



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัย

อิทธิพลของโอเมปราโซลต่อการดูดซึมแมกนีเซียมในหนูขาวเพศผู้สายพันธุ์ Sprague-Dawley

The effect of omeprazole on intestinal magnesium absorption in male Sprague-Dawley rats

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน
รองศาสตราจารย์ ดร. ณรงค์ฤทธิ์ ทองอ่อน

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้
จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๖๐
มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ ๓๘๖๘๗๖
เลขที่สัญญา ๑๓๘/๒๕๖๐

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัย

กลไกระดับเซลล์ของสภาวะกรดด้านโพรงลำไส้ลดการออกฤทธิ์ของโอเมปราชอล
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. ๒๕๖๐
มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ
เลขที่สัญญา ๑๓๘/๒๕๖๐

Acknowledgment

This work was financially supported by the Research Grant of
Burapha University through National Research Council of
Thailand (Grant no. 138/2560)

บทคัดย่อ

Acid peptic disorders คือความผิดปกติของระบบทางเดินอาหารอันเนื่องมาจากการหลั่งกรดในกระเพาะอาหารที่มากเกินไป รายงานทางการแพทย์บ่งชี้ว่าประชากรหลายล้านคนทั่วโลก การรักษาที่มีประสิทธิภาพที่สุดคือยาในกลุ่มโปรตอนปั๊มอินฮิบิเตอร์ (proton pump inhibitors; PPIs) จึงทำให้ยาในกลุ่ม PPIs นี้เป็นหนึ่งในยาที่ขายดีที่สุดทั่วโลก และมีผู้ใช้ยาต่อเนื่องเป็นระยะเวลานานหลายล้านคนทั่วโลกเช่นกัน นับตั้งแต่ปี ค.ศ. 2006 จนปัจจุบันมีรายงานทางการแพทย์หลายฉบับบ่งชี้ผลข้างเคียงของการใช้ omeprazole ซึ่งเป็นยาในกลุ่ม PPIs ติดต่อกันมากกว่า 1 ปี ทำให้ระดับ Mg^{2+} ในกระแสเลือดต่ำอย่างรุนแรง โดยสันนิษฐานว่าน่าจะเกิดจากการดูดซึม Mg^{2+} ผิดปกติ แต่ยังไม่มีการศึกษาวิจัย การศึกษาครั้งนี้จึงศึกษาผลของการให้ omeprazole ซึ่งเป็นยาในกลุ่ม PPIs ในหนูขาว ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการให้ยา omeprazole ติดต่อกันเป็นระยะเวลานานมีผลทำให้ปริมาณ Mg^{2+} ในกระแสเลือดของหนูลดต่ำกว่าปกติจริง คล้ายคลึงกับที่พบเจอในมนุษย์ เมื่อศึกษาระดับ Mg^{2+} ในปัสสาวะก็พบว่ามีระดับต่ำเช่นเดียวกัน บ่งชี้ว่าไม่มีการสูญเสีย Mg^{2+} ในปัสสาวะ จึงน่าจะมาจากการลดการดูดซึม Mg^{2+} ในลำไส้ และเมื่อทำการศึกษากการดูดซึม Mg^{2+} ในลำไส้ ก็พบว่า omeprazole มีฤทธิ์กีดการดูดซึม Mg^{2+} ในลำไส้จริง เป็นการยืนยันสมมุติฐานคือ omeprazole มีฤทธิ์กีดการดูดซึม Mg^{2+} ในลำไส้ เมื่อได้รับ omeprazole ติดต่อกันจึงมีผลทำให้ระดับ Mg^{2+} ในกระแสเลือดต่ำลงอย่างรุนแรง อย่างไรก็ตาม ASIC1a, OGR1, และ P2Y purinoceptors ไม่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการควบคุมการทำงานของลำไส้ในการ ดูดซึม Mg^{2+} การศึกษาคุณสมบัติทางไฟฟ้าพบว่า omeprazole มีฤทธิ์ลด I_{sc} และเพิ่ม TER อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ บ่งชี้ว่า omeprazole ลดการขนส่งไอออนและลด paracellular permeability การศึกษาทางชีวฟิสิกส์พบว่า omeprazole มีฤทธิ์ลด P_{Na}/P_{Cl} และ P_{Na} อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ บ่งชี้ว่า omeprazole ลด paracellular cation selectivity สรุปได้ว่า omeprazole ลดการเลือกประจุบวกขนส่งผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์ และเพิ่มความต้านทานของการขนส่งสารผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์จึงมีผลลดการขนส่งผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์ การศึกษาทางด้าน histology ทั้ง H&E technique และ TEM technique ก็พบว่า omeprazole มีฤทธิ์ลด absorptive area surface และลดความกว้างของ tight junction เป็นการยืนยันได้ว่า omeprazole มีฤทธิ์กีดการทำงานในลำไส้จริง อย่างไรก็ตามกลไกที่ omeprazole กีดการทำงานของลำไส้ทั้งในระดับโครงสร้างและระดับเซลล์ยังไม่มีการศึกษาวิจัย

อย่างไรก็ตามเมื่อร่างกายอยู่ในภาวะพร่อง Mg^{2+} ก็พยายามชดเชยโดยการเพิ่มการแสดงออกของ TRPM6 และ CNNM4 ซึ่งทำงานในการดูดซึม Mg^{2+} ในลำไส้ ในลำไส้เกือบทุกส่วน เป็นข้อบ่งชี้ชัดเจนว่าร่างกายสัตว์ทดลองกำลังปรับตัวเพื่อรับมือกับผลข้างเคียงของ omeprazole แต่กลไกที่ควบคุมการปรับตัวนี้ก็ยังไม่ทราบแน่ชัด

คำสำคัญ: ระดับแมกนีเซียมในกระแสเลือดต่ำ การดูดซึมในลำไส้ โปรตอนปั๊มอินฮิบิเตอร์

Abstract

Acid peptic disorders are the result from either excessive gastric acid secretion or diminished mucosal defense that affects millions people worldwide. The most effective therapeutic agents for these disorders is proton pump inhibitors (PPIs), which are the fifth best-selling drug that has been taken by millions of chronic users worldwide. However, since 2006, there is a growing body of evidence indicating that omeprazole, a PPIs, induced hypomagnesemia is a serious side effect of PPIs in chronic users. The mechanism of PPIs induced systemic Mg^{2+} deficit is currently unclear. The present study aimed to elucidate the direct effect long-term omeprazole administrations in rats. Our result showed omeprazole significantly suppressed plasma Mg^{2+} level and urinary Mg^{2+} excretion. Thus, omeprazole induced hypomagnesemia in rats. By using Ussing chamber techniques, it was shown that omeprazole markedly suppressed paracellular and transcellular Mg^{2+} absorptions. However, ASIC1a, OGR1, and P2Y purinoceptors had no contribution on the regulation of intestinal Mg^{2+} absorptions in rats. Omeprazole decreased I_{sc} and paracellular cation selectivity and increased TER, thus, its suppressed intestinal paracellular permeability. Histological study revealed that omeprazole suppressed intestinal absorptive surface area and tight junction width. Therefore, omeprazole suppressed intestinal absorption, the mechanism of which still elusive.

However, our results showed the compensatory mechanism in rat intestine by upregulation of TRPM6 and CNNM4 expression throughout intestinal tract. The underlying mechanism of this compensatory mechanism is unknown.

Keyword: hypomagnesemia, intestinal absorption, proton pump inhibitor

สารบัญเรื่อง (Table of Contents)

	หน้า
ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	1
ขอบเขตของโครงการวิจัย	2
ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย	2
การทบทวนวรรณกรรม	2
วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	5
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	6
วิธีการดำเนินการวิจัย และสถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล	6
ผลการวิจัย (Results)	11
อภิปราย/วิจารณ์ (Discussion) ผลการทดลอง/ผลการวิจัย ที่ได้ทั้งหมด	18
สรุปและเสนอแนะเกี่ยวกับการวิจัยในขั้นตอนต่อไป	18
ผลผลิต (Output)	18
รายงานการเงิน	19
ประวัตินักวิจัยและคณะ พร้อมหน่วยงานสังกัด	20
เอกสารอ้างอิง	22

สารบัญภาพ (List of illustrations)

	หน้า
รูปที่ 1. กลไกการรักษาสมดุล Mg^{2+} ในร่างกายมนุษย์	3
รูปที่ 2. กลไกการดูดซึม Mg^{2+} ในเซลล์เยื่อบุลำไส้	3
รูปที่ 3. ภาพแสดงช่วงเวลาการฉีด omeprazole ในสัตว์ทดลอง	7
รูปที่ 4. ภาพแสดงช่วงเวลาการเก็บตัวอย่างในสัตว์ทดลอง	8
รูปที่ 5. ภาพแสดง high throughput Ussing chamber setup	9
รูปที่ 6. อิทธิพลของการได้รับ omeprazole ติดต่อกันเป็นเวลานาน ต่อระดับ Mg^{2+} ในกระแสเลือด (a) และในปัสสาวะ (b) ของหนูขาว	12
รูปที่ 7. อิทธิพลของการได้รับ omeprazole ต่อการดูดซึม Mg^{2+} แบบไม่ใช้พลังงาน (a) และใช้พลังงานในลำไส้ (b) ของหนูขาว	13
รูปที่ 8. อิทธิพลของการได้รับ omeprazole ต่อค่าความต่างศักย์ไฟฟ้า (potential difference; PD) (a), กระแส short circuit (Isc) (b) และ ความต้านทานไฟฟ้า (transpithelial electrical resistance; TER)	13
รูปที่ 9. อิทธิพลของการได้รับ omeprazole ต่อค่า relative permeability ratio ของ Na^+ ต่อ Cl^- ($P_{Na/Cl}$) (a), ค่า absolute permeability ของ Na^+ (P_{Na}) (b), และ ค่า absolute permeability ของ Cl^- (P_{Cl}) (c).	14
รูปที่ 10. การแสดงออกของโปรตีน TRPM6 ในลำไส้ส่วน duodenum jejunum ileum cecum และ colon ของหนูขาว กลุ่มควบคุม (a) กลุ่มที่ได้รับ omeprazole เป็นเวลา 1 เดือน (b) และ กลุ่มที่ได้รับ omeprazole เป็นเวลา 6 เดือน (c)	15
รูปที่ 11. โปรตีน TRPM6 ในลำไส้ส่วน duodenum (a, b) jejunum (a, c) ileum (a, d) และ colon (a, e) ของหนูขาว	15
รูปที่ 12. โปรตีน TRPM6 ในเซลล์ลำไส้ส่วน duodenum. Neg.; negative, Cont.; control, Ome; omeprazole	16
รูปที่ 13. โปรตีน CNNM4 ในลำไส้ส่วน duodenum, jejunum, ileum และ colon ของหนูขาว.	16
รูปที่ 14. ภาพ H&E ลำไส้ส่วน duodenum ของหนูขาว	17
รูปที่ 15. ภาพ TEM ลำไส้ส่วน duodenum ของหนูขาว	17

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย (List of Abbreviations)

ASIC1a	acid-sensing ion channel 1a
Cldn	claudin
CNNM	cyclin m4
Cont.	control
Neg.	negative
OGR1	ovarian cancer G protein-coupled receptor 1
Ome	omeprazole
P_{Na}/P_{Cl}	relative permeability ratio of Na^+ to Cl^-
P_{Na}	sodium permeability
P_{Cl}	chloride permeability
PD	potential difference
PPIs	proton pump inhibitors
I_{sc}	short circuit
TRPM	transient receptor potential melastatin
TRPV4	Transient potential vanilloid 4
TEM	Transmission electron microscopy
TER	transrithelial electrical resistance

,

บทนำ (Introduction)

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

แมกนีเซียม (Mg^{2+}) เป็นไอออนที่มีความสำคัญต่อการทำงานของเซลล์ทั่วร่างกายมนุษย์ โดยมีอิทธิพลควบคุมการทำงานของ ion channel ควบคุมการคงรูปของโปรตีนภายในเซลล์ ควบคุมกระบวนการเผาผลาญพลังงานภายในเซลล์ และยังเป็นโคเอนไซม์ของเอนไซม์สำคัญภายในเซลล์มากกว่า 300 ชนิด [21, 27] ดังนั้นหากเกิดภาวะพร่อง Mg^{2+} ย่อมส่งผลกระทบต่อการทำงานของระดับเซลล์ และก่อให้เกิดปัญหาทางสุขภาพมากมาย อาทิเช่น โรคกระดูกพรุน [28] Alzheimer's disease [6] และความดันโลหิตสูง [34] ร่างกายมนุษย์จึงจำเป็นต้องรักษาระดับ Mg^{2+} ในกระแสเลือดให้อยู่ในระดับที่เหมาะสมคือประมาณ 0.7-1.1 mM โดยอาศัยการทำงานของลำไส้ในการดูดซึม Mg^{2+} เข้าสู่ร่างกาย แต่ในการขับ Mg^{2+} ส่วนเกินออกจากร่างกาย กระดูกและเซลล์เนื้อเยื่อต่างๆ เป็นแหล่งสะสม Mg^{2+} ในร่างกายมนุษย์ [14, 21, 27, 35]

โอเมป्राโซล (omeprazole) เป็นยาที่มีฤทธิ์ยับยั้งการหลั่งกรดในกระเพาะอาหาร นิยมใช้รักษาโรคและภาวะผิดปกติของระบบทางเดินอาหาร อาทิเช่น โรคกรดไหลย้อน ภาวะอาหารอักเสบ และลำไส้เล็กส่วนต้นอักเสบ เป็นต้น เนื่องจากมีผลข้างเคียงน้อย และหาซื้อได้ง่ายจึงทำให้มีการใช้ omeprazole อย่างแพร่หลายจนเป็นยาในกลุ่มที่ขายดีที่สุดทั่วโลก [3, 23] อย่างไรก็ตามนับตั้งแต่ปี ค.ศ. 2006 จนปัจจุบันมีรายงานทางการแพทย์หลายฉบับบ่งชี้ว่าผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาด้วย omeprazole ติดต่อกันมากกว่า 1 ปี ส่งผลให้ระดับ Mg^{2+} ในกระแสเลือดต่ำกว่าระดับปกติอย่างรุนแรง (severe hypomagnesaemia) ร่วมกับภาวะผิดปกติอื่นๆ อาทิเช่น สับสน เชื่องซึม สั่นอย่างรุนแรง ฝ่ามือฝ่าเท้าเกร็ง ลมชัก และหมดสติ [2, 4, 7, 12, 15, 20, 29, 36] ผลการทดสอบพิเศษบ่งชี้ว่าผู้ป่วยข้างต้นมีภาวะพร่อง Mg^{2+} ในแหล่งสะสมในร่างกายอย่างรุนแรง ผลการทดสอบการทำงานของไตบ่งชี้ว่าไตทำงานได้ปกติ โดยผู้ป่วยไม่ได้มีภาวะสูญเสีย Mg^{2+} ทางปัสสาวะ แต่เป็นที่น่าสนใจว่าการรักษาโดยให้ Mg^{2+} เสริมทางการรับประทานไม่สามารถเพิ่มระดับ Mg^{2+} ในกระแสเลือดได้ แต่การให้ Mg^{2+} ทางหลอดเลือดสามารถรักษาระดับ Mg^{2+} ในกระแสเลือดให้กลับเป็นปกติได้อย่างรวดเร็ว บ่งชี้ว่าผู้ป่วยข้างต้นน่าจะมีการดูดซึม Mg^{2+} ในลำไส้บกพร่อง [2, 4, 7, 12, 15, 20, 29, 36]

ร่างกายมนุษย์จะได้รับ Mg^{2+} ทางการดูดซึมผ่านลำไส้ ผ่าน 2 กลไกหลักคือ passive Mg^{2+} absorption เป็นการดูดซึมแบบไม่ใช้พลังงานผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์ใน tight junction โดยเกี่ยวข้องกับการทำงานของโปรตีน claudin (Cldn)-2, -4, -5, -7, -8, -12, -13 และ -15 ที่แสดงออกใน tight junction ของแผ่นเซลล์เยื่อบุลำไส้ [9, 10, 26] และ active Mg^{2+} absorption เป็นการขนส่งแบบผ่านเซลล์ อาศัยการทำงานของ transient receptor potential melastatin 6 (TRPM6), TRPM7, และ basolateral Na^+/Mg^{2+} exchanger [24, 39] หากคิดเป็นร้อยละการดูดซึม Mg^{2+} ทั้งหมดโดยลำไส้ ลำไส้เล็กส่วน duodenum ดูดซึม 15% ส่วน jejunum ดูดซึม 22% ส่วน ileum ดูดซึม 56% และลำไส้ใหญ่ ดูดซึม 56% [21] การศึกษาก่อนหน้าของคณะผู้วิจัยพบว่า omeprazole มีฤทธิ์กีดการขนส่ง Mg^{2+} เพิ่มการแสดงออกของ acid sensors ได้แก่ acid-sensing ion channel 1a (ASIC1a), potential vanilloid 4 (TRPV4) และ ovarian cancer G protein-coupled receptor 1 (OGR1) ในแผ่นเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 ทั้งนี้การทำงานของ ASIC1a และ OGR1 มีผลเปลี่ยนแปลงการดูดซึม Mg^{2+} ผ่านแผ่นเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 ด้วย [31-33] การศึกษานำร่องของผู้วิจัยในหนูขาวเพศผู้สายพันธุ์ Sprague-Dawley โดยให้ omeprazole ความเข้มข้น 20 mg/kg (subcutaneous injection) เป็นเวลา 6 เดือนติดต่อกัน มีผลลดอัตราการดูดซึม Mg^{2+} ทางลำไส้เล็ก และในปี 2013 Lameris และคณะรายงานผลของ omeprazole เพิ่มการแสดงออกของ TRPM6 ในลำไส้ใหญ่หนู [17] อย่างไรก็ตามยังไม่มีการศึกษาอิทธิพลของ omeprazole ต่อกลไกการดูดซึม Mg^{2+} และกลไกควบคุมการดูดซึม

Mg²⁺ ระดับเซลล์ ในลำไส้ส่วน duodenum jejunum ileum cecum และ colon ผลการศึกษาจากโครงการวิจัยนี้จะแสดงผลข้างเคียงของการได้รับยา omeprazole ติดต่อกันเป็นระยะเวลานานต่อการดูดซึม Mg²⁺ ในลำไส้โดยตรง ซึ่งจะเป็นข้อมูลสำคัญต่อการศึกษาวิจัยต่อเนื่องเพื่อพัฒนาวิธีการป้องกัน และรักษาผลข้างเคียงของยา omeprazole ในผู้ป่วยที่จำเป็นต้องได้รับการรักษาด้วยยานี้ติดต่อกันเป็นเวลานาน

เพื่อศึกษาอิทธิพลของการได้รับ omeprazole ต่อการรักษาสมดุล Mg²⁺ ในร่างกายการศึกษานี้จึงเลือกใช้หนูขาวเพศผู้สายพันธุ์ Sprague-Dawley เนื่องจากเภสัชจลนศาสตร์ของ omeprazole ในหนูขาวสายพันธุ์ Sprague-Dawley [18] คล้ายคลึงกับในร่างกายมนุษย์ [18] การรักษาสมดุล Mg²⁺ โดยอาศัยการทำงานของลำไส้ ไต กระดูกและเนื้อเยื่อทั่วร่างกาย [8] คล้ายคลึงกับกลไกของมนุษย์ [5] นอกจากนั้นเมื่อพิจารณาจากอายุเฉลี่ย และระยะเวลาเจริญของมนุษย์และหนูขาว พบว่าระยะเวลา 1 ปีของมนุษย์ มีค่าโดยเฉลี่ยเท่ากับ 16.7 วันในหนูขาว [25] ดังนั้นหนูขาวจึงมีความเหมาะสมจะใช้ในการศึกษาอิทธิพลของการได้รับ omeprazole ติดต่อกันเป็นเวลานาน

ขอบเขตของโครงการวิจัย

การศึกษาทั้งหมดในโครงการวิจัยนี้ครอบคลุมการศึกษาสรีรวิทยาการควบคุมการดูดซึม Mg²⁺ ในลำไส้

ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

1. การให้ omeprazole ติดต่อกันเป็นเวลานาน (20 สัปดาห์) มีฤทธิ์ลดปริมาณ Mg²⁺ ในกระแสเลือดของสัตว์ทดลอง แต่ไม่มีผลในกลุ่มที่ได้รับในระยะเวลานี้ (4 สัปดาห์)

2. omeprazole มีฤทธิ์กีดการขนส่งแบบ passive Mg²⁺ absorption ซึ่งเป็นกลไกหลัก ในภาวะปกติ 90% ของ Mg²⁺ ที่ดูดซึมในลำไส้ ดูซึมผ่านกลไกนี้

3. omeprazole มีฤทธิ์เปลี่ยนแปลงการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการดูดซึมแบบ passive Mg²⁺ absorption และ active Mg²⁺ absorption ในลำไส้ของหนูขาว

4. ลำไส้ของหนูขาวมีการปรับตัวโดยเพิ่มอัตราการดูดซึมแบบ active Mg²⁺ absorption เพื่อชดเชยการลดลงของ passive Mg²⁺ absorption

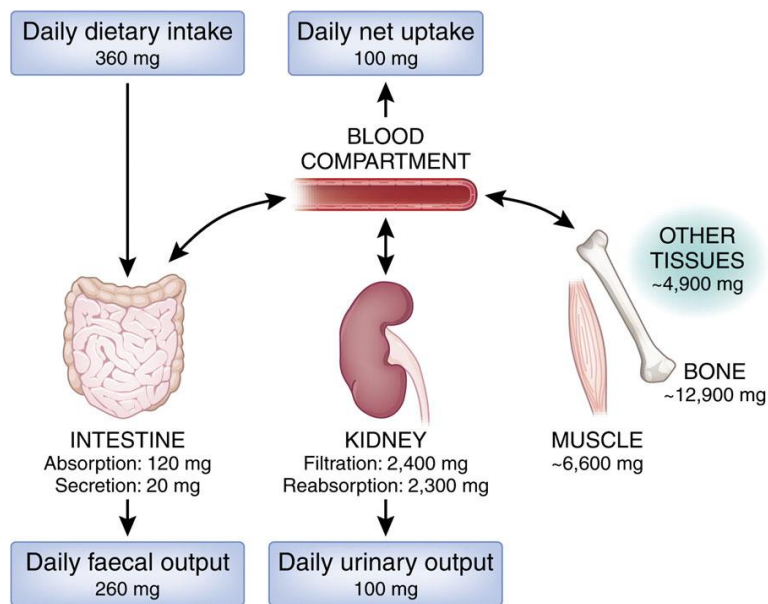
5. ลำไส้ของหนูขาวมีการปรับตัวโดยเพิ่มอัตราการดูดซึม Mg²⁺ ในลำไส้ส่วน cecum ซึ่งมีศักยภาพในการดูดซึมไอออนหลายตัว เช่น Ca²⁺ และดูดซึมได้ในปริมาณสูงเมื่อเทียบกับความยาว

6 omeprazole มีฤทธิ์เปลี่ยนแปลงการแสดงออกของ acid sensors ในลำไส้แต่ละส่วน และการทำงานของ acid sensor แต่ละชนิดก็มีฤทธิ์ควบคุมการดูดซึม Mg²⁺ ในลำไส้แต่ละส่วน

การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง

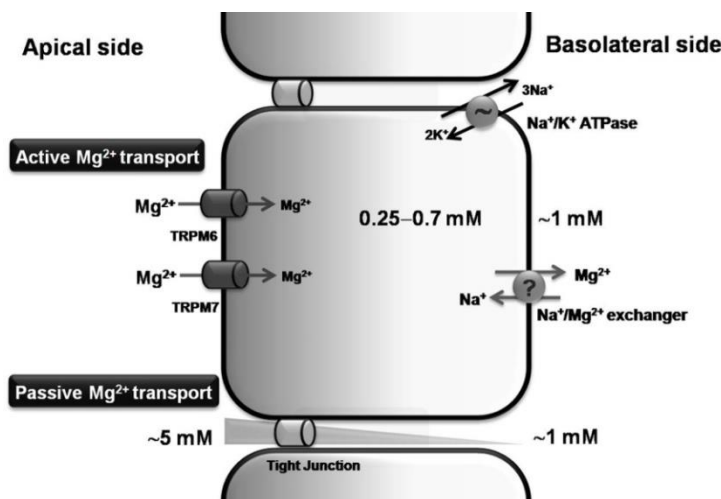
1 สมดุลของ Mg²⁺ ในร่างกายมนุษย์

ร่างกายของมนุษย์มี Mg²⁺ อยู่ทั้งหมดประมาณ 24 g [35] ส่วนใหญ่จะสะสมในกระดูก (~53%) และอยู่ในเซลล์เนื้อเยื่อต่างๆ ทั่วร่างกาย (~46%) ถือเป็นแหล่งสะสม Mg²⁺ ของร่างกายมนุษย์ ส่วนที่เหลือประมาณ 1% อยู่ในกระแสเลือดและของเหลวนอกเซลล์ [21, 27, 35] หากพิจารณาเฉพาะภายในเซลล์ Mg²⁺ จะรวมอยู่กับ adenosine triphosphate (ATP) ประมาณ 80–90% อีกประมาณ 6.5–9% จะรวมอยู่กับโปรตีนภายในเซลล์ และส่วนที่เหลือประมาณ 1–3.5% หรือ 0.25–0.7 mM อยู่ในรูปีอิสระ [11] ทั้งนี้ Mg²⁺ มีความสำคัญต่อการทำงานของเซลล์ทั่วร่างกาย เนื่องจาก Mg²⁺ เป็นไอออนที่ควบคุมการทำงานของ ion channel



รูปที่ 1. กลไกการรักษาสมดุล Mg^{2+} ในร่างกายมนุษย์ [5]

การคงรูปของโปรตีนภายในเซลล์ กระบวนการเผาผลาญพลังงานภายในเซลล์ และยังเป็นโคเอนไซม์ของ เอนไซม์สำคัญภายในเซลล์มากกว่า 300 ชนิด [21, 27] หากเกิดภาวะพร่อง Mg^{2+} ย่อมส่งผลกระทบต่อการทำงานของ ระดับเซลล์ และก่อให้เกิดปัญหาทางสุขภาพมากมาย อาทิเช่น โรคกระดูกพรุน [28] Alzheimer's disease [6] และความดันโลหิตสูง [34] เป็นต้น ดังนั้นปริมาณ Mg^{2+} ในกระแสเลือดจึงจำเป็นต้องถูกควบคุมให้อยู่ในระดับ ที่เหมาะสมดังแสดงในรูปที่ 1 คือประมาณ 0.7–1.1 mM โดยอาศัยการทำงานของลำไส้ในการดูดซึม Mg^{2+} เข้าสู่ร่างกาย ได้ในการขับ Mg^{2+} ส่วนเกินออกจากร่างกาย ในขณะที่กระดูกและอยู่ในเซลล์เนื้อเยื่อต่างๆ ทั่วร่างกายจะปล่อย Mg^{2+} ออกมาเมื่อปริมาณ Mg^{2+} ในการสเล็ดลดต่ำกว่าระดับปกติ เพื่อรักษาระดับ Mg^{2+} ในกระแสเลือด [5, 14]



รูปที่ 2. กลไกการดูดซึม Mg^{2+} ในเซลล์เยื่อบุลำไส้ [39]

การดูดซึม Mg^{2+} แบบผ่านช่องระหว่างเซลล์นั้นเป็นกระบวนการที่ไม่ใช้พลังงาน (passive Mg^{2+} transport) อาศัยความลาดเอียงทางความเข้มข้นของ Mg^{2+} ซึ่งปริมาณ Mg^{2+} อิสระในโพรงลำไส้มีค่ามากกว่าหรือประมาณ 5 mM ซึ่งสูงกว่าความเข้มข้นของ Mg^{2+} อิสระในกระแสเลือด และศักย์ไฟฟ้าที่เป็นบวก

ด้านโพรงลำไส้ (+5 mV) เหนี่ยวนำให้ Mg^{2+} แพร่จากโพรงลำไส้ผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์เยื่อลำไส้ก่อนเข้าสู่กระแสเลือด [24] กลไกการดูดซึมแบบผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์นี้ถือเป็นกลไกหลักของร่างกาย เนื่องจากดูดซึม ~90% ของปริมาณ Mg^{2+} ทั้งหมดที่ดูดซึมที่ลำไส้ [24] การศึกษาก่อนหน้าของผู้วิจัยพบว่า Cldn-7 และ Cldn-12 มีหน้าที่เป็น paracellular Mg^{2+} channel ในลำไส้ [32] การศึกษากลไกควบคุมการแสดงออกของ Cldn-7 และ Cldn-12 จึงอาจเป็นแนวทางสำคัญ ที่จะทำให้เข้าใจกลไกการดูดซึมแมกนีเซียมแบบผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์ นอกจากนั้นเซลล์เยื่อลำไส้ยังมีการแสดงออกของ Cldn-2, -4, -5, -8, -13 และ -15 ที่ [9, 10, 26] ซึ่งยังไม่มีการศึกษาวิจัยว่าโปรตีนเหล่านี้มีส่วนเกี่ยวข้องกับการดูดซึม Mg^{2+} แบบผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์ในลำไส้หรือไม่

2 omeprazole

omeprazole เป็นยาในกลุ่ม proton pump inhibitors ที่ประกอบด้วยสารเคมีสำคัญคือ pyridyl methyl sulfinylbenzimidazole เมื่อถูกกระตุ้นด้วยภาวะที่เป็นกรดในกระเพาะอาหาร จะเปลี่ยนเป็น sulphenamides ซึ่งจะจับกับหมู่ sulphhydryl ของกรดอะมิโน cysteine ตำแหน่งที่ 813 ของ H^+/K^+ -ATPase ด้วยพันธะโควาเลนต์ และยับยั้งการทำงานของ H^+/K^+ -ATPase ของ parietal cells ในกระเพาะอาหาร [19] ดังนั้น omeprazole จึงนิยมใช้รักษาโรคของระบบทางเดินอาหารที่จำเป็นต้องยับยั้งการหลั่งกรดจาก parietal cells ในกระเพาะอาหาร อาทิเช่น Barrett's esophagitis, gastro-esophageal reflux disease, gastritis เนื่องจากเป็นยาที่มีรายงานผลข้างเคียงน้อย และหาซื้อได้ง่ายโดยไม่ต้องมีใบสั่งยาจากแพทย์ก็มักจะทำให้ omeprazole เป็นยาที่นิยมและใช้อย่างแพร่หลาย และเป็นยาในกลุ่มยาที่ขายดีที่สุดทั่วโลก [3, 23] เมื่อรับประทาน omeprazole 40 mg จะทำให้มีระดับ omeprazole ในกระแสเลือดสูงสุดที่ 200–400 ng/ml [19] 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 [3]

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 (loss of consciousness) จนต้องนำส่งโรงพยาบาลโดยเร่งด่วน [2, 4, 7, 12, 16, 20, 29] จากการทดสอบพิเศษที่เรียกว่า Mg^{2+} retention test บ่งชี้ว่าผู้ป่วยข้างต้นมีภาวะพร่อง Mg^{2+} ในแหล่งสะสมของร่างกายอย่างรุนแรง [4] แต่ผู้ป่วยมีการทำงานของไตในการจัดการ Mg^{2+} เป็นปกติ มิได้มีการสูญเสีย Mg^{2+} ไปกับปัสสาวะ [2, 4, 7, 12, 16, 20, 29, 36] เป็นที่น่าสนใจว่าการรักษาโดยการให้ Mg^{2+} ปริมาณสูงเสริมทางการรับประทานนั้นไม่สามารถรักษาระดับของ Mg^{2+} ในกระแสเลือดให้กลับเป็นปกติได้ ในทางตรงกันข้ามการให้ Mg^{2+} เสริมทางหลอดเลือดโดยตรงกลับทำให้ระดับ Mg^{2+} ในกระแสเลือดกลับสู่ระดับปกติอย่างรวดเร็ว บ่งชี้ว่า omeprazole มีฤทธิ์รบกวนการดูดซึม Mg^{2+} ในลำไส้ [2, 4, 7, 12, 16, 20, 29] ยิ่งไปกว่านั้นเมื่อแพทย์หยุดจ่ายยา omeprazole ให้คนไข้เพียง 1 – 2 สัปดาห์ พร้อมกับการให้ Mg^{2+} เสริมทางการรับประทาน ส่งผลให้ระดับ Mg^{2+} ในกระแสเลือดกลับสู่ระดับปกติได้ แต่เนื่องจากคนไข้ข้างต้นมักเป็นผู้ป่วยเรื้อรัง การหยุดใช้ omeprazole จึงทำให้อาการของระบบทางเดินอาหารกลับแย่ลงจึงจำเป็นต้องจ่ายยาตัวนี้อีกครั้ง หรือยาในกลุ่มยายับยั้งการหลั่งกรดตัวอื่น และเมื่อมีการกลับมาใช้ omeprazole อีก

เพียง 1 – 2 สัปดาห์ พร้อมกับการให้ Mg^{2+} เสริมทางการรับประทาน กลับทำให้ระดับ Mg^{2+} ในกระแสเลือดต่ำลงอีกครั้ง [2, 4, 7, 12, 16, 20, 29] บ่งชี้ได้ว่า omeprazole มีฤทธิ์ลดการดูดซึม Mg^{2+} เพียง 7 – 14 วันหลังได้รับยา ดังนั้นการพัฒนาของภาวะปริมาณ Mg^{2+} ในกระแสเลือดต่ำที่ใช้เวลานานนั้นน่าจะเกิดจากการสูญเสียการดูดซึม Mg^{2+} ในลำไส้ จึงทำให้ร่างกายต้องใช้ Mg^{2+} จากแหล่งสะสมของร่างกาย แต่เมื่อมีการนำ Mg^{2+} จากแหล่งสะสมมาใช้ติดต่อกันเป็นระยะเวลานานจึงทำให้เกิดการพร่องของ Mg^{2+} ในแหล่งสะสมของร่างกาย และไม่สามารถช่วยรักษาระดับ Mg^{2+} ในกระแสเลือดได้ จนเกิดภาวะปริมาณ Mg^{2+} ในกระแสเลือดต่ำกว่าปกติ [4] การศึกษากลไกควบคุมการดูดซึม Mg^{2+} ในเซลล์เยื่อบุลำไส้ และกลไกการออกฤทธิ์ระดับเซลล์ของ omeprazole ต่อการดูดซึม Mg^{2+} ในลำไส้จึงเป็นสิ่งจำเป็นยิ่งในการป้องกันภาวะ hypomagnesaemia ในคนไข้ที่ต้องใช้ยากลุ่มนี้ติดต่อกันเป็นเวลานาน และเพื่อเป็นองค์ความรู้ต่อการศึกษาค้นคว้าพัฒนาวิธีการเพิ่มการดูดซึม Mg^{2+} ในผู้ป่วยที่มีภาวะพร่อง Mg^{2+} จากสาเหตุอื่นๆ อย่างไรก็ตามข้อมูลข้างต้นนั้นเป็นข้อมูลในชั้นคลินิกในผู้ป่วยจริงที่ใช้ omeprazole ติดต่อกันเป็นเวลานานซึ่งอาจจะมีหลายปัจจัยที่เกี่ยวข้องต่อภาวะ hypomagnesaemia อิทธิพลโดยตรงของ omeprazole ต่อการรักษาสมดุล Mg^{2+} ในร่างกายมนุษย์หรือสัตว์ทดลองนั้นยังไม่มีการศึกษาวิจัย

จากการศึกษาที่ผ่านมาของคณะผู้วิจัยพบว่า omeprazole มีฤทธิ์ลดการขนส่ง Mg^{2+} แบบผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์ ลดความสามารถในการคัดเลือกประจุบวกผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์ ลดการแสดงออกของ Cldn-7 และ -12 เพิ่มการแสดงออกของ ASIC1a, TRPV4, และ OGR1 และเพิ่มการขับ HCO_3^- ในแผ่นเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 [31-33] การศึกษานำร่องของผู้วิจัยในหนูขาวเพศผู้สายพันธุ์ Sprague-Dawley โดยให้ omeprazole ความเข้มข้น 20 mg/kg (subcutaneous injection) เป็นเวลา 20 สัปดาห์ติดต่อกัน มีผลลดอัตราการดูดซึม Mg^{2+} ทางลำไส้เล็กเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ Lameris และคณะรายงานผลของ omeprazole (28 วัน) เพิ่มการแสดงออกของ TRPM6 ในลำไส้ใหญ่ของสัตว์ทดลอง ซึ่งน่าจะเป็นกลไกการปรับตัวของสัตว์ทดลอง [17] อย่างไรก็ตามยังไม่มีการศึกษาอิทธิพลของ omeprazole ต่อกลไกการดูดซึม Mg^{2+} และกลไกควบคุมการดูดซึม Mg^{2+} ระดับเซลล์ ในลำไส้ส่วน duodenum jejunum ileum cecum และ colon ผลการศึกษาจากโครงการวิจัยนี้จะแสดงผลข้างเคียงของการได้รับยา omeprazole ติดต่อกันเป็นระยะเวลานานต่อการดูดซึม Mg^{2+} ในลำไส้โดยตรง ซึ่งจะเป็นข้อมูลสำคัญต่อการศึกษาวิจัยต่อเนื่องเพื่อพัฒนาวิธีการป้องกัน และรักษาผลข้างเคียงของยา omeprazole ในผู้ป่วยที่จำเป็นต้องได้รับการรักษาด้วยยานิดนี้ติดต่อกันเป็นเวลานาน

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

- 1 เพื่อศึกษาผลของการได้รับ omeprazole ติดต่อกันเป็นเวลานาน ต่อระดับ Mg^{2+} ในกระแสเลือดและในปัสสาวะของหนูขาว
- 2 เพื่อศึกษาผลของการได้รับ omeprazole ติดต่อกันเป็นเวลานาน ต่อการดูดซึม Mg^{2+} แบบใช้พลังงานและไม่ใช้พลังงานในลำไส้ส่วน duodenum jejunum ileum cecum และ colon ของหนูขาว
- 3 เพื่อศึกษาผลของการได้รับ omeprazole ติดต่อกันเป็นเวลานานกลไกการส่งคำสั่งระดับเซลล์ ที่เกี่ยวข้องกับการดูดซึม Mg^{2+} ในลำไส้ส่วน duodenum jejunum ileum cecum และ colon ของหนูขาว
- 4 เพื่อศึกษาผลของการได้รับ omeprazole ติดต่อกันเป็นเวลานาน ต่อการแสดงออกของ TRPM6 และ CNM4 ในลำไส้ส่วน duodenum jejunum ileum cecum และ colon ของหนูขาว

5 เพื่อศึกษาผลของการได้รับ omeprazole ติดต่อกันเป็นเวลานาน ต่อการแสดงออก และการทำงานของ ASIC1a, OGR1, และ P2Y purinoceptors ในลำไส้ส่วน duodenum jejunum ileum cecum และ colon ของหนูขาว

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1 ด้านวิชาการ

ผลการศึกษาจากโครงการวิจัยนี้จะเพิ่มองค์ความรู้ด้านสรีรวิทยาการรักษาสสมดุล Mg^{2+} และกลไกควบคุมการดูดซึม Mg^{2+} ในลำไส้ ซึ่งจะเป็นข้อมูลสำคัญต่อการศึกษาต่อยอดเพื่อการพัฒนาวิธีการป้องกันและรักษาผลข้างเคียงของยา omeprazole ในผู้ป่วยที่จำเป็นต้องได้รับการรักษาด้วยยาชนิดนี้ติดต่อกันเป็นเวลานาน

ผู้วิจัยมีแผนที่จะให้นิสิตระดับบัณฑิตศึกษาในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตรการแพทย์) และปรัชญาดุษฎีบัณฑิต (วิทยาศาสตรการแพทย์) ที่ผู้วิจัยเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วมทำการวิจัยภายใต้การควบคุมของผู้วิจัย ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการสร้างนักวิจัยรุ่นใหม่ในสาขาวิชาสรีรวิทยา

ผลการวิจัยจากโครงการวิจัยนี้คาดว่าจะตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารวิจัยระดับนานาชาติคือ Journal of Physiological Science ในหัวข้อเรื่อง The effect of prolong omeprazole administration on intestinal Mg^{2+} handling of male Sprague-Dawley rats

ผลงานวิจัยจากโครงการวิจัยนี้ที่ได้รับการเผยแพร่ในวารสารวิชาการนานาชาติจะถูกนำไปเป็นหัวข้อเรียนของนิสิตระดับปริญญาตรี และบัณฑิตศึกษาในรายวิชาการวิเคราะห์บทความวิจัยทางวิทยาศาสตร์ และรายวิชาหัวข้อเลือกสรรคทางสรีรวิทยา 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 ซึ่งผู้ให้การรักษาควรตระหนักหากต้องจ่ายยายับยั้งการหลั่งกรดแก่ผู้ป่วยติดต่อกันเป็นระยะเวลานานเพื่อป้องกันผลข้างเคียงของยา และลดภาระค่าใช้จ่ายด้านการดูแลสุขภาพของผู้ป่วยเหล่านั้นด้วย

เนื้อเรื่อง (Main body)

วิธีการดำเนินการวิจัย และสถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล

การดำเนินการวิจัยทั้งหมดในโครงการวิจัยนี้ ดำเนินการ ณ อาคารวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา โดยมีวิธีการดำเนินการวิจัยดังนี้

1 สัตว์ทดลอง

1.1 การเลี้ยงสัตว์ทดลอง

หนูขาวเพศผู้สายพันธุ์ Sprague-Dawley อายุ 9 สัปดาห์ น้ำหนัก 250-350 กรัม จำนวน 45 ตัว ได้รับจากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล และเลี้ยงในสภาพแวดล้อมปิดเป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์ก่อนเริ่มดำเนินการทดลองเพื่อให้สัตว์ทดลองปรับสภาพต่อสภาพแวดล้อมของสถานที่เลี้ยงใหม่ จากนั้นในสัตว์ทดลองจะถูกแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่

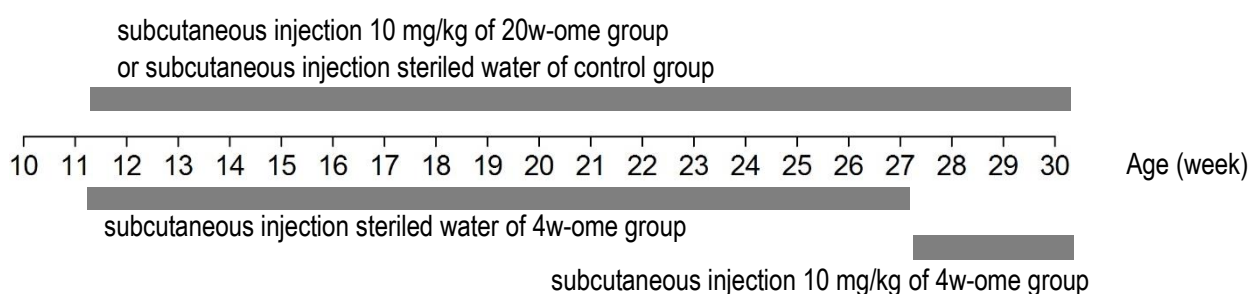
1. กลุ่มควบคุม (control group) จำนวน 15 ตัว
2. กลุ่มที่ได้รับโอเมปราโซล 4 สัปดาห์ (4w-ome group) จำนวน 15 ตัว
3. กลุ่มที่ได้รับโอเมปราโซล 20 สัปดาห์ (20w-ome group) จำนวน 15 ตัว

จากนั้นสัตว์ทดลองทั้งหมดจะถูกเลี้ยงในสภาพแวดล้อมเดียวกันจนกว่าจะมีอายุครบ 30 สัปดาห์ก่อนทำการเก็บตัวอย่าง และกำจัดสัตว์ทดลองตามข้อปฏิบัติจริยธรรมการวิจัยในสัตว์ทดลอง

1.2 การให้ยา omeprazole แก่สัตว์ทดลอง

การศึกษานี้เลือกใช้ omeprazole ชนิดฉีดเข้าหลอดเลือด (Ocid[®] IV, Zydus Cadila, India) ซึ่งตัวทำละลายของยาเป็นน้ำปลอดเชื้อมีค่า pH 6-7 ช่วยลดการระคายเคืองจากการฉีดโดยฉีดเข้าชั้นใต้ผิวหนัง (subcutaneous injection) ที่ความเข้มข้น 10 mg/kg [11] เนื่องจากบริเวณชั้นใต้ผิวหนังเป็นบริเวณที่มีหลอดเลือดฝอยจำนวนมาก ตัวยาจึงถูกดูดซึมเข้ากระแสเลือดได้อย่างรวดเร็ว ลดการบาดเจ็บต่ออวัยวะภายในจากการฉีดเข้าช่องท้อง ลดการบาดเจ็บของหลอดเลือดจากการฉีดเข้าหลอดเลือดโดยตรง และสามารถฉีดได้ต่อเนื่องเป็นเวลานานโดยมีผลกระทบต่อสัตว์ทดลองน้อยที่สุด [22] และจากการศึกษานำร่องของคณะผู้วิจัยพบว่าการฉีด omeprazole เข้าชั้นใต้ผิวหนังติดต่อกัน 20 สัปดาห์ ไม่ก่อให้เกิดการระคายเคือง หรือการอักเสบของผิวหนัง และชั้นใต้ผิวหนังของหนูขาว ยิ่งไปกว่านั้นประสิทธิภาพในการยับยั้งการหลั่งกรดในกระเพาะอาหาร หลังจากให้ omeprazole โดยฉีดเข้าชั้นใต้ผิวหนัง ก็ทัดเทียมกับการให้ omeprazole โดยการฉีดเข้าหลอดเลือดดำทั้งในหนูขาว [13] และในมนุษย์ [1]

- กลุ่มควบคุม จะได้รับการฉีดน้ำปลอดเชื้อที่ใช้ในการละลาย omeprazole ในสัปดาห์ที่ 11 ถึง สัปดาห์ที่ 30
 - กลุ่มที่ได้รับโอเมปราโซล 4 สัปดาห์ (4w-ome group) จะได้รับการฉีดน้ำปลอดเชื้อที่ใช้ในการละลาย omeprazole ในสัปดาห์ที่ 11 ถึง 26 จึงทำการฉีด omeprazole ที่ความเข้มข้น 20 mg/kg ในสัปดาห์ที่ 27, 28, 29, และ 30
 - กลุ่มที่ได้รับโอเมปราโซล 20 สัปดาห์ (20w-ome group) จะได้รับการฉีด omeprazole ที่ความเข้มข้น 20 mg/kg ในสัปดาห์ที่ 11 ถึง สัปดาห์ที่ 30 (รูปที่ 3)
- ทั้งนี้ตลอดระยะเวลาที่ทำการฉีด ผู้วิจัยจะสังเกตผลข้างเคียงของการฉีด omeprazole เข้าชั้นใต้ผิวหนัง ได้แก่ การระคายเคือง แผลจากการฉีด ปริมาณอาหารและน้ำที่สัตว์ทดลองบริโภค ซึ่งหากพบว่ามีผิดปกติกับสัตว์ทดลองตัวใดผู้วิจัยจะทำการแก้ไข หรือคัดสัตว์ทดลองตัวนั้นๆ ออกจากการทดลอง

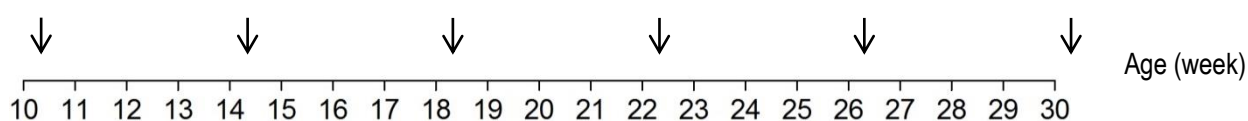


รูปที่ 3. ภาพแสดงช่วงเวลาการฉีด omeprazole ในสัตว์ทดลอง

1.3 การเก็บตัวอย่างในสัตว์ทดลอง

เก็บปัสสาวะในสัปดาห์ที่ 10 14 18 22 26 และ 30 (รูปที่ 4) โดยเลี้ยงสัตว์ทดลองใน metabolic cage และเก็บปัสสาวะในระยะเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อนำไปวัดระดับ Mg^{2+} , Ca^{2+} , และ PO_4^- ซึ่งส่งตรวจที่ห้องปฏิบัติการเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลมหาวิทยาลัยบูรพา

ในสัปดาห์ที่ 30 สัตว์ทดลองจะถูกทำให้สลบโดยใช้ thiopental ความเข้มข้น 70 mg/kg ฉีดเข้าช่องท้อง จากนั้นจึงเปิดช่องอกเพื่อเก็บเลือดจากหัวใจปริมาตร 4 – 5 ml และถือเป็นการ terminate สัตว์ทดลองเพื่อนำไปวัดระดับ Mg^{2+} , Ca^{2+} , และ PO_4^- ระดับ parathyroid hormone (PTH) และ vitamin-D₃ ซึ่งส่งตรวจที่ห้องปฏิบัติการเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลมหาวิทยาลัยบูรพา จากนั้นรีบทำการเปิดช่องท้องเพื่อเก็บลำไส้เล็ก โดยแบ่งลำไส้ออกเป็น 5 ส่วน คือ (1) duodenum เก็บลำไส้ส่วนที่ต่อจากกระเพาะอาหารความยาวประมาณ 12 เซนติเมตร (2) ileum เก็บลำไส้ส่วนที่อยู่เหนือต่อ cecum ความยาวประมาณ 12 เซนติเมตร (3) jejunum คือส่วนที่อยู่ระหว่าง duodenum และ ileum (4) cecum และ (5) colon ความยาวประมาณ 7 เซนติเมตร ถัดจาก cecum จากนั้นลำไส้ทั้ง 5 ส่วนจะถูกนำไปศึกษาการดูดซึม Mg^{2+} คุณสมบัติทางชีวฟิสิกส์ การแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการขนส่ง Mg^{2+} และลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยา ซึ่งจะกล่าวถึงในลำดับหัวข้อถัดไป



รูปที่ 4. ภาพแสดงช่วงเวลาการเก็บตัวอย่างในสัตว์ทดลอง (ลูกศร)

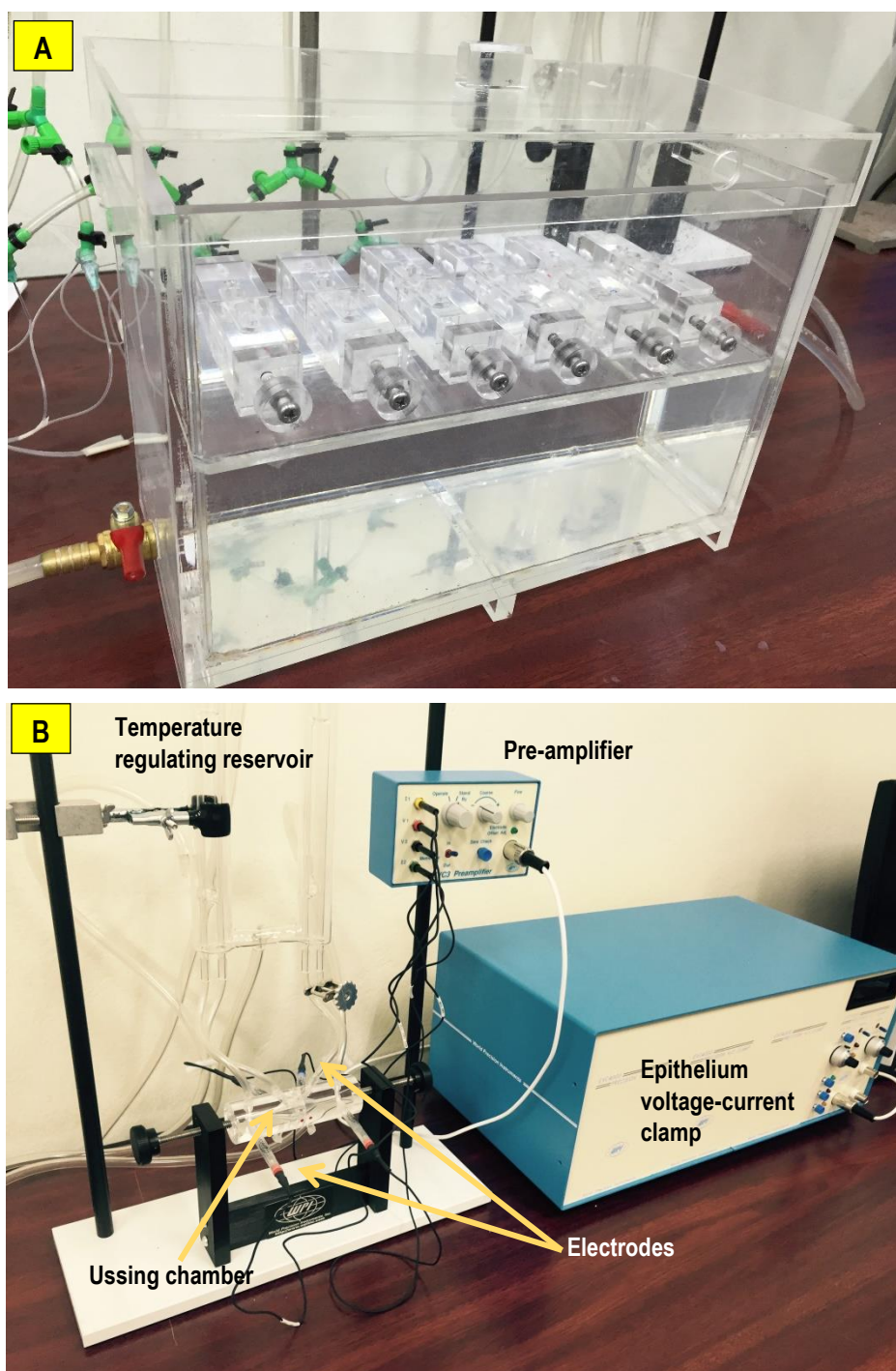
2 การศึกษาลำไส้ของหนูขาว

2.1 การศึกษาการขนส่ง Mg^{2+}

โดยนำลำไส้เล็กแต่ละส่วนมาแผ่ออกเป็นแผ่น ล้างให้สะอาดด้วย physiological bathing solution ที่ประกอบด้วย NaCl 118 mM, KCl 4.7 mM, $MgCl_2$ 1.1 mM, $CaCl_2$ 1.25mM, $NaHCO_3$ 23 mM, D-glucose 12 mM, L-glutamine 2.5 mM และ mannitol 2 mM และมีค่า osmolarity เท่ากับ 290-295 mmol kg^{-1} H_2O อุณหภูมิ 37 °C ก่อนนำไปศึกษาด้วย high throughput Ussing chamber setup (รูปที่ 5A) แผ่นลำไส้จะอยู่ตรงกลาง Ussing chamber และแบ่งระหว่างสองด้านของ chamber ทั้งนี้ high throughput Ussing chamber setup ผู้วิจัยเป็นผู้ออกแบบเอง โดยมี Ussing chamber 6 คู่ ทำให้สามารถศึกษาการขนส่ง Mg^{2+} ในการทดลองที่แตกต่างกันได้ 6 การทดลองในครั้งเดียว และจากการศึกษานำร่องพบว่าการขนส่ง Mg^{2+} ที่ศึกษาโดยใช้ high throughput Ussing chamber setup (รูปที่ 5A) มีประสิทธิภาพทัดเทียมกับ standard Ussing chamber system (World Precision Instrument, Sarasota, FL, USA) (รูปที่ 5B) นอกจากนี้ผู้วิจัยยังมีแผนผลิต high throughput Ussing chamber setup เพิ่ม เพื่อให้สามารถทำการทดลองได้หลายการทดลองในเวลาเดียวกัน และลดจำนวนการใช้สัตว์ทดลองได้อีกด้วย

เมื่อเริ่มทำการทดลอง ดูด physiological bathing solution ออก แล้วเติมด้าน basolateral ของแผ่นลำไส้ด้วย Mg-free bathing solution ($CaCl_2$ 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 osmolarity เท่ากับ 290–295 mmol kg^{-1} H_2O) และเติมด้าน apical ของแผ่นลำไส้ด้วย 40 mM Mg bathing solution ($MgCl_2$ 40 mM, $CaCl_2$ 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 osmolarity เท่ากับ 290–295 mmol kg^{-1} H_2O) ทั้งนี้เพื่อให้เกิดความลาดเอียงทางความเข้มข้นและเหนี่ยวนำให้เกิดการขนส่ง Mg^{2+} แบบผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์ จากนั้นจึงเก็บตัวอย่าง 50 μ L จาก bathing solution ด้าน basolateral ทุกๆ 30 นาทีเป็นเวลา 90 นาที ก่อนผสมตัวอย่างกับ Xylidyl-Blue reagent ซึ่งประกอบด้วย Tris Buffer 250 mM, K_2CO_3 70 mM, EGTA 40 mM, และ Xylidyl-Blue (Sigma, St. Louis, MO, USA) 0.1 mM ปริมาตร 1 mL แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืน

แสงที่ความยาวคลื่น 520 nm โดยใช้เครื่อง UV spectrophotometer (model UV-2550; Shimadzu, Kyoto, Japan) [23] ความเข้มข้นของ Mg^{2+} จะถูกคำนวณโดยนำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปเทียบกับเส้นกราฟความเข้มข้นมาตรฐานซึ่งเกิดจากการนำ 50 μL ของ $MgCl_2$ ที่ความเข้มข้น 0, 2, 8, 20, 40 หรือ 80 mM ผสมกับ Xylidyl-Blue reagent 1 mL แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 nm เช่นเดียวกับวิธีการข้างต้น จากนั้นจึงหาค่าความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของ Mg^{2+} ก่อนนำค่าความเข้มข้นของ Mg^{2+} ไปคำนวณหาค่าอัตราการขนส่ง Mg^{2+} [31]



รูปที่ 5. ภาพแสดง high throughput Ussing chamber setup (A) และ standard Ussing chamber system (B)

อัตราการขนส่ง Mg^{2+} ข้างต้นถือเป็น total Mg^{2+} absorption คือเกิดจากการขนส่งแบบ passive และ active Mg^{2+} absorption รวมกัน ผู้วิจัยจะทำการทดลองการขนส่ง Mg^{2+} ดังวิธีการข้างต้น โดยใช้ลำไส้ส่วนเดียวกันและจากสัตว์ตัวเดียวกัน แต่เติม 10 nM ruthenium red ด้านโพรงลำไส้ เพื่อหยุดการทำงานของ TRPM6 และ TRPM7 และเป็นการยับยั้ง active Mg^{2+} absorption ผลที่ได้จึงเป็นอัตราการขนส่งแบบ passive Mg^{2+} absorption จากนั้นจึงนำอัตราการขนส่ง total Mg^{2+} absorption ลบด้วย passive Mg^{2+} absorption จะได้เป็นอัตราการขนส่งแบบ active Mg^{2+} absorption

2.3 การวัดค่าทางไฟฟ้าของแผ่นเซลล์เยื่อบุลำไส้

ทำการศึกษาใน standard Ussing chamber system (World Precision Instrument, Sarasota, FL, USA) (รูปที่ 5B) ซึ่งแผ่นลำไส้จะแช่อยู่ใน physiological bathing solution ที่ประกอบด้วย NaCl 118 mM, KCl 4.7 mM, $MgCl_2$ 1.1 mM, $CaCl_2$ 1.25 mM, $NaHCO_3$ 23 mM, D-glucose 12 mM, L-glutamine 2.5 mM และ mannitol 2 mM และมีค่า osmolarity เท่ากับ 290-295 mmol kg^{-1} H_2O ตลอดการทดลองใน modified Ussing chamber system จะมีการให้ humidified 5% CO_2 และ 95% O_2 เข้าไปในระบบ ซึ่งควบคุมอุณหภูมิที่ 37 °C

ในการวัดค่าทางไฟฟ้านั้น chamber แต่ละด้านจะถูกต่อพ่วงด้วย Ag/AgCl electrode จำนวน 2 คู่ โดย electrode คู่แรกจะอยู่บริเวณชิดกับแผ่นลำไส้เพื่อทำการวัดค่าความต่างศักย์ไฟฟ้า (Vt) (รูปที่ 5B) โดยปลายอีกด้านของ electrode ที่วัดค่าความต่างศักย์ไฟฟ้านั้นจะต่อพ่วงกับ pre-amplifier ของเครื่อง epithelium voltage-current clamp (model ECV-4000; World Precision Instrument, Sarasota, FL, USA) ส่วน electrode อีกคู่หนึ่งจะต่อเข้ากับปลายแต่ละด้านของ chamber เพื่อให้กระแส short-circuits current (I_{sc}) จาก ECV-4000 current-generating unit ของเครื่อง epithelium voltage-current clamp วัดค่าทางไฟฟ้าทุก 5 นาที เป็นเวลา 30 นาที ค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าและค่า I_{sc} ที่ได้จะถูกนำไปคำนวณเพื่อหาค่าความต้านทานไฟฟ้าของแผ่นแผ่นลำไส้โดยใช้กฎของโอห์ม [31]

2.4 การศึกษา charge selectivity โดย dilution potential technique

ทำการทดลองใน Ussing chamber setup โดยก่อนเริ่มทำการศึกษาแผ่นลำไส้จะแช่อยู่ใน physiological bathing solution ซึ่งมีความเข้มข้นของ NaCl ที่ 145 mM เช่นเดียวกับการศึกษาในข้อ 13.2.3 เมื่อเริ่มทำการทดลอง bathing solution ด้าน basolateral จะถูกเปลี่ยนเป็น bathing solution ที่มีความเข้มข้นของ NaCl ที่ 72.5 mM จากนั้นจะวัดค่าทางไฟฟ้าทุก 1 วินาที เป็นเวลาทั้งสิ้น 8 วินาที แล้วนำค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าที่เปลี่ยนไป และ I_{sc} ไปใช้ในการคำนวณด้วย Goldman-Hodgkin-Katz equation และ Kimizuka-Koketsu equation เพื่อหาค่า permeability ratio ของ Na^+ ต่อ Cl^- (P_{Na}/P_{Cl}) ค่า absolute sodium permeability (P_{Na}) และ ค่า absolute chloride permeability (P_{Cl}) [32] เพื่อศึกษาการคัดเลือกประจุของแผ่นลำไส้ว่าขนส่งไอออนประจุบวก หรือประจุลบ มากกว่า

2.5 Western blot analysis

สกัดโปรตีนจากเซลล์เซลล์เยื่อบุลำไส้โดยใช้ Pierce® Ripa Buffer (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL, USA) และเครื่อง ultrasonicator จากนั้นนำโปรตีน (35 μ g) ที่สกัดได้ไปแยกด้วยกระแสไฟฟ้าใน 10% SDS-PAGE gel จากนั้นทำการย้ายโปรตีนไปยัง nitrocellulose membrane (Amersham, Buckinghamshire, UK) และนำ membrane ไปบ่มใน primary antibody ที่มีความจำเพาะต่อโปรตีน TRPM6, TRPM7, Na^+/Mg^{2+} exchanger, Cldn-2, -4, -5, -7, -8, -12, -13, -15 (Santa Cruz Biotechnology, California, USA) หรือ actin เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4°C ก่อนนำ membrane มา

บ่มใน HRP-conjugated secondary antibody (Zymed, San Francisco, CA, USA) ทำการศึกษาปริมาณ การแสดงออกของโปรตีนโดยใช้ Thermo Scientific SuperSignal® West Pico Substrate (Thermo Fisher Scientific Inc.) และ CL-XPosure Film (Thermo Fisher Scientific Inc.) แล้ววัดความเข้มของแถบ โปรตีนด้วยโปรแกรม Scion Image และเปรียบเทียบขนาดของโปรตีนที่ศึกษาโดยใช้ Cruz Marker™ Molecular Weight Standards (Santa Cruz Biotechnology)

2.6 Avidin biotin complex immunohistochemistry

นำแผ่นลำไส้ที่แช่ใน 10% paraformaldehyde แล้วล้างด้วย 3 ครั้ง กำจัดพาราฟินในไซ ลิน (deparaffinization) ผ่านในชุดของ alcohol เพื่อเติมน้ำ (rehydrate) ล้างด้วย tris-buffered saline (TBS) นำไปแช่ในสารละลาย hydrogen peroxide (0.3%, v/v ใน methyl alcohol) นาน 30 นาที แล้วบ่ม ด้วย normal goat serum ที่ทิ้งไว้ 15 นาที บ่มด้วย primary antibody ที่จำเพาะต่อ TRPM6 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4°C ล้างด้วย TBS 3 ครั้ง บ่มด้วย biotinylated secondary antibody ที่ทิ้งไว้ นาน 30 นาที ล้างด้วย TBS 3 ครั้ง แล้วบ่มด้วย streptavidin peroxidase conjugate นาน 45 นาที ล้างด้วย TBS 3 ครั้ง จากนั้นจึงบ่มด้วย 3, 3-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) ที่มี hydrogen peroxide เข้มข้น 0.03% นาน 5 นาที ย้อมทับด้วยสี hematoxylin นำสไลด์ไปผ่านในชุดของ alcohol เพื่อดึงน้ำออก (dehydrate) บ่มในไซลีน ปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์ ก่อนนำไปศึกษาใต้กล้องจุลทรรศน์

2.7 Transmission electron microscopy (TEM)

นำแผ่นลำไส้มาบ่มด้วย 2.5% glutaraldehyde ที่ละลายใน 0.1 mmol/L PBS ที่ อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย 0.1 mmol/L PBS 3 ครั้ง จากนั้นจึง บ่มด้วย 1% OsO₄ ที่ อุณหภูมิ 4 °C นาน 1 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย 0.1 mmol/L PBS 6 ครั้ง นำตัวอย่างมา dehydrate ด้วย 50%, 70%, 80%, 95% ethyl alcohol ขั้นตอนละ 1 ครั้ง ครั้งละ 30 นาที และ 100% ethyl alcohol 3 ครั้ง ครั้ง ละ 30 นาที หลังจากนั้นนำมาแช่ใน propylene oxide (PO) 2 ครั้ง ครั้งละ 30 นาที และ PO ที่ผสมด้วย araldite 502 ในอัตราส่วน 2:1 นาน 1 ชั่วโมง และในอัตราส่วน 1:2 นาน 12 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำตัวอย่าง ไปฝังใน araldite 502 ปริศูร์ทนาน 24 ชั่วโมง แล้วนำไป polymerize ที่อุณหภูมิ 45 และ 60 °C ขั้นตอนละ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ นำตัวอย่างที่ได้มาตัด ultrathin section วางบน copper grid แล้วย้อมด้วย uranyl acetate และ lead citrate ขั้นตอนละ 30 นาที ตามลำดับ แล้วนำไปศึกษาภายในกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน แบบส่องผ่าน (TEM)

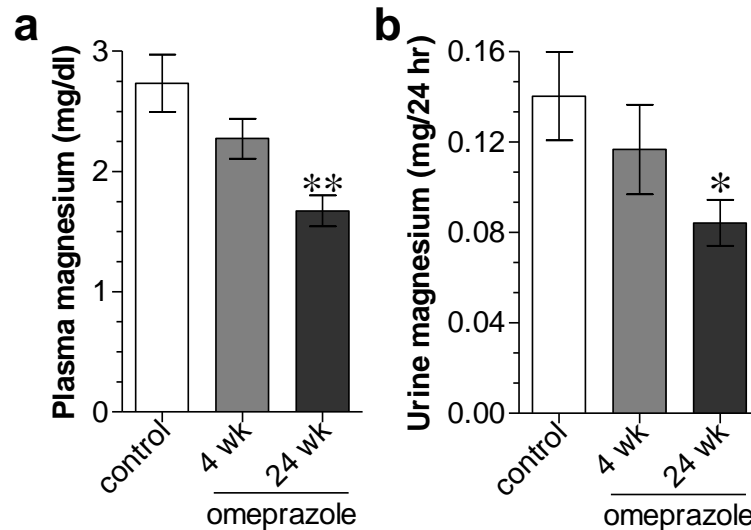
3 วิธีการประเมินผล/ สังเคราะห์ข้อมูล

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

ผลการวิจัย (Results)

1 ผลของการได้รับ omeprazole ติดต่อกันเป็นเวลานาน ต่อระดับ Mg^{2+} ในกระแสเลือด และในปัสสาวะ ของหนูขาว

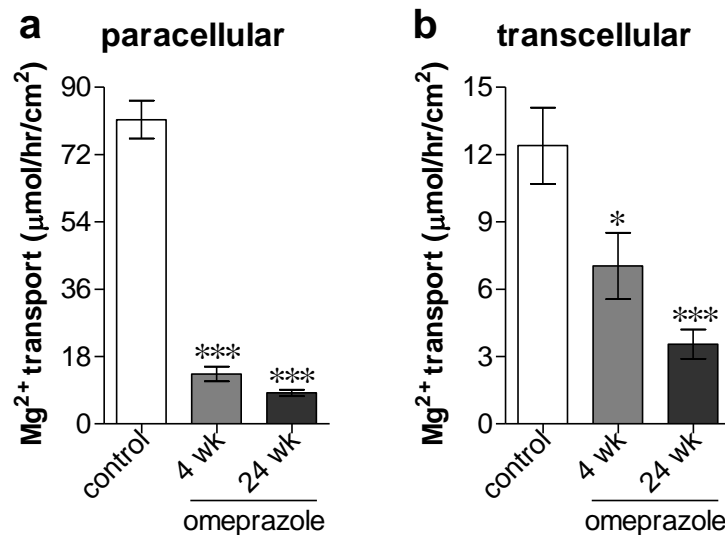
ผลการศึกษาวิจัยส่วนที่ 1 พบว่าการได้รับ omeprazole ติดต่อกันเป็นเวลา 6 เดือน มีฤทธิ์ลดระดับ Mg^{2+} ในกระแสเลือด (รูปที่ 6 a) และในปัสสาวะ (รูปที่ 6 b) ของหนูขาวเพศผู้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อพิจารณาระดับ Mg^{2+} ในร่างกายที่ 1.75–2.45 mg/dL จะพบว่าระดับ Mg^{2+} ในกระแสเลือดของหนูที่ได้รับ omeprazole ติดต่อกันเป็นเวลา 6 เดือน มีค่า 1.67 ± 0.13 mg/dL ต่ำกว่าระดับมาตรฐาน บ่งชี้ภาวะพร่อง Mg^{2+} ในกระแสเลือด (hypomagnesaemia)



รูปที่ 6 อิทธิพลของการได้รับ omeprazole ติดต่อกันเป็นเวลานาน ต่อระดับ Mg^{2+} ในกระแสเลือด (a) และในปัสสาวะ (b) ของหนูขาว * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($n = 5$).

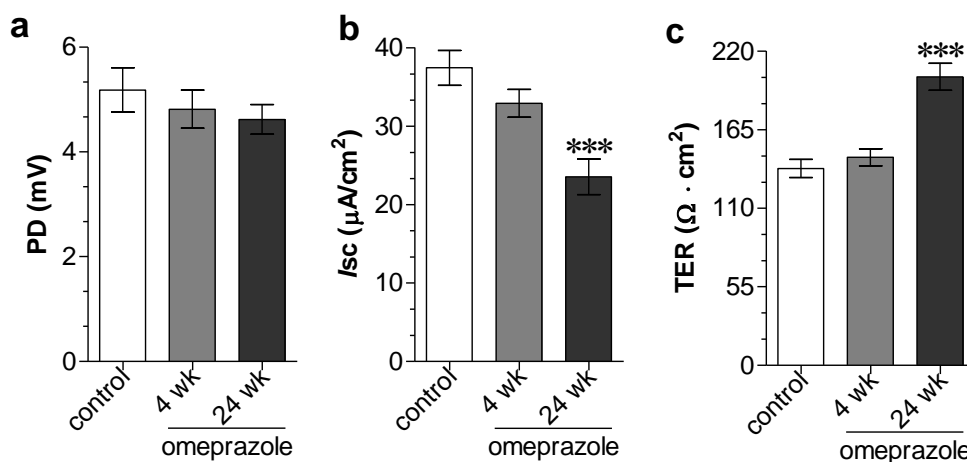
2 ผลของการได้รับ omeprazole ติดต่อกันเป็นเวลานาน ต่อการดูดซึม Mg^{2+} แบบใช้พลังงาน และไม่ใช้พลังงานในลำไส้ของหนูขาว

ดังแสดงในรูปที่ 7 แสดงอัตราการขนส่ง Mg^{2+} ผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์แบบไม่ใช้พลังงาน (รูปที่ 7 a) และอัตราการขนส่ง Mg^{2+} ผ่านเซลล์แบบใช้พลังงาน (รูปที่ 7 b) ของแผ่นเซลล์ลำไส้เล็กส่วน duodenum ของหนูขาว พบว่าการให้ omeprazole ทั้งในระยะเวลา 1 เดือน และ 6 เดือน มีผลลดอัตราการขนส่ง Mg^{2+} ทั้งแบบไม่ใช้พลังงาน และ แบบใช้พลังงาน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อย่างไรก็ตาม เมื่อใช้ตัวกระตุ้น หรือตัวยับยั้งการทำงานของ ASIC1a, OGR1, และ P2Y purinoceptors พบว่าไม่มีผลเปลี่ยนแปลงการดูดซึม Mg^{2+} ในลำไส้หนูปกติ และหนูที่ได้รับ omeprazole



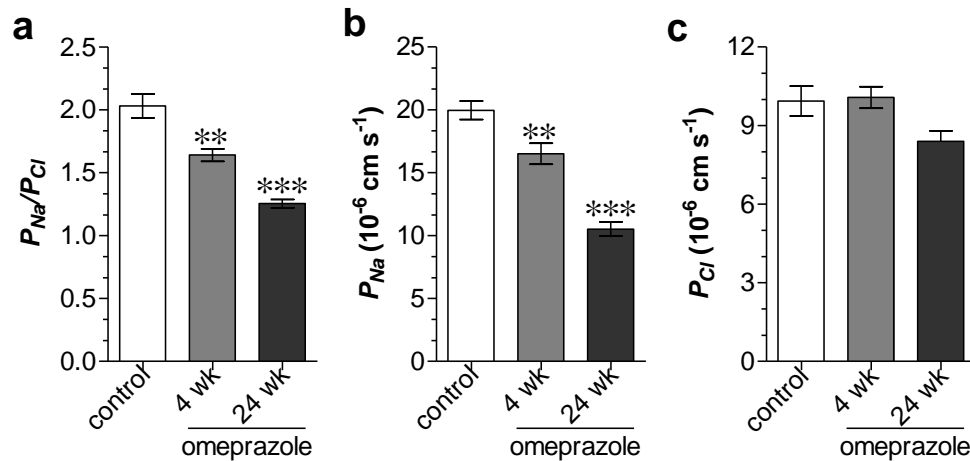
รูปที่ 7 อิทธิพลของการได้รับ omeprazole ต่อการดูดซึม Mg^{2+} แบบไม่ใช้พลังงาน (a) และใช้พลังงานในลำไส้ (b) ของหนูขาว. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม. (n = 5).

เมื่อพิจารณาคคุณสมบัติทางไฟฟ้าของแผ่นลำไส้ส่วน duodenum ของหนูขาว พบว่า omeprazole ไม่มีผลต่อความต่างศักย์ไฟฟ้า (potential difference; PD) ของแผ่นลำไส้ (รูปที่ 8 a) แต่การได้รับ omeprazole เป็นเวลา 6 เดือน มีผลลดค่ากระแส short circuit (I_{sc}) (รูปที่ 8 b) และ เพิ่มค่าความต้านทานไฟฟ้า (transpithelial electrical resistance; TER) (รูปที่ 8 c) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



รูปที่ 8 อิทธิพลของการได้รับ omeprazole ต่อค่าความต่างศักย์ไฟฟ้า (potential difference; PD) (a), กระแส short circuit (I_{sc}) (b) และ ความต้านทานไฟฟ้า (transpithelial electrical resistance; TER) (c). *** $P < 0.001$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม. (n = 5).

เมื่อศึกษาคุณสมบัติการคัดเลือกประจุของแผ่นลำไส้ส่วน duodenum ของหนูขาว ด้วยเทคนิค dilution potential พบว่า omeprazole มีผลลดค่า relative permeability ratio ของ Na^+ ต่อ Cl^- ($P_{Na/Cl}$) (รูปที่ 9 a) และค่า absolute permeability ของ Na^+ (P_{Na}) (รูปที่ 9 b) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ไม่มีผลต่อค่า absolute permeability ของ Cl^- (P_{Cl}) (รูปที่ 9 c) บ่งชี้ว่า omeprazole มีฤทธิ์ลดความสามารถในการขนส่งไอออนประจุบวกของเซลล์เยื่อบุลำไส้เล็กของหนูขาว



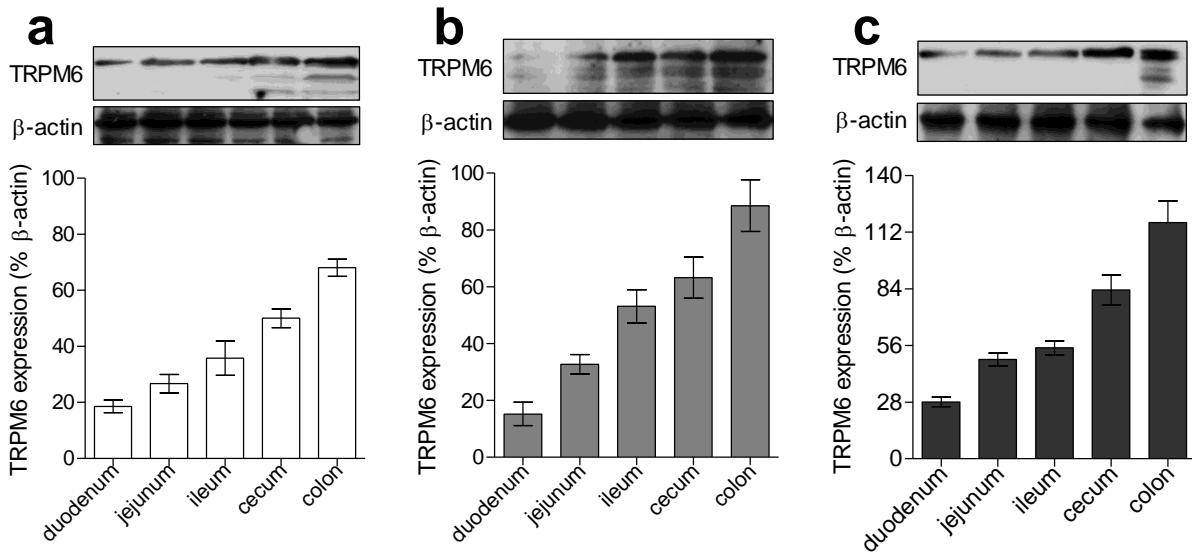
รูปที่ 9 อิทธิพลของการได้รับ omeprazole ต่อค่า relative permeability ratio ของ Na^+ ต่อ Cl^- ($P_{\text{Na}/\text{Cl}}$) (a), ค่า absolute permeability ของ Na^+ (P_{Na}) (b), และ ค่า absolute permeability ของ Cl^- (P_{Cl}) (c). ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม. (n = 5).

3 ผลของการได้รับ omeprazole ต่อการแสดงออกของ TRPM6 และ CNNM4 ในลำไส้ส่วน duodenum jejunum ileum cecum และ colon ของหนูขาว

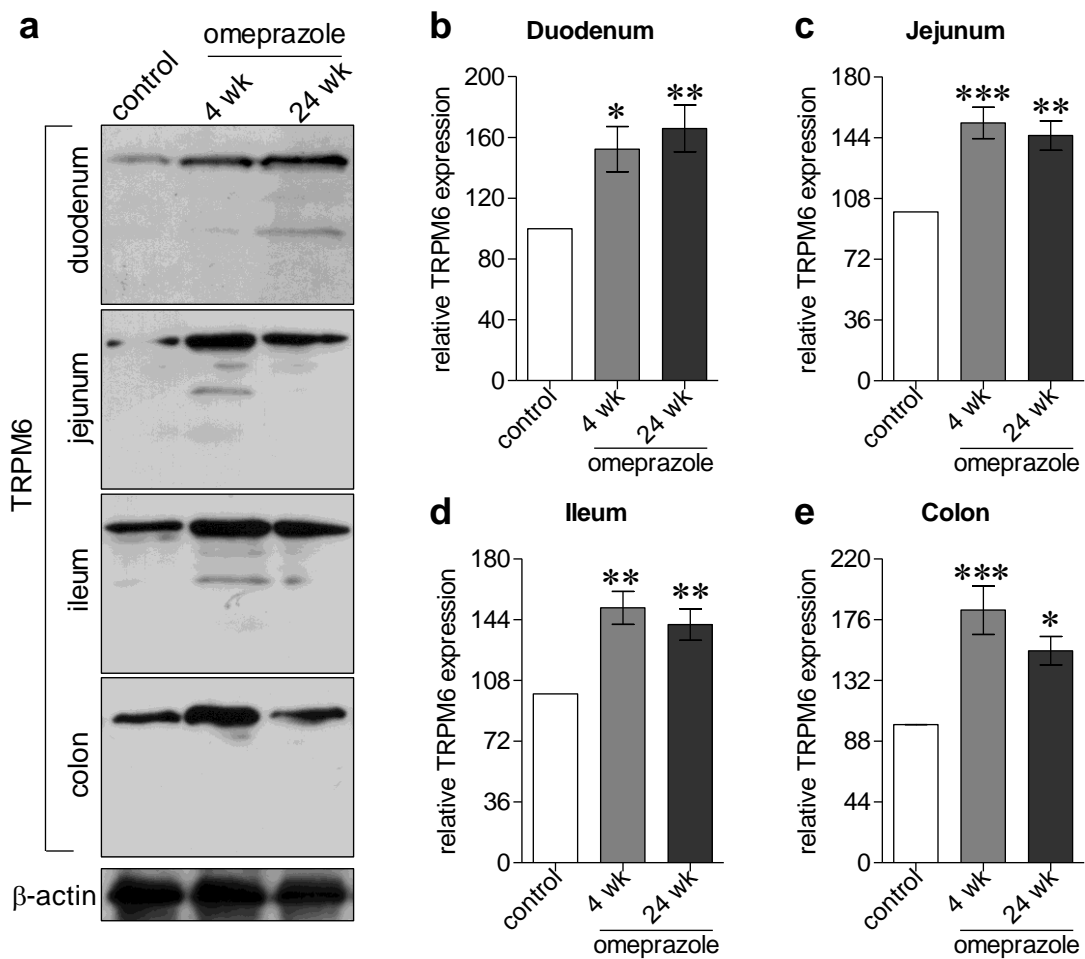
เมื่อศึกษาการกระจายตัวของการแสดงออกของโปรตีน TRPM6 ในลำไส้ส่วน duodenum jejunum ileum cecum และ colon ของหนูขาว กลุ่มควบคุม (รูปที่ 10 a) กลุ่มที่ได้รับ omeprazole เป็นเวลา 1 เดือน (รูปที่ 10 b) และ กลุ่มที่ได้รับ omeprazole เป็นเวลา 6 เดือน (รูปที่ 10 c) พบว่าระดับการแสดงออกของโปรตีน TRPM6 ของลำไส้ของทุกกลุ่มการทดลองมีรูปแบบเดียวกัน คือลำไส้ส่วน duodenum มีระดับการแสดงออกน้อยที่สุด และมีระดับการแสดงออกเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ในลำไส้ส่วน jejunum ileum cecum และ colon โดย colon มีระดับการแสดงออกสูงที่สุด

จากการศึกษาเปรียบเทียบการแสดงออกของ TRPM6 ในลำไส้แต่ละส่วนพบว่า omeprazole ทั้งในกลุ่มที่ได้รับเป็นเวลา 1 เดือน และ 6 เดือน มีฤทธิ์เพิ่มการแสดงออกของโปรตีน TRPM6 ในลำไส้ส่วน duodenum, jejunum, ileum, และ colon (รูปที่ 11) ของหนูขาว อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

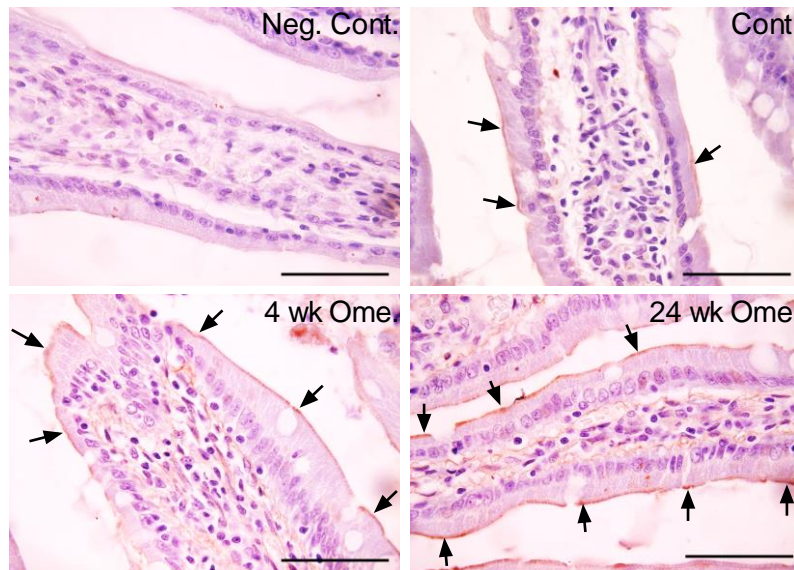
เมื่อศึกษาโดยเทคนิค immunohistochemistry technique พบว่า TRPM6 แสดงออกบริเวณ apical membrane ของเซลล์เยื่อลำไส้ ซึ่งระบุด้วยการติดสีน้ำตาลที่มีหัวลูกศรชี้ (รูปที่ 12) และการติดสีน้ำตาลเพิ่มขึ้นในกลุ่มที่ได้รับ omeprazole 1 เดือน และ 6 เดือน ตามลำดับ



รูปที่ 10 การแสดงออกของโปรตีน TRPM6 ในลำไส้ส่วน duodenum jejunum ileum cecum และ colon ของหนูขาว กลุ่มควบคุม (a) กลุ่มที่ได้รับ omeprazole เป็นเวลา 1 เดือน (b) และ กลุ่มที่ได้รับ omeprazole เป็นเวลา 6 เดือน (c)

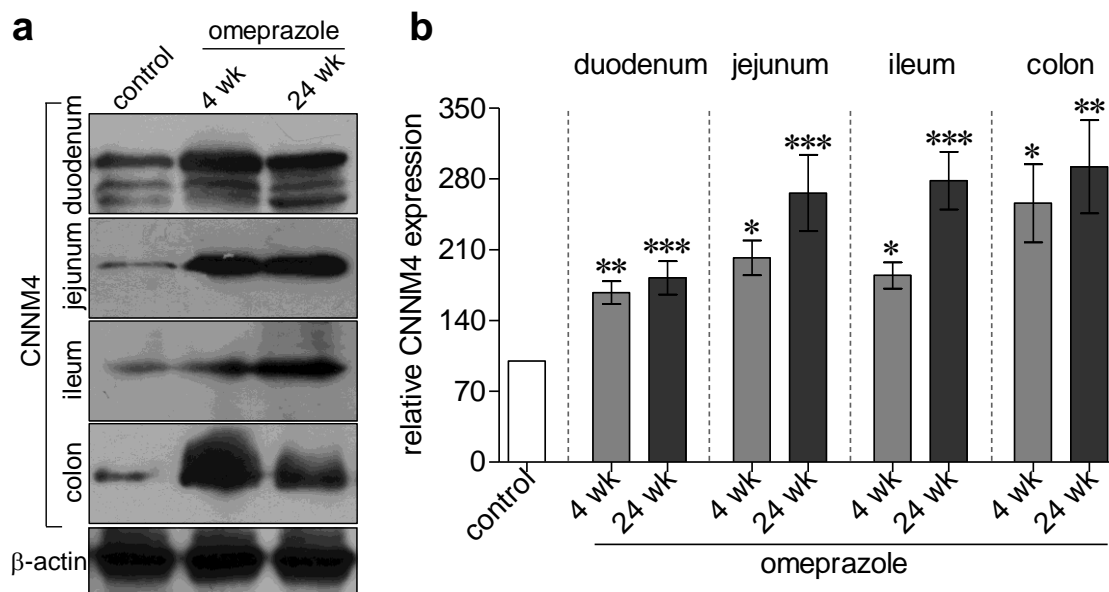


รูปที่ 11 โปรตีน TRPM6 ในลำไส้ส่วน duodenum (a, b) jejunum (a, c) ileum (a, d) และ colon (a, e) ของหนูขาว. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม. (n = 5).



รูปที่ 12 โปรตีน TRPM6 ในเซลล์ลำไส้ส่วน duodenum. Neg.; negative, Cont.; control, Ome; omeprazole

จากการศึกษาเปรียบเทียบการแสดงของ CNNM4 ในลำไส้แต่ละส่วนพบว่า omeprazole ทั้งในกลุ่มที่ได้รับเป็นเวลา 1 เดือน และ 6 เดือน มีฤทธิ์เพิ่มการแสดงออกของโปรตีน CNNM4 ในลำไส้ส่วน duodenum, jejunum, ileum, และ colon (รูปที่ 13) ของหนูขาว อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



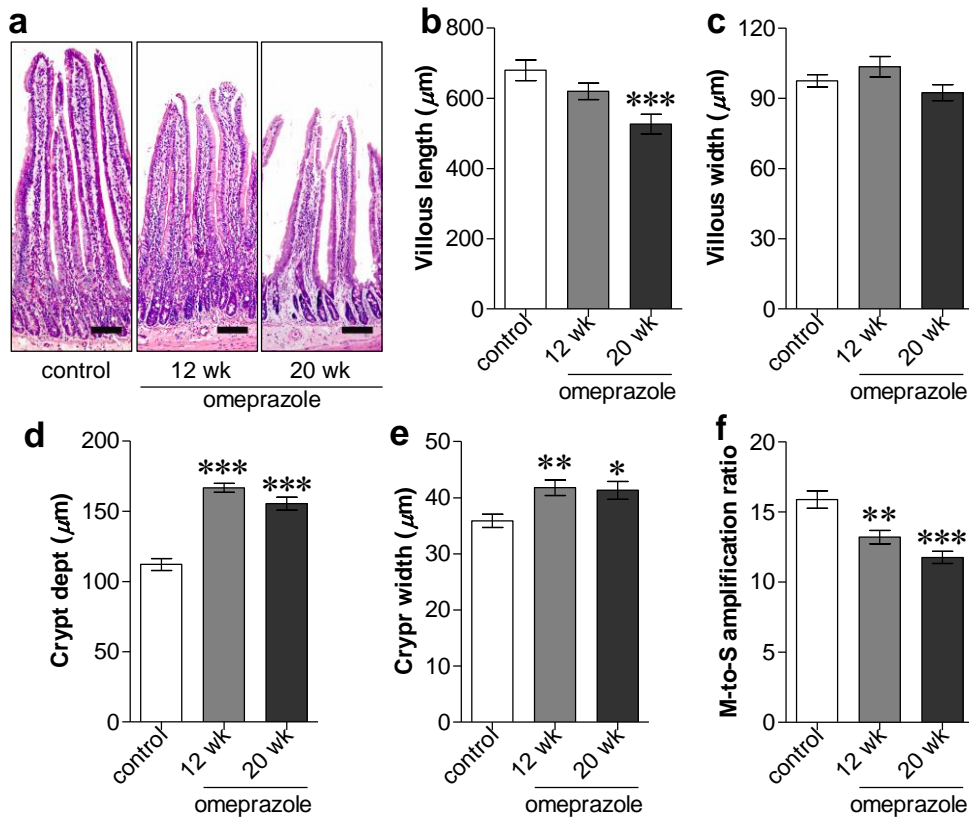
รูปที่ 13 โปรตีน CNNM4 ในลำไส้ส่วน duodenum, jejunum, ileum และ colon ของหนูขาว. $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม. (n = 5).

4 ผลของการได้รับ omeprazole ต่อการเปลี่ยนทางโครงสร้างในลำไส้ของหนูขาว

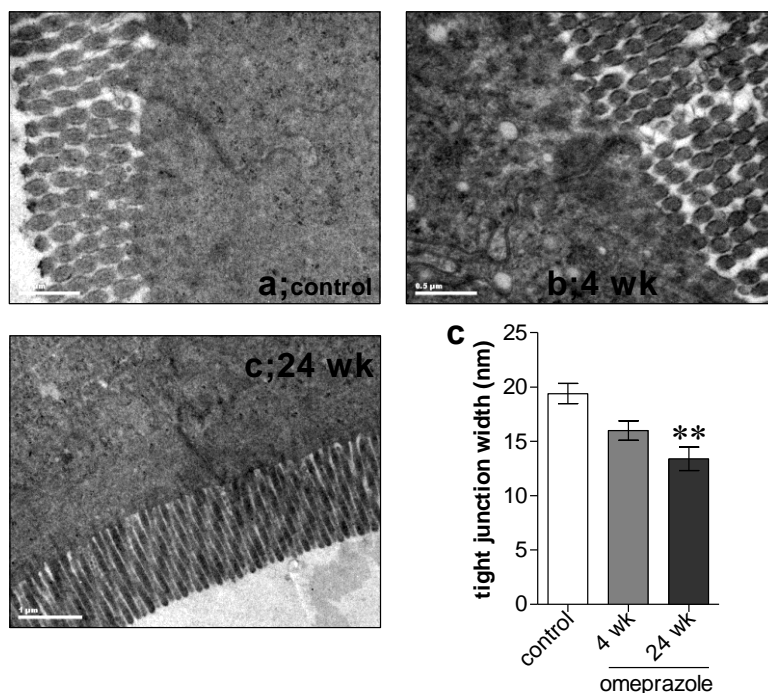
ผลจากการศึกษาด้วย H&E technique (รูปที่ 14) พบว่า omeprazole มีฤทธิ์ลดความยาว villous อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 14 a, b) และมีฤทธิ์เพิ่ม crypt depth (รูปที่ 14 a, d) และ crypt width (รูปที่ 14 a, e) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อคำนวณหาค่า mucosal-to-serosal amplification ratio (รูป

ที่ 14 f) พบว่า omeprazole มีฤทธิ์ลด mucosal-to-serosal amplification ratio อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ บ่งชี้ว่า omeprazole ลดพื้นที่ในการดูดซึมของลำไส้

และเมื่อศึกษาด้วยเทคนิค TEM เพื่อหาความกว้างของ tight junction (รูปที่ 15) พบว่า omeprazole มีฤทธิ์ลดความกว้างของ tight junction อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



รูปที่ 14 ภาพ H&E ลำไส้ส่วน duodenum. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม. (n = 5).



รูปที่ 15 ภาพ TEM ลำไส้ส่วน duodenum ของหนูขาว. ** $P < 0.01$ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม. (n = 5).

อภิปราย/วิจารณ์ (Discussion) ผลการทดลอง/ผลการวิจัย ที่ได้ทั้งหมด

ผลการทดลองจากโครงการวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าการให้ยา omeprazole ซึ่งเป็นยายับยั้งการหลั่งกรดในกระเพาะอาหาร ติดต่อกันเป็นระยะเวลาอันยาวนานมีผลทำให้ปริมาณ Mg^{2+} ในกระแสเลือดของหนูลดต่ำกว่าปกติจริง คล้ายคลึงกับที่พบเจอในมนุษย์ เมื่อศึกษาในระดับ Mg^{2+} ในปัสสาวะก็พบว่ามึระดับต่ำเช่นเดียวกัน บ่งชี้ว่าไม่มีการสูญเสีย Mg^{2+} ในปัสสาวะ จึงน่าจะมาจากการลดการดูดซึม Mg^{2+} ในลำไส้ และเมื่อทำการศึกษาการดูดซึม Mg^{2+} ในลำไส้ก็พบว่า omeprazole มีฤทธิ์ลดการดูดซึม Mg^{2+} ในลำไส้จริง เป็นการยืนยันสมมุติฐานคือ omeprazole มีฤทธิ์ลดการดูดซึม Mg^{2+} ในลำไส้ เมื่อได้รับ omeprazole ติดต่อกันจึงมีผลทำให้ระดับ Mg^{2+} ในกระแสเลือดต่ำลงอย่างรุนแรง อย่างไรก็ตาม ASIC1a, OGR1, และ P2Y purinoceptors ไม่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการควบคุมการทำงานของลำไส้ในการ ดูดซึม Mg^{2+}

การศึกษาคุณสมบัติทางไฟฟ้าพบว่า omeprazole มีฤทธิ์ลด I_{sc} และเพิ่ม TER อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ บ่งชี้ว่า omeprazole ลดการขนส่งไอออนและลด paracellular permeability การศึกษาทางชีวฟิสิกส์พบว่า omeprazole มีฤทธิ์ลด P_{Na}/P_{Cl} และ P_{Na} อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ บ่งชี้ว่า omeprazole ลด paracellular cation selectivity สรุปได้ว่า omeprazole ลดการเลือกประจุบวกขนส่งผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์ และเพิ่มความต้านทานของการขนส่งสารผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์จึงมีผลการขนส่งผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์ การศึกษาทางด้าน histology ทั้ง H&E technique และ TEM technique ก็พบว่า omeprazole มีฤทธิ์ลด absorptive area surface และลดความกว้างของ tight junction เป็นการยืนยันได้ว่า omeprazole มีฤทธิ์ลดการทำงานของลำไส้จริง อย่างไรก็ตามกลไกที่ omeprazole กัดการทำงานของลำไส้ทั้งในระดับโครงสร้างและระดับเซลล์ยังไม่มีการศึกษาวิจัย

อย่างไรก็ตามเมื่อร่างกายอยู่ในภาวะพร่อง Mg^{2+} ก็พยายามชดเชยโดยการเพิ่มการแสดงออกของ TRPM6 และ CNNM4 ซึ่งทำงานในการดูดซึม Mg^{2+} ในลำไส้ ในลำไส้เกือบทุกส่วน เป็นข้อบ่งชี้ชัดเจนว่าร่างกายสัตว์ทดลองกำลังปรับตัวเพื่อรับมือกับผลข้างเคียงของ omeprazole แต่กลไกที่ควบคุมการปรับตัวนี้ก็ยังไม่ทราบแน่ชัด

สรุปและเสนอแนะเกี่ยวกับการวิจัยในขั้นตอนต่อไป ตลอดจนประโยชน์ในทางประยุกต์ของผลการวิจัยที่ได้

ผลการวิจัยของโครงการวิจัยนี้ยืนยันผลข้างเคียงของการใช้ omeprazole ติดต่อกันเป็นระยะเวลาอันยาวนาน ซึ่งกัดการทำงานของลำไส้ทั้งในระดับโครงสร้างและระดับเซลล์ อย่างไรก็ตามร่างกายก็พยายามชดเชยโดยเพิ่มการแสดงออกของโปรตีนจำเพาะบางอย่าง จึงควรศึกษาวิจัยต่อเนื่องเพื่อหาว่าอะไรที่กระตุ้นการแสดงของโปรตีนเหล่านั้น จะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อองค์ความรู้ด้านสรีรวิทยาพื้นฐานของลำไส้ และการพัฒนาวิธีป้องกันและรักษาผลข้างเคียงของยา omeprazole

ผลผลิต (Output)

อยู่ในระหว่างการเตรียม manuscript เพื่อส่งขอรับการตีพิมพ์

เอกสารอ้างอิง

1. Agar M, Webster R, Lacey J, Donovan B, Walker A. The use of subcutaneous omeprazole in the treatment of dyspepsia in palliative care patients. *J Pain Symptom Manage* 2004;28(6):529-531.
2. 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.
3. Boparai V, Rajagopalan J, Triadafilopoulos G. Guide to the use of proton pump inhibitors in adult patients. *Drugs* 2008;68(7):925-947.
4. Cundy T, Dissanayake A. Severe hypomagnesaemia in long-term users of proton-pump inhibitors. *Clin Endocrinol* 2008; 69, 338–341.
5. de Baaij JHF, Hoenderop JG, Bindels RJM. Regulation of magnesium balance: lessons learned from human genetic disease. *Clin Kidney J* 2012; 5[Suppl 1]: i15–i24
6. Durlach J. Magnesium depletion and pathogenesis of Alzheimer's disease. *Magnes Res* 1990; 3(3): 217-218.
7. Epstein M, McGrath S, Law F. Proton-pump inhibitors and hypomagnesemic hypoparathyroidism. *N Engl J Med* 2006; 355(17): 1834-1836.
8. Feillet-Coudray C, Coudray C, Brûlé F, Gueux E, Mazur A, Abrams SA, Rayssiguier Y. Exchangeable magnesium pool masses reflect the magnesium status of rats. *J Nutr* 2000;130(9):2306-11.
9. 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 Ca²⁺ absorption between enterocytes. *Mol Biol Cell* 2008;19:1912-1921.
10. 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
11. Grubbs RD. Intracellular magnesium and magnesium buffering. *Biometals* 2002; 15(3): 251-259.
12. 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.
13. Im WB, Blakeman DP, Davis JP. Irreversible inactivation of rat gastric (H⁺-K⁺)-ATPase in vivo by omeprazole. *Biochem Biophys Res Commun* 1985;126(1):78-82.
14. Konrad M, Schlingmann KP, Gudermann T. Insights into the molecular nature of magnesium homeostasis. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004; 286(4): F599-F605.
15. Kraidith K, Jantarajit W, Teerapornpuntakit J, Nakkrasae LI, Krishnamra N, Charoenphandhu N. Direct stimulation of the transcellular and paracellular calcium transport in the rat cecum by prolactin. *Pflugers Arch* 2009;458(5):993-1005.

16. Kuipers MT, Thang HD, Arntzenius AB. Hypomagnesaemia due to use of proton pump inhibitors: a review. *Neth J Med* 2009;67:169-172
17. Lameris AL, Hess MW, van Kruijsbergen I, Hoenderop JG, Bindels RJ. Omeprazole enhances the colonic expression of the Mg²⁺ transporter TRPM6. *Pflugers Arch* 2013;465(11):1613-20.
18. Lee DY, Lee I, Lee MG. Pharmacokinetics of omeprazole after intravenous and oral administration to rats with liver cirrhosis induced by dimethylnitrosamine. *Int J Pharm* 2007;330(1-2):37-44.
19. 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.
20. Mackay JD, Bladon PT. Hypomagnesaemia due to proton-pump inhibitor therapy: a clinical case series. *QJM* 2010;103(6):387-395
21. 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.
22. Nebendahl K. Routes of administration, In: Krinke G, Bullock G, Bunton TE, eds. *The Handbook of Experimental Animals: The Laboratory Rat*. London: Academic Press 2000: 463-482.
23. 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.
24. Quamme GA. Recent developments in intestinal magnesium absorption. *Curr Opin Gastroenterol* 2008; 24(2): 230-235.
25. Quinn R. Comparing rat's to human's age: how old is my rat in people years? *Nutrition* 2005;21(6):775-7.
26. Regårdh CG1, Andersson T, Lagerström PO, Lundborg P, Skånberg I. The pharmacokinetics of omeprazole in humans--a study of single intravenous and oral doses. *Ther Drug Monit* 1990;12(2):163-72.
27. Rude RK. Magnesium deficiency: a cause of heterogeneous disease in humans. *J Bone Miner Res* 1998; 13(4): 749-758.
28. Rude RK, Gruber HE. Magnesium deficiency and osteoporosis: animal and human observations. *J Nutr Biochem* 2004; 15(12): 710-716
29. Shabajee N, Lamb EJ, Sturgess I, Sumathipala RW. Omeprazole and refractory hypomagnesaemia. *BMJ* 2008;337:a425
30. Thongon N. Hypomagnesemia from long-term omeprazole administration. *Burapha Sci J* 2010; 15(2):116-121.
31. Thongon N, Krishnamra N. Omeprazole decreases magnesium transport across Caco-2 monolayers. *World J Gastroenterol* 2011;17:1574-1583

32. Thongon N, Krishnamra N. Apical acidity decreases inhibitory effect of omeprazole on Mg^{2+} absorption and claudin-7 and -12 expression in Caco-2 monolayers. *Exp Mol Med* 2012; 44(11): 684-693.
33. Thongon N, Ketkeaw P, Nuekchob C. 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* 2014; 64(2):129–139.
34. Touyz RM. Role of magnesium in the pathogenesis of hypertension. *Mol Aspects Med* 2003; 24(1-3): 107-136.
35. Vormann J. Magnesium: nutrition and metabolism. *Mol Aspects Med* 2003; 24(1-3): 27-37.
36. William JH1, Nelson R, Hayman N, Mukamal KJ, Danziger J. Proton-Pump Inhibitor use is associated with lower urinary magnesium excretion. *Nephrology* 2014; 19(12):798-801.