีความเป็นไปได้ที่จะพัฒนาเป็นอาหารเสริมซึ่งขนาดรับประทานที่ปลอดภัยควรมีค่าอยู่ในช่วงกว้าง ผู้วิจัยจึงพิจารณาแล้วว่าการทดสอบพิษเฉียบพลันในขนาดสูงดังกล่าวจะมีความจำเป็นเพื่อแสดงความปลอดภัยในมนุษย์ เพื่อประโยชน์ต่อการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารต่อไป

ผู้วิจัยทำการทดสอบด้วยการให้ซิริชินขนาดสูง 5 g/kg ของน้ำหนักตัวหนู และสังเกตพฤติกรรมและบันทึกการตายของหนูทดลอง ในช่วง 24 ชม.แรก และทำการสังเกตพฤติกรรมต่ออีก 2 สัปดาห์ ผลปรากฏว่าหนูยังมีชีวิตอยู่และมีพฤติกรรมปกติ จึงสรุปได้ว่าซิริชินมีค่า LD50 (50% lethal dose) มากกว่า 5000 mg/kg จึงจัดว่าซิริชินเป็นสารที่มีความปลอดภัยสูงเมื่อให้ด้วยการรับประทาน

สำหรับการทดสอบพิษเรื้อรังของซิริซิน ในการให้อาหารที่มีซิริซินเป็นส่วนประกอบ (4% w/w) เป็นเวลานาน 5 เดือน ซึ่งปริมาณของซิริซินที่หนูแต่ละตัวได้รับต่อวันนั้นอยู่ระหว่าง 1000-1200 mg/day พบว่าหนูมีความปกติทั้งพฤติกรรมและค่าทางห้องปฏิบัติการ ไม่แตกต่างจากหนูกลุ่มควบคุม จากผลการทดสอบทั้งพิษเฉียบพลันและพิษเรื้อรังของซิริซิน แสดงให้เห็นว่าซิริซินเป็นสารที่มีความปลอดภัยเมื่อได้รับทั้งในระยะสั้นและระยะยาว เมื่อให้ด้วยการรับประทาน

4. การพัฒนาตำรับอาหารเสริมซิริซิน

การพัฒนาตำรับยาเม็ด sericin B โดยใช้เทคนิคการตอกลง ซึ่งเป็นเทคนิคที่ง่ายที่สุด ช่วยให้ประหยัดเวลา และต้นทุน อย่างไรก็ตามพบว่ายาเม็ด sericin B ที่เตรียมได้ไม่สามารถแตกตัวในน้ำได้ภายใน 30 นาที ซึ่งจะส่งผลต่อให้ sericin B ละลายออกมาได้น้อย มีผลให้การดูดซึมน้อยตามไปด้วย ทำให้ค่าชีวประสิทธิผล (bioavailability) ต่ำ การที่เม็ดยาแตกตัวได้ยากอาจเนื่องจาก sericin B มีคุณสมบัติเป็น hydropscopic (ดูดความชื้น) และเป็นสารเพิ่มความหนืด เมื่อทำการตอกลงโดยตรง จึงทำให้โมเลกุลของ sericin เกาะกันแน่น เปียกน้ำได้ยาก จึงทำให้เม็ดยาแตกตัวในน้ำค่อนข้างยาก จึงได้ทำการพัฒนาตำรับโดยใช้เทคนิค wet granulation เพื่อเพิ่มอัตราเร็วในการแตกตัวของยาเม็ด sericin โดยเทคนิคนี้จะต้องทำการเตรียม sericin B ให้อยู่ในรูปแกรนูล ก่อนที่จะนำมาตอกเป็นยาเม็ด เพื่อหวังผลให้ยาเม็ดแตกตัวได้ง่ายขึ้น

จากผลการทดลองสามารถเตรียมเป็นยาเม็ด sericin B ได้สำเร็จ โดยในการศึกษานี้พบว่า สารช่วยแตกกระจายตัว (disintegrant) ไม่มีผลต่อความสามารถในการแตกตัวของยาเม็ด ในขณะที่ ชนิดของ binder มีผลต่อความสามารถในการแตกตัวของยาเม็ด จากการทดลองในครั้งนี้พบว่าตำรับที่มีคุณสมบัติทางกายภาพที่เหมาะสม ประกอบด้วย diluents คือ avicel PH101 และ corn starch ที่อัตราส่วนของ 3:1 และ 1:1 และ binder คือ isopropanol และ น้ำ ที่อัตราส่วน 1:1 ยาเม็ดที่เตรียมได้มีสีเนื้อนวล ประกอบด้วย sericin 350 mg มีน้ำหนักประมาณ 700 mg, ความหนา ~ 0.44 mm, ความแข็ง ~ 6 kg ความกร่อนมีค่าน้อยกว่า 1% ซึ่งอยู่ในช่วงที่กำหนดตามเกสซ์ตำรับ ค่าการแตกกระจายตัวใช้เวลาประมาณ 9 นาที และ % drug content อยู่ในช่วง 85 – 115% และมีค่า RSD น้อยกว่า 6% ซึ่งอยู่ในช่วงที่กำหนดตามเกสซ์ตำรับ แต่จาก dissolution test ที่บ่งชี้ว่า sericin B ละลายออกมาจากยาเม็ดเพียงประมาณร้อยละ 50 แม้ว่ายาเม็ดจะสามารถแตกกระจายตัวได้ภายในเวลา 10 นาที อาจเป็นผลมาจากการที่ sericin B เป็น polymer ที่เป็นสารช่วยเพิ่มความหนืด เมื่อเจอน้ำอาจเกิดการเกาะกลุ่ม ทำให้น้ำแทรกตัวเข้าไปละลายผงยาได้ยาก แนวทางแก้ไข อาจทำได้โดยลดปริมาณ sericin B และเพิ่มปริมาณ diluents ในตำรับเพื่อเพิ่มพื้นที่ผิวของผงยา หรืออาจเติม wetting agent เพื่อให้ผงยาเปียกได้ง่าย