



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัย

กลไกระดับเซลล์ของสภาวะกรดด้านโพรงลำไส้ลดการออกฤทธิ์ของโอเมปราโซลในการยับยั้งการดูดซึมแมกนีเซียมผ่านแผ่นเซลล์เยื่อลำไส้เพาะเลี้ยงคาโค-๒

Cellular mechanism of apical acidity decreases inhibitory effect of omeprazole on Mg^{2+} absorption across intestinal-like Caco-2 monolayers)

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน
รองศาสตราจารย์ ดร. ณรงค์ฤทธิ์ ทองอุ่น

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้
จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๕๙ มหาวิทยาลัยบูรพา

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัย

กลไกระดับเซลล์ของสภาวะกรดด้านโพรงลำไส้ลดการออกฤทธิ์ของโอเมปราโซล
ในการยับยั้งการดูดซึมแมกนีเซียมผ่านแผ่นเซลล์เยื่อบุลำไส้เพาะเลี้ยงคาโค-๒

Cellular mechanism of apical acidity decreases inhibitory effect
of omeprazole on Mg^{2+} absorption across intestinal-like Caco-2
monolayers)

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน
รองศาสตราจารย์ ดร. ณรงค์ฤทธิ์ ทองอ่อน
คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงิน
อุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๕๙
มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ
เลขที่สัญญา ๓๓/๒๕๕๙

Acknowledgment

This work was financially supported by the Research Grant of
Burapha University through National Research Council of
Thailand (Grant no. 33/2559)

บทคัดย่อ

การดูดซึมแมกนีเซียม (magnesium; Mg^{2+}) แบบไม่ใช้พลังงานในลำไส้ เป็นปัจจัยที่สำคัญยิ่งต่อการรักษาสมดุล Mg^{2+} ในร่างกาย มีรายงานก่อนหน้านี้แสดงให้เห็นว่าภาวะกรดด้านโพรงลำไส้ และยา omeprazole มีฤทธิ์เปลี่ยนแปลงการดูดซึม Mg^{2+} แบบไม่ใช้พลังงานในลำไส้ การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์หลักเพื่อศึกษาบทบาทของภาวะกรดด้านโพรงลำไส้ และ omeprazole ต่อการขนส่ง Mg^{2+} แบบไม่ใช้พลังงาน จากการทดลองพบว่า omeprazole มีฤทธิ์เพิ่มการแสดงออกของ ตัวรับรู้ภาวะกรด (acid sensor) คือ P2Y purinoceptors ชนิด P2Y2 P2Y4 และ P2Y6 ในเซลล์ลำไส้เพาะเลี้ยง Caco-2 อีกทั้งยังยับยั้งการขนส่ง Mg^{2+} แบบไม่ใช้พลังงานผ่านแผ่นเซลล์ลำไส้เพาะเลี้ยง Caco-2 การกระตุ้นการทำงานของ P2Y2 ก็ยังยับยั้งการขนส่ง Mg^{2+} แบบไม่ใช้พลังงานผ่านแผ่นเซลล์ลำไส้เพาะเลี้ยง Caco-2 เช่นกัน ภาวะกรดด้านโพรงลำไส้สามารถยับยั้งอิทธิพลของ omeprazole ต่อการแสดงออกของ P2Y purinoceptors ชนิด P2Y2 P2Y4 และ P2Y6 และการขนส่ง Mg^{2+} แบบไม่ใช้พลังงานผ่านแผ่นเซลล์ลำไส้เพาะเลี้ยง Caco-2 สารยับยั้ง P2Y2 และ intracellular Ca^{2+} มีฤทธิ์เพิ่มการขนส่ง Mg^{2+} แบบไม่ใช้พลังงานผ่านแผ่นเซลล์ลำไส้เพาะเลี้ยง Caco-2 ที่ถูกบ่มด้วย omeprazole นอกจากนี้ omeprazole ยังเพิ่มความต้านทานไฟฟ้าและลดความสามารถในการขนส่งไอออนประจุบวกผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์ของ แผ่นเซลล์ลำไส้เพาะเลี้ยง Caco-2 เมื่อศึกษาการขับ HCO_3^- พบว่า omeprazole และ สารกระตุ้น P2Y2 มีฤทธิ์เพิ่มการขับ HCO_3^- ผ่านแผ่นเซลล์ลำไส้เพาะเลี้ยง Caco-2 แต่สารยับยั้ง P2Y2 และ intracellular Ca^{2+} สามารถยับยั้งฤทธิ์ของ สารกระตุ้น P2Y2 และ omeprazole ต่อการขับ HCO_3^- ได้ บ่งชี้ได้ว่าการกระตุ้น P2Y2-intracellular Ca^{2+} signaling กระตุ้นการขับ HCO_3^- และมีผลยับยั้งการขนส่ง Mg^{2+} แบบไม่ใช้พลังงานผ่านแผ่นเซลล์ลำไส้เพาะเลี้ยง Caco-2 ภาวะกรดด้านโพรงลำไส้สามารถยับยั้งอิทธิพลของ omeprazole ต่อการขนส่ง Mg^{2+} แบบไม่ใช้พลังงาน โดยเพิ่มคุณสมบัติการคัดเลือกและยอมให้อิออนประจุบวกผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์ Caco-2 ผลการศึกษาจากโครงการวิจัยนี้แนะนำเสนอบทบาทของ acid sensor P2Y2 receptor ในการควบคุมการขนส่ง Mg^{2+} แบบไม่ใช้พลังงาน

คำสำคัญ: ตัวรับรู้ภาวะกรด การขับไบคาร์บอเนตในลำไส้ การขนส่งแมกนีเซียมแบบผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์ โปรตอนปั๊มอินฮิบิเตอร์

Abstract

Intestinal passive Mg^{2+} absorption is the vital factor for normal Mg^{2+} homeostasis. Apical proton and omeprazole have previously been shown to regulate paracellular Mg^{2+} absorption. We aimed to study the role of apical acidity and omeprazole on paracellular passive Mg^{2+} transport. Omeprazole, which suppressed apical proton accumulation, enhanced the expression of acid sensor P2Y purinoceptors i.e., P2Y2, P2Y4, P2Y6, in Caco-2 cells. It also inhibited passive Mg^{2+} transport across Caco-2 monolayers. Activation of P2Y2 receptor suppressed passive Mg^{2+} transport across Caco-2 monolayers. Apical acidity abolished omeprazole effects on passive Mg^{2+} transport and acid sensor P2Y purinoceptor expressions. P2Y2 receptor inhibitor sarumin and intracellular Ca^{2+} chelator BAPTA-AM significantly increased passive Mg^{2+} transport across omeprazole treated-Caco-2 monolayers. Omeprazole increased transepithelium electrical resistance but decreased paracellular cation selectivity. Omeprazole and P2Y2 receptor activator markedly increased HCO_3^- secretion in Caco-2 monolayers. P2Y2 receptor inhibitor sarumin and intracellular Ca^{2+} chelator BAPTA-AM significantly abolished stimulatory effect of omeprazole on apical HCO_3^- secretion. Indicating that activation of P2Y2 receptor-intracellular signaling pathway triggered apical HCO_3^- secretion which then suppressed paracellular Mg^{2+} absorption. By increased paracellular cation selectivity, apical acidity markedly increased paracellular Mg^{2+} absorption in control and omeprazole-treated Caco-2 monolayers. Our results proposed the regulatory role of P2Y2 receptor on intestinal passive Mg^{2+} absorption.

Keyword: acid sensor, intestinal HCO_3^- secretion, paracellular Mg^{2+} absorption, proton pump inhibitor

สารบัญเรื่อง (Table of Contents)

	หน้า
ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	1
ขอบเขตของโครงการวิจัย	3
ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย	3
การทบทวนวรรณกรรม	4
วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	9
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	10
วิธีการดำเนินการวิจัย และสถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล	11
ผลการวิจัย (Results)	15
อภิปราย/วิจารณ์ (Discussion) ผลการทดลอง/ผลการวิจัย ที่ได้ทั้งหมด	21
สรุปและเสนอแนะเกี่ยวกับการวิจัยในขั้นต่อไป	23
ผลผลิต (Output)	23
รายงานการเงิน	24
บรรณานุกรม (Bibliography)	25
ประวัตินักวิจัยและคณะ พร้อมหน่วยงานสังกัด	30
ภาคผนวก (Appendix)	32

สารบัญภาพ (List of illustrations)

	หน้า
รูปที่ 1. แสดงสมมุติฐาน และกรอบแนวคิดของโครงการวิจัย	3
รูปที่ 2. กลไกการดูดซึม Mg^{2+} ในเซลล์เยื่อบุลำไส้	5
รูปที่ 3. ภาพแสดงแผ่นเซลล์เยื่อบุลำไส้เพาะเลี้ยง Caco-2 บน Transwell® inserts	11
รูปที่ 4. ภาพแสดงการบ่มแผ่นเซลล์เยื่อบุลำไส้เพาะเลี้ยง Caco-2 ด้วยสารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่มีค่า pH ต่างๆ เพื่อจำลองภาวะ apical acidity	12
รูปที่ 5. ภาพแสดงระบบของ modified Ussing chamber	14
รูปที่ 6. อิทธิพลของ omeprazole ต่อการแสดงออกของโปรตีน P2Y2, P2Y4, และ P2Y6 ในแผ่นเซลล์เยื่อบุลำไส้เพาะเลี้ยง Caco-2	16
รูปที่ 7. อิทธิพลของสภาวะ apical acidity ต่อการแสดงออกของโปรตีน P2Y2, P2Y4, และ P2Y6 ในแผ่นเซลล์เยื่อบุลำไส้เพาะเลี้ยง Caco-2 ปกติ และที่ได้รับ omeprazole	16
รูปที่ 8. บทบาทของ P2Y2, P2Y4, และ P2Y6 ต่อการการดูดซึม Mg^{2+} ผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์ของแผ่นเซลล์เยื่อบุลำไส้เพาะเลี้ยง Caco-2 ปกติ และที่ได้รับ omeprazole	17
รูปที่ 9. กลไกการส่งสัญญาณภายในเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับบทบาทของ P2Y2, P2Y4, และ P2Y6 ต่อการการดูดซึม Mg^{2+} ผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์ของแผ่นเซลล์เยื่อบุลำไส้เพาะเลี้ยง Caco-2 ปกติ และที่ได้รับ omeprazole.	18
รูปที่ 10. การทำงานของ P2Y2, P2Y4, และ P2Y6 และกลไกการส่งสัญญาณภายในเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการขับ HCO_3^- ผ่านแผ่นเซลล์เยื่อบุลำไส้เพาะเลี้ยง Caco-2 ปกติ และที่ได้รับ omeprazole.	19
รูปที่ 11. คุณสมบัติทางไฟฟ้าของแผ่นเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2	20
รูปที่ 12. คุณสมบัติทางชีวฟิสิกส์ของแผ่นเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2	21
รูปที่ 13. แสดงผลวิจัยที่สอดคล้องกับสมมุติฐานงานวิจัย	22

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย (List of Abbreviations)

ASIC1a	acid-sensing ion channel 1a
OGR1	ovarian cancer G protein-coupled receptor 1
PLC	Phospholilase C
PKC	protein kinase C
CFTR	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
TRPM	transient receptor potential melastatin
Cldn	claudin
P_{Na}/P_{Cl}	relative permeability ratio of Na^+ to Cl^-
P_{Na}	sodium permeability
P_{Cl}	chloride permeability
UTP	Uridine-5'-triphosphate
UDP	Uridine diphosphate
SR	sarumin
RB2	reactive blue 2
MRS	MRS2578
TFP	trifluoperazine

บทนำ (Introduction)

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

โอเมปราชอล (omeprazole) เป็นยาที่มีฤทธิ์ยับยั้งการหลั่งกรดในกระเพาะอาหาร นิยมใช้รักษาโรคและภาวะผิดปกติของระบบทางเดินอาหาร อาทิเช่น โรคกรดไหลย้อน (gastro-esophageal reflux disease) กระเพาะอาหารอักเสบ (gastritis) และลำไส้เล็กส่วนต้นอักเสบ (duodenitis) เป็นต้น เนื่องจากมีผลข้างเคียงน้อยและหาซื้อได้ง่ายจึงทำให้มีการใช้ omeprazole อย่างแพร่หลายจนเป็นยาในกลุ่มที่ขายดีที่สุดทั่วโลก [5, 40] อย่างไรก็ตามนับตั้งแต่ปี ค.ศ. 2006 จนปัจจุบันมีรายงานหลายฉบับบ่งชี้ว่าผู้ป่วยที่ใช้ omeprazole ติดต่อกันส่งผลให้ระดับแมกนีเซียม (Mg^{2+}) ในกระแสเลือดต่ำกว่าระดับปกติอย่างรุนแรง (severe hypomagnesaemia) ร่วมกับภาวะผิดปกติอื่นๆ อาทิเช่น สับสน (confusion) เชื่องซึม (lethargy) สั่นอย่างรุนแรง (convulsion) ฝ่ามือฝ่าเท้าเกร็ง (carpopedal spasm) ลมชัก (seizure) และหมดสติ (lost of consciousness) [4, 8, 13, 25, 30, 34, 48, 59] ผลการทดสอบพิเศษบ่งชี้ว่าผู้ป่วยข้างต้นมีภาวะพร่อง Mg^{2+} ในร่างกายอย่างรุนแรง [8] ผลการทดสอบการทำงานของไตบ่งชี้ว่าไตทำงานได้ปกติ โดยผู้ป่วยไม่ได้มีภาวะสูญเสีย Mg^{2+} ทางปัสสาวะ แต่เป็นที่น่าสนใจว่าการรักษาโดยให้ Mg^{2+} เสริมทางการรับประทานไม่สามารถเพิ่มระดับ Mg^{2+} ในกระแสเลือดได้ แต่การให้ Mg^{2+} ทางหลอดเลือดสามารถรักษาระดับ Mg^{2+} ในกระแสเลือดให้กลับเป็นปกติได้อย่างรวดเร็ว บ่งชี้ว่าผู้ป่วยข้างต้นน่าจะมีการดูดซึม Mg^{2+} ในลำไส้บกพร่อง [4, 8, 13, 25, 30, 34, 48, 59] การศึกษาที่ผ่านมาของผู้วิจัยพบว่า omeprazole มีฤทธิ์ยับยั้งการดูดซึม Mg^{2+} แบบผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์เยื่อบุลำไส้ [51–53] ซึ่งเป็นกลไกหลักในการดูดซึม Mg^{2+} เข้าสู่ร่างกายมนุษย์ [43] อย่างไรก็ตามกลไกการออกฤทธิ์ระดับเซลล์ของ omeprazole ยับยั้งการดูดซึม Mg^{2+} ผ่านเซลล์เยื่อบุลำไส้ นั้นยังไม่ทราบแน่ชัด และถึงแม้ว่าร่างกายมนุษย์จะได้รับ Mg^{2+} จากดูดซึมผ่านเซลล์เยื่อบุลำไส้ นั้นเท่านั้น แต่กลไกควบคุมการดูดซึม Mg^{2+} ผ่านเซลล์เยื่อบุลำไส้ นั้นก็ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดในปัจจุบัน [35, 43]

กระเพาะอาหารเป็นอวัยวะที่สามารถหลั่งกรดได้ปริมาณมากส่งผลให้ภายในกระเพาะอาหารมีความเป็นกรดสูง (pH ~2 – 4) หลังรับประทานอาหาร เมื่ออาหารจากกระเพาะอาหารผ่านเข้าสู่ลำไส้เล็กจึงทำให้กรดถูกเติมลงสู่โพรงลำไส้เล็กเช่นกัน เป็นผลให้ในโพรงลำไส้เล็กของมนุษย์ตั้งแต่ลำไส้เล็กส่วนต้น (duodenum) จนถึงลำไส้เล็กส่วนปลาย (distal ileum) มีภาวะเป็นกรด โดยมีค่า pH 5.5 – 7.0 [39] เรียกภาวะกรดด้านในโพรงลำไส้ว่า apical acidity จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าภาวะ apical acidity มีฤทธิ์กระตุ้นการดูด Mg^{2+} ในลำไส้เล็กและแผ่นเซลล์เยื่อบุลำไส้ [20, 46] และ omeprazole มีฤทธิ์ยับยั้งสภาวะ apical acidity จึงลดการดูดซึม Mg^{2+} ของเซลล์เยื่อบุลำไส้ [52] แต่เมื่อบ่มด้านโพรงลำไส้ของแผ่นเซลล์เยื่อบุลำไส้ด้วยสารเลี้ยงเซลล์ที่มีค่า pH 5.5, 6.0, 6.5, และ 7.0 เพื่อจำลองภาวะ apical acidity พบว่าภาวะ apical acidity ทุกค่า pH มีฤทธิ์เพิ่มการดูดซึม Mg^{2+} ผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์เยื่อบุลำไส้ ทั้งในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับ omeprazole [52, 53] อย่างไรก็ตามกลไกการออกฤทธิ์ของภาวะ apical acidity ควบคุมการดูดซึม Mg^{2+} และยับยั้งการออกฤทธิ์ของ omeprazole ในการรบกวนการดูดซึม Mg^{2+} ในเซลล์เยื่อบุลำไส้ นั้นยังไม่ทราบแน่ชัด

เมื่อเกิดภาวะ apical acidity เซลล์เยื่อบุลำไส้สามารถรับรู้ และควบคุมการตอบสนองของเซลล์โดยอาศัยการทำงานของกลุ่มโปรตีนที่ตอบสนองต่อปริมาณกรดในโพรงลำไส้ (acid sensor) ได้แก่ acid-sensing ion channel 1a (ASIC1a), ovarian cancer G protein-coupled receptor 1 (OGR1), และ P2Y purinoceptors [2, 9, 10, 22, 23, 37, 61] การศึกษาก่อนหน้าของผู้วิจัยพบว่า omeprazole มีฤทธิ์รบกวนการแสดงออกและการทำงานของ ASIC1a และ OGR1 ส่งผลรบกวนการทำงานของเซลล์เยื่อบุลำไส้ในการดูดซึม Mg^{2+} แบบผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์ [53] ในขณะที่ P2Y purinoceptors โดยเฉพาะชนิด P2Y₂, P2Y₄, และ P2Y₆ เป็น acid sensor ที่มีการแสดงออกที่จำเพาะบนบริเวณผนังด้านโพรงลำไส้ ของเซลล์ลำไส้มนุษย์และแผ่นเซลล์เยื่อบุลำไส้เพาะเลี้ยง Caco-2 [60] ทั้งนี้ P2Y purinoceptors มีส่วนสำคัญในกระบวนการควบคุมการขนส่งไอออนประจุบวก อาทิเช่น Na^+ , K^+ , และ Ca^{2+} ผ่านแผ่นเซลล์เยื่อบุต่างๆ [31] โดย P2Y purinoceptors จะกระตุ้นการส่งสัญญาณภายในเซลล์ผ่านทาง G_q protein, Phospholipase C (PLC), intracellular Ca^{2+} signaling, และ protein kinase C (PKC) เพื่อควบคุมการทำงานระดับเซลล์ [10, 31] อย่างไรก็ตามการทำงานของ P2Y purinoceptors ที่เกี่ยวข้องกับการดูดซึม Mg^{2+} และอิทธิพลของ omeprazole ต่อการทำงานของ P2Y purinoceptors และการส่งสัญญาณคำสั่งภายในเซลล์เยื่อบุลำไส้ นั้นยังไม่มีการศึกษาวิจัย

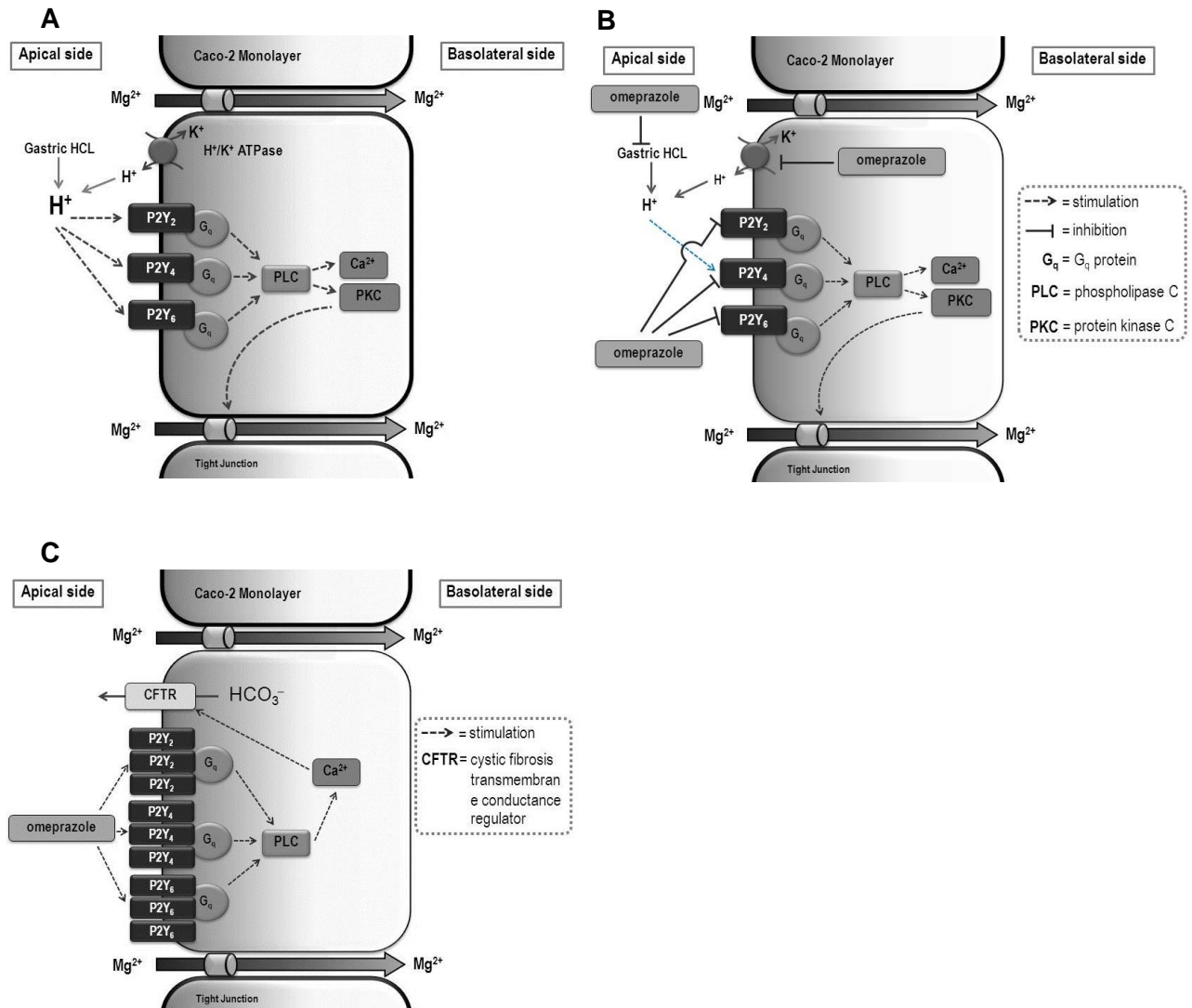
Mertz-Nielsen และคณะ [36] รายงานผลการศึกษาในลำไส้เล็กของมนุษย์พบว่า omeprazole มีฤทธิ์เพิ่มการขับไบคาร์บอเนต (HCO_3^-) ของเซลล์เยื่อบุลำไส้เข้าสู่โพรงลำไส้ เนื่องจาก HCO_3^- เป็นไอออนประจุลบ การขับ HCO_3^- เข้าสู่โพรงลำไส้มากขึ้นจะลดศักย์ไฟฟ้าที่เป็นบวกด้านโพรงลำไส้ และรบกวนการดูดซึม Mg^{2+} ผ่านช่องระหว่างเซลล์ได้ เนื่องจากการดูดซึมรูปแบบนี้อาศัยความลาดเอียงทางความเข้มข้นของ Mg^{2+} และศักย์ไฟฟ้าที่เป็นบวกด้านโพรงลำไส้ เหนี่ยวนำให้ Mg^{2+} แพร่จากโพรงลำไส้ผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์เยื่อบุลำไส้ก่อนเข้าสู่กระแสเลือด [43] การศึกษาล่าสุดของผู้วิจัยพบว่า omeprazole เพิ่มการแสดงออกและการทำงานของ ASIC1a มีผลเพิ่มการขับ HCO_3^- ผ่านทาง intracellular Ca^{2+} -cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) dependent mechanism และลดการขนส่ง Mg^{2+} ผ่านช่องระหว่างเซลล์ลำไส้ [53] Dong และคณะ [10] รายงานผลการศึกษาในลำไส้เล็กของสัตว์ทดลองว่า P2Y purinoceptor ทำงานโดยกระตุ้นการขับ HCO_3^- ผ่านทาง intracellular Ca^{2+} -CFTR dependent mechanism เช่นกัน อย่างไรก็ตามอิทธิพลของ omeprazole ต่อการทำงานของ P2Y purinoceptor ที่เกี่ยวข้องต่อการขับ HCO_3^- ในเซลล์เยื่อบุลำไส้ยังไม่มีการศึกษาวิจัย

ผลการศึกษาจากโครงการวิจัยนี้จะยืนยันผลข้างเคียงของการใช้ omeprazole ส่งผลให้เกิดภาวะ hypomagnesaemia โดยยับยั้งการดูดซึม Mg^{2+} ในลำไส้ นอกจากนั้นการศึกษารั้งนี้ยังจะแสดงถึงกลไกในการยับยั้งการออกฤทธิ์ของ omeprazole โดย apical acidity ซึ่งจะเป็นข้อมูลสำคัญต่อการพัฒนาวิธีการป้องกัน และรักษาผลข้างเคียงของยา omeprazole ในผู้ป่วยที่จำเป็นต้องได้รับการรักษาด้วยยาชนิดนี้ติดต่อกันเป็นเวลานาน รวมถึงผู้ป่วยที่มีภาวะพร่อง Mg^{2+} จากสาเหตุอื่นด้วย

ขอบเขตของโครงการวิจัย

การศึกษาทั้งหมดในโครงการวิจัยนี้ครอบคลุมการศึกษาสรีรวิทยาการรักษาสสมดุล Mg^{2+} ในร่างกาย และกลไกควบคุมการดูดซึม Mg^{2+} ในลำไส้

ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย



รูปที่ 1. แสดงสมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

ในภาวะปกติ (รูปที่ 1A) กรดจากกระเพาะอาหาร และจากการขับออกนอกเซลล์ผ่าน H^+/K^+ -ATPase ซึ่งมีการแสดงออกบริเวณผนังด้านโพรงลำไส้ของเซลล์ลำไส้และแผ่นเซลล์เยื่อลำไส้เพาะเลี้ยง Caco-2 [1] ทำให้เกิดภาวะ apical acidity และกระตุ้น P2Y purinoceptors ชนิด $P2Y_2, P2Y_4,$ และ $P2Y_6$ ซึ่งมีการแสดงออกบริเวณผนังด้านโพรงลำไส้ (apical side) ของเซลล์ลำไส้และแผ่นเซลล์เยื่อลำไส้เพาะเลี้ยง Caco-2 [60] การกระตุ้นการ

ทำงานของ P2Y purinoceptors ก่อนจะกระตุ้นกลไกการส่งสัญญาณภายในเซลล์ผ่านทาง G_q protein-PLC dependent pathway ซึ่งจะกระตุ้นการส่งสัญญาณคำสั่งต่อไปยัง Ca^{2+} -PCK dependent pathway [10, 30] ในการกระตุ้นการกระตุ้นการดูดซึม Mg^{2+} แบบผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์

แต่ในภาวะที่ได้รับ omeprazole (รูปที่ 1B) omeprazole จะรบกวนการทำงานของ H^+/K^+ -ATPase และยับยั้งสภาวะ apical acidity [52] จึงทำให้ลดการกระตุ้นการทำงานของ P2Y purinoceptors และกลไกต่างๆ ภายในเซลล์ นอกจากนี้ omeprazole อาจรบกวนการทำงานของ P2Y purinoceptors โดยตรง จนมีผลให้ลดการดูดซึม Mg^{2+} แบบผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์ของแผ่นเซลล์เยื่อลำไส้ หรือในอีกแง่มุม (รูปที่ 1C) omeprazole อาจส่งเสริมการแสดงออกและการทำงานของ P2Y purinoceptors ที่เกี่ยวข้องต่อการขับ HCO_3^- ในเซลล์เยื่อลำไส้ผ่านทาง intracellular Ca^{2+} -CFTR dependent mechanism เป็นเหตุให้มีการลดศักย์ไฟฟ้าที่เป็นบวกด้านโพรงลำไส้ และรบกวนการดูดซึม Mg^{2+} ผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์เยื่อลำไส้

การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง

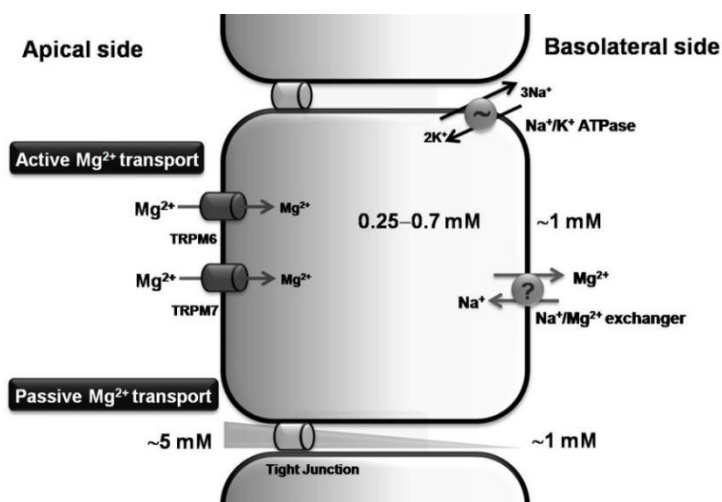
1 สมดุลของ Mg^{2+} ในร่างกายมนุษย์

ร่างกายของมนุษย์มี Mg^{2+} อยู่ประมาณ 24 g [57] ส่วนใหญ่จะสะสมในกระดูก (~53%) และอยู่ในเซลล์เนื้อเยื่อต่างๆ ทั่วร่างกาย (~46%) ส่วนที่เหลือประมาณ 1% อยู่ในกระแสเลือดและของเหลวนอกเซลล์ [35, 45, 57] หากพิจารณาเฉพาะภายในเซลล์ Mg^{2+} จะรวมอยู่กับ adenosine triphosphate (ATP) ประมาณ 80–90% อีกประมาณ 6.5–9% จะรวมอยู่กับโปรตีนภายในเซลล์ และส่วนที่เหลือประมาณ 1–3.5% หรือ 0.25–0.7 mM อยู่ในรูปอิสระ [18] ทั้งนี้ Mg^{2+} มีความสำคัญต่อการทำงานของเซลล์ทั่วร่างกาย เนื่องจาก Mg^{2+} เป็นออสโมติกควบคุมการทำงานของ ion channel การคงรูปของโปรตีนภายในเซลล์ กระบวนการเผาผลาญพลังงานภายในเซลล์ และยังเป็นโคเอนไซม์ของเอนไซม์สำคัญภายในเซลล์มากกว่า 300 ชนิด [35, 45] หากเกิดภาวะพร่อง Mg^{2+} ย่อมส่งผลกระทบต่อการทำงานระดับเซลล์ และก่อให้เกิดปัญหาทางสุขภาพมากมาย อาทิเช่น โรคกระดูกพรุน [46] Alzheimer's disease [11] และความดันโลหิตสูง [54] เป็นต้น ดังนั้นปริมาณ Mg^{2+} ในกระแสเลือดจึงจำเป็นต้องถูกควบคุมให้อยู่ในระดับที่เหมาะสมคือประมาณ 0.7–1.1 mM โดยอาศัยการทำงานของลำไส้ในการดูดซึม Mg^{2+} เข้าสู่ร่างกาย และไตในการขับ Mg^{2+} ส่วนเกินออกจากร่างกาย [28] แต่เนื่องจากร่างกายมนุษย์จะได้รับ Mg^{2+} จากอาหารที่รับประทานเท่านั้น ดังนั้นการดูดซึม Mg^{2+} ในลำไส้ จึงถือเป็นกลไกที่สำคัญยิ่งต่อการรักษาสมดุล Mg^{2+} ในร่างกายมนุษย์

ในแต่ละวันเราได้รับประทาน Mg^{2+} ประมาณ 300–360 mg ในจำนวนนี้ ~30 % จะถูกดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือด [45] อย่างไรก็ตามในกรณีที่รับประทาน Mg^{2+} ในปริมาณน้อย ลำไส้สามารถเพิ่มการดูดซึมเป็นประมาณ ~60 % ของปริมาณทั้งหมดที่รับประทาน [14, 43] ซึ่งหากพิจารณาแต่ละส่วนของลำไส้ ในภาวะปกติลำไส้เล็กส่วน duodenum ดูดซึม Mg^{2+} ประมาณ 15 mg ลำไส้เล็กส่วน jejunum ดูดซึมประมาณ 30 mg ลำไส้เล็กส่วน ileum

ดูดซึมประมาณ 75 mg หรือคิดเป็น 56% ของปริมาณ Mg^{2+} ทั้งหมดที่ดูดซึมโดยลำไส้ [35] ดังนั้นหากสูญเสียการดูดซึม Mg^{2+} โดยลำไส้เล็กน้อยส่งผลให้ปริมาณ Mg^{2+} ในร่างกายลดลง [55] ส่วนลำไส้ใหญ่นั้นจะดูดซึมประมาณ 15 mg [35] เซลล์เยื่อบุลำไส้ดูดซึม Mg^{2+} ผ่านทาง 2 กลไกคือ แบบผ่านเซลล์ และแบบผ่านช่องระหว่างเซลล์ (รูปที่ 2)

การดูดซึม Mg^{2+} แบบผ่านเซลล์นั้นเป็นกระบวนการที่ใช้พลังงาน (active Mg^{2+} transport) โดย Mg^{2+} จากโพรงลำไส้จะเข้าสู่เซลล์ผ่านทาง transient receptor potential melastatin (TRPM) 6 และ TRPM7 จากนั้น Mg^{2+} จะถูกนำออกนอกเซลล์เพื่อเข้าสู่กระแสเลือดโดย Na^+/Mg^{2+} exchanger การดูดซึม Mg^{2+} ด้วยกลไกนี้มีความสำคัญในภาวะที่รับประทาน Mg^{2+} ในปริมาณน้อย [43, 44, 47]



รูปที่ 2. กลไกการดูดซึม Mg^{2+} ในเซลล์เยื่อบุลำไส้ [50]

การดูดซึม Mg^{2+} แบบผ่านช่องระหว่างเซลล์นั้นเป็นกระบวนการที่ไม่ใช้พลังงาน (passive Mg^{2+} transport) อาศัยความลาดเอียงทางความเข้มข้นของ Mg^{2+} ซึ่งปริมาณ Mg^{2+} อิสระในโพรงลำไส้มีจะค่า มากกว่าหรือประมาณ 5 mM ซึ่งสูงกว่าความเข้มข้นของ Mg^{2+} อิสระในกระแสเลือด และศักย์ไฟฟ้าที่เป็นบวกด้านโพรงลำไส้ (+5 mV) เหนี่ยวนำให้ Mg^{2+} แพร่จากโพรงลำไส้ผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์เยื่อบุลำไส้ก่อนเข้าสู่กระแสเลือด [43] กลไกการดูดซึมแบบผ่านช่องระหว่างเซลล์นี้ถือเป็นกลไกหลักของร่างกาย เนื่องจากดูดซึม ~90% ของปริมาณ Mg^{2+} ทั้งหมดที่ดูดซึมที่ลำไส้ [43] การขนส่ง Mg^{2+} ด้วยกลไกนี้ถูกควบคุมด้วยโปรตีนของ tight junction ที่มีชื่อว่า claudin (พบประมาณ 24 ชนิดในมนุษย์) ซึ่งสามารถคัดเลือกประจุและขนาดสารที่ผ่าน tight junction [17, 29, 49, 56, 58] เป็นที่ยอมรับกันอย่างแพร่หลายว่า Cldn-16 คือโปรตีนที่มีหน้าที่ในการขนส่ง Mg^{2+} ผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์ในท่อไต [26, 27] อย่างไรก็ตาม Cldn-16 นั้นไม่มีการแสดงในเซลล์เยื่อบุลำไส้ [14] เป็นไปได้ว่าจะมี Cldn ชนิดอื่นที่เกี่ยวข้องกับการดูดซึมแมกนีเซียมผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์เยื่อบุลำไส้ การศึกษาก่อนหน้าของผู้วิจัยพบว่า Cldn-7 และ Cldn-12 มีหน้าที่เป็น paracellular Mg^{2+} channel ในลำไส้ [52] การศึกษากลไก

ควบคุมการแสดงออกของ Cldn-7 และ Cldn-12 จึงอาจเป็นแนวทางสำคัญที่จะทำให้เข้าใจกลไกการดูดซึมแมกนีเซียมแบบผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์

ถึงแม้ว่าการดูดซึม Mg^{2+} ในลำไส้จะมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการรักษาระดับ Mg^{2+} ในร่างกาย แต่กลับไม่มีฮอร์โมนชนิดใดที่มีหน้าที่ควบคุมการดูดซึม Mg^{2+} ในลำไส้ ถึงแม้จะมีรายงานว่าวิตามินดีมีฤทธิ์ควบคุมการดูดซึม Mg^{2+} ในลำไส้ แต่ผลการศึกษาในมนุษย์ยังขัดแย้งกันหลายประเด็น [19] ต่างจากการดูดกลับ Mg^{2+} ที่ท่อไตส่วน thick ascending limb ซึ่งถูกควบคุมด้วยฮอร์โมนหลายชนิด ได้แก่ arginine vasopressin, glucagon, calcitonin, parathyroid hormone, estrogen, epidermal growth factor, และ insulin [42] ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจและมุ่งเน้นศึกษาวิจัยเพื่อค้นหากลไกควบคุมการดูดซึม Mg^{2+} ในลำไส้

2 omeprazole

omeprazole เป็นยาในกลุ่ม proton pump inhibitors ที่ประกอบด้วยสารเคมีสำคัญคือ pyridyl methyl sulfinylbenzimidazole เมื่อถูกกระตุ้นด้วยภาวะที่เป็นกรดในกระเพาะอาหารจะเปลี่ยนเป็น sulphenamides ซึ่งจะจับกับหมู่ sulphhydryl ของกรดอะมิโน cysteine ตำแหน่งที่ 813 ของ H^+/K^+ -ATPase ด้วยพันธะโควาเลนต์ และยับยั้งการทำงานของ H^+/K^+ -ATPase ของ parietal cells ในกระเพาะอาหาร [40] ดังนั้น omeprazole จึงนิยมใช้รักษาโรคของระบบทางเดินอาหารที่จำเป็นต้องยับยั้งการหลั่งกรดจาก parietal cells ในกระเพาะอาหาร อาทิเช่น Barrett's esophagitis, gastro-esophageal reflux disease, gastritis เนื่องจากเป็นยาที่มีรายงานผลข้างเคียงน้อยและหาซื้อได้ง่ายโดยไม่ต้องมีใบสั่งยาจากแพทย์กำกับจึงทำให้ omeprazole เป็นยาที่นิยมและใช้อย่างแพร่หลาย และเป็นยาในกลุ่มยาที่ขายดีที่สุดทั่วโลก [5, 40] เมื่อรับประทาน omeprazole 40 mg จะทำให้มีระดับ omeprazole ในกระแสเลือดสูงสุดที่ 200–400 ng/ml [33] เนื่องจากร่างกายสามารถกำจัด omeprazole ได้เร็ว (half-life~0.5–2 ชั่วโมง) จึงทำให้ผู้ป่วยที่มีอาการป่วยเรื้อรัง อาทิเช่น chronic peptic ulcer, Barret's disease, และ gastro-esophageal reflux disease ต้องได้รับ omeprazole ติดต่อกันเป็นเวลานาน [5, 38]

3 omeprazole และสมดุล Mg^{2+}

นับตั้งแต่ปี ค.ศ. 2006 มีรายงานทางการแพทย์จำนวนมากระบุว่าผู้ป่วยที่ได้รับ omeprazole ติดต่อกันเป็นเวลานานมากกว่า 1 ปี ซึ่งส่วนมากเป็นผู้ป่วยที่มีอาการทางระบบทางเดินอาหารเรื้อรัง ส่งผลให้เกิดภาวะปริมาณ Mg^{2+} ในกระแสเลือดต่ำกว่าปกติ (hypomagnesaemia) ร่วมกับภาวะผิดปกติอื่นๆ อาทิเช่น สับสน (confusion) เชื่องซึม (lethargy) สั่นอย่างรุนแรง (convulsion) ฝ่ามือฝ่าเท้าเกร็ง (carpopedal spasm) ลมชัก (seizure) และหมดสติ (lost of consciousness) จนต้องนำส่งโรงพยาบาลโดยเร่งด่วน [4, 8, 13, 25, 30, 34, 48] จากการทดสอบพิเศษที่เรียกว่า Mg^{2+} retention test บ่งชี้ว่าผู้ป่วยข้างต้นมีภาวะพร่อง Mg^{2+} ในแหล่งสะสมของร่างกายอย่างรุนแรง [8] แต่ผู้ป่วยมีการทำงานของไตในการจัดการ Mg^{2+} เป็นปกติ มิได้มีการสูญเสีย Mg^{2+} ไปกับปัสสาวะ [4, 8, 13, 25, 30, 34, 48, 59] เป็นที่น่าสนใจว่าการรักษาโดยการให้ Mg^{2+} ปริมาณสูงเสริมทางการรับประทานนั้นไม่สามารถรักษาระดับของ Mg^{2+} ในกระแสเลือดให้กลับเป็นปกติได้ ในทางตรงกันข้ามการให้ Mg^{2+}

เสริมทางหลอดเลือดโดยตรงกลับทำให้ระดับ Mg^{2+} ในกระแสเลือดกลับสู่ระดับปกติอย่างรวดเร็ว บ่งชี้ว่า omeprazole มีฤทธิ์รบกวนการดูดซึม Mg^{2+} ในลำไส้ [4, 13, 25, 30, 34, 48] ยิ่งไปกว่านั้นเมื่อแพทย์หยุดจ่ายยา omeprazole ให้คนไข้เพียง 1 – 2 สัปดาห์ พร้อมกับการให้ Mg^{2+} เสริมทางการรับประทาน ส่งผลให้ระดับ Mg^{2+} ในกระแสเลือดกลับสู่ระดับปกติได้ แต่เนื่องจากคนไข้ข้างต้นมักเป็นผู้ป่วยเรื้อรังการหยุดใช้ omeprazole จึงทำให้อาการของระบบทางเดินอาหารกลับแย่ลงจึงจำเป็นต้องจ่ายยาตัวนี้อีกครั้ง หรือยาในกลุ่มยับยั้งการหลั่งกรดตัวอื่น และเมื่อมีการกลับมาใช้ omeprazole อีกเพียง 1 – 2 สัปดาห์ พร้อมกับการให้ Mg^{2+} เสริมทางการรับประทาน กลับทำให้ระดับ Mg^{2+} ในกระแสเลือดต่ำลงอีกครั้ง [4, 8, 13, 25, 30, 34, 48] บ่งชี้ได้ว่า omeprazole มีฤทธิ์กีดการดูดซึม Mg^{2+} เพียง 7 – 14 วันหลังได้รับยา ดังนั้นการพัฒนาของภาวะปริมาณ Mg^{2+} ในกระแสเลือดต่ำที่ใช้เวลานานนั้นน่าจะเกิดจากการสูญเสียการดูดซึม Mg^{2+} ในลำไส้ จึงทำให้ร่างกายต้องใช้ Mg^{2+} จากแหล่งสะสมของร่างกาย แต่เมื่อมีการนำ Mg^{2+} จากแหล่งสะสมมาใช้ติดต่อกันเป็นระยะเวลาจนถึงทำให้เกิดการพร่องของ Mg^{2+} ในแหล่งสะสมของร่างกาย และไม่สามารถช่วยรักษาระดับ Mg^{2+} ในกระแสเลือดได้ จนเกิดภาวะปริมาณ Mg^{2+} ในกระแสเลือดต่ำกว่าปกติ [8] การศึกษากลไกควบคุมการดูดซึม Mg^{2+} ในเซลล์เยื่อบุลำไส้ และกลไกการออกฤทธิ์ระดับเซลล์ของ omeprazole ต่อการดูดซึม Mg^{2+} ในลำไส้จึงเป็นสิ่งที่จำเป็นยิ่งในการป้องกันภาวะ hypomagnesemia ในคนไข้ที่ต้องใช้ยากลุ่มนี้ติดต่อกันเป็นเวลานาน และเพื่อเป็นองค์ความรู้ต่อการศึกษาต่อยอดพัฒนาวิธีการเพิ่มการดูดซึม Mg^{2+} ในผู้ป่วยที่มีภาวะพร่อง Mg^{2+} จากสาเหตุอื่นๆ

จากการศึกษาที่ผ่านมาผู้วิจัยพบว่า omeprazole มีฤทธิ์ลดการขนส่ง Mg^{2+} แบบผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์เยื่อบุลำไส้ แต่ไม่มีผลต่อการขนส่งแบบผ่านเซลล์ โดย omeprazole ลดคุณสมบัติการคัดเลือกประจุบวกของ tight junction ลดความเข้าสนามไฟฟ้าประจุลบในช่องว่างระหว่างเซลล์ และเพิ่มพลังงานก่อกัมมันต์ของการขนส่งแบบผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์ของแผ่นเซลล์เยื่อบุลำไส้เพาะเลี้ยง Caco-2 [51] นอกจากนี้ omeprazole ยังลดความสามารถในการจดจำ Mg^{2+} ของ paracellular Mg^{2+} channel และลดการแสดงออกของ Cldn-7 และ -12 [52] อย่างไรก็ตามกลไกการออกฤทธิ์ระดับเซลล์ของ omeprazole รบกวนการทำงานของ paracellular Mg^{2+} channel และลดการดูดซึม Mg^{2+} แบบผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์นั้นยังไม่ทราบแน่ชัด

4 Apical acidity และการขนส่งอออน

กระเพาะอาหารเป็นอวัยวะที่หลังกรด HCL โดยอาศัยการทำงานของ H^+/K^+ -ATPase ใน parietal cells จนทำให้ภายในกระเพาะอาหารมีความเป็นกรดสูง (pH~2–4) เมื่ออาหารผ่านเข้าสู่ลำไส้จึงทำให้กรดเหล่านี้ถูกเติมลงสู่โพรงลำไส้เล็กเช่นเดียวกัน ถึงแม้ว่าจะมีการขับ HCO_3^- เข้าสู่โพรงลำไส้เพื่อลดภาวะกรด แต่ในโพรงลำไส้เล็กของมนุษย์ตั้งแต่ duodenum จนถึง distal ileum ก็ยังมีภาวะเป็นกรด โดยมีค่า pH 5.5–7.0 [39] เรียกว่าภาวะ apical acidity ทั้งนี้เซลล์เยื่อบุลำไส้สามารถรับรู้และควบคุมการตอบสนองของเซลล์โดยอาศัยการทำงานของ acid sensor อาทิเช่น ASIC1a, OGR1 และ P2Y purinoceptors [2, 9, 10, 22, 23, 37, 61]

apical acidity สามารถควบคุมการดูด Mg^{2+} ในลำไส้ได้ Heijnen และคณะ [20] รายงานผลของ apical acidity เพิ่มการดูดซึม Mg^{2+} แบบผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์ในลำไส้ส่วน ileum ได้ Tang และ Goodenough [46]

รายงานการลดค่า pH ของสารน้ำด้านโพรงลำไส้เป็น 4.0 สามารถเพิ่มการขนส่ง Mg^{2+} แบบผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์ได้ประมาณ 10 เท่า ของกลุ่มควบคุมที่มีค่า pH ของสารน้ำด้านโพรงลำไส้ที่ 7.4 จากการศึกษาล่าสุดผู้วิจัยพบว่า omeprazole ซึ่งมีฤทธิ์ลดการหลั่งกรดจึงไปยับยั้งสถานะ apical acidity และลดการดูดซึม Mg^{2+} ของเซลล์เยื่อบุลำไส้ [52] แต่เมื่อปรับด้านโพรงลำไส้ของแผ่นเซลล์เยื่อบุลำไส้ด้วยสารเลี้ยงเซลล์ที่มีค่า pH 5.5, 6.0, 6.5, และ 7.0 เพื่อจำลองภาวะ apical acidity พบว่าภาวะ apical acidity มีฤทธิ์เพิ่มการดูดซึม Mg^{2+} แบบผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์ และเพิ่มการแสดงออกของ Cldn-7 และ -12 ในแผ่นเซลล์เยื่อบุลำไส้เพาะเลี้ยง Caco-2 ปกติ และแผ่นเซลล์เยื่อบุลำไส้เพาะเลี้ยง Caco-2 ที่ได้รับ omeprazole [52, 53]

เมื่อเกิดภาวะ apical acidity เซลล์เยื่อบุลำไส้สามารถรับรู้ และควบคุมการตอบสนองของเซลล์โดยอาศัยการทำงานของกลุ่มโปรตีนที่ตอบสนองต่อปริมาณกรดในโพรงลำไส้ (acid sensor) ได้แก่ ASIC1a, OGR1, และ P2Y purinoceptors [2, 9, 10, 22, 23, 37, 61] การศึกษาก่อนหน้านี้ของผู้วิจัยพบว่า omeprazole มีฤทธิ์รบกวนการแสดงออกและการทำงานของ ASIC1a และ OGR1 ส่งผลรบกวนการทำงานของเซลล์เยื่อบุลำไส้ในการดูดซึม Mg^{2+} แบบผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์ [53] P2Y purinoceptors โดยเฉพาะชนิด P2Y₂, P2Y₄, และ P2Y₆ เป็น acid sensor ที่มีการแสดงออกที่จำเพาะบนบริเวณผนังด้านโพรงลำไส้ (apical side) ของเซลล์ลำไส้มนุษย์และแผ่นเซลล์เยื่อบุลำไส้เพาะเลี้ยง Caco-2 [60] การกระตุ้น acid sensor อย่าง P2Y purinoceptors มีส่วนควบคุมการทำงานของเซลล์เยื่อบุลำไส้โดยกระตุ้นกลไกการส่งสัญญาณภายในเซลล์ผ่านทาง G_q protein-PLC dependent pathway ซึ่งจะกระตุ้นการส่งสัญญาณคำสั่งต่อไปยัง Ca²⁺-PCK dependent pathway [10, 31] เพื่อควบคุมการส่งอิออน อาทิเช่น Na⁺, K⁺, และ Ca²⁺ ผ่านแผ่นเซลล์เยื่อบุ [31] อย่างไรก็ตามการทำงานของ P2Y purinoceptors ที่เกี่ยวข้องกับการดูดซึม Mg^{2+} และอิทธิพลของ omeprazole ต่อการทำงานของ P2Y purinoceptors และการส่งสัญญาณคำสั่งภายในเซลล์เยื่อบุลำไส้ นั้นยังไม่มีการศึกษาวิจัย

นอกจากนั้น apical acidity ยังสามารถกระตุ้นการขับ HCO₃⁻ ในเซลล์เยื่อบุลำไส้ โดยกระตุ้นการทำงานของ ASIC1a และ P2Y purinoceptor และส่งสัญญาณต่อภายในเซลล์ผ่าน intracellular Ca²⁺ signaling เพื่อกระตุ้นการทำงานของ CFTR ให้ขับ HCO₃⁻ เข้าสู่โพรงลำไส้ [9, 10, 53] เนื่องจาก HCO₃⁻ เป็นไอออนประจุลบ การขับ HCO₃⁻ เข้าสู่โพรงลำไส้มากขึ้นจะลดศักย์ไฟฟ้าที่เป็นบวกด้านโพรงลำไส้ ซึ่งจำเป็นต่อการดูดซึม Mg^{2+} ผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์ลำไส้ที่เป็นกลไกหลักในการดูดซึม Mg^{2+} ในลำไส้เล็กของมนุษย์ [43] Mertz-Nielsen และคณะ [36] รายงานผลการศึกษาในลำไส้เล็กของมนุษย์พบว่า omeprazole มีฤทธิ์เพิ่มการขับ HCO₃⁻ ของเซลล์เยื่อบุลำไส้เข้าสู่โพรงลำไส้ การศึกษาล่าสุดของผู้วิจัย [53] พบว่า omeprazole เพิ่มการแสดงออกและการทำงานของ ASIC1a มีผลเพิ่มการขับ HCO₃⁻ ผ่านทาง intracellular Ca²⁺-cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) dependent mechanism และลดการขนส่ง Mg^{2+} ผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์ลำไส้ [53] อย่างไรก็ตามอิทธิพลของ omeprazole ต่อการทำงานของ P2Y purinoceptor ที่เกี่ยวข้องต่อการขับ HCO₃⁻ ในเซลล์เยื่อบุลำไส้ยังไม่มีการศึกษาวิจัย

5 แบบจำลองในการศึกษาการขนส่ง Mg^{2+} ในลำไส้

Caco-2 epithelial cell เป็นเซลล์เพาะเลี้ยงที่ได้มาจากเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ของมนุษย์ แต่แสดงคุณสมบัติสำคัญของเซลล์เยื่อบุลำไส้เล็ก ไม่ว่าจะเป็นด้านโครงสร้างที่มีการแสดงออกของเอนไซม์ที่มีความจำเพาะต่อลำไส้เล็ก อาทิเช่น sucrase, isomaltase, lactase, alkaline phosphatase, และ aminopeptidase N [6, 41, 63] หรือด้านการดูดซึมสารต่างๆ ไม่ว่าจะเป็นยา สารอาหาร และอออน คล้ายคลึงกับลำไส้เล็กของมนุษย์ [3, 21, 32, 62] ดังนั้นเซลล์เยื่อบุลำไส้เพาะเลี้ยง Caco-2 จึงได้รับการยอมรับ และนิยมใช้เป็นแบบจำลองในการศึกษาการขนส่งสารต่างๆ ผ่านลำไส้เล็กมนุษย์ นอกจากนั้นเซลล์เยื่อบุลำไส้เพาะเลี้ยง Caco-2 ยังเป็นแบบจำลองที่เหมาะสมในการศึกษาการขนส่ง Mg^{2+} ผ่านแผ่นเซลล์ลำไส้ [12, 51] และจากการศึกษาของ Abrahamase และคณะ แสดงให้เห็นว่า Caco-2 cell มีการแสดงออกของ H^+/K^+ -ATPase ซึ่งจำเป็นต่อการทำงานของเซลล์ [1] และ H^+/K^+ -ATPase ก็เป็นโปรตีนเป้าหมายในการออกฤทธิ์ของ omeprazole แสดงว่าเซลล์เยื่อบุลำไส้เพาะเลี้ยง Caco-2 จะตอบสนองต่อ omeprazole [51] นอกจากนี้ Caco-2 cell ยังมีรูปแบบการแสดงออกของ Cldn บน tight junction และ P2Y purinoceptors ชนิด P2Y₂, P2Y₄, และ P2Y₆ บนผนังด้านโพรงลำไส้ (apical side) เหมือนกับที่พบในเซลล์ epithelium ของลำไส้เล็ก [7, 15, 16, 60] ด้วยเหตุผลข้างต้นนี้เซลล์เยื่อบุลำไส้เพาะเลี้ยง Caco-2 จึงเป็นแบบจำลองเหมาะสมในโครงการวิจัยนี้

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

- 1 เพื่อศึกษาอิทธิพลของ omeprazole ต่อการแสดงออกของโปรตีน P2Y₂, P2Y₄, และ P2Y₆ ในแผ่นเซลล์เยื่อบุลำไส้เพาะเลี้ยง Caco-2
- 2 เพื่อศึกษาอิทธิพลของสภาวะ apical acidity ต่อการแสดงออกของโปรตีน P2Y₂, P2Y₄, และ P2Y₆ ในแผ่นเซลล์เยื่อบุลำไส้เพาะเลี้ยง Caco-2 ปกติ และที่ได้รับ omeprazole
- 3 เพื่อศึกษาบทบาทของ P2Y₂, P2Y₄, และ P2Y₆ ต่อการการดูดซึม Mg^{2+} ผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์ของแผ่นเซลล์เยื่อบุลำไส้เพาะเลี้ยง Caco-2
- 4 เพื่อศึกษาอิทธิพลของสภาวะ apical acidity และ omeprazole ต่อการทำงานของ P2Y₂, P2Y₄, และ P2Y₆ และกลไกการส่งสัญญาณภายในเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการดูดซึม Mg^{2+} ผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์ของแผ่นเซลล์เยื่อบุลำไส้เพาะเลี้ยง Caco-2 ปกติ และที่ได้รับ omeprazole
- 5 เพื่อศึกษาอิทธิพลของสภาวะ apical acidity และ omeprazole ต่อการทำงานของ P2Y₂, P2Y₄, และ P2Y₆ และกลไกการส่งสัญญาณภายในเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการขับ HCO_3^- ผ่านแผ่นเซลล์เยื่อบุลำไส้เพาะเลี้ยง Caco-2 ปกติ และที่ได้รับ omeprazole

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1 ด้านวิชาการ

ผลการศึกษาจากโครงการวิจัยนี้จะเพิ่มองค์ความรู้ด้านสรีรวิทยาการรักษาสมดุล Mg^{2+} และกลไกควบคุมการดูดซึม Mg^{2+} ในลำไส้ นอกจากนี้การศึกษานี้ยังจะแสดงถึงกลไกในการยับยั้งการออกฤทธิ์ของ omeprazole โดย apical acidity ซึ่งจะเป็นข้อมูลสำคัญต่อการพัฒนาวิธีการป้องกัน และรักษาผลข้างเคียงของยา omeprazole ในผู้ป่วยที่จำเป็นต้องได้รับการรักษาด้วยยาชนิดนี้ติดต่อกันเป็นเวลานาน

ผู้วิจัยมีแผนที่จะให้นิสิตระดับบัณฑิตศึกษาที่ผู้วิจัยเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วมทำการวิจัยภายใต้การควบคุมของผู้วิจัย ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการสร้างนักวิจัยรุ่นใหม่ในสาขาวิชาสรีรวิทยา

ผลการวิจัยจากโครงการวิจัยนี้คาดว่าจะตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารวิจัยระดับนานาชาติคือ Experimental and Molecular Medicine ในหัวข้อเรื่อง The roles of P2Y purinoceptors on passive Mg^{2+} transport across intestinal epithelium-like Caco-2 monolayers

ผลงานวิจัยจากโครงการวิจัยนี้ที่ได้รับการเผยแพร่ในวารสารวิชาการนานาชาติจะถูกนำไปเป็นหัวข้อเรียนของนิสิตระดับปริญญาตรี และบัณฑิตศึกษาในรายวิชาการวิเคราะห์บทความวิจัยทางวิทยาศาสตร์การแพทย์ และรายวิชาหัวข้อเลือกสรรค์ทางสรีรวิทยา คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

2 ด้านสังคม

ประเด็นเรื่องผลข้างเคียงของการใช้ยายับยั้งการหลั่งกรดติดต่อกันเป็นเวลานานเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะปริมาณ Mg^{2+} ในกระแสเลือดต่ำอย่างรุนแรงนั้นได้รับความสนใจกันอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน ดังที่ได้มีการเผยแพร่ข้อมูลโดยองค์กรด้านสุขภาพหลายองค์กร อาทิเช่น สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา สหรัฐอเมริกา (<http://www.fda.gov/drugs/drugsafety/ucm245011.htm>) ผลการศึกษาจากโครงการวิจัยนี้จะยืนยัน และสนับสนุนผลข้างเคียงของยายับยั้งการหลั่งกรดต่อการดูดซึม Mg^{2+} ในลำไส้ ซึ่งผู้ให้การรักษาควรตระหนักหากต้องจ่ายยายับยั้งการหลั่งกรดแก่ผู้ป่วยติดต่อกันเป็นระยะเวลาเวลานานเพื่อป้องกันผลข้างเคียงของยา และลดภาระค่าใช้จ่ายด้านการดูแลสุขภาพของผู้ป่วยเหล่านั้นด้วย

เนื้อเรื่อง (Main body)

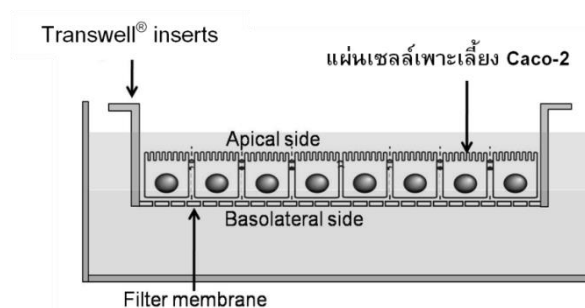
วิธีการดำเนินการวิจัย และสถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล

การดำเนินการวิจัยทั้งหมดในโครงการวิจัยนี้ ดำเนินการ ณ อาคารวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา โดยมีวิธีการดำเนินการวิจัยดังนี้

1 การเลี้ยงเซลล์เยื่อบุลำไส้เพาะเลี้ยง Caco-2

ทำการเลี้ยงเซลล์เยื่อบุลำไส้เพาะเลี้ยง Caco-2 (ATCC® Number: HTB-37) ใน Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Sigma, St. Louis, MO, USA) ที่ประกอบด้วย heat-inactivated fetal bovine serum (GIBCO, Grand Island, NY, USA) 12%, nonessential amino acid (Sigma, St. Louis, MO, USA) 1% และ penicillin-streptomycin (GIBCO, Grand Island, NY, USA) 1% โดยเลี้ยงใน T-flask (Corning, Corning, NY, USA) ขนาด 75 cm² ในตู้ปลอดเชื้อที่ 37 °C และความเข้มข้น CO₂ ที่ 5%

ในการเตรียมแผ่นเซลล์เยื่อบุลำไส้เพาะเลี้ยง Caco-2 เพื่อนำไปศึกษาวิจัยนั้น เซลล์เยื่อบุลำไส้เพาะเลี้ยง Caco-2 จะถูกเลี้ยงบน polyester Transwell (polyester Transwell® inserts, Corning, Corning, NY, USA) ที่ความหนาแน่น 5×10^5 cells/cm² เป็นเวลา 14 วัน ในตู้ปลอดเชื้อที่ 37 °C และความเข้มข้น CO₂ ที่ 5% ซึ่งจะทำให้เซลล์มีการสร้าง tight junction และกลายเป็นแผ่น epithelium [52] (รูปที่ 3)

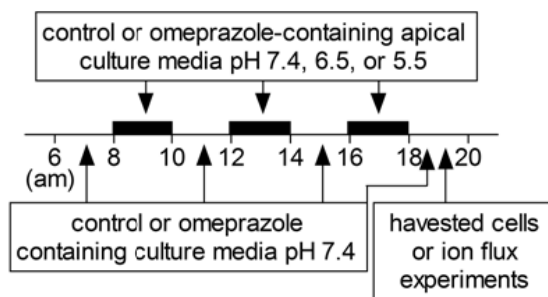


รูปที่ 3. ภาพแสดงแผ่นเซลล์เยื่อบุลำไส้เพาะเลี้ยง Caco-2 บน Transwell® inserts

2 การให้ omeprazole และการเหนี่ยวนำสภาวะ apical acidity แก่เซลล์เยื่อบุลำไส้เพาะเลี้ยง Caco-2

เลี้ยงเซลล์เยื่อบุลำไส้เพาะเลี้ยง Caco-2 บน Transwell เช่นเดียวกับวิธีการเลี้ยงที่กล่าวถึงก่อนหน้านี้เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นจึงเลี้ยงต่อด้วย DMEM ที่มี omeprazole (Sigma, St. Louis, MO, USA) ความเข้มข้น 200 หรือ 400 ng/ml ซึ่งเป็นระดับความเข้มข้นของ omeprazole ในกระแสเลือดของมนุษย์หลังจากรับประทาน omeprazole [33] และยังเป็นระดับความเข้มข้นของ omeprazole ที่สามารถยับยั้งการขนส่ง Mg²⁺ แบบผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์ของแผ่นเซลล์เยื่อบุลำไส้เพาะเลี้ยง Caco-2 [51] ในวันที่ 8 ถึง 14 ก่อนที่จะนำแผ่นเซลล์เยื่อบุลำไส้เพาะเลี้ยง Caco-2 ไปศึกษาต่อไป

ในการศึกษาอิทธิพลของ apical acidity ต่อการแสดงออกของ P2Y₂, P2Y₄ และ P2Y₆ และการขนส่ง Mg²⁺ และ HCO₃⁻ ด้าน apical ของแผ่นเซลล์เยื่อบุลำไส้เพาะเลี้ยง Caco-2 จะถูกบ่มด้วยสารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่มีค่า pH 7.4, 6.5, หรือ 5.5 เป็นเวลา 2 ชั่วโมงต่อครั้ง 3 ครั้งต่อวัน แต่ด้าน basolateral จะได้รับ DMEM ที่มีค่า pH 7.4 ในการเลี้ยงเซลล์วันที่ 8 ถึง 14 ก่อนนำไปศึกษาวิจัย (รูปที่ 4)



รูปที่ 4. ภาพแสดงการบ่มแผ่นเซลล์เยื่อบุลำไส้เพาะเลี้ยง Caco-2 ด้วยสารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่มีค่า pH ต่างๆ เพื่อจำลองภาวะ apical acidity [53]

3 การศึกษาการขนส่ง Mg²⁺ และ HCO₃⁻ ผ่านแผ่นเซลล์เยื่อบุลำไส้เพาะเลี้ยง Caco-2

การศึกษากการขนส่ง Mg²⁺ ทำการทดลองใน Transwell โดยดัดแปลงจากวิธีการทดลองของ Tang และ Goodenough [49] โดยนำ culture media ออก ก่อนล้างแผ่นเซลล์เยื่อบุลำไส้เพาะเลี้ยง Caco-2 และ transwell ด้วย sterilized PBS ก่อนเติมด้าน basolateral ของแผ่นเซลล์เยื่อบุลำไส้เพาะเลี้ยง Caco-2 (รูปที่ 3) ด้วย sterilized-Mg free bathing solution (CaCl₂ 1.25mM, KCL 4.5 mM, D-glucose 12 mM, L-glutamine 2.5 mM, D-mannitol 250 mM และ HEPES-pH7.4 10 mM และมีค่า osmolality เท่ากับ 290–295 mmol kg⁻¹ H₂O) และเติมด้าน apical ของแผ่นเซลล์เยื่อบุลำไส้เพาะเลี้ยง Caco-2 ด้วย sterilized-40 mM Mg bathing solution (MgCl₂ 40 mM, CaCl₂ 1.25mM, KCL 4.5 mM, D-glucose 12 mM, L-glutamine 2.5 mM, D-mannitol 115 mM และ HEPES-pH7.4 10 mM และมีค่า osmolality เท่ากับ 290–295 mmol kg⁻¹ H₂O) ทั้งนี้เพื่อให้เกิดความลาดเอียงทางความเข้มข้นและเหนี่ยวนำให้เกิดการขนส่ง Mg²⁺ แบบผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์ ในตู้ปลอดเชื้อที่ 37 °C และความเข้มข้น CO₂ ที่ 5% จากนั้นจึงเก็บตัวอย่าง 50 µL จาก bathing solution ด้าน basolateral ทุกๆ 30 นาทีเป็นเวลา 90 นาที ก่อนผสมตัวอย่างกับ Xylidyl-Blue reagent ซึ่งประกอบด้วย Tris Buffer 250 mM, K₂CO₃ 70 mM, EGTA 40 mM, และ Xylidyl-Blue (Sigma, St. Louis, MO, USA) 0.1 mM ปริมาตร 1 mL แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 nm โดยใช้เครื่อง UV spectrophotometer (model UV-2550; Shimadzu, Kyoto, Japan) [51] ความเข้มข้นของ Mg²⁺ จะถูกคำนวณโดยนำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปเทียบกับเส้นกราฟความเข้มข้นมาตรฐานซึ่งเกิดจากการนำ 50 µL ของ MgCl₂ ที่ความเข้มข้น 0, 2, 8, 20, 40 หรือ 80 mM ผสมกับ Xylidyl-Blue reagent 1 mL แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 nm เช่นเดียวกับวิธีการข้างต้น จากนั้นจึงหากราฟเส้นตรงความสัมพันธ์ระหว่าง

ค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของ Mg^{2+} โดยเส้นกราฟต้องมีค่า $r^2 \geq 0.99$ ก่อนนำค่าความเข้มข้นของ Mg^{2+} ไปคำนวณหาค่าอัตราการขนส่ง Mg^{2+} [51]

การศึกษาการขนส่ง HCO_3^- ทำการทดลองใน Transwell ในตู้ปลอดเชื้อที่ $37^\circ C$ และความเข้มข้น CO_2 ที่ 5% [53] โดยนำ culture media ออกก่อนล้างแผ่นเซลล์เยื่อบุลำไส้เพาะเลี้ยง Caco-2 และ transwell ด้วย sterilized PBS ก่อนเติมด้าน apical ของแผ่นเซลล์เยื่อบุลำไส้เพาะเลี้ยง Caco-2 ด้วย sterilized $NaHCO_3$ -free apical solution (1.25 mM $CaCl_2$, 4.5 mM KCl , 1 mM $MgCl_2$, 12 mM D-glucose, 2.5 mM L-glutamine, 230 mM D-mannitol, และ 10 mM HEPES pH 7.4 และมีค่า osmolarity เท่ากับ $290-295 \text{ mmol kg}^{-1} H_2O$) และเติมด้าน basolateral ของแผ่นเซลล์เยื่อบุลำไส้เพาะเลี้ยง Caco-2 ด้วย sterilized $NaHCO_3$ -containing basolateral solution (25 mM $NaHCO_3$, 1.25 mM $CaCl_2$, 4.5 mM KCl , 1 mM $MgCl_2$, 12 mM D-glucose, 2.5 mM L-glutamine, 200 mM D-mannitol, และ 10 mM HEPES pH 7.4. และมีค่า osmolarity เท่ากับ $290-295 \text{ mmol kg}^{-1} H_2O$) หลังจากเติม bathing solution เป็นเวลา 20 นาที ทำการเติม HCL ที่ด้าน apical ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายที่ 10 mM และบ่มเป็นเวลา 5 min ก่อนล้างและเติม $NaHCO_3$ -free apical solution ที่ด้าน apical ของแผ่นเซลล์เยื่อบุลำไส้เพาะเลี้ยง Caco-2 อีกครั้ง จากนั้นจึงเก็บตัวอย่าง $100 \mu L$ จาก bathing solution ด้าน apical ทุกๆ 10 นาทีเป็นเวลา 50 นาที ความเข้มข้นของ HCO_3^- วัดโดยใช้เครื่อง clinical chemistry analyzer (ILab Taurus; Instrumentation Laboratory, Bedford, MA, USA).

ในการศึกษาอิทธิพลของ apical acidity นั้น HEPES-pH7.4 ใน sterilized-40 mM Mg bathing solution ด้าน apical (รูปที่ 3) จะถูกเปลี่ยนเป็น HEPES ที่ความเข้มข้นเดียวกันแต่มีค่า pH ที่ 7.0, 6.5, 6.0, และ 5.5 [52, 53]

4 การศึกษาค่า absolute permeability ของ Mg^{2+} (P_{Mg})

ทำการศึกษาร่วมกับการศึกษาการขนส่ง Mg^{2+} ซึ่งค่า P_{Mg} สามารถคำนวณได้โดยการนำค่าอัตราการขนส่ง Mg^{2+} ที่ได้จากการทดลอง 13.3 หารด้วยค่าความต่างความเข้มข้นของ Mg^{2+} ใน bathing solution ด้าน apical และ basolateral [51]

5 Western blot analysis

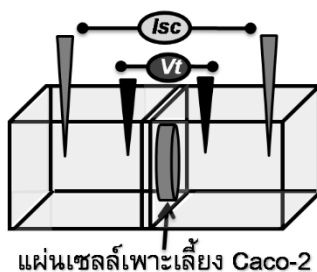
สกัดโปรตีนจากเซลล์เพาะเลี้ยงที่เลี้ยงบน 6 well plate โดยใช้ Pierce® Ripa Buffer (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL, USA) จากนั้นนำโปรตีน (35 μg) ที่สกัดได้ไปแยกด้วยกระแสไฟฟ้าใน 10% SDS-PAGE gel จากนั้นทำการย้ายโปรตีนไปยัง nitrocellulose membrane (Amersham, Buckinghamshire, UK) และนำ membrane ไปบ่มใน primary antibody ที่มีความจำเพาะต่อโปรตีน $P2Y_2$, $P2Y_4$, $P2Y_6$, และ CFTR (Santa Cruz Biotechnology, California, USA) หรือ actin เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ $4^\circ C$ ก่อนนำ membrane มาบ่มใน HRP-conjugated secondary antibody (Zymed, San Francisco, CA, USA) ทำการศึกษาปริมาณการแสดงออกของโปรตีนโดยใช้ Thermo Scientific SuperSignal® West Pico Substrate

(Thermo Fisher Scientific Inc.) และ CL-XPosure Film (Thermo Fisher Scientific Inc.) แล้ววัดความเข้มของแถบโปรตีนด้วยโปรแกรม Scion Image และเปรียบเทียบขนาดของโปรตีนที่ศึกษาโดยใช้ Cruz Marker™ Molecular Weight Standards (Santa Cruz Biotechnology)

6 การวัดค่าทางไฟฟ้าของแผ่นเซลล์เยื่อบุลำไส้เพาะเลี้ยง Caco-2

ในการทดลองนี้แผ่นเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 จะถูกใส่ลงใน modified Ussing chamber (รูปที่ 5) ซึ่งแผ่นเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 จะอยู่ตรงกลางและแบ่งระหว่างสองด้านของ chamber โดยที่ แผ่นเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 จะแช่อยู่ใน bathing solution ที่ประกอบด้วย NaCl 118 mM, KCl 4.7 mM, MgCl₂ 1.1 mM, CaCl₂ 1.25mM, NaHCO₃ 23 mM, D-glucose 12 mM, L-glutamine 2.5 mM และ mannitol 2 mM และมีค่า osmolarity เท่ากับ 290-295 mmol kg⁻¹ H₂O ตลอดการทดลองใน modified Ussing chamber system จะมีการให้ humidified 5% CO₂ และ 95% O₂ เข้าไปในระบบ ซึ่งควบคุมอุณหภูมิที่ 37 °C [51]

ในการวัดค่าทางไฟฟ้านั้น chamber แต่ละด้านจะถูกต่อพ่วงด้วย Ag/AgCl electrode จำนวน 2 คู่ โดย electrode คู่แรกจะอยู่บริเวณชิดกับแผ่นเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 เพื่อทำการวัดค่าความต่างศักย์ไฟฟ้า (V_t) (รูปที่ 5) โดยปลายอีกด้านของ electrode ที่วัดค่าความต่างศักย์ไฟฟ้านั้นจะต่อพ่วงกับ pre-amplifier ของเครื่องแคลมป์กระแสและความต่างศักย์ไฟฟ้า ส่วน electrode อีกคู่นั้นจะต่อเข้ากับปลายแต่ละด้านของ chamber เพื่อให้กระแส short-circuits current (I_{sc}) จาก ECV-4000 current-generating unit ของเครื่องแคลมป์กระแสและความต่างศักย์ไฟฟ้า วัดค่าทางไฟฟ้าทุก 5 นาที เป็นเวลา 30 นาที ค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าและค่า I_{sc} ที่ได้จะถูกนำไปคำนวณเพื่อหาค่าความต้านทานไฟฟ้าของแผ่นเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 โดยใช้กฎของโอห์ม [51]



รูปที่ 5. ภาพแสดงระบบของ modified Ussing chamber

7 การศึกษา charge selectivity โดย dilution potential technique

ก่อนเริ่มทำการศึกษาแผ่นเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 จะแช่อยู่ใน bathing solution ซึ่งมีความเข้มข้นของ NaCl ที่ 145 mM ใน modified Ussing chamber setup เช่นเดียวกับการศึกษาในข้อ 13.6 เมื่อเริ่มทำการทดลอง bathing solution ด้าน basolateral จะถูกเปลี่ยนเป็น bathing solution ที่มีความเข้มข้นของ NaCl ที่ 72.5 mM จากนั้นจะวัดค่าทางไฟฟ้าทุก 1 วินาที เป็นเวลาทั้งสิ้น 8 วินาที แล้วนำค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าที่เปลี่ยนไปและ I_{sc} ไปใช้ในการคำนวณด้วย Goldman-Hodgkin-Katz equation และ Kimizuka-Koketsu equation เพื่อ

หาค่า permeability ratio ของ Na^+ ต่อ Cl^- ($P_{\text{Na}}/P_{\text{Cl}}$) ค่า sodium permeability (P_{Na}) และ ค่า chloride permeability (P_{Cl}) [51]

8 การศึกษาค่า absolute permeability ของ Li (P_{Li}), Na (P_{Na}), K (P_{K}), Rb (P_{Rb}), และ Cs (P_{Cs})

การศึกษาค่า P_{Li} , P_{Na} , P_{K} , P_{Rb} และ P_{Cs} นั้นจะทำการศึกษาใน modified Ussing chamber setup เช่นเดียวกับการศึกษาในข้อ 13.6 และทำการวัดค่าทางไฟฟ้า จากนั้นเปลี่ยน bathing solution ด้าน apical เป็น bathing solution ที่ผสม LiCl, NaCl, KCl, RbCl หรือ CsCl ที่ความเข้มข้น 100 mM และเปลี่ยน bathing solution ด้าน basolateral เป็น bathing solution ที่ผสม LiCl, NaCl, KCl, หรือ RbCl ที่ความเข้มข้น 50 mM

โดย bathing solution ทั้งหมดจะมีค่า osmolality เท่ากับ $290\text{-}295 \text{ mmol kg}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$ จากนั้นจึงวัดค่าทางไฟฟ้าที่เปลี่ยนไปทุก 1 วินาที เป็นเวลาทั้งสิ้น 8 วินาที แล้วนำค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าที่เปลี่ยนไป และ I_{sc} ไปใช้ในการคำนวณด้วย Goldman-Hodgkin-Katz equation และ Kimizuka-Koketsu equation [51] เพื่อหาค่า absolute permeability ของไอออนแต่ละชนิด ก่อนนำค่า P_{Li} , P_{Na} , P_{K} , P_{Rb} และ P_{Cs} มาศึกษาลักษณะสนามไฟฟ้าภายในช่องว่างระหว่างเซลล์ของแผ่นเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 โดยเทียบเคียงตาม Eisenman selective sequence [51]

9 การบ่มเซลล์เยื่อบุลำไส้เพาะเลี้ยง Caco-2 ด้วยสารต่างๆ

เลี้ยงเซลล์เยื่อบุลำไส้เพาะเลี้ยง Caco-2 บน Transwell ดังที่กล่าวถึงในข้อ 13.1 และ 13.2 เป็นเวลา 21 วัน จากนั้นในวันทำการทดลอง ทำการบ่มแผ่นเซลล์เยื่อบุลำไส้เพาะเลี้ยง Caco-2 ทั้งกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ได้รับโอมิพราโซลด้วยสารดังแสดงในตารางที่ 1 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อนทำการศึกษาดังกระบวนการที่อธิบายในข้อ 13.3 13.4 13.5 13.6 13.7 และ 13.8

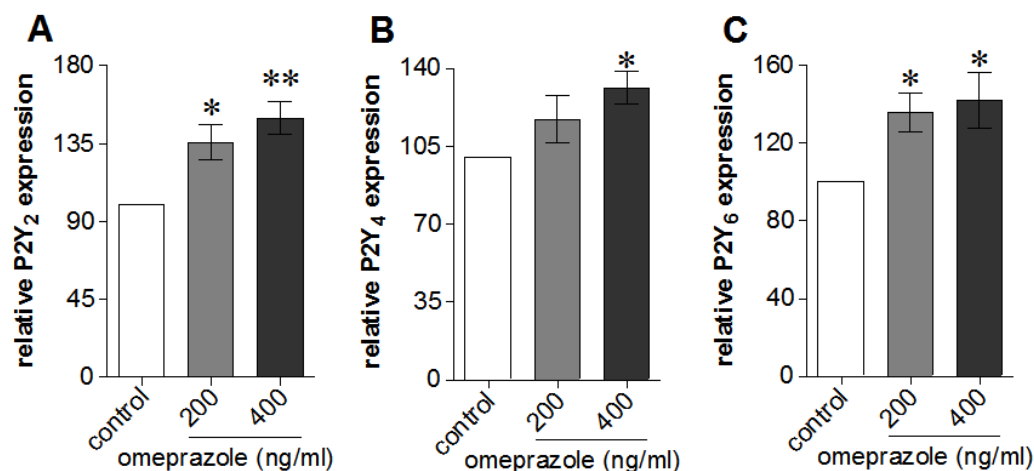
10 วิธีการประเมินผล/ สังเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลทั้งหมดจะถูกนำเสนอเป็นค่า means \pm SE ความแตกต่างทางสถิติของข้อมูลสองชุดจะทดสอบโดย unpaired Student's t-test ความแตกต่างทางด้านสถิติของข้อมูลมากกว่าสองชุดจะทดสอบโดย One-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison test ความแตกต่างทางด้านสถิติของทุกการทดสอบต้องมีค่า $P \leq 0.05$ ประเมินผลข้อมูลโดย GraphPad Prism 5.0 for Mac Os (GraphPad Prism Software, San Diego, CA, USA)

ผลการวิจัย (Results)

1 อิทธิพลของ omeprazole ต่อการแสดงออกของโปรตีน P2Y2, P2Y4, และ P2Y6 ในแผ่นเซลล์เยื่อบุลำไส้เพาะเลี้ยง Caco-2

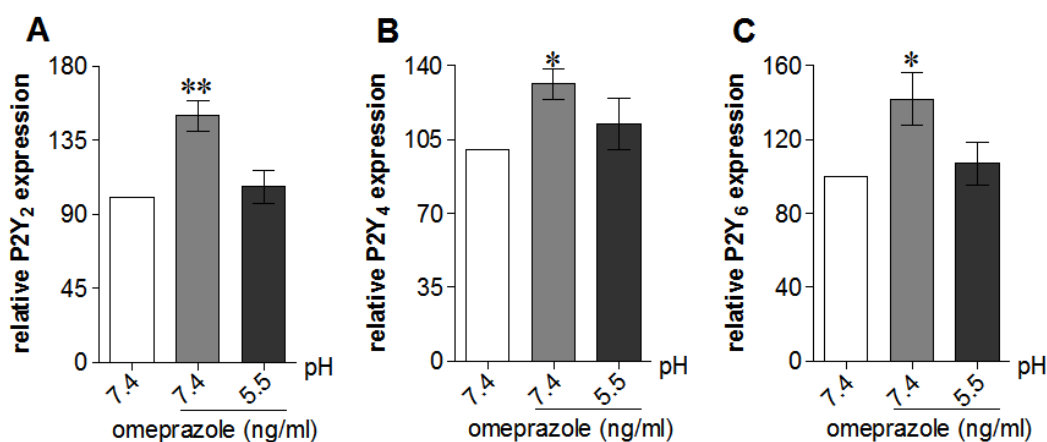
ผลการศึกษารายงานส่วนที่ 1 พบว่า omeprazole ที่ความเข้มข้น 200 และ 400 ng/ml มีฤทธิ์เพิ่มระดับการแสดงออกของ P2Y2, P2Y4, และ P2Y6 โปรตีนในแผ่นเซลล์เยื่อบุลำไส้เพาะเลี้ยง Caco-2 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 6)



รูปที่ 6 อิทธิพลของ omeprazole ต่อการแสดงออกของโปรตีน P2Y₂, P2Y₄, และ P2Y₆ ในแผ่นเซลล์เยื่อบุลำไส้เพาะเลี้ยง Caco-2. Representative densitometric analysis ที่บ่งบอกระดับการแสดงออกของ P2Y₂ (A), P2Y₄ (B), และ P2Y₆ (C) ในเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 ปกติ หรือได้รับ 200 หรือ 400 ng/mL omeprazole. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมในแต่ละการทดลอง. (n = 5).

2 อิทธิพลของสภาวะ apical acidity ต่อการแสดงออกของโปรตีน P2Y₂, P2Y₄, และ P2Y₆ ในแผ่นเซลล์เยื่อบุลำไส้เพาะเลี้ยง Caco-2 ปกติ และที่ได้รับ omeprazole

ดังแสดงในรูปที่ 7 พบว่า omeprazole ที่ความเข้มข้น 400 ng/ml มีฤทธิ์เพิ่มระดับการแสดงของ P2Y₂, P2Y₄, และ P2Y₆ ในทางตรงกันข้ามภาวะกรดด้านโพรงลำไส้ที่ pH 5.5 สามารถลดอิทธิพลของ omeprazole ต่อการแสดงออกของ P2Y₂, P2Y₄, และ P2Y₆ ได้



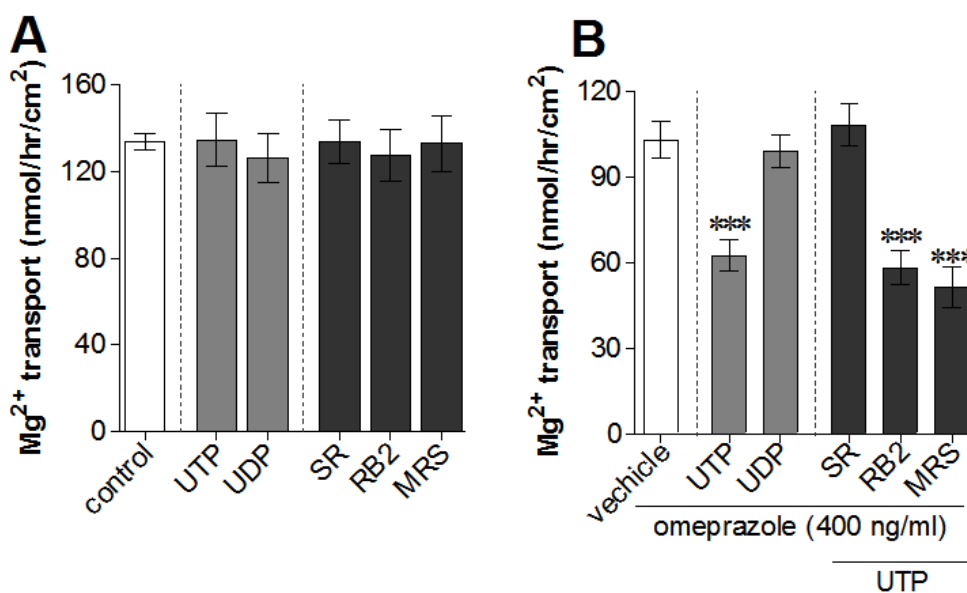
รูปที่ 7 อิทธิพลของสภาวะ apical acidity ต่อการแสดงออกของโปรตีน P2Y₂, P2Y₄, และ P2Y₆ ในแผ่นเซลล์เยื่อบุลำไส้เพาะเลี้ยง Caco-2 ปกติ และที่ได้รับ omeprazole. Representative densitometric analysis ที่บ่งบอกระดับการแสดงออกของ P2Y₂ (A), P2Y₄ (B), และ P2Y₆ (C) ในเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 ปกติ

400 ng/mL omeprazole. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมในแต่ละการทดลอง. (n = 5).

3 บทบาทของ P2Y₂, P2Y₄, และ P2Y₆ ต่อการการดูดซึม Mg²⁺ ผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์ของแผ่นเซลล์เยื่อบุลำไส้เพาะเลี้ยง Caco-2 ปกติ และที่ได้รับ omeprazole

ดังแสดงในรูปที่ 8A แสดงการขนส่ง Mg²⁺ ผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์ของแผ่นเซลล์เยื่อบุลำไส้เพาะเลี้ยง Caco-2 ปกติ และแผ่นเซลล์ที่บ่มด้วย P2Y₂/P2Y₄ agonist คือ 10 μmol/L UTP, P2Y₆ agonist คือ 10 μmol/L UDP, P2Y₂ antagonist 1 mmol/L sarumin (SR), P2Y₄ antagonist 1 mmol/L reactive blue 2 (RB2), หรือ P2Y₆ antagonist 1 mmol/L MRS2578 (MRS) พบว่าสารทุกชนิดไม่มีผลต่อการขนส่ง Mg²⁺ ผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์ของแผ่นเซลล์เยื่อบุลำไส้เพาะเลี้ยง Caco-2 ปกติ

แต่เมื่อศึกษาการขนส่ง Mg²⁺ ผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์ของแผ่นเซลล์เยื่อบุลำไส้เพาะเลี้ยง Caco-2 ที่ได้รับ omeprazole 400 ng/ml (รูปที่ 8B) พบว่า P2Y₂/P2Y₄ agonist UTP มีฤทธิ์ลดการขนส่ง Mg²⁺ ผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ บ่งชี้ว่าการกระตุ้น P2Y₂ และ P2Y₄ ส่งเสริมฤทธิ์ของ omeprazole ในการกวดการขนส่ง Mg²⁺ ผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์ แต่เมื่อบ่มเซลล์ด้วย UTP ร่วมกับ SR, RB2, หรือ MRS พบว่าเฉพาะ SR ซึ่งเป็นสารยับยั้งการทำงานของ P2Y₂ เท่านั้นที่สามารถยับยั้งฤทธิ์ของ UTP ได้ จึงบ่งชี้ได้ว่า การกระตุ้นการทำงานของ P2Y₂ ที่กวดการขนส่ง Mg²⁺ ผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์

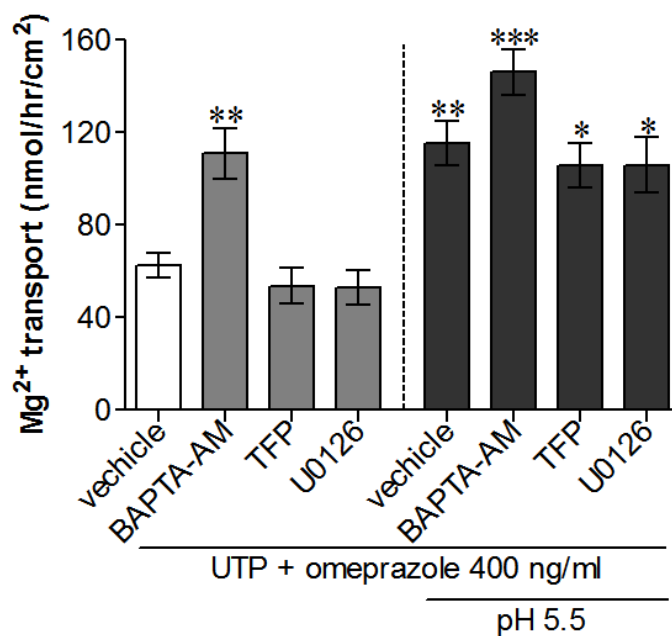


รูปที่ 8 บทบาทของ P2Y₂, P2Y₄, และ P2Y₆ ต่อการการดูดซึม Mg²⁺ ผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์ของแผ่นเซลล์เยื่อบุลำไส้เพาะเลี้ยง Caco-2 ปกติ และที่ได้รับ omeprazole. แสดงอัตราการขนส่ง Mg²⁺ ผ่าน

ช่องว่างระหว่างเซลล์ของแผ่นเซลล์เยื่อบุลำไส้เพาะเลี้ยง Caco-2 ปกติ (A) และที่ได้รับ omeprazole 400 ng/ml (B). $***P < 0.001$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมในแต่ละการทดลอง. (n = 5).

4 กลไกการส่งสัญญาณภายในเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับบทบาทของ P2Y2, P2Y4, และ P2Y6 ต่อการการดูดซึม Mg^{2+} ผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์ของแผ่นเซลล์เยื่อบุลำไส้เพาะเลี้ยง Caco-2 ปกติ และที่ได้รับ omeprazole

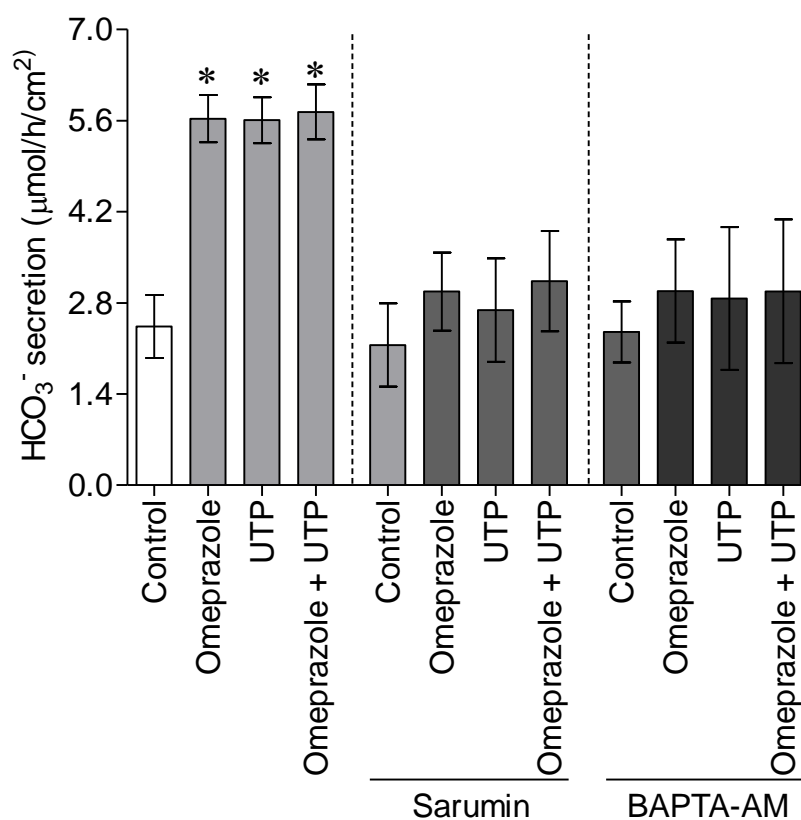
แต่เมื่อศึกษาการขนส่ง Mg^{2+} ผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์ของแผ่นเซลล์เยื่อบุลำไส้เพาะเลี้ยง Caco-2 ที่ได้รับ omeprazole 400 + UTP หรือภาวะกรดด้านโพรงลำไส้ พบว่าภาวะกรดด้านโพรงลำไส้สามารถเพิ่มอัตราการขนส่ง Mg^{2+} ผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์ของแผ่นเซลล์เยื่อบุลำไส้ได้ แต่เมื่อบ่มด้วย intracellular Ca^{2+} chelator BAPTA-AM, calmodulin antagonist trifluoperazine (TFP), MEK/MAPK antagonist U0126 พบว่า BAPTA-AM เพิ่มอัตราการขนส่ง Mg^{2+} ผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์ของแผ่นเซลล์ บ่งชี้ว่าการกระตุ้น P2Y2 ทำงานผ่านทาง Ca^{2+} signaling ในการกวดการขนส่ง Mg^{2+} ผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์ (รูปที่ 9) และเมื่อบ่มแผ่นเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 ที่ค่า pH ที่เป็นกรดที่ 5.5 พบว่า ภาวะกรดสามารถเพิ่มการขนส่ง Mg^{2+} ผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์ของแผ่นเซลล์เยื่อบุลำไส้เพาะเลี้ยง Caco-2 ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



รูปที่ 9 กลไกการส่งสัญญาณภายในเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับบทบาทของ P2Y2, P2Y4, และ P2Y6 ต่อการการดูดซึม Mg^{2+} ผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์ของแผ่นเซลล์เยื่อบุลำไส้เพาะเลี้ยง Caco-2 ปกติ และที่ได้รับ omeprazole. แสดงอัตราการขนส่ง Mg^{2+} ผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์ของแผ่นเซลล์เยื่อบุลำไส้เพาะเลี้ยง Caco-2. $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (n = 5).

5. อิทธิพลของ omeprazole ต่อการทำงานของ P2Y₂, P2Y₄, และ P2Y₆ และกลไกการส่งสัญญาณภายในเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการขับ HCO₃⁻ ผ่านแผ่นเซลล์เยื่อบุลำไส้เพาะเลี้ยง Caco-2 ปกติ และที่ได้รับ omeprazole

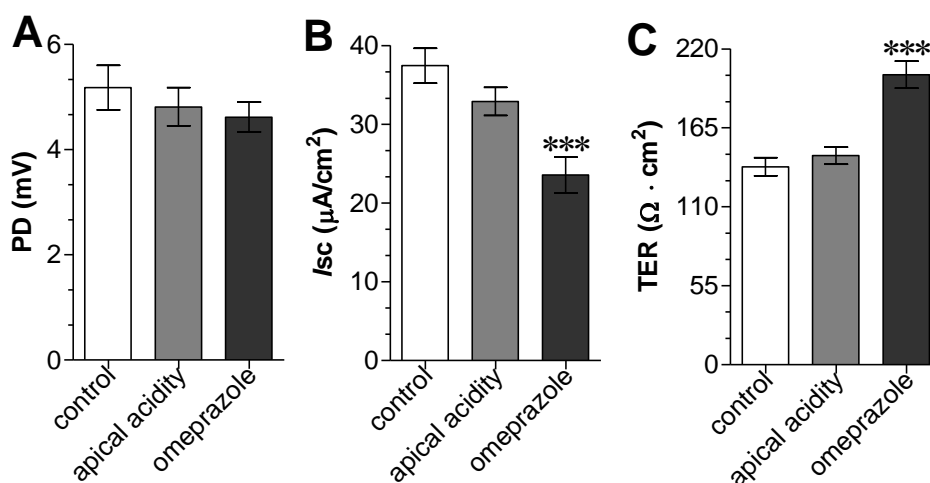
ดังแสดงในภาพที่ 10 พบว่า omeprazole และ UTP มีฤทธิ์เพิ่มการขับ HCO₃⁻ และเมื่อบ่มเซลล์ด้วย omeprazole และ UTP ร่วมกันก็เพิ่มการขับ HCO₃⁻ แต่ไม่แตกต่างจากกลุ่มที่ได้รับ omeprazole หรือ UTP เพียงอย่างเดียว จากนั้นเมื่อบ่มเซลล์ด้วย P2Y₂ inhibitor Sarumin และ intracellular Ca²⁺ chelator BAPTA-AM พบว่าสารทั้ง 2 ชนิดนี้ไม่มีผลต่อการขับ HCO₃⁻ ในกลุ่มควบคุม แต่ทั้ง Sarumin และ BAPTA-AM สามารถยับยั้งการออกฤทธิ์ของ omeprazole, UTP, และ omeprazole + UTP ต่อการขับ HCO₃⁻ ผ่านแผ่นเซลล์เยื่อบุลำไส้เพาะเลี้ยง Caco-2 ปกติ และที่ได้รับ omeprazole บ่งชี้ว่า การกระตุ้นการทำงานของ P2Y₂ ส่งผลกระทบต่อ intracellular Ca²⁺ signaling และเพิ่มการขับ HCO₃⁻



รูปที่ 10 การทำงานของ P2Y₂, P2Y₄, และ P2Y₆ และกลไกการส่งสัญญาณภายในเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการขับ HCO₃⁻ ผ่านแผ่นเซลล์เยื่อบุลำไส้เพาะเลี้ยง Caco-2 ปกติ และที่ได้รับ omeprazole. แสดงอัตราการขับ HCO₃⁻ ของแผ่นเซลล์เยื่อบุลำไส้เพาะเลี้ยง Caco-2. **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (n = 5).

6. อิทธิพลของสภาวะ apical acidity และ omeprazole คุณสมบัติทางไฟฟ้าของแผ่นเซลล์เยื่อลำไส้เพาะเลี้ยง Caco-2

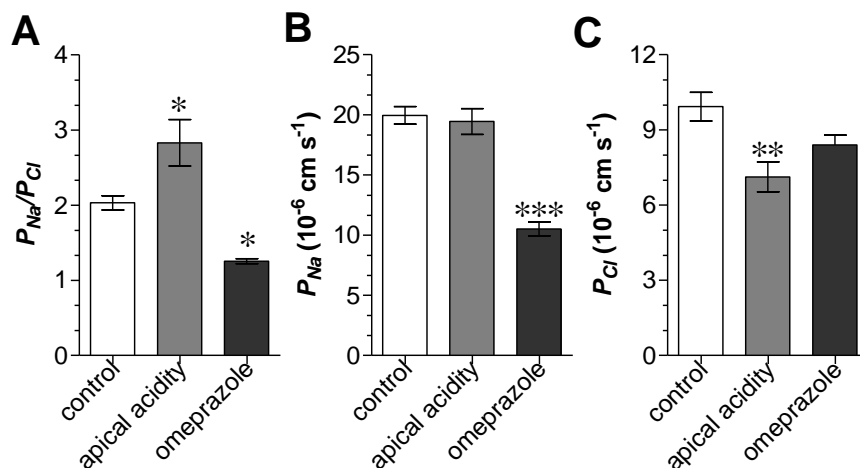
รูปที่ 11 แสดงคุณสมบัติทางไฟฟ้าของแผ่นเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 ได้แก่ ความต่างศักย์ไฟฟ้า (potential difference; PD) กระแส short-circuits current (I_{sc}) และ ค่าความต้านทานไฟฟ้า (transepithelial potential difference; TER) ของแผ่นเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 พบว่า สภาวะ apical acidity ไม่เปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางไฟฟ้า แต่ omeprazole มีฤทธิ์ลด I_{sc} และเพิ่ม TER อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ บ่งชี้ว่า omeprazole ลดการขนส่งไอออนและลด paracellular permeability



รูปที่ 11 คุณสมบัติทางไฟฟ้าของแผ่นเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2. A ความต่างศักย์ไฟฟ้า (potential difference; PD), B กระแส short-circuits current (I_{sc}) และ C ค่าความต้านทานไฟฟ้า (transepithelial potential difference; TER) ของแผ่นเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2. *** $P < 0.001$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($n = 5$).

7. อิทธิพลของสภาวะ apical acidity และ omeprazole คุณสมบัติทางชีวฟิสิกส์ของแผ่นเซลล์เยื่อลำไส้เพาะเลี้ยง Caco-2

รูปที่ 12 แสดงคุณสมบัติทางชีวฟิสิกส์ของแผ่นเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 ได้แก่ คุณสมบัติ charge selectivity โดยศึกษาจากค่า permeability ratio ของ Na^+ ต่อ Cl^- ($P_{\text{Na}}/P_{\text{Cl}}$) ค่า sodium permeability (P_{Na}) และ ค่า chloride permeability (P_{Cl}) พบว่า สภาวะ apical acidity เพิ่ม $P_{\text{Na}}/P_{\text{Cl}}$ และลด P_{Cl} อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ บ่งชี้ว่า apical acidity มีฤทธิ์เพิ่ม paracellular cation selectivity และลด paracellular anion selectivity ในขณะที่ omeprazole มีฤทธิ์ลด $P_{\text{Na}}/P_{\text{Cl}}$ และ P_{Na} อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ บ่งชี้ว่า omeprazole ลด paracellular cation selectivity สรุปได้ว่า apical acidity ส่งเสริมการขนส่งประจุบวกผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์ ในขณะที่ omeprazole จะขัดขวางการขนส่งประจุบวกผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์



รูปที่ 12 คุณสมบัติทางชีวฟิสิกส์ของของแผ่นเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2. A permeability ratio ของ Na^+ ต่อ Cl^- ($P_{\text{Na}}/P_{\text{Cl}}$), B ค่า sodium permeability (P_{Na}) และ C ค่า chloride permeability (P_{Cl}) ของแผ่นเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2. *** $P < 0.001$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($n = 5$).

อภิปราย/วิจารณ์ (Discussion) ผลการทดลอง/ผลการวิจัย ที่ได้ทั้งหมด

ผลการทดลองจากโครงการวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าในภาวะปกตินั้นการทำงานของ P2Y₂, P2Y₄, และ P2Y₆ นั้นไม่มีผลต่อการขนส่ง Mg^{2+} ผ่านแผ่นเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 แต่เมื่อได้รับ omeprazole พบว่า มีการแสดงของ P2Y₂, P2Y₄, และ P2Y₆ เพิ่มขึ้น ซึ่งโครงการวิจัยนี้เป็นงานวิจัยแรกที่แสดงอิทธิพลของ omeprazole ต่อการแสดงออกของ P2Y receptor family อย่างไรก็ตามกลไกระดับเซลล์นั้นก็ยังไม่มีการศึกษาวิจัย

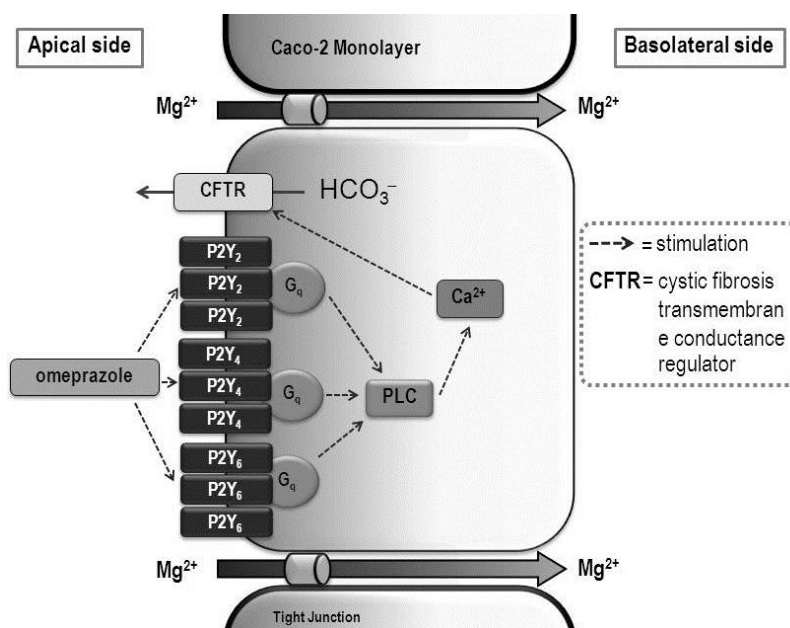
เมื่อกระตุ้นการทำงานของ P2Y₂ ในแผ่นเซลล์เพาะเลี้ยงที่ได้รับ omeprazole พบว่ามีฤทธิ์กีดการดูดซึม Mg^{2+} เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ omeprazole เพียงอย่างเดียว และเมื่อให้สารยับยั้ง P2Y₂ และ intracellular Ca^{2+} chelator สามารถยับยั้งการออกฤทธิ์ของตัวกระตุ้นการทำงานของ P2Y₂ ต่อการขนส่ง Mg^{2+} ได้ บ่งชี้ว่าการกระตุ้น P2Y₂ ในแผ่นเซลล์เพาะเลี้ยงที่ได้รับ omeprazole กระตุ้น intracellular signaling และมีผลกีดการดูดซึม Mg^{2+}

เมื่อศึกษาการขับ HCO_3^- พบว่าเซลล์ที่ได้รับ omeprazole แลพ P2Y₂ receptor activator มีฤทธิ์กระตุ้นการขับ HCO_3^- ผ่านแผ่นเซลล์เยื่อบุลำไส้เพาะเลี้ยง Caco-2 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อให้สารยับยั้ง P2Y₂ และ intracellular Ca^{2+} chelator สามารถยับยั้งการออกฤทธิ์ของตัวกระตุ้นการทำงานของ P2Y₂ ต่อการขนส่ง ขับ HCO_3^- ได้ บ่งชี้ว่าการกระตุ้น P2Y₂ ในแผ่นเซลล์เพาะเลี้ยงที่ได้รับ omeprazole กระตุ้น intracellular signaling และกระตุ้นการขับ HCO_3^- ผ่านแผ่นเซลล์เยื่อบุลำไส้เพาะเลี้ยง Caco-2

การศึกษาคุณสมบัติทางไฟฟ้าพบว่า omeprazole มีฤทธิ์ลด I_{sc} และเพิ่ม TER อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ บ่งชี้ว่า omeprazole ลดการขนส่งไอออนและลด paracellular permeability การศึกษาทางชีวฟิสิกส์พบว่า omeprazole มีฤทธิ์ลด $P_{\text{Na}}/P_{\text{Cl}}$ และ P_{Na} อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ บ่งชี้ว่า omeprazole ลด paracellular

cation selectivity สรุปได้ว่า omeprazole ลดการเลือกประจุบวกขนส่งผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์ และเพิ่มความต้านทานของการขนส่งสารผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์จึงมีผลลดการขนส่งผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์

ผลการศึกษานี้เป็นไปตามสมมติฐานงานวิจัยที่ตั้งไว้คือ omeprazole ส่งเสริมการแสดงออกและการทำงานของ P2Y purinoceptors ที่เกี่ยวข้องต่อการขับ HCO_3^- ในเซลล์เยื่อบุลำไส้ผ่านทาง intracellular Ca^{2+} -CFTR dependent mechanism เป็นเหตุให้มีการลดศักย์ไฟฟ้าที่เป็นบวกด้านโพรงลำไส้ และอาจจะทำให้เกิดการ precipitation ของ Mg^{2+} กับ สารตัวอื่น เป็นผลรบกวนการดูดซึม Mg^{2+} ผ่านช่องระหว่างเซลล์เยื่อบุลำไส้ ดังแสดงในรูปที่ 13



รูปที่ 13. แสดงผลวิจัยที่สอดคล้องกับสมมติฐานงานวิจัย

ภาวะ apical acidity สามารถยับยั้งการออกฤทธิ์ของ omeprazole และสารกระตุ้น P2Y2 receptor ได้ โดยเพิ่มการดูดซึมผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์ ทั้งนี้ apical acidity เพิ่ม $P_{\text{Na}}/P_{\text{Cl}}$ และลด P_{Cl} อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ บ่งชี้ว่า apical acidity มีฤทธิ์เพิ่ม paracellular cation selectivity และลด paracellular anion selectivity สรุปได้ว่า apical acidity ส่งเสริมการขนส่งประจุบวกผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์

สรุปและเสนอแนะเกี่ยวกับการวิจัยในขั้นตอนต่อไป ตลอดจนประโยชน์ในทางประยุกต์ของผลการวิจัยที่ได้

ผลการวิจัยของโครงการวิจัยนี้สรุปได้ว่า omeprazole ส่งเสริมการแสดงออกและการทำงานของ P2Y purinoceptors การกระตุ้นการทำงานของ P2Y2 จะส่งเสริมการขับ HCO_3^- ในเซลล์เยื่อบุลำไส้ผ่านทาง intracellular Ca^{2+} - CFTR dependent mechanism เป็นเหตุให้มีการลดศักย์ไฟฟ้าที่เป็นบวกด้านโพรงลำไส้ และอาจจะทำให้เกิดการ precipitation ของ Mg^{2+} กับสารตัวอื่น เป็นผลรบกวนการดูดซึม Mg^{2+} ผ่านช่องระหว่างเซลล์เยื่อบุลำไส้ ภาวะ apical acidity สามารถยับยั้งการออกฤทธิ์ของ omeprazole และสารกระตุ้น P2Y2 receptor ได้ โดยเพิ่มการดูดซึมผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์ ทั้งนี้ apical acidity เพิ่ม $P_{\text{Na}}/P_{\text{Cl}}$ และลด P_{Cl} อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ บ่งชี้ว่า apical acidity มีฤทธิ์เพิ่ม paracellular cation selectivity และลด paracellular anion selectivity สรุปได้ว่า apical acidity ส่งเสริมการขนส่งประจุบวกผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์

ควรมีการวิจัยอย่างต่อเนื่องโดยเฉพาะในสัตว์ทดลอง เนื่องจากการศึกษาแบบ in vitro มีข้อมูลมากพอจะต่อยอดสู่การศึกษาในสัตว์ทดลอง และการศึกษาในสัตว์ทดลองจะช่วยให้สามารถศึกษาอิทธิพลของ omeprazole ต่อสมดุล Mg^{2+} ในระดับร่างกายได้

ผลผลิต (Output)

ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการทั้งในระดับชาติ และนานาชาติ

Thongon N, Penguy J, Kulwong S, Khongmueang K, Thongma M. Omeprazole suppressed plasma magnesium level and duodenal magnesium absorption in male Sprague-Dawley rats. Pflugers Arch Eur J Physiol 2016 (3rd Revised).

ส่วนประกอบตอนท้าย

รายงานการเงิน

เลขที่โครงการระบบบริหารงานวิจัย 2559A10802150 สัญญาเลขที่ 33/2559

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559

มหาวิทยาลัยบูรพา

ชื่อโครงการ กลไกระดับเซลล์ของสภาวะกรดด้านโพรงลำไส้ลดการออกฤทธิ์ของโอมิพราโซลในการยับยั้งการดูดซึม
แมกนีเซียมผ่านแผ่นเซลล์เยื่อลำไส้เพาะเลี้ยงคาโค-2

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน รศ.ดร. ณรงค์ฤทธิ์ ทองอ่อน

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม 2558 ถึงวันที่ 30 กันยายน 2559

ระยะเวลาดำเนินการ...1...ปี เดือน ตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม 2558

รายรับ

จำนวนเงินที่ได้รับ

งวดที่ 1 (50%)	320,650 บาท	เมื่อ 15 ธันวาคม 2558
งวดที่ 2 (40%)	256,520 บาท	เมื่อ 12 มิถุนายน 2559
งวดที่ 3 (10%)	64,130 บาท	เมื่อ รอเบิกจ่าย
รวม	641,300 บาท	

รายจ่าย

รายการ	งบประมาณที่ตั้งไว้	งบประมาณที่ใช้จริง	จำนวนเงินคงเหลือ/เกิน
1. ค่าตอบแทน	57,000	57,000	-
2. ค่าจ้าง - ค่าจ้างเหมาตรวจวัด ปริมาณ HCO_3^- - ค่าตอบแทนผู้ช่วยวิจัย	113,000	113,000	-
3. ค่าวัสดุ	407,170	407,170	-
4. ค่าใช้สอย	-	-	-
5. ค่าครุภัณฑ์	-	-	-
6. ค่าใช้จ่ายอื่น ๆ - ค่าสาธารณูปโภค	64,130	64,130	-
รวม	641,300	641,300	-

(.....)

ลงนามหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน

บรรณานุกรม (Bibliography)

1. Abrahamse SL, Bindels RJ, van Os CH. The colon carcinoma cell line Caco-2 contains an H⁺/K⁺-ATPase that contributes to intracellular pH regulation. *Pflugers Arch* 1992;421(6):591-597.
2. Akiba Y, Mizumori M, Guth PH, Engel E, Kaunitz JD. Duodenal brush border intestinal alkaline phosphatase activity affects bicarbonate secretion in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2007;293(6):G1223-G1233
3. Artursson P, Karlsson J. Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1991;175(3):880-885.
4. Broeren MA, Geerdink EA, Vader HL, van den Wall Bake AW. Hypomagnesemia induced by several proton-pump inhibitors. *Ann Intern Med* 2009;151:755-756.
5. Boparai V, Rajagopalan J, Triadafilopoulos G. Guide to the use of proton pump inhibitors in adult patients. *Drugs* 2008;68(7):925-947.
6. Chantret I, Barbat A, Dussaulx E, Brattain MG, Zweibaum A. Epithelial polarity, villin expression, and enterocytic differentiation of cultured human colon carcinoma cells: a survey of twenty cell lines. *Cancer Res* 1988;48(7):1936-1942.
7. Charoenphandhu N, Nakkrasae L, Kraidith K, Teerapornpuntakit J, Thongchote K, Thongon N, Krishnamra N. Two-step stimulation of intestinal Ca²⁺ absorption during lactation by long-term prolactin (PRL) exposure and suckling-induced PRL surge. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009; 297(3): E609-E619.
8. Cundy T, Dissanayake A. Severe hypomagnesaemia in long-term users of proton-pump inhibitors. *Clin Endocrinol* 2008; 69, 338–341.
9. Dong X, Ko KH, Chow J, Tuo B, Barrett KE, Dong H. Expression of acid-sensing ion channels in intestinal epithelial cells and their role in the regulation of duodenal mucosal bicarbonate secretion. *Acta Physiol* 2011; 201:97–107.
10. Dong X, Smoll EJ, Ko KH, Lee J, Chow JY, Kim HD, Insel PA, Dong H. P2Y receptors mediate Ca²⁺ signaling in duodenocytes and contribute to duodenal mucosal bicarbonate secretion. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2009;296(2):G424-G432
11. Durlach J. Magnesium depletion and pathogenesis of Alzheimer's disease. *Magnes Res* 1990; 3(3): 217-218.
12. Ekmekcioglu C, Ekmekcioglu A, Marktl W. Magnesium transport from aqueous solutions across Caco-2 cells--an experimental model for intestinal bioavailability studies. Physiological considerations and recommendations. *Magnes Res* 2000; 13(2): 93-102.
13. Epstein M, McGrath S, Law F. Proton-pump inhibitors and hypomagnesemichypoparathyroidism. *N Engl J Med* 2006; 355(17): 1834-1836.

14. Fine KD, Santa Ana CA, Porter JL, Fordtran JS. Intestinal absorption of magnesium from food and supplements. *J Clin Invest* 1991. 88(2): 396-402.
15. Fujita H, Chiba H, Yokozaki H, Sakai N, Sugimoto K, Wada T, Kojima T, Yamashita T, Sawada N. Differential expression and subcellular localization of claudin-7, -8, -12, -13, and -15 along the mouse intestine. *J Histochem Cytochem* 2006;54:933-944
16. Fujita H, Sugimoto K, Inatomi S, Maeda T, Osanai M, Uchiyama Y, Yamamoto Y, Wada T, Kojima T, Yokozaki H, Yamashita T, Kato S, Sawada N, Chiba H. Tight junction proteins claudin-2 and -12 are critical for vitamin D-dependent Ca^{2+} absorption between enterocytes. *Mol Biol Cell* 2008;19:1912-1921.
17. Furuse M, Tsukita S. Claudins in occluding junctions of humans and flies. *Trends Cell Biol* 2006; 16(4): 181-188.
18. Grubbs RD. Intracellular magnesium and magnesium buffering. *Biometals* 2002; 15(3): 251-259.
19. Hardwick LL, Jones MR, Brautbar N, Lee DB. Magnesium absorption: mechanisms and the influence of vitamin D, calcium and phosphate. *J Nutr* 1991;121(1):13-23
20. Heijnen AM, Brink EJ, Lemmens AG, Beynen AC. Ileal pH and apparent absorption of magnesium in rats fed on diets containing either lactose or lactulose. *Br J Nutr* 1993;70(3):747-756.
21. Hidalgo IJ, Raub TJ, Borchardt RT. Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology* 1989; 96(3): 736-749.
22. Hoenderop JG, Bindels RJ. Calciotropic and magnesiotropic TRP channels. *Physiology* 2008; 23: 32-40.
23. Holzer P. Taste receptors in the gastrointestinal tract. V. Acid-sensing in the gastrointestinal tract. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007; 292:G699-G705.
24. Holzer P. Acid-sensitive ion channels and receptors. *Handb Exp Pharmacol* 2009; 194:283-332.
25. Hoorn EJ, van der Hoek J, de Man RA, Kuipers EJ, Bolwerk C, Zietse R. A case series of proton pump inhibitor-induced hypomagnesemia. *Am J Kidney Dis* 2010;56:112-116.
26. Hou J, Renigunta A, Konrad M, Gomes AS, Schneeberger EE, Pual DL, Waldegger S, Goodenough DA. Claudin-16 and claudin-19 interact and form a cation-selective tight junction complex. *J Clin Invest* 2008; 118(2): 619-628.
27. Ikari A, Okude C, Sawada H, Sasaki Y, Yamazaki Y, Sugatani J, Degawa M, Miwa M. Activation of a polyvalent cation-sensing receptor decreases magnesium transport via claudin-16. *Biochim Biophys Acta*. 2008; 1778(1):283-290.

28. Konrad M, Schlingmann KP, Gudermann T. Insights into the molecular nature of magnesium homeostasis. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004; 286(4): F599-F605.
29. Krause G, Winkler L, Mueller SL, Haseloff RF, Piontek J, Blasig IE. Structure and function of claudins. *Biochim Biophys Acta* 2008;1778:631-645
30. Kuipers MT, Thang HD, Arntzenius AB. Hypomagnesaemia due to use of proton pump inhibitors--a review. *Neth J Med* 2009;67:169-172
31. Leipziger J. Control of epithelial transport via luminal P2 receptors. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2003;284(3):F419-32
32. Lennernas H, Palm K, Fagerholm U, Artursson P. Comparison between active and passive drug transport in human intestinal epithelial (Caco-2) cells in vitro and human jejunum in vivo. *Intl J Pharm* 1996; 127: 103-107.
33. Macek J, Klíma J, Ptáček P. Rapid determination of omeprazole in human plasma by protein precipitation and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2007; 852(1-2): 282-287.
34. Mackay JD, Bladon PT. Hypomagnesaemia due to proton-pump inhibitor therapy: a clinical case series. *QJM* 2010;103(6):387-395
35. McCarthy JM, Kumar R. Divalent cation metabolism: Magnesium, In: Glasscock RJ, Cohen AH, Grunfeld JP, eds. *The Schrier Atlas of Diseases of the Kidney*. Philadelphia: Current Medicine Inc. 1999: 4.1-4.12.
36. Mertz-Nielsen A, Hillingsø J, Bukhave K, Rask-Madsen J. Omeprazole promotes proximal duodenal mucosal bicarbonate secretion in humans. *Gut* 1996; 38:6–10.
37. Mizumori M, Ham M, Guth PH, Engel E, Kaunitz JD, Akiba Y. Intestinal alkaline phosphatase regulates protective surface microclimate pH in rat duodenum. *J Physiol* 2009;587(Pt 14):3651-63
38. Nicholson C, Tao L. Hindered diffusion of high molecular weight compounds in brain extracellular microenvironment measured with integrative optical imaging. *Biophys J* 1993; 65(6): 2277-2290.
39. Nugent SG, Kumar D, Rampton DS, Evans DF. Intestinal luminal pH in inflammatory bowel disease: possible determinants and implications for therapy with aminosalicylates and other drugs. *Gut* 2001;48:571-577.
40. Olbe L, Carlsson E, Lindberg P. A proton-pump inhibitor expedition: the case histories of omeprazole and esomeprazole. *Nat Rev Drug Discov* 2003; 2(2): 132-139.
41. Pinto M, Robin-Leon S, Appay MD, Kedinger M, Triadow N, Dussaulx E. Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. *Biol Cell* 1983; 47: 323–330.

42. Quamme GA, de Rouffignac C. Epithelial magnesium transport and regulation by the kidney. *Front Biosci* 2000; 5: D694-D711.
43. Quamme GA. Recent developments in intestinal magnesium absorption. *Curr Opin Gastroenterol* 2008; 24(2): 230-235.
44. Romani A. Regulation of magnesium homeostasis and transport in mammalian cells. *Arch Biochem Biophys* 2007; 458(1): 90-102.
45. Rude RK. Magnesium deficiency: a cause of heterogeneous disease in humans. *J Bone Miner Res* 1998; 13(4): 749-758.
46. Rude RK, Gruber HE. Magnesium deficiency and osteoporosis: animal and human observations. *J Nutr Biochem* 2004; 15(12): 710-716.
47. Schlingmann KP, Waldegger S, Konrad M, Chubanov V, Gudermann T. TRPM6 and TRPM7-- Gatekeepers of human magnesium metabolism. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1772(8): 813-821.
48. Shabajee N, Lamb EJ, Sturgess I, Sumathipala RW. Omeprazole and refractory hypomagnesaemia. *BMJ* 2008;337:a425
49. Tang VW, Goodenough DA. Paracellular ion channel at the tight junction. *Biophys J* 2003; 84(3):1660-1673.
50. Thongon N. Hypomagnesemia from long-term omeprazole administration. *Burapha Sci J* 2010; 15(2):116-121.
51. Thongon N, Krishnamra N. Omeprazole decreases magnesium transport across Caco-2 monolayers. *World J Gastroenterol* 2011;17:1574-1583
52. Thongon N, Krishnamra N. Apical acidity decreases inhibitory effect of omeprazole on Mg²⁺ absorption and claudin-7 and -12 expression in Caco-2 monolayers. *Exp Mol Med* 2012; 44(11): 684-693.
53. Thongon N, Ketkeaw P, Nuekchob C. The roles of acid-sensing ion channel 1a and ovarian cancer G protein-coupled receptor 1 on passive Mg²⁺ transport across intestinal epithelium-like Caco-2 monolayers. *J Physiol Sci* 2014; 64(2):129-139.
54. Touyz RM. Role of magnesium in the pathogenesis of hypertension. *Mol Aspects Med* 2003; 24(1-3): 107-136.
55. Van Gaal L, Delvigne C, Vandewoude M, Cogge E, Vaneerdeweg W, Schoofs E, De Leeuw L. Evaluation of magnesium before and after jejuno-ileal versus gastric bypass surgery for morbid obesity. *J Am Coll Nutr* 1987; 6(5): 397-400.
56. Van Itallie CM, Holmes J, Bridges A, Gookin JL, Coccaro MR, Protor W, Colegio OR, Anderson JM. The density of small cell types and is increased by expression of claudin-2. *J Cell Sci* 2008; 121: 298-305.
57. Vormann J. Magnesium: nutrition and metabolism. *Mol Aspects Med* 2003; 24(1-3): 27-37.

58. Wen H, Watry DD, Marcondes MC, Fox HS. Selective decrease in paracellular conductance of tight junctions: role of the first extracellular domain of claudin-5. *Mol Cell Biol* 2004;24(19):8408-8417
59. William JH1, Nelson R, Hayman N, Mukamal KJ, Danziger J. Proton-Pump Inhibitor use is associated with lower Urinary Magnesium Excretion. *Nephrology* 2014; doi: 10.1111/nep.12330.
60. Wolff SC, Qi AD, Harden TK, Nicholas RA. Polarized expression of human P2Y receptors in epithelial cells from kidney, lung, and colon. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2005;288(3):C624-C632
61. Xu Y, Casey G. Identification of human OGR1, a novel G protein-coupled receptor that maps to chromosome 14. *Genomics* 1996; 35:397–402
62. Yee S. In vitro permeability across Caco-2 (colonic) can predict in vivo (small intestine) absorption in man: fact or myth. *Pharm Res* 1997; 14(6): 763-766.
63. Yoshioka M, Erickson RH, Matsumoto H, Gum E, Kim ES. Expression of dipeptidylaminopeptidase IV during enterocytic differentiation of human colon cancer (Caco-2) cells. *Int J Cancer* 1991; 47(6): 16-21

ภาคผนวก (Appendix)

Thongon N, Penguy J, Kulwong S, Khongmueang K, Thongma M. Omeprazole suppressed plasma magnesium level and duodenal magnesium absorption in male Sprague-Dawley rats. *Pflugers Arch Eur J Physiol* 2016 (3rd Revised).

1
2
3 **Omeprazole suppressed plasma magnesium level and duodenal magnesium**
4
5 **absorption in male Sprague-Dawley rats**
6
7
8
9

10
11 **Narongrit Thongon, Jirawat Penguy, Sasikan Kulwong, Kanyanat Khongmueang,**
12
13 **Matthana Thongma**
14
15
16
17

18
19 Division of Physiology, Department of Biomedical Sciences, Faculty of Allied Health Sciences,
20
21 Burapha University, Chonburi, Thailand
22
23
24
25

26 **Corresponding author:** Narongrit Thongon, Ph.D.,
27

28 Division of Physiology, Department of Biomedical Sciences,
29
30 Faculty of Allied Health Sciences, Burapha University,
31
32 169 Long-Hard Bangsaen Rd., Saensook, Muang,
33
34 Chonburi 20131, Thailand.
35
36

37 Email; narongritt@buu.ac.th
38

39 Tel. & Fax.: +66-3-839-3497
40
41
42
43
44

45 **Author contributions:** Thongon N designed and performed experiments, analyzed and
46
47 interpreted the results, wrote and edited the manuscript. Penguy J, Kulwong S, Khongmueang K,
48
49 and Thongma M performed experiments.
50
51
52
53
54

55 **Conflict of interest statement:** The authors declare no conflicts of interest.
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Abstract

1
2
3 Hypomagnesemia is the most concerned side effect of proton pump inhibitors (PPIs) in
4 chronic users. However, the mechanism of PPIs-induced systemic Mg^{2+} deficit is currently
5 unclear. The present study aimed to elucidate the direct effect of short-term and long-term PPIs
6 administrations on whole body Mg^{2+} homeostasis and duodenal Mg^{2+} absorption in rats. Mg^{2+}
7 homeostasis was studied by determining the serum Mg^{2+} level, urine and fecal Mg^{2+} excretions,
8 and bone and muscle Mg^{2+} contents. Duodenal Mg^{2+} absorption as well as paracellular charge
9 selectivity were studied. Our result showed that gastric and duodenal pH markedly increased in
10 omeprazole-treated rats. Omeprazole significantly suppressed plasma Mg^{2+} level, urinary Mg^{2+}
11 excretion, bone and muscle Mg^{2+} content. Thus, omeprazole induced systemic Mg^{2+} deficiency.
12 By using Ussing chamber techniques, it was shown that omeprazole markedly suppressed
13 duodenal Mg^{2+} channel-driven and Mg^{2+} channel-independent Mg^{2+} absorptions and cation
14 selectivity. Inhibitors of mucosal HCO_3^- secretion significantly increased duodenal Mg^{2+}
15 absorption in omeprazole-treated rats. We therefore hypothesized that secreted HCO_3^- in
16 duodenum decreased luminal proton, this impeded duodenal Mg^{2+} absorption. Higher plasma
17 total 25-OH vitamin D, diuresis, and urine PO_4^{3-} were also demonstrated in hypomagnesemic
18 rats. As a compensatory mechanism for systemic Mg^{2+} deficiency, the expressions of duodenal
19 transient receptor potential melastatin 6 (TRPM6), cyclin M4 (CNNM4), claudin (Cldn)-2,
20 Cldn-7, Cldn-12, and Cldn-15 proteins were enhanced in omeprazole-treated rats. Our findings
21 support the potential role of duodenum on the regulation of Mg^{2+} homeostasis.
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50

51 **Keywords:** hypomagnesemia, intestinal Mg^{2+} absorption, Mg^{2+} homeostasis, proton pump
52 inhibitors, Ussing chamber
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Introduction

1
2
3 Magnesium (Mg^{2+}) is an essential co-factor or activator of at least 800 enzymes which
4 are involved in numerous cellular functions, i.e., energy metabolism, cell cycle, and membrane
5 transport. Mg^{2+} deficiency has been implicated in several diseases, e.g., Parkinson's disease,
6
7 asthma, hypertension, and osteoporosis [9, 41]. Therefore, plasma Mg^{2+} level is tightly regulated
8
9 within a narrow range by collaborative actions of the intestinal absorption, renal excretion, bone
10 and muscle storage. Parathyroid hormone (PTH) and vitamin D had been reported to regulate
11
12 plasma Mg^{2+} level [25, 46]. The bulk of intestinal Mg^{2+} absorption, approximately 90%, occurs
13
14 through paracellular passive mechanism, whereas transcellular active Mg^{2+} absorption plays an
15
16 important role during low dietary Mg^{2+} intake [32]. It has been previously proposed that small
17
18 intestine absorbs Mg^{2+} exclusively through paracellular route, but transcellular Mg^{2+} uptake
19
20 exists exclusively in colon [9, 24]. While renal tubular Mg^{2+} handling is well documented [9,
21
22 46], cellular mechanism and regulatory factor of intestinal Mg^{2+} absorption are largely unknown.

23
24
25
26
27
28
29
30
31
32 Acid peptic disorders are the result from either excessive gastric acid secretion or
33
34 diminished mucosal defense that affects millions people worldwide [28]. The most effective
35
36 therapeutic agents for these disorders is proton pump inhibitors (PPIs), which are the fifth best-
37
38 selling drug that has been taken by millions of chronic users worldwide [28, 31]. However, since
39
40 2006, there is a growing body of evidence indicating that PPIs-induced hypomagnesemia (PPIH)
41
42 is a serious side effect of PPIs in chronic users [6, 7, 11, 26, 39]. The mechanism of PPIs
43
44 induced systemic Mg^{2+} deficit is currently unclear. Previous reports suggested that PPIH might
45
46 be due to chronic suppression of intestinal Mg^{2+} absorption and severe depletion of body Mg^{2+}
47
48 storage pool [6, 7, 11, 39]. While oral Mg^{2+} failed to normalized plasma Mg^{2+} level, intravenous
49
50 Mg^{2+} supplement rapidly cured hypomagnesemia [6, 11, 39]. In addition, hypomagnesemia was
51
52 rapidly resolved when PPIs was discontinued, and then recurred again within 1–2 wk if PPIs
53
54 was re-prescribed [6, 11]. These data suggested PPIs rapidly suppressed intestinal Mg^{2+}
55
56 absorption. However, short-term omeprazole administration did not affect intestinal Mg^{2+}
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 absorption in human [36]. There was no evidence of urinary Mg^{2+} wasting in those PPIH
2 patients [6, 7, 11, 26, 39]. On the other hand, a large-scale clinical investigation reported that
3 PPIH was restricted to patients taking diuretics, i.e., loop and thiazide diuretics [8]. Since these
4 diuretics could suppress Mg^{2+} reabsorption [3], renal Mg^{2+} wasting probably involved in the
5 development of PPIH.
6
7
8
9

10
11
12 Recent *in vivo* studies proposed that PPIs mainly affected colonic Mg^{2+} handling by
13 inducing magnesiotropic genes expressions in mice colon [17, 24]. However, the effect of PPIs
14 on Mg^{2+} homeostasis was still controversial. Hess and colleagues [17] demonstrated that 20
15 mg/kg omeprazole treatment for 14 days suppressed serum Mg^{2+} level with normal urinary and
16 fecal Mg^{2+} excretions in C57BL/J6 mice. On the other hand, Lameris et al. [24] reported that
17 dietary Mg^{2+} restriction, but not 20 mg/kg omeprazole administration for 28 days, suppressed
18 serum Mg^{2+} level in C57BL/J6 mice. Dietary inulin, which stimulated colonic Mg^{2+} absorption
19 [34], could not normalized plasma Mg^{2+} level in PPIH mice [17]. Therefore, large intestine may
20 not be a suitable intestinal segment that should be modulated to counteract PPIH. On the other
21 hand, previous *in vitro* studies proposed that PPIs impeded Mg^{2+} absorption in small intestine
22 [43–45]. Mertz-Nielsen et al. [29] reported that omeprazole significantly enhanced duodenal
23 HCO_3^- secretion in healthy subjects. Since omeprazole suppressed pancreatic secretion [49],
24 thus it specifically induced duodenal HCO_3^- secretion. Previous study reported that omeprazole
25 markedly enhanced apical HCO_3^- secretion, decreased apical proton, and subsequently
26 suppressed passive Mg^{2+} absorption [44, 45]. However, the effect of PPIs on duodenal Mg^{2+}
27 absorption remains unknown.
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50

51 In the present study, we aimed to elucidate the direct effect of short-term (4 wk) and
52 long-term (24 wk) omeprazole-treatments on whole-body Mg^{2+} homeostasis in male Sprague-
53 Dawley rats by determining serum Mg^{2+} level, urine and fecal Mg^{2+} excretions, and bone and
54 muscle Mg^{2+} contents. Plasma Ca^{2+} , PO_4^{3-} , PTH, and total 25-OH vitamin D, as well as urine
55 Ca^{2+} and PO_4^{3-} were also determined. Duodenal total, Mg^{2+} channel-driven transcellular, and
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 Mg²⁺ channel-independent paracellular Mg²⁺ absorptions, as well as paracellular charge
2 selectivity, were studied. The involvement of mucosal HCO₃⁻ secretion on omeprazole-affected
3
4 duodenal Mg²⁺ absorption was also examined. The expressions of duodenal TRPM6, cyclin M4
5 (CNNM4), Cldn-2, -7, -12, and -15 of omeprazole-treated rats were also elucidated. The
6
7 ultrastructure of duodenum and head of femurs were observed.
8
9

14 **Materials and methods**

17 **Animals**

20 This study was performed in strict compliance with the Animal for Scientific Purposes
21 Act of Thailand and in accordance with Ethical Principles and Guidelines for the Use of
22 Animals for Scientific Purposes, National Research Council of Thailand. All experimental
23 procedures were approved by the Ethics Committee on Animal Experiment of Burapha
24 University, Thailand. Male Sprague-Dawley rats (9 wk old, weighting 250-350 g) were
25 purchased from the National Laboratory Animal Centre, Mahidol University, Thailand. The
26 animals were randomly allocated into three experimental groups, i.e., control, 4 wk-omeprazole
27 treatment, and 24 wk-omeprazole treatment. They were acclimatized for 7 days before starting
28 of the experiments. They were housed in a temperature-, humidity-, and light-controlled room
29 with standard pellet chow containing 0.23% wt/wt magnesium, 1.0% wt/wt calcium, 0.9%
30 phosphorus, and 4,000 IU/kg vitamin D (CP, Bangkok, Thailand) and reverse osmosis water
31 given ad libitum. The health, body weight, and food intake were monitored and recorded daily.
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50

51 **Experimental design**

54 In the present study we decided to use subcutaneous omeprazole injection that safely and
55 effectively inhibited gastric acid secretion in rat [21] and human [2]. The first series of
56 experiment aimed to elucidate the efficacy of subcutaneous omeprazole (20 mg/kg: Ocid[®] IV;
57 Zydus Cadila, India) and oral gavage omeprazole (20 mg/kg: Losec[®]; AstraZeneca, Thailand)
58
59
60
61
62
63
64
65

1 administrations on gastric acid suppression. The pellet chow were removed 4 hr before and then
2 retrieved 30 min after oral gavage or subcutaneous omeprazole administration. At 2 hr and 24 hr
3
4 after administration, stomach and duodenum were removed under thiopental anesthesia (70
5 mg/kg; Anesthal, Jagsonpal Pharmaceuticals Ltd, India). Stomach and duodenum pH were
6
7 determined using diagnostic test strips (MColorpHast™ pH-Indicator Strips, Merck-Millipore,
8
9 German).

10
11
12 The second series of experiment aimed to study the effect of short-term and long-term
13 omeprazole-treatments on Mg^{2+} homeostasis in the rats. Control and 24 wk-omeprazole-treated
14 rats were respectively received daily subcutaneous sham or subcutaneous omeprazole (20
15 mg/kg) injection for 24 wk. In the 4 wk-omeprazole-treatment group, rats received subcutaneous
16 sham injection daily for 20 wk and subsequently followed by subcutaneous omeprazole injection
17 for 4 wk. For urine and feces collections, rats were housed in metabolic cages for 24 hr. The
18 health of all rats were checked daily throughout 24 wk of injection. At the experiment end point,
19 the rats were anesthetized with thiopental, blood were collected from left ventricle, and the rats
20 were subsequently sacrificed. Duodenum, left and right femurs, and left soleus muscle were
21 collected.

41 Analytical procedures

42
43 Plasma and urine Mg^{2+} , Ca^{2+} , and PO_4^{3-} concentrations were respectively determined by
44 xylydyl blue II, asenazo III, and phosphomolybdate method, and analyzed by an automate
45 clinical chemistry analyzer (ILab Taurus; Instrumentation Laboratory, Bedford, MA, USA).
46
47 Total serum 25-OH vitamin D level was determined by Tosoh™ Bioscience ST AIA-PACK 25-
48 OH vitamin D and an automate Tosoh AIA-900 analyzer (Tosoh Bioscience, Inc., South San
49 Francisco, CA, USA). Plasma PTH level was determined by ARCHITECT Intact PTH and
50 ARCHITECT i2000sr automatic immunoassay analyzer (Abbott Diagnostics, Abbott Park, IL,
51 USA). Soleus muscles were chopped and digested with nitric acid (Sigma, St. Louis, MO,
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 USA). Left femurs and feces were dried, ashed, and subsequently extracted with nitric acid
2 (Sigma-Aldrich). Muscle, bone, and fecal Mg^{2+} content were determined by an atomic
3 absorption spectrophotometer (Shimadzu, Tokyo, Japan).
4
5
6
7
8
9

10 **Epithelial electrical parameter measurement and dilution potential experiment**

11 Rat duodenum was cut longitudinally, rinsed gently, mounted in a Ussing chamber (World
12 Precision Instrument, Sarasota, FL, USA), and bathed on both sides with normal bathing
13 solution containing (in mmol/mL) 118 NaCl, 4.7 KCl, 1.1 $MgCl_2$, 1.25 $CaCl_2$, 23 $NaHCO_3$, 12
14 D-glucose, 2.5 L-glutamine, and 2 D-mannitol. The solution was maintained at 37 °C, pH of 7.4,
15 osmolality of 290-295 mmol/kg H_2O , and continuously gassed with 5% CO_2 in 95% O_2 .
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Transepithelial potential difference (PD) and short-circuits current (I_{sc}) were determined by Ag/AgCl electrodes and an epithelial voltage/current clamp apparatus (model ECV-4000; World Precision Instrument) as previously described [42]. Transepithelial resistance (TER) was calculated from PD and I_{sc} by Ohm's law.

To determine paracellular charge selectivity by measuring absolute sodium permeability (P_{Na}) and chloride permeability P_{Cl} and relative P_{Na}/P_{Cl} [16], dilution potential experiment was performed by modified method of Thongon et al. [42]. In brief, duodenal tissue was equilibrated for 10 min within Ussing chamber in a normal bathing solution containing 145 mmol/l NaCl before the apical solution was replaced with 72.5 mmol/l NaCl-containing solution. Difference between the PD before and after fluid replacement (i.e., dilution potential) were recorded. The P_{Na}/P_{Cl} was calculated by using the Goldman-Hodgkin-Katz equation, whereas P_{Na} and P_{Cl} were calculated by using Kimizuka-Koketsu equations.

56 **Magnesium flux measurement**

58 The duodenum (10 cm) of each rat was dissected into 4 pieces, which then were rapidly
59 mounted onto 4 individual modified Ussing chamber setups with an exposed surface area of
60
61
62
63
64
65

0.69 cm². The tissues were equilibrated for 10 min as mentioned above. To study total Mg²⁺ flux the apical solution of one Ussing chamber setup was substituted with Mg-bathing solution containing (in mmol/l) 40 MgCl₂, 2.5 CaCl₂, 4.5 KCl, 12 D-glucose, 2.5 L-glutamine, 115 mannitol, and 10 HEPES pH 7.4. While, the basolateral solution was substituted with Mg-free bathing solution containing (in mmol/l) 1.25 CaCl₂, 4.5 KCl, 12 D-glucose, 2.5 L-glutamine, 250 D-mannitol, and 10 HEPES pH 7.4. To investigate the Mg²⁺ channel-independent Mg²⁺ transport, mucosal sites of duodenal tissues in other setups were pre-incubated for 10 min with Co(III)hexaammine (1 mmol/l; Sigma), ruthenium red (20 μmol/l; Sigma), or Co(III)hexaammine+ruthenium red. The Mg²⁺ channel blocker Co(III)hexaammine, which is competing the Mg²⁺-hexahydrate molecules, and noncompetitive pan specific TRP channel inhibitor ruthenium red had been reported to completely inhibit epithelial Mg²⁺ influx [47, 50]. Suppression of mucosal Mg²⁺ influx in enterocyte epithelium should impeded transcellular Mg²⁺ absorption. After pretreatment the apical and basolateral solutions were substituted with Mg-bathing solution and Mg-free bathing solution, respectively. At 30, 60, and 120 min after solution replacements, 100 μl solution was collected from the basolateral side, as well as from apical side. The Mg²⁺ concentration and the rate Mg²⁺ flux were determined by the method of Thongon and Krishnanra [43]. The difference between the rate of total Mg²⁺ transport and Mg²⁺ channel-independent Mg²⁺ transport was calculated to be the rate of Mg²⁺ channel-driven Mg²⁺ transport.

To study the involvement of basal duodenal HCO₃⁻ secretion on omeprazole-affected Mg²⁺ transport, mucosal site of duodenal tissues were pre-incubated for 10 min with 500 μmol/l 4,4'-Diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonic acid (DIDS; Sigma) or 50 μmol/l N-(2-Naphthalenyl)-((3,5-dibromo-2,4-dihydroxyphenyl)methylene)glycine hydrazide (GlyH-101; Calbiochem, San Diego, CA, USA). After inhibitor pre-incubations, Mg²⁺ flux study was performed as mention above.

Western blot analysis

1
2 The duodenal segment was cut longitudinally to expose the mucosa. Duodenal epithelial
3
4 cells were collected by scraping the mucosal surface with an ice-cold glass slide, and lysed in
5
6 Piece[®] Ripa Buffer (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL, USA) with 10% v/v protease
7
8 inhibitor cocktail (Sigma). The lysates were sonicated, centrifuged at 12,000 g for 15 min, and
9
10 inhibited cocktail (Sigma). The lysates were sonicated, centrifuged at 12,000 g for 15 min, and
11
12 then heated for 5 min at 95°C. Proteins (50 µg) or Cruz Marker[™] Molecular Weight Standards
13
14 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) were loaded and separated on SDS-PAGE
15
16 gel, then transferred to a polyvinylidene difluoride membrane (PVDF; Amersham,
17
18 Buckinghamshire,UK). Membranes were blocked with 5% nonfat milk overnight at 4°C and
19
20 probed overnight at 4°C with 1:1,000 primary antibodies (Santa Cruz Biotechnology) raised
21
22 against CNNM4 (sc-68437), Cldn-2 (sc-55617), Cldn-7 (sc-33532), Cldn-12 (sc-98608), Cldn-
23
24 15 (sc-25712), and TRPM6 (sc-98695). Membranes were also re probed with 1:5,000 anti-β-
25
26 actin monoclonal antibodies (Santa Cruz Biotechnology). Subsequently, membrane were
27
28 incubated with 1:10,000 HRP-conjugated secondary antibodies (Santa Cruz Biotechnology) for
29
30 2 hr at 25°C, visualized by Thermo Scientific SuperSignal[®] West Pico Substrate (Thermo Fisher
31
32 Scientific Inc.) and captured on CL-XPosure Film (Thermo Fisher Scientific Inc.).
33
34 Densitometric analysis was performed using ImageJ for Mac Os X.
35
36
37
38
39
40
41
42
43

Haematoxylin and eosin (H&E) staining and immunohistochemistry analysis

44
45
46 Mouse duodenal tissues were dissected and preserved overnight at 4°C in 4% wt/vol
47
48 paraformaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS) (Sigma-Aldrich). After being dehydrated
49
50 and cleared by graded ethanol and xylene, respectively, they were embedded in paraffin, then
51
52 cut cross-sectionally into 3-µm thick section. The deparaffinized sections were stained with
53
54 haematoxylin and eosin and examined under a light microscope (model BX51; Olympus, Tokyo,
55
56 Japan).
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

For immunohistochemistry analysis, deparaffinized sections were incubated at 37°C for 15 min in Dako proteinase K reagent (Dako North America, CA, USA). Nonspecific bindings were blocked by 10 min Dako Real™ peroxidase blocking reagent (Dako North America). The sections were incubated at 4°C overnight with 1:50 diluted primary antibody against TRPM6 (Santa Cruz Biotechnology). Subsequently, the sections were incubated for 25 min at room temperature with 1:300 HRP-conjugated secondary antibodies (Santa Cruz Biotechnology), followed by a 60-min incubation with EnVision™ Flex DAB + chromogen (Dako North America). For negative controls, the sections were incubated with blocking solution in the absence of primary antibodies. Finally, all sections were counterstained with hematoxylin and examined under a light microscope (Olympus).

Scanning electron microscope (SEM)

Femurs were dried at 85°C for 72 hr in an incubator. Fractured head of femur was coated with an ultra-thin gold layer by a sputter coater (Polaron SC7620; Quorum Technologies Ltd, Kent, UK). Surface structure of the trabeculae of femur was captured using SEM (LEO1450 VP; LEO Electron Microscopy Ltd, Clifton Road, UK).

Statistical analysis

Results were expressed as means \pm SE. Two sets of data were compared using unpaired Student's t-test. One-way analysis of variance (ANOVA) with Dunnett's posttest was used for comparison of multiple sets of data. All data were analyzed by GraphPad Prism for Mac Os (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

Results

Effect of omeprazole administration on gastric and duodenal pH

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

These experiments were performed to demonstrate the effect of 20 mg/kg oral gavage and subcutaneous omeprazole administrations on gastric acid secretion by means of gastric and duodenal pH measurements. After 2 hr of omeprazole administration gastric and duodenal pH of omeprazole-treated rats were significantly higher than that of sham-treated control rats (Fig. 1A, and 1B). Gastric and duodenal pH of omeprazole-treated rats remained higher after 24 hr of the last dose when compared with control rats. These results suggested that omeprazole administration (20 mg/kg, daily) effectively inhibited gastric acid secretion. Therefore, we chose subcutaneous omeprazole injection to treat the rats throughout 24 wk of experiment.

Effect of omeprazole on Mg²⁺ homeostasis

These experiments aimed to observe the effect of short-term and long-term omeprazole treatment on Mg²⁺ homeostasis in the rats. Throughout 24 wk of experiment all rats were healthy and showed equal increase of body weight (Fig. 1C). The mean body weight, food and water intake, and fecal output at last week of experiment of omeprazole-treated groups were not different from those of sham-treated control group (Table 1). However, 24 wk-omeprazole-treated groups showed statistically higher diuresis than control group.

Plasma Mg²⁺ concentration (in mmol/l) of 24 wk-omeprazole-treated group (0.69 ± 0.05), but not 4 wk-omeprazole-treated group (0.93 ± 0.07), was significantly decreased in comparison to sham-treated group (1.12 ± 0.09) (Fig. 2A). The 24 wk-omeprazole-treated rats also had significantly lower 24 hr urinary excretion compared to control rats (Fig. 2B). Fecal Mg²⁺ excretion of all experimental groups did not differ (Fig. 2C). Bone Mg²⁺ contents of 4 wk- and 24 wk-omeprazole-treated groups (126.91 ± 3.79 and 95.03 ± 4.46 mmol/100 g dry weight, respectively) were significantly decreased in comparison to control group (143.71 ± 2.20 mmol/100 g dry weight) (Fig. 2D). Muscle Mg²⁺ content of 24 wk-omeprazole-treated group, but not 4 wk-omeprazole-treated group, was significantly lower than that of control group (Fig.

1 E). These results indicated hypomagnesemia and depletion of Mg^{2+} storage in prolonged
2 omeprazole-treated rats.
3
4
5
6

7 **Effect of omeprazole on plasma total 25-OH vitamin D, PTH, Ca^{2+} , and PO_4^{3-} , as well as**
8 **urine Ca^{2+} and PO_4^{3-} , levels**
9

10
11
12 Since PTH and vitamin D had been reported to regulate plasma Mg^{2+} level [25, 41, 46],
13 plasma 25-OH vitamin D and PTH levels in PPIH rats were determined. As demonstrated in
14 Table 2, total plasma 25-OH vitamin D of 24 wk-omeprazole-treated rats, but not 4 wk-
15 omeprazole-treated rats, was significantly higher than that of control rats. However, plasma PTH
16 level of all experimental groups was not statistically different.
17
18
19
20
21
22
23

24 Plasma Ca^{2+} level of 24 wk-omeprazole-treated rats was significantly lower than that of
25 control rats. Plasma phosphate and urine Ca^{2+} levels were not different among all experimental
26 groups. Urinary phosphate excretion of 24 wk-omeprazole-treated rats significantly higher than
27 that of control rats.
28
29
30
31
32
33

34
35
36 **Omeprazole suppressed duodenal Mg^{2+} absorption**
37

38
39 Intestinal epithelium absorbs Mg^{2+} through transcellular active and paracellular passive
40 mechanisms. Transcellular active Mg^{2+} absorption depends on the activity of apical TRPM6 and
41 basolateral CNNM4 proteins [9]. Paracellular passive Mg^{2+} uptake was modulated by the
42 expression and function of tight junction-associated Cldns [9, 16, 20, 44]. It has been previously
43 showed that mice small intestine absorbed Mg^{2+} through passive, but not active, mechanism
44 [25]. However, TRPM6 and CNNM4 had been identified in small intestine [47, 51]. In the
45 present study we performed immunohistochemical analysis to visualize the expression of
46 TRPM6 in duodenal slices. As illustrated in Fig. 3A, TRPM6 was expressed in the apical
47 membrane of duodenal villous cells. The positive signals of TRPM6 expression was increased in
48 omeprazole-treated duodenum. We also observed the expression of duodenal TRPM6 (Fig. 3B)
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 and CNNM4 proteins (Fig. 3C) by western blot analysis. As expected, the expressions of
2 TRPM6 and CNNM4 were significantly increased in omeprazole-treated groups compared to
3 control group (Fig. 3B, 3C). Therefore, rat duodenum might absorbed Mg^{2+} through both
4 paracellular and transcellular mechanisms.
5
6
7

8
9 These experiments aimed to observe the direct effect of short-term and long-term
10 omeprazole treatments on duodenal Mg^{2+} channel-independent and Mg^{2+} channel-driven Mg^{2+}
11 absorptions. Figure 4 demonstrated the rates of Mg^{2+} absorptions, i.e., total, Mg^{2+} channel-
12 independent, and Mg^{2+} channel-driven Mg^{2+} transport, of sham-treated control (Fig. 4A), 4 wk-
13 (Fig. 4B), and 24 wk-omeprazole-treated groups (Fig. 4C). In the same experimental group Mg^{2+}
14 channel-independent Mg^{2+} transports, as well as Mg^{2+} channel-driven Mg^{2+} transport, upon
15 various inhibitor pretreatments were not statistically different (Fig. 4A–4C). Both 4 wk- and 24
16 wk-omeprazole-treated groups had statistically lower total Mg^{2+} absorption than the control
17 group (Fig. 4D). The Mg^{2+} channel-independent Mg^{2+} transport, which was referred to
18 paracellular Mg^{2+} transport, of 4 wk- and 24 wk-omeprazole-treated groups were statistically
19 lower than that of Co(III)hexaammine-treated control group (Fig. 4E). In addition, Mg^{2+}
20 channel-driven Mg^{2+} transport, which was referred to transcellular Mg^{2+} transport, of 4 wk- and
21 24 wk-omeprazole-treated groups were also statistically lower than that of Co(III)hexaammine-
22 treated control group (Fig. 4E). These results suggested that omeprazole suppressed duodenal
23 paracellular and transcellular Mg^{2+} absorptions.
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45

46 Omeprazole had no effect on duodenal PD of all groups (Table 3). The *I_{sc}* of 24 wk-, but
47 not 4 wk-, omeprazole-treated group was significantly decreased in comparison to control group.
48 On the other hand, 24 wk-omeprazole-treated group had higher TER compared to control group.
49 These results indicated lower net ionic movement across omeprazole-treated duodenum.
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

61 **Omeprazole suppressed duodenal paracellular cation selectivity**

62
63
64
65

1 Since omeprazole impeded duodenal paracellular Mg^{2+} absorption, then, we observed
2 epithelial charge selectivity which modulated paracellular permeability [16, 42, 43]. By using
3 the dilution potential technique, we observed P_{Na} , P_{Cl} , and P_{Na}/P_{Cl} . The results showed that 4
4 wk- and 24 wk-omeprazole-treated rats had significantly lower P_{Na}/P_{Cl} and P_{Na} compared to
5 sham-treated control group (Table 3). The P_{Cl} was equal in all experimental groups. Therefore,
6 omeprazole suppressed duodenal paracellular cation selectivity.
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16

17 **Omeprazole altered ultrastructure of duodenum**

18 From the observation of 108 slides (9 slides per rat, 4 rats per group), we found blunted
19 and shortened duodenal villi in 24 wk-omeprazole-treated rats (Fig 5A–5C). Moreover, villous
20 to crypt (V:C) ratio of 24 wk-omeprazole-treated rats was significantly lower than that of control
21 groups (Fig 5D). Suggested shortened of villi or crypt hyperplasia [38] which was indicated
22 lower absorption or higher secretion.
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33

34 **Contribution of duodenal HCO_3^- secretion on omeprazole-suppressed Mg^{2+} transport**

35 Mertz-Nielsen et al. [29] reported that omeprazole promoted human duodenal HCO_3^-
36 secretion. Previous in vitro study showed that omeprazole enhanced apical basal and HCl-
37 stimulated HCO_3^- secretion which led to a lower Mg^{2+} transport across intestinal-liked Caco-2
38 monolayers [45]. The Cl^-/HCO_3^- exchanger and cystic fibrosis transmembrane conductance
39 regulator (CFTR) in the brush-border membranes of duodenum provide important routes for
40 duodenal HCO_3^- secretion [4]. In this experiment we pre-incubated mucosal site of duodenal
41 tissue with Cl^-/HCO_3^- exchanger inhibitor DIDS and CFTR inhibitor GlyH-101 prior to perform
42 Mg^{2+} transport study in Ussing chamber setups. As demonstrated in Figure 6, DIDS and GlyH-
43 101 had no effect on Mg^{2+} transport in control duodenum. However, both DIDS and GlyH-101
44 significantly increased Mg^{2+} transport in 4 wk- and 24-wk omeprazole treated groups when
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 compared to its corresponding vehicle-treated group. These results indicated that omeprazole
2 impeded duodenal Mg^{2+} absorption due partly to mucosal HCO_3^- secretion.
3
4
5
6

7 **Omeprazole enhanced duodenal Cldn-2, Cldn-7, Cldn-12, and Cldn-15 expressions**

8
9 It is widely accepted that tight junction-associated Cldn protein modulates epithelial
10 paracellular permeability and charge selectivity [16]. Since omeprazole suppressed duodenal
11 paracellular Mg^{2+} absorption and cation selectivity, we further observed the expression of Cldn
12 proteins. Cldn-16 and -19 had been proposed as paracellular channels for Mg^{2+} in kidney [19].
13 However Cldn-16 and -19 were not detected along small intestine [13], suggesting that other
14 Cldns might be involved in paracellular intestinal Mg^{2+} absorption. In the present study we
15 observed the expressions of cation selective Cldn, i.e., Cldn-2, -7, -12, and -15, which were
16 expressed in small intestine [13, 14]. Unexpectedly, the expressions of Cldn-2, -7, -12, and -15
17 were significantly increased in omeprazole-treated groups compared to control group (Fig. 7).
18 These results demonstrated compensatory responds of duodenal epithelium for systemic Mg^{2+}
19 deficit.
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38

39 **Omeprazole altered structure of trabeculae bone**

40
41 In human, chronic PPIs administration led to increased risk of fracture and significant
42 suppression of the trabecular bone density [1, 27]. By using SEM, we investigated the structure
43 of trabeculae bone in the head of femurs of omeprazole-treated rats. The 24 wk-omeprazole-
44 treated rats had thinner and longer trabeculae compared to sham-treated control group (Fig 8).
45
46
47
48
49
50
51 Wider spaces between trabeculae were also observed in omeprazole-treated rats.
52
53
54
55

56 **Discussion**

57
58 There is a growing body of evidence suggesting that severe hypomagnesemia is a side
59 effect of PPIs in chronic users [6–8, 11, 26]. About 18%, 29%, and 61% of PPIH cases,
60
61
62
63
64
65

1 respectively, had PPIs prescription for at least 2, 10, and 5 years [7]. In the present study we
2 found that 24 wk-omeprazole-treated rats had hypomagnesemia. Comparing to human's age,
3 approximately 16.7 rat days equal to 1 human year [33], thus, 168 d omeprazole administration
4 in rats equal to 10 years in human. On the other hand, 28 d omeprazole administration in mice
5 [24] and rats, which is less than 2 human years, had no effect on the plasma Mg^{2+} level. In
6 addition, Denziger et al. [8] reported an association of PPIH with loop and thiazide diuretics
7 using, which agreed with our results that PPIH rats had higher diuresis. Previous studies
8 reported that 1,25-OH vitamin D promoted renal Mg^{2+} excretion [23, 25]. In the present study,
9 the level of total 25-OH vitamin D markedly increased in omeprazole-treated rats. In addition,
10 loop and thiazide diuretics suppresses renal tubular Mg^{2+} reabsorption [3]. Thus, higher renal
11 Mg^{2+} excretion is probably involved in development of hypomagnseemia in chronic PPIs users.
12 However, lower urinary Mg^{2+} had been reported in PPIH in human [6, 11, 39] and our rat model,
13 suggesting that hypomagnesemia should be of concern in person who continuously using PPIs
14 for more than 2 years with diuretic administration.
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33

34 Previous reports suggested that suppression of intestinal Mg^{2+} absorption and depletion
35 of Mg^{2+} storage could be involved in the pathophysiology of PPIH [6–8, 11, 26, 39]. Mg^{2+}
36 retention test demonstrated severe Mg^{2+} storage depletion in PPIH patients [6]. Intravenous
37 Mg^{2+} but not high dose oral Mg^{2+} supplement rapidly cured hypomagnesemia [11, 39],
38 indicating that PPIs impeded intestinal Mg^{2+} absorption [6, 26]. Our results supported these case
39 reports that long-term omeprazole administration suppressed plasma Mg^{2+} level, duodenal Mg^{2+}
40 absorption, bone and muscle Mg^{2+} levels in PPIH rat model. The proposed pathophysiology of
41 PPIH in prolonged users is that PPIs continuously suppresses small intestinal Mg^{2+} absorption
42 which subsequently stimulates Mg^{2+} releasing from its storage pool. The later development of
43 hypomagnesemia is due to the time required for depletion of Mg^{2+} from its storage [6].
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57

58 The exact mechanism of PPIs suppressed intestinal Mg^{2+} absorption is currently under
59 debate. Previous in vivo studies indicated that PPIs mainly affected an important active Mg^{2+}
60
61
62
63
64
65

1 absorption and induced magnesiotropic genes expressions in mouse colon [17, 24]. On the other
2 hand, our previous in vitro studies proposed that PPIs affected passive Mg^{2+} absorption in small
3 intestine [43–45]. Previous in vivo study reported that omeprazole enhanced human duodenal
4 HCO_3^- secretion [29], which probably suppressed small intestinal Mg^{2+} absorption [45]. Our
5 data suggested that omeprazole enhanced basal duodenal HCO_3^- secretion and suppressed
6 duodenal Mg^{2+} channel-driven transcellular and Mg^{2+} channel-independent paracellular Mg^{2+}
7 absorption under an un-physiological condition of concentration gradient of $MgCl_2$ about 40
8 mmol/l. Moreover, after feeding duodenal HCO_3^- secretion markedly increased by several
9 activating factors, e.g., gastric acid, CO_2 , and neurohumeral factors [4]. Secreted HCO_3^-
10 suppressed luminal proton and subsequently increased intra-duodenal pH. Since luminal proton
11 enhanced Mg^{2+} absorptions [18, 24, 44,], this impeded large amount Mg^{2+} uptake by small
12 intestine. In addition, in human small intestine, luminal acidic environment varied between pH
13 5.5–7.0 [30] which is necessary for mineral absorption by stabilizing their solubility [12].
14 Elevation of luminal pH led to a lower soluble Mg^{2+} , which decreased from 79.61 % at pH 4.4–
15 5.15 to 8.71% at pH 7.8–8.15 [5], that affected intestinal Mg^{2+} absorption. Our recent results
16 agreed with previous study that omeprazole induced duodenal HCO_3^- secretion [29, 45] and
17 effectively increased duodenal pH from 5.38 to 7.50. Therefore, PPIs suppressed small intestinal
18 uptake is due partly to less soluble Mg^{2+} in small intestine.

19 As reported previously, omeprazole enhanced TRPM6 mRNA expression in mice colon
20 [24], and in this study, it enhanced TPRM6, CNNM4, Cldn-2, -7, -12, and -15 protein
21 expressions in rat duodenum. Although plasma 25-hydroxyvitamin D level increased in
22 omeprazole-treated rats, the regulation of TRPM6 expression was vitamin D-independent
23 mechanism [25]. Alternatively, vitamin D enhanced small intestinal Cldn-2 and -12 but not
24 Cldn-7 and -15 expressions [14]. Thus, omeprazole probably enhanced duodenal Cldn-2 and -12
25 expressions through vitamin D dependent mechanism. Previous in vitro study revealed that
26 omeprazole suppressed Cldn-7 expression in Caco-2 cells [44]. However, our recent study
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 demonstrated that omeprazole enhanced Cldn-7 expression, which probably due to the
2 difference in humoral factors. However, the regulatory factors and mechanism of how
3 omeprazole affects intestinal TRPM6, CNNM4, Cldn-2, -7, -12, and -15 protein expressions
4 required further study.
5
6
7
8
9

10 Based on our results a critical question “*why the expression of TRPM6 and those cation*
11 *selective Cldns could not counteract PPIH in our rat model*” has been raised. TRPM6 function
12 required an interaction with membrane-associated phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂),
13 whose hydrolysis through activation of G_q protein coupled receptor-phospholipase C (PLC)
14 dependent pathway fully inactivated TRPM6 channels [22]. Therefore omeprazole might
15 induced PIP₂ degradation through G_q protein-PLC dependent pathway and then inactivated
16 TRPM6 channels in duodenum of PPIH rats. In addition, TRPM6 mutation caused severe
17 hypomagnesemia [40, 48]. Although mutation of TRPM6 has not been reported in PPIH, this
18 might be involved in development of hypomagnesemia in our rat model. However, the role of
19 PIP₂ degradation and TRPM6 mutation in intestinal Mg²⁺ absorption of PPIH rat require further
20 study.
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35

36 It is widely accepted that Cldn modulates paracellular ion permeability [16]. Tight
37 junctions (TJ) are a series of anastomosing membrane strands that occluded the intercellular
38 space between epithelium cells [15, 16]. Dynamic reorganization of TJ strands, i.e., breaking,
39 resealing, and branching, enables paracellular transport without interfering the barrier integrity
40 [15]. Previous in vitro study revealed that over-expression of Cldn-8 or Cldn-15 markedly
41 increased number of TJ strands and decreased paracellular permeability [37, 52]. Therefore,
42 simultaneously over-expressions of Cldn-2, -7, -12, and -15 in PPIH rats probably led to large
43 increase in number of tight junction strands in duodenal epithelium which impeded tight
44 junction dynamic and paracellular Mg²⁺ transport. In addition, elevation of extracellular pH was
45 found to increase the sensitivity of Ca²⁺ sensing receptor (CaSR) [10]. The activation of
46 epithelium-associated CaSR induced Cldn-16 trans-localization from TJ to cytosol, which then
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 suppressed paracellular passive Mg^{2+} transport [20]. Although Cldn-16 was not detected in
2 duodenum [13], hypersensitivity of duodenal-related CaSR might be involved in the inhibition
3
4 of Cldn-dependent paracellular Mg^{2+} absorption in PPIH rats.
5
6

7 As major Mg^{2+} storage pool, during Mg^{2+} depletion bone Mg^{2+} content gradually
8 declined due to activation of osteoclastic bone resorption and suppression of osteoblastic bone
9 formation [35]. Chronic omeprazole user had lower plasma Mg^{2+} level that led to increased risk
10 of fractures [1]. Maggio et al., [27] reported a suppression of trabecular bone density in
11 prolonged PPIs users, which agreed with our results that thinner and longer trabeculae had been
12 observed in PPIH rats. However, the effect of prolonged PPIs administration on bone
13 physiology remains unknown.
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23

24 In conclusion, the present study revealed the potential role of duodenum in handling
25 Mg^{2+} and regulating of Mg^{2+} homeostasis and pathophysiology of PPIH. Duodenal HCO_3^-
26 secretion might be one of the critical factors of PPIs-impeded intestinal Mg^{2+} absorption.
27 Reduction of duodenal Mg^{2+} absorption was shown in omeprazole-treated rats, whether
28 hypomagnesemia was presented or not. Hypomagnesemia occurred only if Mg^{2+} storage pool
29 was depleted in prolonged omeprazole-treated rats. Therefore, stimulation of intestinal Mg^{2+}
30 absorption and/or Mg^{2+} supplement should be consider to avoid PPIH in person who
31 continuously using PPIs.
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45

46 **Acknowledgements**

47
48 This study was supported by the research grants from the Thailand Research Fund
49 (RSA5680005), Burapha University through National Research Council of Thailand (33/2559),
50 and the Faculty of Allied Health Sciences, Burapha University (AHS08/2558) to N. Thongon.
51 We express our gratitude to Emeritus Prof. Dr. Prasert Sobhon of the Faculty of Allied Health
52 Sciences, Burapha University for his helpful suggestions and proofreading. We also thank Asst.
53 Prof. Dr. Siriporn Chamniansawat, Ms. Maneerat Sakuntang, Ms. Sariya Ragsanit, Ms. Warintip
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Wetkama of the Faculty of Allied Health Sciences, Burapha University, Ms. Pornpun Seelaphong of the Microscopic Center, Faculty of Science, Burapha University, Mr. Sakorn Praiwijarn and Ms. Dokerug Suwanchalong of Medical Laboratory Center, Burapha University Hospital, Burapha University for their excellent technical assistance.

References

1. Abrahamsen B, Vestergaard P (2013) Proton pump inhibitor use and fracture risk - effect modification by histamine H1 receptor blockade. Observational case-control study using National Prescription Data. *Bone* 57(1):269–271.
2. Agar M, Webster R, Lacey J, Donovan B, Walker A (2004) The use of subcutaneous omeprazole in the treatment of dyspepsia in palliative care patients. *J Pain Symptom Manage* 28(6):529–531.
3. Agus ZS (1999) Hypomagnesemia. *J Am Soc Nephrol* 10(7):1616–1622.
4. Allen A, Flemström G (2005) Gastroduodenal mucus bicarbonate barrier: protection against acid and pepsin. *Am J Physiol Cell Physiol* 288(1):C1–C19.
5. Ben-Ghedalia D, Tagari H, Zamwel S, Bondi A (1975) Solubility and net exchange of calcium, magnesium and phosphorus in digesta flowing along the gut of the sheep. *Br J Nutr* 33(1):87–94.
6. Cundy T, Dissanayake A (2008) Severe hypomagnesemia in long-term users of proton-pump inhibitors. *Clin Endocrinol* 69:338–341
7. Cundy T, Mackay J (2011) Proton pump inhibitors and severe hypomagnesemia. *Curr Opin Gastroenterol* 27(2):180–185.
8. Danziger J, William JH, Scott DJ, Lee J, Lehman LW, Mark RG, Howell MD, Celi LA, Mukamal KJ (2013) Proton-pump inhibitor use is associated with low serum magnesium concentrations. *Kidney Int* 83(4):692–699.

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
9. de Baaij JHF, Hoenderop JG, Bindels RJM (2015) Magnesium in man: implications for health and disease. *Physiol Rev* 95(1):1–46.
10. Doroszewicz J, Waldegger P, Jeck N, Seyberth H, Waldegger S (2005) pH dependence of extracellular calcium sensing receptor activity determined by a novel technique. *Kidney Int* 67(1):187–192.
11. Epstein M, McGrath S, Law F (2006) Proton-pump inhibitors and hypomagnesemic hypoparathyroidism. *N Engl J Med* 355:1834–1836.
12. Evenepoel P (2001) Alteration in digestion and absorption of nutrients during profound acid suppression. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 15:539–551.
13. Fujita H, Chiba H, Yokozaki H, Sakai N, Sugimoto K, Wada T, Kojima T, Yamashita T, Sawada N (2006) Differential expression and subcellular localization of claudin-7, -8, -12, -13, and -15 along the mouse intestine. *J Histochem Cytochem* 54:933–944.
14. Fujita H, Sugimoto K, Inatomi S, Maeda T, Osanai M, Uchiyama Y, Yamamoto Y, Wada T, Kojima T, Yokozaki H, Yamashita T, Kato S, Sawada N, Chiba H (2008) Tight junction proteins claudin-2 and -12 are critical for vitamin D-dependent Ca²⁺ absorption between enterocytes. *Mol Biol Cell* 19:1912–1921.
15. Furuse M, Tsukita S (2006) Claudins in occluding junctions of humans and flies. *Trends Cell Biol* 16(4):181–188.
16. Günzel D, Yu AS (2013) Claudins and the modulation of tight junction permeability. *Physiol Rev* 93(2):525–569.
17. Hess MW, de Baaij JHF, Gommers LMM, Hoenderop JGJ, Bindels RJM (2015) Dietary Inulin Fibers Prevent Proton-Pump Inhibitor (PPI)-Induced Hypocalcemia in Mice. *PLoS One* 10(9):e0138881
18. Heijnen AM, Brink EJ, Lemmens AG, Beynen AC (1993) Ileal pH and apparent absorption of magnesium in rats fed on diets containing either lactose or lactulose. *Br J Nutr* 70(3):747–756.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

19. Hou J, Renigunta A, Gomes AS, Hou M, Paul DL, Waldegger S, Goodenough DA (2009) Claudin-16 and claudin-19 interaction is required for their assembly into tight junctions and for renal reabsorption of magnesium. *Proc Natl Acad Sci USA* 106(36):15350–15355.

20. Ikari A, Okude C, Sawada H, Sasaki Y, Yamazaki Y, Sugatani J, Degawa M, Miwa M (2008) Activation of a polyvalent cation-sensing receptor decreases magnesium transport via claudin-16. *Biochim Biophys Acta* 1778(1):283–290.

21. Im WB, Blakeman DP, Davis JP (1985) Irreversible inactivation of rat gastric (H^+ - K^+)-ATPase in vivo by omeprazole. *Biochem Biophys Res Commun* 126(1):78–82.

22. Jia Xie, Baonan Sun, Jianyang Du, Wenzhong Yang, Hsiang-Chin Chen, Jeffrey D. Overton, Loren W. Runnels, Lixia Yue (2011) Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂) controls magnesium gatekeeper TRPM6 activity. *Sci Rep* 1:146.

23. Kladnitsky O, Rozenfeld J, Azulay-Debby H, Efrati E, Zelikovic I (2015) The claudin-16 channel gene is transcriptionally inhibited by 1,25-dihydroxyvitamin D. *Exp Physiol* 100(1):79–94.

24. Lameris ALL, Hess MW, van Kruijsbergen I, Hoenderop JGJ, Bindels RJM (2013) Omeprazole enhances the colonic expression of the Mg^{2+} transporter TRPM6. *Pflugers Arch Eur J Physiol* 465(11):1613–1620.

25. Lameris AL, Nevalainen PI, Reijnen D, Simons E, Eygensteyn J, Monnens L, Bindels RJ, Hoenderop JG (2015) Segmental transport of Ca^{2+} and Mg^{2+} along the gastrointestinal tract. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 308(3):G206–G216.

26. Luk CP, Parsons R, Lee YP, Hughes JD (2013) Proton pump inhibitor-associated hypomagnesemia: what do FDA data tell us? *Ann Pharmacother* 47(6):773–780.

27. Maggio M1, Lauretani F, Ceda GP, De Vita F, Bondi G, Corsonello A, Cattabiani C, Lattanzio F, Ruggiero C, Nouvenne A, Meschi T, Bandinelli S, Ferrucci L (2013) Use of proton pump inhibitors is associated with lower trabecular bone density in older individuals. *Bone* 57(2):437–442.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

28. Mejia A, Kraft WK (2009) Acid peptic diseases: pharmacological approach to treatment. *Expert Rev Clin Pharmacol* 2(3):295–314.

29. Mertz-Nielsen A, Hillingsø J, Bukhave K, Rask-Madsen J (1996) Omeprazole promotes proximal duodenal mucosal bicarbonate secretion in humans. *Gut* 38:6–10.

30. Nugent SG, Kumar D, Rampton DS, Evans DF (2001) Intestinal luminal pH in inflammatory bowel disease: possible determinants and implications for therapy with aminosaliculates and other drugs. *Gut* 48:571–577.

31. Patterson Burdsall D, Flores HC, Krueger J, Garretson S, Gorbien MJ, Iacch A, Dobbs V, Homa T (2013) Use of proton pump inhibitors with lack of diagnostic indications in 22 Midwestern US skilled nursing facilities. *J Am Med Dir Assoc* 14(6):429–432.

32. Quamme GA (2008) Recent developments in intestinal magnesium absorption. *Curr Opin Gastroenterol* 24(2):230–235.

33. Quinn R (2005) Comparing rat's to human's age: how old is my rat in people years? *Nutrition* 21(6):775–777.

34. Rondón LJ1, Rayssiguier Y, Mazur A (2008) Dietary inulin in mice stimulates Mg^{2+} absorption and modulates TRPM6 and TRPM7 expression in large intestine and kidney. *Magnes Res* 21(4):224–231.

35. Rude RK, Gruber HE (2004) Magnesium deficiency and osteoporosis: animal and human observations. *J Nutr Biochem* 15(12):710–716.

36. Serfaty-Lacrosniere C, Wood RJ, Voytko D, Saltzman JR, Pedrosa M, Sepe TE, Russell RR (1995) Hypochlorhydria from short-term omeprazole treatment does not inhibit intestinal absorption of calcium, phosphorus, magnesium or zinc from food in humans. *J Am Coll Nutr* 14(4):364–368.

37. Sengoku A, Inai T, Shibata Y (2008) Formation of aberrant TJ strands by overexpression of claudin-15 in MDCK II cells. *Histochem Cell Biol* 129(2):211–222.

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
38. Serra S, Jani PA (2006) An approach to duodenal biopsies. *J Clin Pathol* 59(11): 1133–1150.
39. Shabajee N, Lamb EJ, Sturgess I, Sumathipala RW (2008) Omeprazole and refractory hypomagnesemia. *BMJ* 337:a425.
40. Schlingmann KP, Weber S, Peters M, Niemann Nejsum L, Vitzthum H, Klingel K, Kratz M, Haddad E, Ristoff E, Dinour D, Syrrou M, Nielsen S, Sassen M, Waldegger S, Seyberth HW, Konrad M (2002) Hypomagnesemia with secondary hypocalcemia is caused by mutations in TRPM6, a new member of the TRPM gene family. *Nat Genet* 31: 166–170.
41. Swaminathan R (2003) Magnesium metabolism and its disorders. *Clin Biochem Rev* 24(2):47–66.
42. Thongon N, Nakkrasae LI, Thongbunchoo J, Krishnamra N, Charoenphandhu N (2008) Prolactin stimulates transepithelial calcium transport and modulates paracellular permselectivity in Caco-2 monolayer: mediation by PKC and ROCK pathways. *Am J Physiol Cell Physiol* 294:C1158–C1168.
43. Thongon N, Krishnamra N (2011) Omeprazole decreases magnesium transport across Caco-2 monolayers. *World J Gastroenterol* 17(12):1574–1583.
44. Thongon N, Krishnamra N (2012) Apical acidity decreases inhibitory effect of omeprazole on Mg^{2+} absorption and claudin-7 and -12 expression in Caco-2 monolayers. *Exp Mol Med* 44(11):684–693.
45. Thongon N, Ketkeaw P, Nuekchob C (2014) The roles of acid-sensing ion channel 1a and ovarian cancer G protein-coupled receptor 1 on passive Mg^{2+} transport across intestinal epithelium-like Caco-2 monolayers. *J Physiol Sci* 64(2):129–139.
46. Vetter T, Lohse MJ (2002) Magnesium and the parathyroid. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 11(4):403–410.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

47. Voets T, Nilius B, Hoefs S, van der Kemp AW, Droogmans G, Bindels RJ, Hoenderop JG (2004) TRPM6 forms the Mg^{2+} influx channel involved in intestinal and renal Mg^{2+} absorption. *J Biol Chem* 279:19–25.

48. Walder RY, Landau D, Meyer P, Shalev H, Tsolia M, Borochowitz Z, Boettger MB, Beck GE, Englehardt RK, Carmi R, Sheffield VC (2002) Mutation of TRPM6 causes familial hypomagnesemia with secondary hypocalcemia. *Nat Genet* 31: 171–174.

49. Wang J, Barbuskaite D, Tozzi M, Giannuzzo A, Sørensen CE, Novak I (2015) Proton pump inhibitors inhibit pancreatic secretion: Role of gastric and non-gastric H^+/K^+ -ATPases. *PLoS One* 18;10(5):e0126432.

50. Wolf FI, Trapani V, Simonacci M, Mastrototaro L, Cittadini A, Schweigel M (2010) Modulation of TRPM6 and Na^+/Mg^{2+} exchange in mammary epithelial cells in response to variations of magnesium availability. *J Cell Physiol* 222(2):374–381.

51. Yamazaki D1, Funato Y, Miura J, Sato S, Toyosawa S, Furutani K, Kurachi Y, Omori Y, Furukawa T, Tsuda T, Kuwabata S, Mizukami S, Kikuchi K, Miki H (2013) Basolateral Mg^{2+} extrusion via CNNM4 mediates transcellular Mg^{2+} transport across epithelia: a mouse model. *PLoS Genet* 9(12):e1003983.

52. Yu AS, Enck AH, Lencer WI, Schneeberger EE (2003) Claudin-8 expression in Madin-Darby canine kidney cells augments the paracellular barrier to cation permeation. *J Biol Chem* 278(19):17350–17359.

Figure legends

Figure 1. Effect of oral gavage (OG) or subcutaneous injection (SC) of omeprazole on rat gastric and duodenal pH. Gastric (A) and duodenal (B) pH were measured by using test strips after 2 or 24 hr after omeprazole administration. Body weight of control (*white circles*), 4 wk-omeprazole-treated (*gray circles*), and 24 wk-omeprazole-treated (*black circles*) throughout 24 wk of experiment (C). ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ compared with the control group. ($n = 6$).

Figure 2. Effect of omeprazole on Mg^{2+} homeostasis in male Sprague-Dawley rats. Plasma Mg^{2+} level (A), 24 hr urinary Mg^{2+} excretion (B), 24 hr fecal Mg^{2+} excretion (C), bone Mg^{2+} content (D), and muscle Mg^{2+} content (E) of control (*white bars*), 4 wk-omeprazole-treated (*gray bars*), and 24 wk-omeprazole-treated (*black bars*) group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ compared with the control group. ($n = 6$).

Figure 3. Effect of omeprazole on duodenal TRPM and CNM4 expressions. The expression of TRPM6 (A) in duodenal villi (brownish signals, arrows) from negative control, control, 4 wk-omeprazole-treated, and 24 wk-omeprazole-treated groups by immunohistochemical technique (scale bars, 100 μ m). Neg.; negative, Cont.; control, Ome; omeprazole. The quantitative immunoblotting and representative densitometric analysis of duodenal TRPM6 (B) and CNM4 (C) in control and omeprazole-treated groups. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ compared with control group. ($n = 5$)

Figure 4. Effect of omeprazole on rat duodenal Mg^{2+} absorption. Rate of total (total: *white bars*), Mg^{2+} channel-independent (para: *gray bars*), and Mg^{2+} channel-driven (trans: *black bars*) Mg^{2+} transport in control (A), 4 wk-omeprazole-treated (B), and 24 wk-omeprazole-treated (C) groups. Comparison of total (D), Mg^{2+} channel-independent (E), and Mg^{2+} channel-driven (F) Mg^{2+} transport of control (*white bars*), 4 wk-omeprazole-treated (*gray bars*), and 24 wk-

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

omeprazole-treated (*black bars*) groups. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ compared with the Co(III)hexaammine-treated control group. ($n = 5$). Co; Co(III)hexaammine, RR; ruthenium red. ($n = 5$).

Figure 5. Effect of omeprazole on rat duodenum. Representative H&E stained sections of duodenum in control (**A**), 4 wk-omeprazole-treated (**B**), and 24 wk-omeprazole-treated (**C**) groups. Villous to crypt (V:C) ratio of control (*white bars*), 4 wk-omeprazole-treated (*gray bars*), and 24 wk-omeprazole-treated (*black bars*) groups. * $P < 0.05$ compared with the control group.

Figure 6. Contribution of mucosal HCO_3^- secretion on omeprazole-suppressed duodenal Mg^{2+} absorption. The total Mg^{2+} transport of control (*white bars*), 4 wk-omeprazole-treated (*gray bars*), and 24 wk-omeprazole-treated (*black bars*) groups. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ compared with its corresponding vehicle-treated group. ($n = 5$).

Figure 7. Effect of omeprazole on rat duodenal Cldn-2, -7, -12, and -15 expressions. The quantitative immunoblotting analysis of duodenal Cldn-2, -7, -12, and -15 expressions in control and omeprazole-treated groups (**A**). Representative densitometric analysis of Cldn-2, -7, -12, and -15 (**B**) expression in control (*white bars*), 4 wk-omeprazole-treated (*gray bars*), and 24 wk-omeprazole-treated (*black bars*) groups. *** $P < 0.001$ compared with the control group. ($n = 5$).

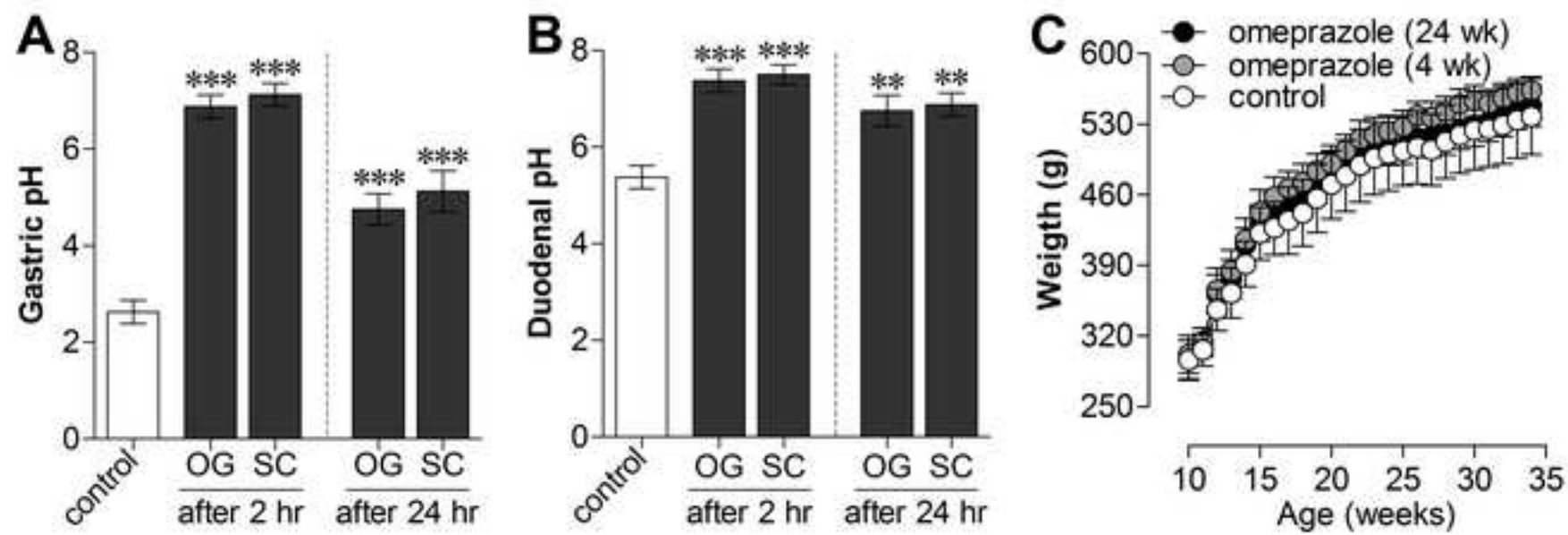
Figure 8. Effect of omeprazole on trabeculae structure of rat bone. SEM images revealed structure of the head of femurs of control (**A–C**) and 24 wk-omeprazole-treated (**D–F**) groups. EP; epiphyseal.

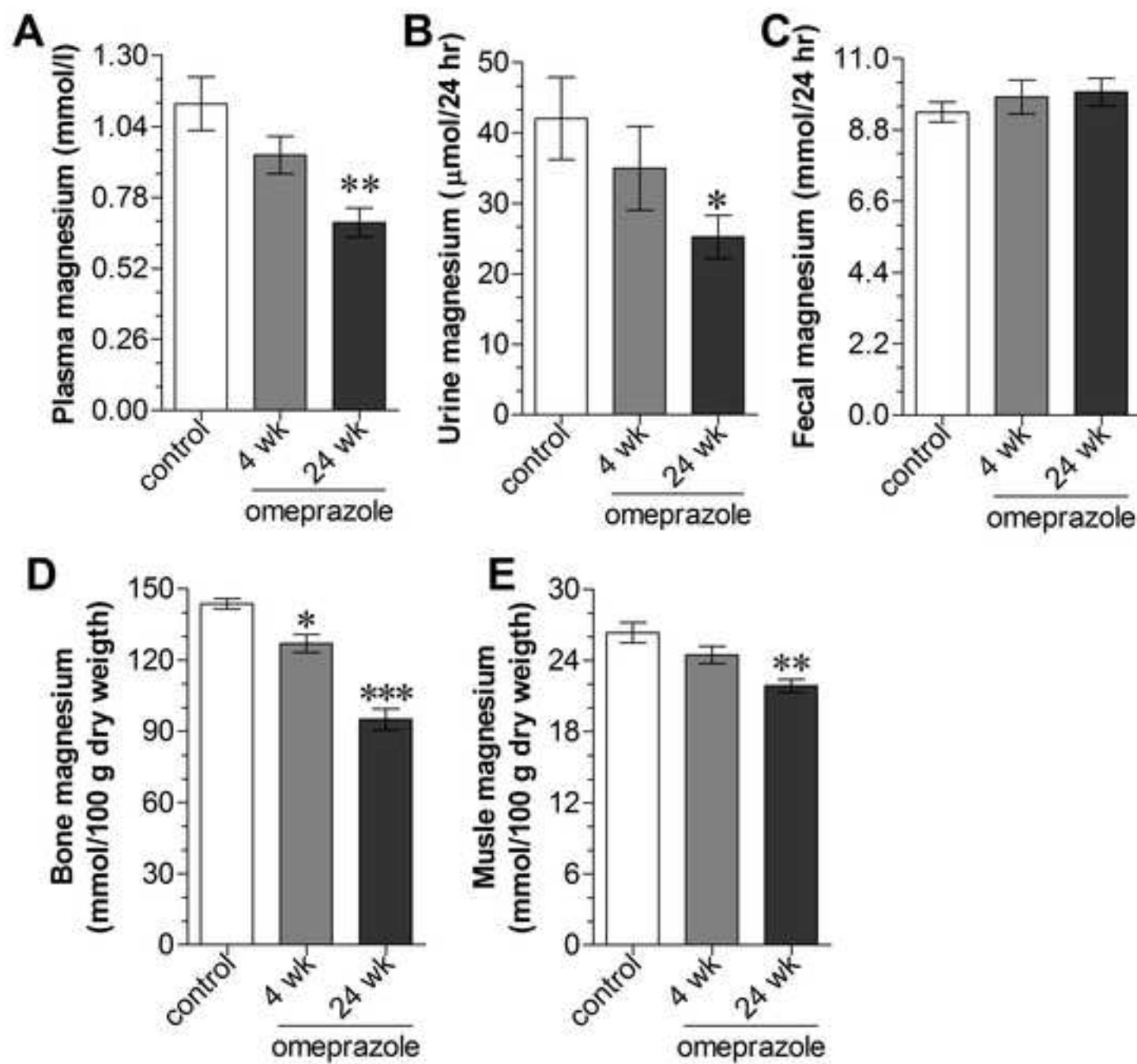
Table legends

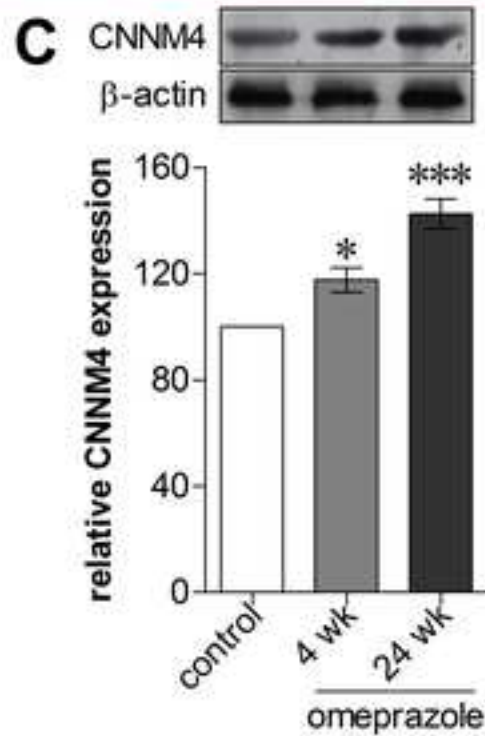
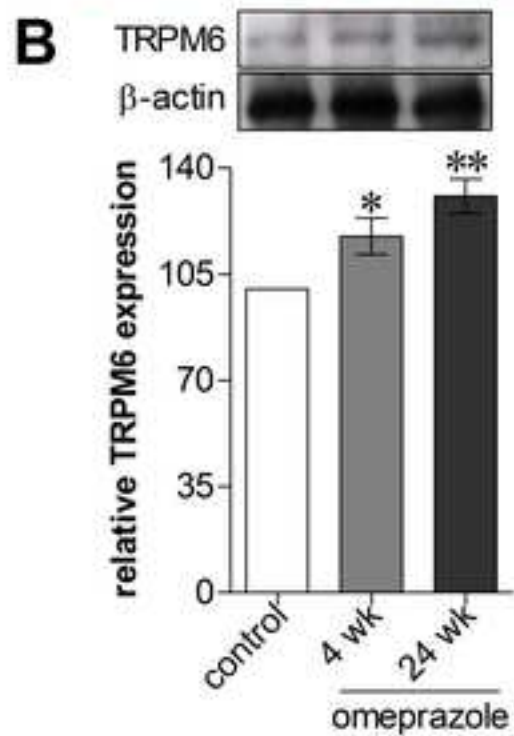
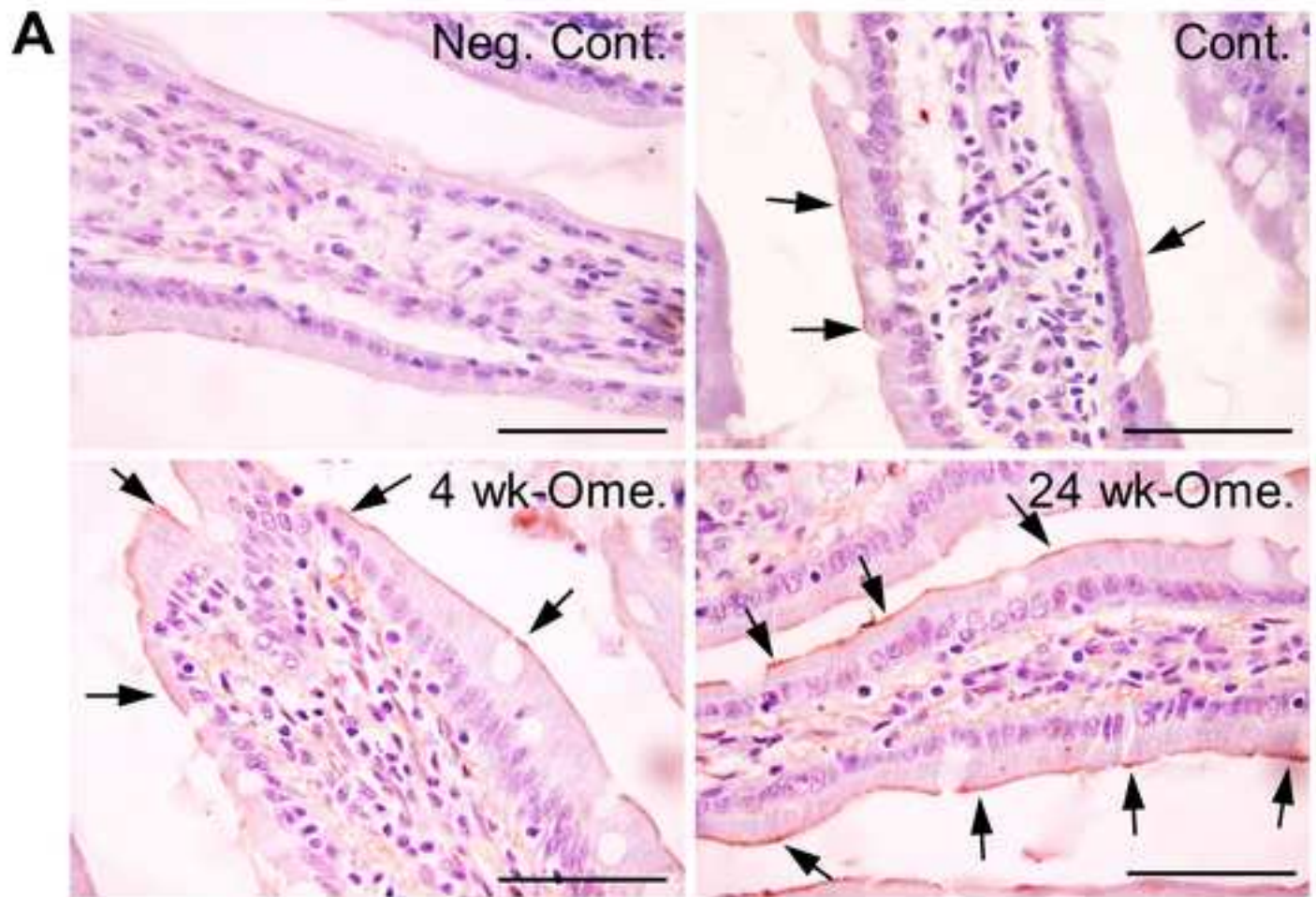
1
2
3 **Table 1.** Metabolic characteristics of control, 4 wk-omeprazole-treated, and 24 wk-omeprazole-
4 treated rats. * $P < 0.05$ compared with the control group. ($n = 6$).
5
6

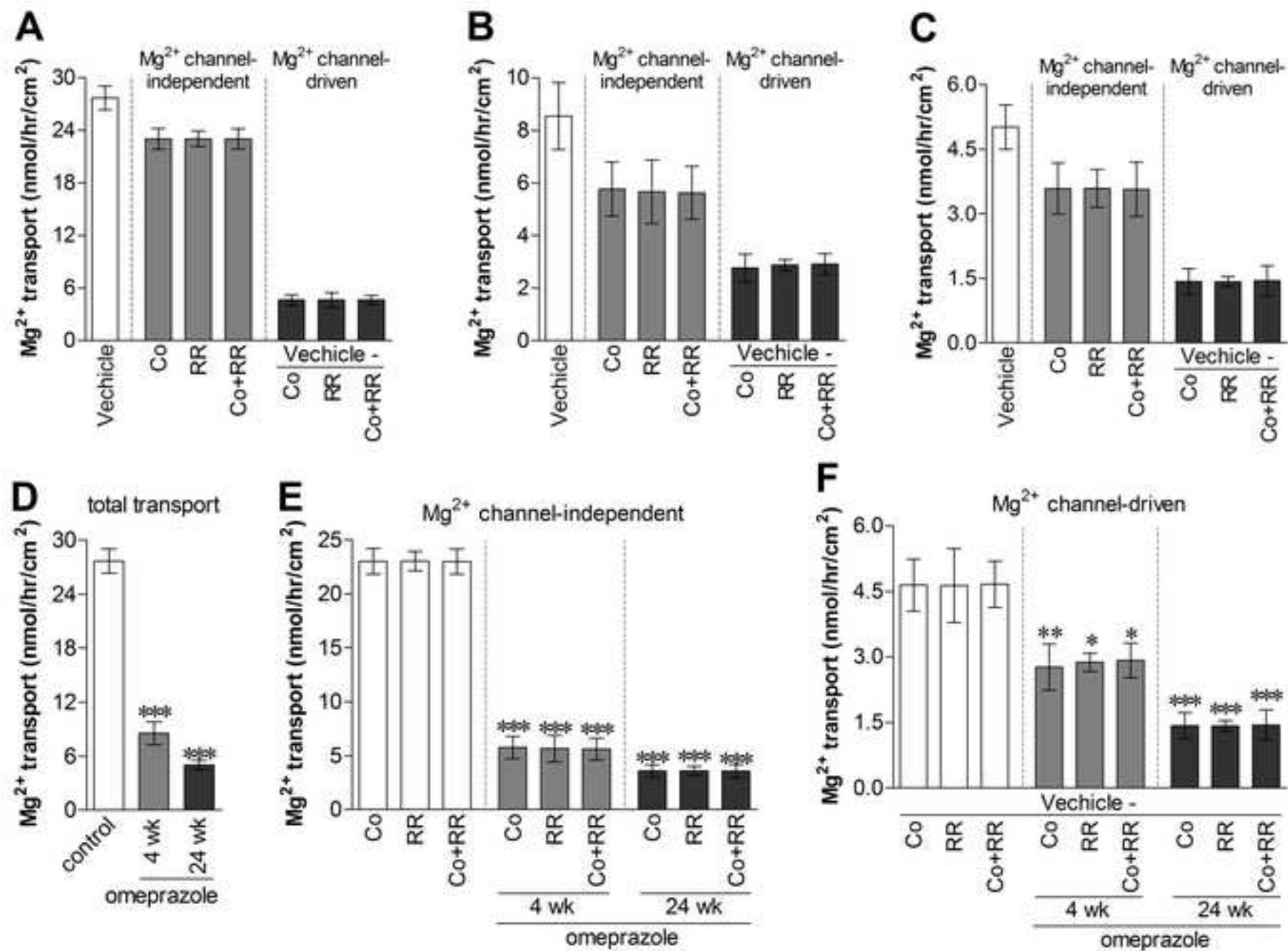
7
8
9
10 **Table 2.** The effect of omeprazole on plasma hormones and electrolytes. PTH, parathyroid
11 hormone. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ compared with the control group. ($n = 6$).
12
13
14

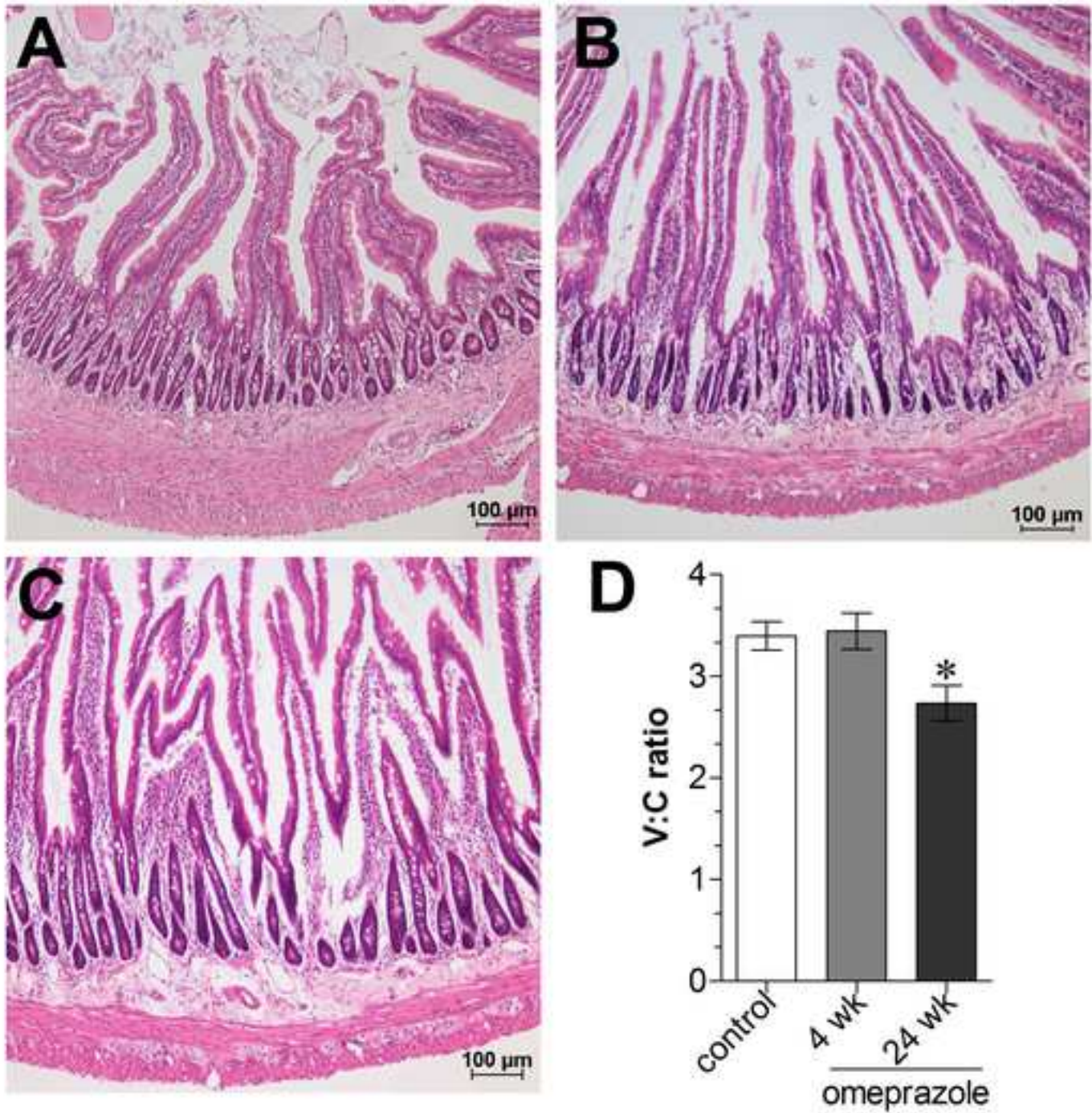
15
16
17 **Table 3.** The effect of omeprazole on electrical parameters and charge selectivity. PD,
18 transepithelial potential difference; I_{sc} , short-circuits current; TER, transepithelial resistance; P_{Na} ,
19 sodium permeability; P_{Cl} , chloride permeability; P_{Na}/P_{Cl} relative sodium to chloride permeability.
20
21
22
23
24
25 *** $P < 0.001$ compared with the control group. ($n = 6$).
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

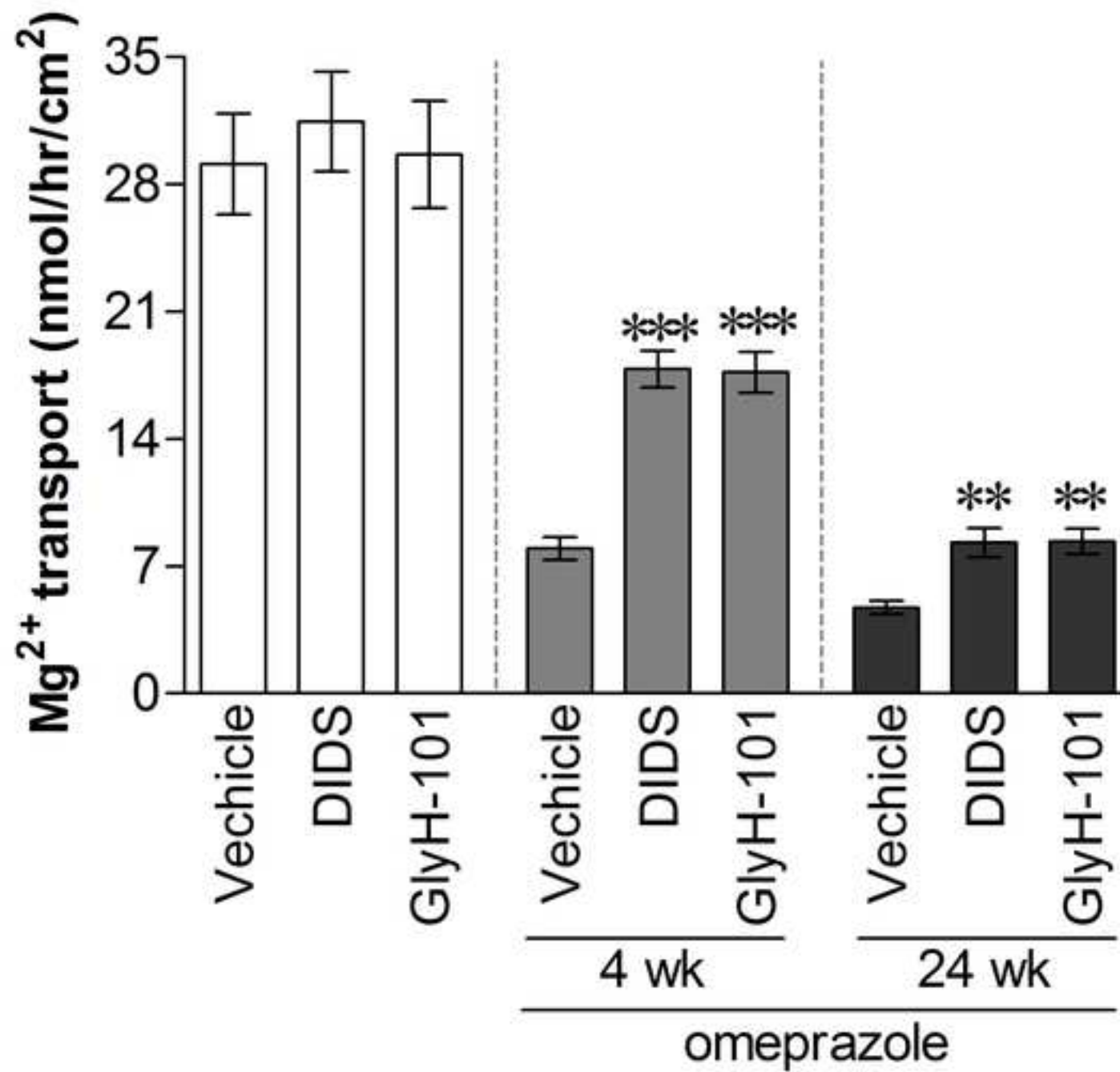


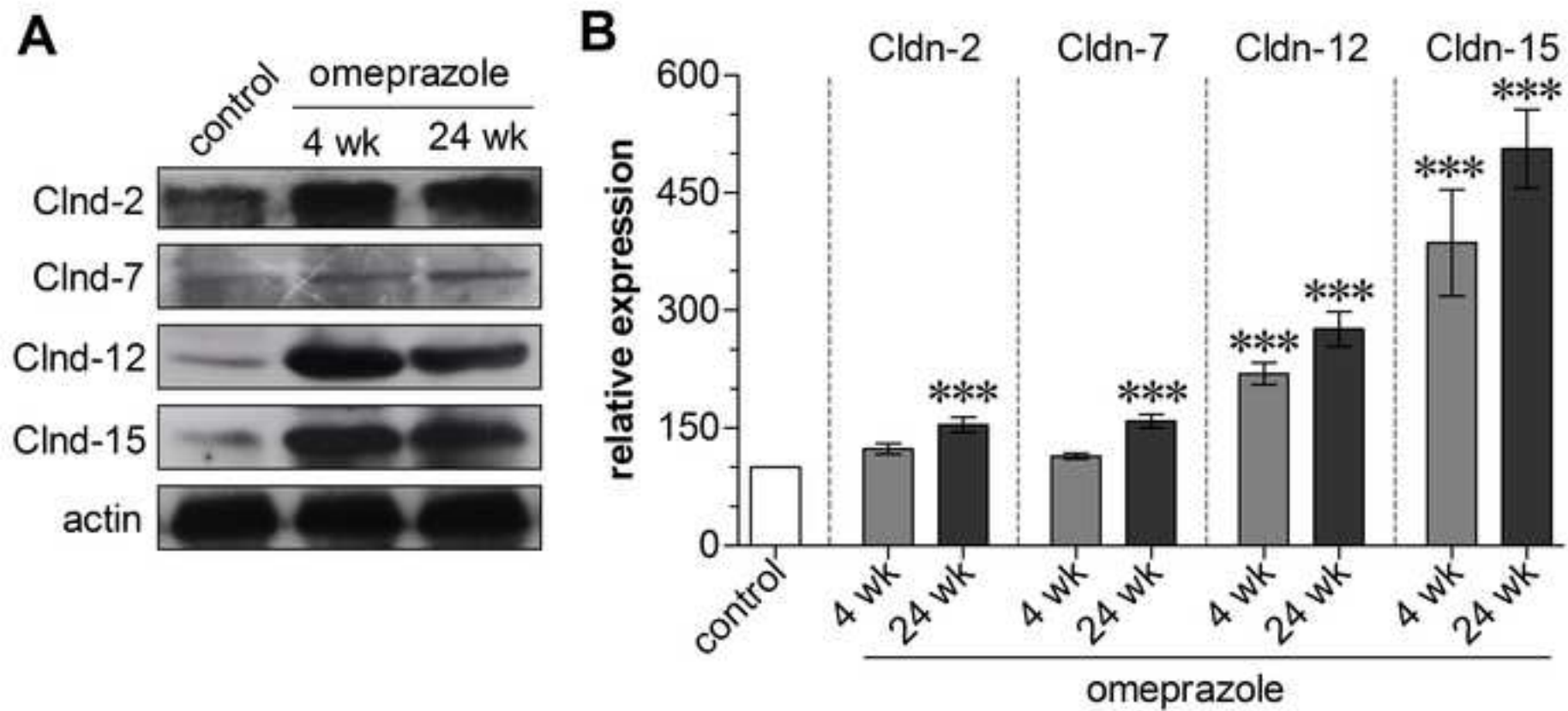












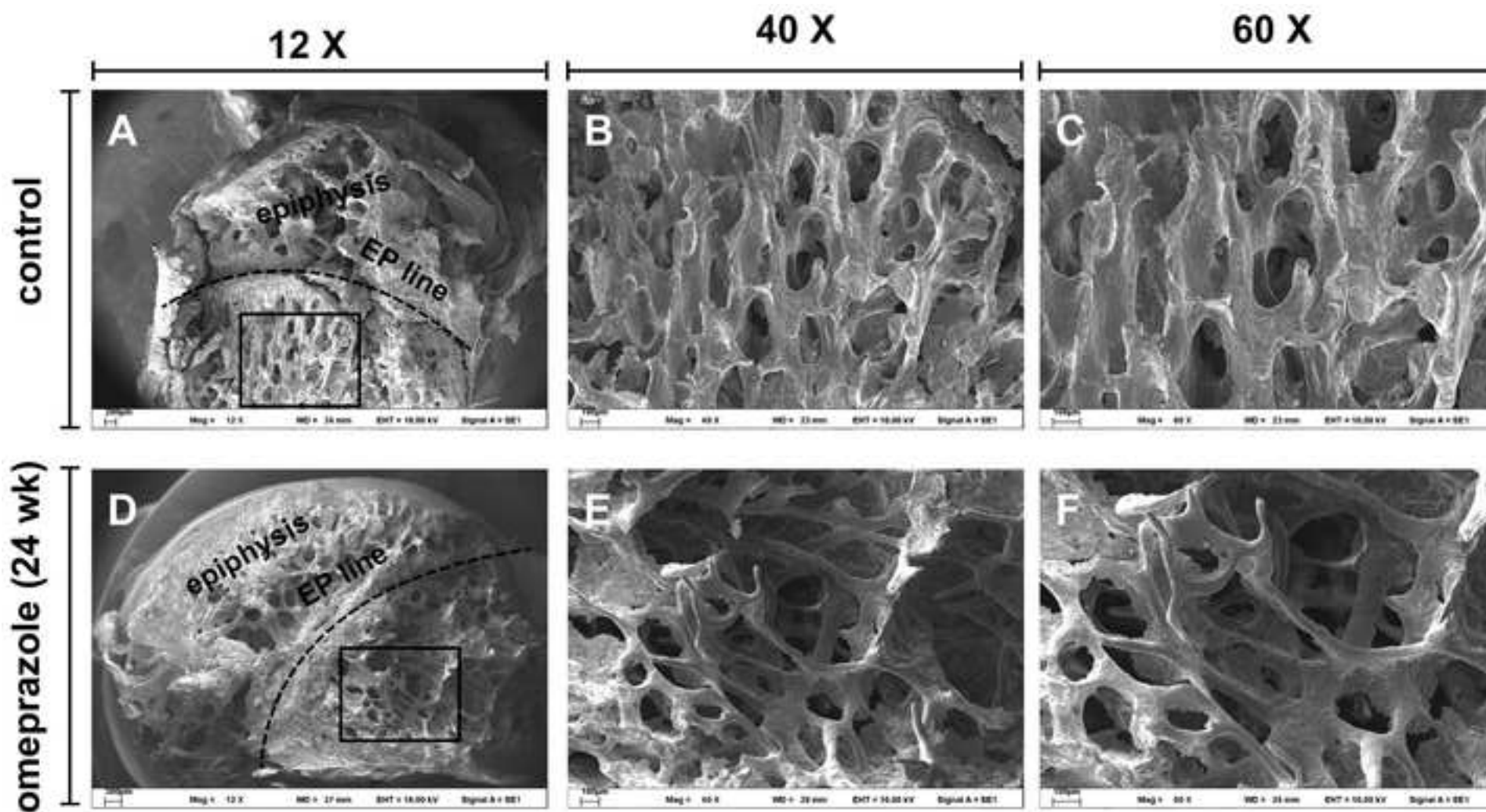


Table 1

	control	omeprazole (20 mg/kg)	
		4 wk	24 wk
Body weight (g)	537.78 ± 37.88	563.50 ± 13.51	548.38 ± 20.07
Food intake (g/day)	23.99 ± 0.67	25.95 ± 0.53	23.76 ± 0.52
Water intake (ml/day)	47.05 ± 1.46	49.06 ± 1.74	51.24 ± 1.49
Diuresis (ml/day)	6.28 ± 1.14	7.43 ± 1.11	10.25 ± 1.05*
Fecal dry weight (g/day)	8.80 ± 0.45	8.93 ± 0.50	8.97 ± 0.57

Table 2

	control	omeprazole (20 mg/kg)	
		4 wk	24 wk
25-OH Vitamin D (nmol/l)	41.70 ± 2.92	40.35 ± 3.66	79.79 ± 4.60 ^{***}
PTH (pmol/l)	0.77 ± 0.20	0.63 ± 0.14	1.08 ± 0.22
plasma calcium (mmol/l)	2.66 ± 0.12	2.44 ± 0.13	2.26 ± 0.08 [*]
plasma phosphate (mmol/l)	2.02 ± 0.12	2.00 ± 0.13	1.92 ± 0.16
urine calcium (μmol/24 hr)	47.98 ± 8.27	40.03 ± 9.57	33.41 ± 7.61
urine phosphate (mmol/24 hr)	0.88 ± 0.19	1.15 ± 0.21	1.46 ± 0.16 [*]

Table 3

	control	omeprazole (20 mg/kg)	
		4 wk	24 wk
<i>Electrical parameters</i>			
PD (mV)	5.18 ± 0.42	4.82 ± 0.36	4.62 ± 0.28
Isc (μA/cm ²)	37.44 ± 2.23	32.89 ± 1.76	23.55 ± 2.28 ^{***}
TER (Ω·cm ²)	137.84 ± 6.39	145.58 ± 5.98	201.93 ± 9.49 ^{***}
<i>Dilution potential experiment</i>			
P_{Na}/P_{Cl}	2.03 ± 0.09	1.64 ± 0.05 ^{**}	1.25 ± 0.03 ^{***}
P_{Na} (10 ⁻⁶ ·cm ² /s)	19.97 ± 0.73	16.51 ± 0.84 ^{**}	10.52 ± 0.57 ^{***}
P_{Cl} (10 ⁻⁶ ·cm ² /s)	9.93 ± 0.57	10.07 ± 0.41	8.39 ± 0.39