



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัย

ผลของการให้สารประกอบฟีนอลิกที่สกัดจากสมุนไพรไทยต่อสมดุลแมกนีเซียม และการทำงานของลำไส้ในหนูขาวเพศผู้สายพันธุ์ Sprague-Dawley: เพื่อพัฒนาการรักษาทางเลือกในผู้ป่วยที่ต้องใช้ยาโปรตอนปั๊มอินฮิบิเตอร์ติดต่อกันเป็นระยะเวลานาน

The effect of Thai herb-derived phenolic compound administration on magnesium metabolism and intestinal function in male Sprague-Dawley rats: The development of alternative treatment in long-term proton pump inhibitor administration

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน
รองศาสตราจารย์ ดร. ณรงค์ฤทธิ์ ทองอ่อน

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้
จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๖๒

มหาวิทยาลัยบูรพา

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัย

ผลของการให้สารประกอบฟีนอลิกที่สกัดจากสมุนไพรไทยต่อสมดุลแมกนีเซียม และการทำงานของลำไส้ในหนูขาวเพศผู้สายพันธุ์ Sprague-Dawley: เพื่อพัฒนาการรักษาทางเลือกในผู้ป่วยที่ต้องใช้ยาโปรตอนปั๊มอินฮิบิเตอร์ติดต่อกันเป็นระยะเวลานาน

The effect of Thai herb-derived phenolic compound administration on magnesium metabolism and intestinal function in male Sprague-Dawley rats: The development of alternative treatment in long-term proton pump inhibitor administration

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน
รองศาสตราจารย์ ดร. ณรงค์ฤทธิ์ ทองอ่อน
คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงิน
อุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๖๒
มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ
เลขที่สัญญา ๑๕/๒๕๖๒

Acknowledgment

This work was financially supported by the Research Grant of
Burapha University through National Research Council of
Thailand (Grant no. 15/2562)

บทคัดย่อ

Acid peptic disorders คือความผิดปกติของระบบทางเดินอาหารอันเนื่องมาจากการหลั่งกรดในกระเพาะอาหารที่มากเกินไป รายงานทางการแพทย์บ่งชี้ว่าประชากรหลายล้านคนทั่วโลก การรักษาที่มีประสิทธิภาพที่สุดคือยาในกลุ่มโปรตอนปั๊มอินฮิบิเตอร์ (proton pump inhibitors; PPIs) จึงทำให้ยาในกลุ่ม PPIs นี้เป็นหนึ่งในยาที่ขายดีที่สุดทั่วโลก และมีผู้ใช้ต่อเนื่องเป็นระยะเวลานานหลายล้านคนทั่วโลกเช่นกัน นับตั้งแต่ปี ค.ศ. 2006 จนปัจจุบันมีรายงานทางการแพทย์หลายฉบับบ่งชี้ผลข้างเคียงของการใช้ omeprazole ซึ่งเป็นยาในกลุ่ม PPIs ติดต่อกันมากกว่า 1 ปี ทำให้ระดับ Mg^{2+} ในกระแสเลือดต่ำอย่างรุนแรง โดยสันนิษฐานว่าน่าจะเกิดจากการดูดซึม Mg^{2+} ผิดปกติ

จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าสารประกอบฟีนอลิกที่สกัดจากขิง (*Zingiber officinale*) มีฤทธิ์กีดการทำงานของ H^+/K^+ ATPase ในกระเพาะอาหาร และมีประสิทธิภาพเทียบเท่า PPIs ทั้งนี้เบื้องต้นจากการศึกษาข้อมูลงานวิจัยก่อนหน้านี้ผู้วิจัยพบว่ากลไกการยับยั้ง H^+/K^+ ATPase ของ PPIs และ สารประกอบฟีนอลิก นั้นแตกต่างกัน ดังนั้นการได้รับสารประกอบฟีนอลิกในระยะเวลาอันยาวจะไม่มีผลข้างเคียงเช่นเดียวกับที่พบใน PPIs

ผลการทดลองพบว่าการใช้ยา omeprazole ซึ่งเป็น PPIs และสารสกัด phenolic มีฤทธิ์กีดการหลั่งกรดในกระเพาะอาหารได้ทัดเทียมกัน และสารทั้งสองไม่มีผลต่อการบริโภคอาหาร และเติบโตของสัตว์ทดลอง omeprazole เพิ่มการดื่มน้ำและการขับปัสสาวะ แต่การได้รับ omeprazole ติดต่อกันเป็นระยะเวลานานมีผลทำให้ปริมาณ Mg^{2+} ในกระแสเลือดของหนูลดต่ำกว่าปกติจริง คล้ายคลึงกับที่พบเจอในมนุษย์ เมื่อศึกษาระดับ Mg^{2+} ในปัสสาวะก็พบว่ามียกระดับต่ำเช่นเดียวกัน บ่งชี้ว่าไม่มีการสูญเสีย Mg^{2+} ในปัสสาวะ ทั้งนี้ สารสกัด phenolic ไม่มีผลต่อสมดุล Mg^{2+} ในสัตว์ทดลอง สัตว์กลุ่มที่มีระดับ Mg^{2+} ต่ำยังมีระดับ Vitamin D และ FGF-23 ในกระแสเลือดเพิ่มขึ้น แต่มีระดับ EGF ในกระแสเลือดลดลง ทั้งนี้สารสกัด phenolic ไม่มีผลต่อระดับฮอร์โมนในกระแสเลือด เมื่อศึกษาการดูดซึม Mg^{2+} ในลำไส้พบว่า omeprazole กีดการดูดซึม Mg^{2+} ในลำไส้ทุกส่วน แต่สารสกัด phenolic ไม่มีผลต่อการดูดซึม Mg^{2+} ในลำไส้ เป็นการยืนยันสมมุติฐานงานวิจัยคือ สารสกัด phenolic ไม่มีผลต่อการทำงานของลำไส้ แตกต่างจาก omeprazole ที่มีฤทธิ์กีดการดูดซึม Mg^{2+} ในลำไส้ เป็นข้อมูลสำคัญเพื่อการศึกษาต่อเนื่อง

ผลการวิจัยของโครงการวิจัยนี้นำเสนอผลของ สารสกัด phenolic ที่มีฤทธิ์กีดการหลั่งกรดในกระเพาะอาหารได้ทัดเทียมกับ omeprazole แต่ไม่มีผลรบกวนสมดุล Mg^{2+} และการทำงานของลำไส้ต่อการดูดซึม Mg^{2+} เป็นข้อมูลสำคัญเพื่อการศึกษาต่อยอด และพัฒนาสารสกัดธรรมชาติเพื่อใช้เป็นการรักษาทางเลือกในผู้ป่วยกลุ่ม chronic acid peptic disorders

คำสำคัญ: ระดับแมกนีเซียมในกระแสเลือดต่ำ การดูดซึมในลำไส้ โปรตอนปั๊มอินฮิบิเตอร์ สารประกอบฟีนอลิก

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. Previous study proposed that PPIs suppressed intestinal Mg^{2+} absorption.

Previous study reported that plant-extracted phenolic compound effectively suppressed gastric acid secretion with different mechanism of PPIs action. Therefore, it is possible that phenolic compound may has no adverse on intestinal function and body Mg^{2+} homeostasis.

Our result showed that prolong omeprazole omeprazole and phenolic compound treatment had no effect on metabolic characteristics and growth of male rats. 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 duodenal, jejunal, ileal, and colon Mg^{2+} absorptions. On the other hand, phenolic compound had no effect of intestinal Mg^{2+} absorption and Mg^{2+} homeostasis. Omeprazole, but not phenolic compound, increased vitamin-D and FGF-23, but decreased EGF, in plasma of rats.

Our finding showed the antacid effect of plant-extracted phenolic compound. Prolong phenolic compound treatment has no adverse on intestinal function and body Mg^{2+} homeostasis, differed from those found in prolong PPIs treatment.

Keyword: hypomagnesemia, intestinal absorption, proton pump inhibitor, plant-extracted phenolic compound

สารบัญเรื่อง (Table of Contents)

	หน้า
ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	1
วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	2
ขอบเขตของโครงการวิจัย	2
ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย	3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
การทบทวนวรรณกรรม	3
วิธีการดำเนินการวิจัย และสถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล	7
ผลการวิจัย (Results)	13
อภิปราย/วิจารณ์ (Discussion) ผลการทดลอง/ผลการวิจัย ที่ได้ทั้งหมด	21
สรุปและเสนอแนะเกี่ยวกับการวิจัยในขั้นตอนต่อไป	22
ผลผลิต (Output)	22
รายงานการเงิน	23
ประวัตินักวิจัยและคณะ พร้อมหน่วยงานสังกัด	24
เอกสารอ้างอิง	26

สารบัญภาพ (List of illustrations)

	หน้า
รูปที่ 1. กลไกการรักษาสมดุล Mg^{2+} ในร่างกายมนุษย์	4
รูปที่ 2. กลไกการดูดซึม Mg^{2+} ในเซลล์เยื่อบุลำไส้	5
รูปที่ 3. ภาพแสดง high throughput Ussing chamber setup	10
รูปที่ 4 แสดงน้ำหนักสัตว์ทดลองกลุ่มควบคุม กลุ่มได้รับ omeprazole 12 สัปดาห์ และกลุ่มได้รับ omeprazole 20 สัปดาห์	13
รูปที่ 5 ลักษณะทางเมตาโบลิซึมของสัตว์ทดลอง คือ การบริโภคน้ำ (a) การบริโภคน้ำ (b) การขับถ่ายอุจจาระ (c) และการขับถ่ายปัสสาวะ (d)	14
รูปที่ 6 แสดงค่า pH ภายในกระเพาะอาหาร duodenum jejunum ileum cecum และ colon	15
รูปที่ 7 แสดงค่า Mg^{2+} , Ca^{2+} และ Mg^{2+} ทั้งในเลือดและในปัสสาวะ	15
รูปที่ 8 แสดงค่า PTH, vitamin D, insulin, EGF, และ FGF-23 ในกระแสเลือดของหนูขาว	16
รูปที่ 9 แสดงค่าอัตราการดูดซึม Mg^{2+} แบบ total Mg^{2+} transport (total), paracellular passive Mg^{2+} transport (para), และ transcellular active Mg^{2+} transport (trans) ในลำไส้ส่วน duodenum ของหนูขาว	17
รูปที่ 10 แสดงค่าอัตราการดูดซึม Mg^{2+} แบบ total Mg^{2+} transport (total), paracellular passive Mg^{2+} transport (para), และ transcellular active Mg^{2+} transport (trans) ในลำไส้ส่วน jejunum ของหนูขาว	17
รูปที่ 11 แสดงค่าอัตราการดูดซึม Mg^{2+} แบบ total Mg^{2+} transport (total), paracellular passive Mg^{2+} transport (para), และ transcellular active Mg^{2+} transport (trans) ในลำไส้ส่วน ileum ของหนูขาว	18
รูปที่ 12 แสดงค่าอัตราการดูดซึม Mg^{2+} แบบ total Mg^{2+} transport (total), paracellular passive Mg^{2+} transport (para), และ transcellular active Mg^{2+} transport (trans) ในลำไส้ส่วน colon ของหนูขาว	18
รูปที่ 13 แสดงค่าอัตราการดูดซึม Mg^{2+} แบบ paracellular passive Mg^{2+} transport ในลำไส้ส่วน duodenum, jejunum, ileum และ colon ของหนูขาว	19
รูปที่ 14 แสดงค่าอัตราการดูดซึม Mg^{2+} แบบ transcellular active Mg^{2+} transport ในลำไส้ส่วน duodenum, jejunum, ileum และ colon ของหนูขาว	19
รูปที่ 15 ระดับการแสดงออกของ TRPM6 ในลำไส้ส่วน duodenum, jejunum, ileum และ colon	20
รูปที่ 16 ระดับการแสดงออกของ CNNM4 ในลำไส้ส่วน duodenum, jejunum, ileum และ colon	20

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย (List of Abbreviations)

Co(III)hex	Co(III)hexaammine
CNNM4	basolateral cyclin M4
EGF	epidermal growth factor
FGF-23	fibroblast growth factor-23
PTH	parathyroid hormone
PPIs	proton pump inhibitors
TRPM	transient receptor potential melastatin
TRPV	transient potential vanilloid
OGR1	ovarian cancer G protein-coupled receptor 1
P_{Mg}	absolute permeability ของ Mg^{2+}
I_{sc}	short-circuits current
P_{Na}/P_{Cl}	permeability ratio ของ Na^+ ต่อ Cl^-
P_{Na}	absolute sodium permeability
P_{Cl}	absolute chloride permeability

1. บทนำ (Introduction)

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

สืบเนื่องจากนายพลกฤต วิโรจน์สุรรัตน์ ประธานกรรมการ หจก.แสงทองมหาชัยเท็กซ์ไทล์ ได้หาเรื่อกับผู้วิจัยเกี่ยวกับปัญหาทางสุขภาพของคนในครอบครัว ที่ป่วยด้วยโรคกรดไหลย้อน ต้องทานยาลดการหลั่งกรดในกระเพาะอาหารต่อเนื่องอยู่หลายปีแต่อาการก็ไม่ได้หายไป นอกจากนี้ยังสังเกตเห็นความผิดปกติอื่นๆ ที่เกิดขึ้นเช่น มีอาการฝ่ามือฝ่าเท้าเกร็ง เป็นต้น จึงเปลี่ยนมาทานยาสมุนไพรที่เชื่อว่าช่วยลดกรดในกระเพาะอาหาร เมื่อทานไปประมาณ 5 เดือนพบว่าอาการดีขึ้นมากกว่าตอนที่ใช้อย่างยั้งการหลั่งกรดในกระเพาะอาหาร และไม่มีอาการฝ่ามือฝ่าเท้าเกร็งเกิดขึ้นอีก ทำให้นายพลกฤตเกิดความสนใจในตัวยาสมุนไพรอย่างมาก จึงเริ่มศึกษาแนวทางการวิจัยและพัฒนา การผลิตยาสมุนไพร แนวทางการตลาด จากเครือข่ายผู้ประกอบการด้านนี้โดยตรง ทำให้เล็งเห็นช่องทางการขยายขอบเขตธุรกิจ ร่วมกับคนในครอบครัว และในเครือญาติเองเป็นแพทย์ และบุคลากรสายสุขภาพหลายคน จึงเกิดโครงการที่จัดตั้งบริษัทด้านผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพและยาสมุนไพรขึ้นมา เมื่อสืบค้นข้อมูลนักวิจัยที่ศึกษาด้านระบบทางเดินอาหารและผลจากการใช้อย่างยั้งการหลั่งกรดในกระเพาะอาหารจึงได้เข้ามาปรึกษากับผู้วิจัยที่ศึกษาด้านนี้มาเป็นเวลานานับ 10 ปี และเป็นจุดเริ่มแนวคิดโครงการวิจัย และพัฒนาผลิตภัณฑ์จากพืชสมุนไพร

Acid peptic disorders คือความผิดปกติของระบบทางเดินอาหารอันเนื่องมาจากการหลั่งกรดในกระเพาะอาหารที่มากเกินไป อาทิเช่น โรคกรดไหลย้อน กระเพาะอาหารอักเสบ แผลในกระเพาะอาหาร และลำไส้เล็กส่วนต้นอักเสบ เป็นต้น รายงานทางการแพทย์บ่งชี้ว่าประชากรหลายล้านคนทั่วโลกมีการเจ็บป่วยเรื้อรังด้วยโรคกลุ่มนี้ [27] อาทิเช่น โรคแผลในกระเพาะที่จะพบว่าผู้ป่วยมีแผลในกระเพาะอาหาร รักษาหายแล้วกลับมาเป็นใหม่ซ้ำๆ ต่อเนื่อง ในระยะเวลา 10 – 20 ปี [3] การรักษา Acid peptic disorders ที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดคือยากลุ่มโปรตอนปั๊มอินฮิบิเตอร์ (proton pump inhibitors; PPIs) เป็นยาที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ H^+/K^+ ATPase และลดการขับกรดในกระเพาะอาหาร จึงทำให้ยากลุ่ม PPIs นี้เป็นหนึ่งในยาที่ขายดีที่สุดในโลก และมีผู้ใช้ยาต่อเนื่องเป็นระยะเวลานานหลายล้านคนทั่วโลกเช่นกัน [32] นับตั้งแต่ปี ค.ศ. 2006 จนปัจจุบันมีรายงานทางการแพทย์หลายฉบับบ่งชี้ผลข้างเคียงของการใช้ omeprazole ซึ่งเป็นยาในกลุ่ม PPIs ติดต่อกันมากกว่า 1 ปี ทำให้ระดับ Mg^{2+} ในกระแสเลือดต่ำอย่างรุนแรง ร่วมกับภาวะผิดปกติอื่นๆ อาทิเช่น สับสน เชื่องซึม สั่นอย่างรุนแรง ฝ่ามือฝ่าเท้าเกร็ง ลมชัก และหมดสติ [4, 6, 10, 16, 20, 25, 39, 52] ผลการทดสอบพิเศษบ่งชี้ว่าผู้ป่วยข้างต้นมีภาวะพร่อง Mg^{2+} ในแหล่งสะสมในร่างกายอย่างรุนแรง และพบข้อบ่งชี้ว่าผู้ป่วยข้างต้นน่าจะมีการดูดซึม Mg^{2+} ในลำไส้บกพร่อง [4, 6, 10, 16, 20, 25, 39, 52] ปกติแล้วเซลล์เยื่อบุลำไส้ดูดซึม Mg^{2+} ผ่าน 2 กลไกหลักคือ passive absorption เป็นการดูดซึมแบบผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์ไม่ใช้พลังงาน เกี่ยวข้องกับการทำงานของโปรตีน claudin (Cldn) ใน tight junction [12, 13, 35] และ active absorption เป็นการขนส่งแบบผ่านเซลล์ อาศัยการทำงานของ transient receptor potential melastatin 6 (TRPM6) และ cyclin M4 (CNNM4) [8, 33, 41] อย่างไรก็ตามกลไกควบคุมการดูดซึม Mg^{2+} ในลำไส้ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด [8, 41] การศึกษาก่อนหน้าของกลุ่มวิจัยของข้าพเจ้าพบว่า omeprazole มีฤทธิ์ลดการขนส่ง Mg^{2+} ผ่านแผ่นเซลล์เยื่อบุลำไส้เล็กเพาะเลี้ยง Caco-2 [43-45] การศึกษาในหนูสายพันธุ์ C57BL/J6 พบว่า omeprazole ลดระดับ Mg^{2+} ในกระแสเลือด และเพิ่มการแสดงออกของ TRPM6 ในลำไส้ใหญ่ [15, 22] อย่างไรก็ตามการกระตุ้นการดูดซึม Mg^{2+} ในลำไส้ใหญ่กลับไม่สามารถรักษา ระดับ Mg^{2+} ในกระแสเลือดได้ [15] บ่งชี้ว่าลำไส้ใหญ่อาจไม่ใช่ส่วนสำคัญในการควบคุมระดับ Mg^{2+} ในร่างกาย ผลการศึกษาที่ผ่านมาของกลุ่มวิจัยของข้าพเจ้าในหนูขาวสายพันธุ์ Sprague-Dawley พบว่าการให้ omeprazole ซึ่งเป็นยาในกลุ่ม PPIs ขนาด 20 mg/kg/d เป็นเวลา 6 เดือน มีฤทธิ์ลดระดับ Mg^{2+} ในเลือดในปัสสาวะ ในกระดุก และในกล้ามเนื้อ บ่งชี้ว่า omeprazole มีฤทธิ์ลดระดับ Mg^{2+} ทั่วร่างกายสัตว์ทดลอง

(systemic Mg^{2+} deficiency) เมื่อศึกษาการทำงานของลำไส้เล็กส่วน duodenum ก็พบ omeprazole มีฤทธิ์ลดการดูดซึม Mg^{2+} อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ [46] การศึกษาลำไส้ของกลุ่มข้าพเจ้าพบว่า omeprazole มีฤทธิ์ลดการดูดซึม Mg^{2+} ในลำไส้ส่วน jejunum ileum และ colon อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ [48] นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์เปลี่ยนโครงสร้าง และ absorptive area ของลำไส้ส่วน duodenum jejunum ileum และ colon [47] บ่งชี้ได้ว่า omeprazole มีฤทธิ์ลดการทำงานของลำไส้ ถึงแม้ว่ากลไกการออกฤทธิ์ของ PPIs ในการดูดซึม Mg^{2+} ยังต้องมีการศึกษาวิจัยในเชิงลึกต่อไป แต่การแสวงหาสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการหลังกรดในกระเพาะอาหารเทียบเท่า PPIs แต่ไม่มีผลข้างเคียงแบบที่พบในผู้ป่วยที่ใช้ PPIs ก็มีความสำคัญ

จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าสารประกอบฟีนอลิกที่สกัดจากขิง (*Zingiber officinale*) ได้แก่ cinnamic acid และ gallic acid มีฤทธิ์ลดการทำงานของ H^+/K^+ ATPase ในกระเพาะอาหาร และมีประสิทธิภาพเทียบเท่า PPIs [29, 40] ทั้งนี้เบื้องต้นจากการศึกษาข้อมูลงานวิจัยก่อนหน้าผู้วิจัยพบว่ากลไกการยับยั้ง H^+/K^+ ATPase ของ PPIs และ สารประกอบฟีนอลิก นั้นแตกต่างกัน ดังนั้นการได้รับสารประกอบฟีนอลิกในระยะเวลานานอาจจะไม่มีผลข้างเคียงเช่นเดียวกับที่พบใน PPIs

การศึกษานี้เลือกใช้หนูขาวเพศผู้สายพันธุ์ Sprague-Dawley เนื่องจากเภสัชจลนศาสตร์ของ PPIs ในหนูขาวสายพันธุ์ Sprague-Dawley [23] คล้ายคลึงกับในร่างกายมนุษย์ การรักษาสมดุล Mg^{2+} โดยอาศัยการทำงานของลำไส้ ไต กระดูก และเนื้อเยื่อทั่วร่างกาย [11] คล้ายคลึงกับกลไกของมนุษย์ [7] นอกจากนี้เมื่อพิจารณาจากอายุไขเฉลี่ย และระยะเวลาเจริญของมนุษย์และหนูขาว พบว่าระยะเวลา 1 ปีของมนุษย์ มีค่าโดยเฉลี่ยเท่ากับ 16.7 วันในหนูขาว [34] ดังนั้นหนูขาวจึงมีความเหมาะสมจะใช้ในการศึกษาอิทธิพลของการได้รับสารประกอบฟีนอลิกที่สกัดจากสมุนไพร และ omeprazole ติดต่อกันเป็นเวลานาน ผลการศึกษาจากโครงการวิจัยนี้จะเป็นข้อมูลสำคัญต่อการศึกษาวิจัยต่อเนื่องเพื่อพัฒนาวิธีการป้องกันผลข้างเคียงของยา PPIs ในผู้ป่วยที่จำเป็นต้องได้รับการรักษาด้วยยาชนิดนี้ติดต่อกันเป็นเวลานาน

วัตถุประสงค์

1 เพื่อศึกษาผลของสารสกัดจากขิง, commercial cinnamic acid, commercial gallic acid และ omeprazole ต่อระดับค่า pH ในกระเพาะอาหาร ลำไส้ส่วน duodenum jejunum ileum cecum และ colon ของหนูขาว

2 เพื่อศึกษาผลของการสารสกัดจากขิง, commercial cinnamic acid, commercial gallic acid และ omeprazole ติดต่อกันเป็นเวลา 5 เดือน ต่อระดับ Mg^{2+} ในกระแสเลือด ในปัสสาวะ ในกระดูก และกล้ามเนื้อของหนูขาว

3 เพื่อศึกษาผลของการสารสกัดจากขิง, commercial cinnamic acid, commercial gallic acid และ omeprazole ติดต่อกันเป็นเวลา 5 เดือน ต่อการดูดซึม Mg^{2+} แบบผ่านเซลล์ และแบบผ่านช่องว่างระหว่างลำไส้ส่วน duodenum jejunum และ ileum ของหนูขาว

4 เพื่อศึกษาผลของการสารสกัดจากขิง, commercial cinnamic acid, commercial gallic acid และ omeprazole ติดต่อกันเป็นเวลา 5 เดือน ต่อระดับ parathyroid hormone (PTH), vitamin D, insulin, epidermal growth factor (EGF), และ fibroblast growth factor-23 (FGF-23) ในหนูขาว

5 เพื่อศึกษาผลของการสารสกัดจากขิง, commercial cinnamic acid, commercial gallic acid และ omeprazole ติดต่อกันเป็นเวลา 5 เดือน ต่อการแสดงออกของโปรตีน TRPM6 และ CNNM4 ในกระเพาะอาหาร ลำไส้ส่วน duodenum jejunum ileum cecum และ colon ของหนูขาว

ขอบเขตโครงการวิจัย

การศึกษาทั้งหมดในโครงการวิจัยนี้ครอบคลุมการศึกษาศรีรวิทยาการควบคุมสมดุล Mg^{2+} ในร่างกาย และแสวงหาสารสกัดจากสมุนไพรรักษาที่มีฤทธิ์เทียบเท่า PPIs แต่ไม่มีผลข้างเคียงต่อสมดุล Mg^{2+} เช่นเดียวกับ PPIs

ทฤษฎี สมมติฐาน และกรอบแนวคิดของโครงการวิจัย

1 การให้ omeprazole ติดต่อกันเป็นเวลานาน มีฤทธิ์ลดปริมาณ Mg^{2+} ในกระแสเลือด ในปัสสาวะ ในกระดุก และกล้ามเนื้อของหนูขาว

2 มีการเปลี่ยนแปลงระดับ parathyroid hormone (PTH), vitamin D, insulin, epidermal growth factor (EGF), และ fibroblast growth factor-23 (FGF-23) ในกระแสเลือดของหนูขาวที่ได้รับ omeprazole ติดต่อกันเป็นเวลานาน

3 omeprazole มีฤทธิ์กีดการดูดซึมแบบ passive Mg^{2+} absorption และ active Mg^{2+} absorption ในลำไส้ของหนูขาว

4 สารประกอบฟีนอลิกที่สกัดจากสมุนไพรรักษาที่มีฤทธิ์กีด H^+/K^+ ATPase และลดการหลั่งกรดในกระเพาะอาหารเทียบเท่า omeprazole

5 การให้สารประกอบฟีนอลิกฯ ติดต่อกันเป็นเวลานานไม่มีผลข้างเคียงต่อสมดุล Mg^{2+} และการทำงานของลำไส้

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1 ผลการศึกษาจากโครงการวิจัยนี้จะเพิ่มองค์ความรู้ด้านสรีรวิทยาการรักษาสมดุล Mg^{2+} และกลไกควบคุมการดูดซึม Mg^{2+} ในลำไส้ ซึ่งจะเป็ข้อมูลสำคัญต่อการรักษาต่อยอดเพื่อการพัฒนาวิธีการป้องกัน และรักษาผลข้างเคียงของยา omeprazole ในผู้ป่วยที่จำเป็นต้องได้รับการรักษาด้วยยานี้ติดต่อกันเป็นเวลานาน

2 ผู้วิจัยมีแผนที่จะให้ทุนระดับบัณฑิตศึกษาในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์การแพทย์) และปรัชญาดุษฎีบัณฑิต (วิทยาศาสตรการแพทย์) ที่ผู้วิจัยเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วมทำการวิจัยภายใต้การควบคุมของผู้วิจัย ซึ่งจะเป็ประโยชน์ในการสร้างนักวิจัยหน้าใหม่ในสาขาวิชาสรีรวิทยา

3 ผลการวิจัยจากโครงการวิจัยนี้คาดว่าจะตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารวิจัยระดับนานาชาติคือ Phytochemistry ในหัวข้อเรื่อง Long-term administration of *Zingiber officinale* extract on magnesium homeostasis.

4 ผลงานวิจัยจากโครงการวิจัยนี้ที่ได้รับการเผยแพร่ในวารสารวิชาการนานาชาติจะถูกนำไปเป็นหัวข้อเรียนของนิสิตระดับบัณฑิตศึกษาในรายวิชาการวิเคราะห์บทความวิจัยทางวิทยาศาสตร์ และรายวิชาหัวข้อเลือกสรรคทางวิทยาศาสตรการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

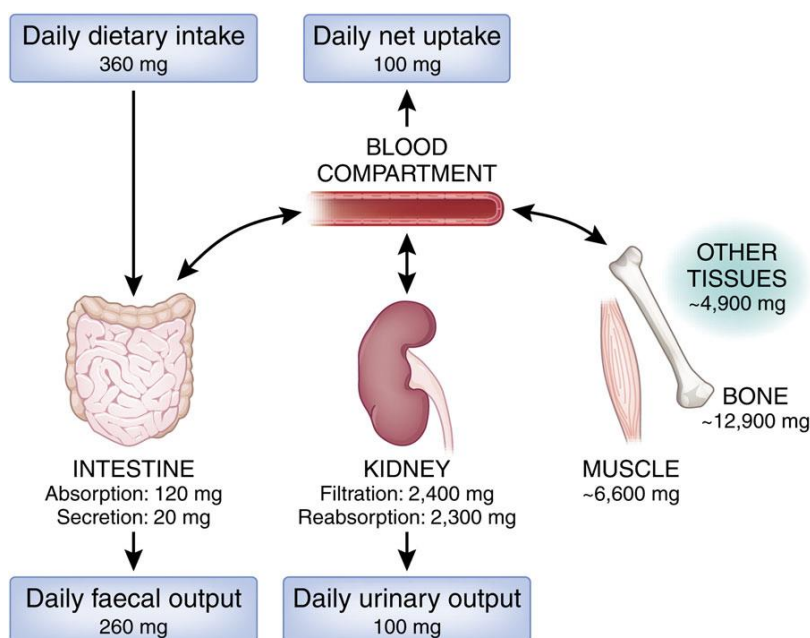
5 ผลการทดลองจากโครงการวิจัยนี้ จะนำไปสู่การพัฒนาสารสกัดจากสมุนไพรรักษาเพื่อการรักษาโรคในกลุ่ม acid peptic disorder

การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง

1 สมดุลของ Mg^{2+} ในร่างกายมนุษย์

ร่างกายของมนุษย์มี Mg^{2+} อยู่ทั้งหมดประมาณ 24 g [50] ส่วนใหญ่จะสะสมในกระดุก (~53%) และอยู่ในเซลล์เนื้อเยื่อต่างๆ ทั่วร่างกาย (~46%) ถือเป็นแหล่งสะสม Mg^{2+} ของร่างกายมนุษย์ ส่วนที่เหลือประมาณ 1% อยู่ในกระแสเลือดและของเหลวนอกเซลล์ [26, 36, 50] 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 [14]

ทั้งนี้ Mg^{2+} มีความสำคัญต่อการทำงานของเซลล์ทั่วร่างกาย เนื่องจาก Mg^{2+} เป็นไอออนที่ควบคุมการทำงานของ ion channel การคงรูปของโปรตีนภายในเซลล์ กระบวนการเผาผลาญพลังงานภายในเซลล์ และยังเป็นโคเอนไซม์ของเอนไซม์สำคัญภายในเซลล์มากกว่า 300 ชนิด [26, 36] หากเกิดภาวะพร่อง Mg^{2+} ย่อมส่งผลกระทบการทำงานของระดับเซลล์ และก่อให้เกิดปัญหาทางสุขภาพมากมาย อาทิเช่น โรคกระดูกพรุน [37] Alzheimer's disease [9] และความดันโลหิตสูง [49] เป็นต้น ดังนั้นปริมาณ

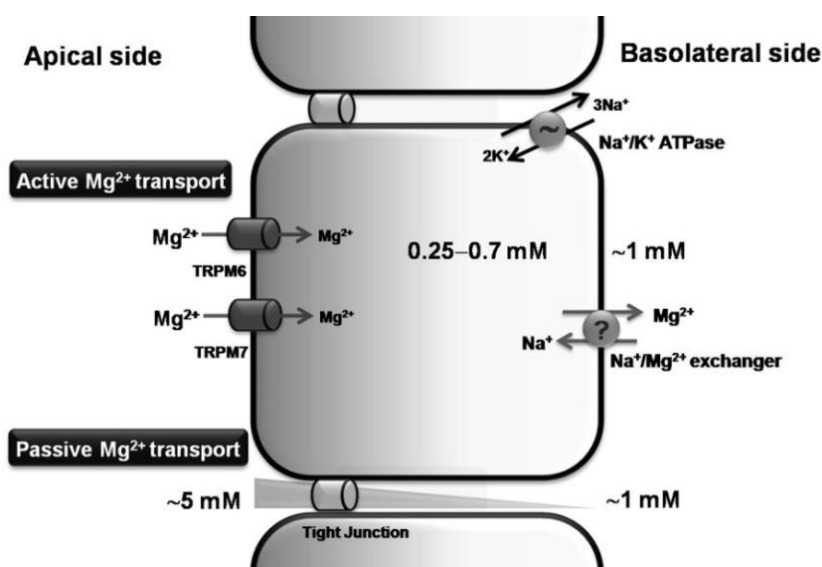


รูปที่ 1. กลไกการรักษาสมดุล Mg^{2+} ในร่างกายมนุษย์ [7]

Mg^{2+} ในกระแสเลือดจึงจำเป็นต้องถูกควบคุมให้อยู่ในระดับที่เหมาะสมดังแสดงในรูปที่ 1 คือประมาณ 0.7–1.1 mM โดยอาศัยการทำงานของลำไส้ในการดูดซึม Mg^{2+} เข้าสู่ร่างกาย ไตในการขับ Mg^{2+} ส่วนเกินออกจากร่างกาย ในขณะที่กระดูกและอยู่ในเซลล์เนื้อเยื่อต่างๆ ทั่วร่างกายจะปล่อย Mg^{2+} ออกมาเมื่อปริมาณ Mg^{2+} ในการแสเลือดลดต่ำกว่าระดับปกติ เพื่อรักษาระดับ Mg^{2+} ในกระแสเลือด [7, 19] มีรายงานวิจัยหลายฉบับบ่งชี้ว่า PTH, vitamin D, insulin และ EGF นั้นมีส่วนเกี่ยวข้องกับการรักษาสมดุล Mg^{2+} ในร่างกาย [8, 19, 26, 36, 50] แต่ก็ยังไม่มีการศึกษาวิจัยกลไกการควบคุมสมดุล Mg^{2+} โดยฮอร์โมนข้างต้น นอกจากนั้นยังมีรายงานว่า fibroblast growth factor-23 (FGF-23) มีฤทธิ์ควบคุมสมดุล Ca^{2+} และการดูดซึม Ca^{2+} ในลำไส้เล็กของสัตว์ทดลอง [18]

การดูดซึม Mg^{2+} แบบผ่านช่องระหว่างเซลล์นั้นเป็นกระบวนการที่ไม่ใช้พลังงาน (passive Mg^{2+} transport) อาศัยความลาดเอียงทางความเข้มข้นของ Mg^{2+} ซึ่งปริมาณ Mg^{2+} อิสระในโพรงลำไส้มีค่ามากกว่าหรือประมาณ 5 mM ซึ่งสูงกว่าความเข้มข้นของ Mg^{2+} อิสระในกระแสเลือด และศักย์ไฟฟ้าที่เป็นบวกด้านโพรงลำไส้ (+5 mV) เหนี่ยวนำให้ Mg^{2+} แพร่จากโพรงลำไส้ผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์เยื่อบุลำไส้ก่อนเข้าสู่กระแสเลือด [33] กลไกการดูดซึมแบบผ่านช่องระหว่างเซลล์นี้ถือเป็นกลไกหลักของร่างกาย เนื่องจากดูดซึม ~90% ของปริมาณ Mg^{2+} ทั้งหมดที่ดูดซึมที่ลำไส้ [33] การศึกษาท่อน้ำหน้าของผู้วิจัยพบว่า Cldn-7 และ Cldn-12 มีหน้าที่เป็น paracellular Mg^{2+} channel ในลำไส้ [44] การศึกษาการควบคุมการแสดงออกของ Cldn-7 และ Cldn-12 จึงอาจเป็นแนวทางสำคัญ ที่จะทำให้เข้าใจกลไกการดูดซึมแมกนีเซียมแบบผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์ นอกจากนั้นเซลล์เยื่อบุลำไส้ยังมีการแสดงออกของ Cldn-2, -4, -5, -8, -13 และ -15 ที่ [12, 13, 35] ซึ่งยังไม่มีการศึกษาวิจัยว่าโปรตีนเหล่านี้มีส่วนเกี่ยวข้องกับการดูดซึม Mg^{2+} แบบผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์ในลำไส้หรือไม่

การดูดซึม Mg^{2+} แบบผ่านเซลล์นั้นเป็นกระบวนการอาศัยใช้พลังงานระดับเซลล์ (active Mg^{2+} absorption) โดยอาศัยการทำงานของ TRPM6 และ CNNM4 [8, 33, 41] หากคิดเป็นร้อยละการดูดซึม Mg^{2+} ทั้งหมดโดยลำไส้ ลำไส้เล็กส่วน duodenum ดูดซึม 15% ส่วน jejunum ดูดซึม 22% ส่วน ileum ดูดซึม 56% และลำไส้ใหญ่ ดูดซึม 7% [26] อย่างไรก็ตามกลไกระดับเซลล์ของการดูดซึม Mg^{2+} ทั้งแบบผ่านเซลล์และผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์ยังไม่ทราบแน่ชัด และกลไกควบคุมการดูดซึม Mg^{2+} ในลำไส้นั้นก็ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดเช่นกัน [8, 41]



รูปที่ 2. กลไกการดูดซึม Mg^{2+} ในเซลล์เยื่อบุลำไส้ [42]

2 omeprazole

omeprazole เป็นยาในกลุ่ม PPIs 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 [24] ดังนั้น omeprazole จึงนิยมใช้รักษาโรคของระบบทางเดินอาหารที่จำเป็นต้องยับยั้งการหลั่งกรดจาก parietal cells ในกระเพาะอาหาร อาทิเช่น Barrett's esophagitis, gastro-esophageal reflux disease, gastritis เนื่องจากเป็นยาที่มีรายงานผลข้างเคียงน้อย และหาซื้อได้ง่ายโดยไม่ต้องมีใบสั่งยาจากแพทย์กำกับจึงทำให้ omeprazole เป็นยาที่นิยมและใช้อย่างแพร่หลาย และเป็นยาในกลุ่มยาที่ขายดีที่สุดทั่วโลก [5, 31] เมื่อรับประทาน omeprazole 40 mg จะทำให้มีระดับ omeprazole ในกระแสเลือดสูงสุดที่ 200–400 ng/ml [24] 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]

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 [4, 6,

10, 16, 21, 25, 39] จากการทดสอบพิเศษที่เรียกว่า Mg^{2+} retention test บ่งชี้ว่าผู้ป่วยข้างต้นมีภาวะพร่อง Mg^{2+} ในแหล่งสะสมของร่างกายอย่างรุนแรง [4] แต่ผู้ป่วยมีการทำงานของไตในการจัดการ Mg^{2+} เป็นปกติ มิได้มีการสูญเสีย Mg^{2+} ไปกับปัสสาวะ [4, 6, 10, 16, 21, 25, 39, 52] เป็นที่น่าสนใจว่าการรักษาโดยการให้ Mg^{2+} ปริมาณสูงเสริมทางการรับประทานนั้นไม่สามารถรักษาระดับของ Mg^{2+} ในกระแสเลือดให้กลับเป็นปกติได้ ในทางตรงกันข้ามการให้ Mg^{2+} เสริมทางหลอดเลือดโดยตรงกลับทำให้ระดับ Mg^{2+} ในกระแสเลือดกลับสู่ระดับปกติอย่างรวดเร็ว บ่งชี้ว่า omeprazole มีฤทธิ์รบกวนการดูดซึม Mg^{2+} ในลำไส้ [4, 6, 10, 16, 21, 25, 39] ยิ่งไปกว่านั้นเมื่อแพทย์หยุดจ่ายยา omeprazole ให้คนไข้เพียง 1 – 2 สัปดาห์ พร้อมกับการให้ Mg^{2+} เสริมทางการรับประทาน ส่งผลให้ระดับ Mg^{2+} ในกระแสเลือดกลับสู่ระดับปกติได้ แต่เนื่องจากคนไข้ข้างต้นมักเป็นผู้ป่วยเรื้อรัง การหยุดใช้ omeprazole จึงทำให้อาการของระบบทางเดินอาหารกลับแย่ลงจึงจำเป็นต้องให้แพทย์ต้องจ่ายยาตัวนี้อีกครั้ง หรือยาในกลุ่มยับยั้งการหลั่งกรดตัวอื่น และเมื่อมีการกลับมาใช้ omeprazole อีกเพียง 1 – 2 สัปดาห์ พร้อมกับการให้ Mg^{2+} เสริมทางการรับประทาน กลับทำให้ระดับ Mg^{2+} ในกระแสเลือดต่ำลงอีกครั้ง [4, 6, 10, 16, 21, 25, 39] บ่งชี้ได้ว่า omeprazole มีฤทธิ์กีดขวางการดูดซึม Mg^{2+} เพียง 7 – 14 วันหลังได้รับยา ดังนั้นการพัฒนาของภาวะปริมาณ Mg^{2+} ในกระแสเลือดต่ำที่ใช้เวลานานนั้นน่าจะเกิดจากการสูญเสียการดูดซึม Mg^{2+} ในลำไส้ จึงทำให้ร่างกายต้องใช้ Mg^{2+} จากแหล่งสะสมของร่างกาย แต่เมื่อมีการนำ Mg^{2+} จากแหล่งสะสมมาใช้ติดต่อกันเป็นระยะเวลาสั้นจึงทำให้เกิดการพร่องของ Mg^{2+} ในแหล่งสะสมของร่างกาย และไม่สามารถช่วยรักษาระดับ Mg^{2+} ในกระแสเลือดได้ จนเกิดภาวะปริมาณ Mg^{2+} ในกระแสเลือดต่ำกว่าปกติ [6] 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 ลด negative electrical field strength ในช่องว่างระหว่างเซลล์ ลด Mg^{2+} affinity ของช่องว่างระหว่างเซลล์ เพิ่มพลังงานก่อกัมมันต์ของการขนส่ง Mg^{2+} ผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์ ลดการแสดงออกของ Cldn-7 และ -12 เพิ่มการแสดงออกของ acid sensors ได้แก่ acid-sensing ion channel 1a (ASIC1a), potential vanilloid 4 (TRPV4) และ ovarian cancer G protein-coupled receptor 1 (OGR1) และเพิ่มการขับ HCO_3^- ในแผ่นเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 [43-45] Mertz-Nielsen และคณะรายงานผลการทดลองในมนุษย์พบว่า omeprazole เพิ่มการหลั่ง HCO_3^- ในลำไส้เล็กส่วน duodenum อย่างมีนัยสำคัญ [28] เนื่องจาก omeprazole ยับยั้งการขับ HCO_3^- จากตับอ่อน เป็นไปได้ว่า omeprazole มีฤทธิ์กระตุ้นการขับ HCO_3^- จากเซลล์เยื่อบุลำไส้เล็กโดยตรง [51] ในปี ค.ศ. 2013 Lameris และคณะรายงานผลของ omeprazole เพิ่มการแสดงออกของ TRPM6 ในลำไส้ใหญ่หนูสายพันธุ์ C57BL/J6 [22] ซึ่งน่าจะเป็นกลไกการปรับตัวของสัตว์ทดลองจากภาวะ systemic Mg^{2+} deficiency ต่อมาในปี ค.ศ. 2015 Hess และคณะพบว่า omeprazole ลดระดับ Mg^{2+} ในกระแสเลือด และเพิ่มการแสดงออกของ TRPM6 ในลำไส้ใหญ่หนูสายพันธุ์ C57BL/J6 [15] อย่างไรก็ตามการกระตุ้นการดูดซึม Mg^{2+} ในลำไส้ใหญ่ กลับไม่สามารถรักษาระดับ Mg^{2+} ของหนูสายพันธุ์ C57BL/J6 ได้ [15] บ่งชี้ว่าลำไส้ใหญ่อาจไม่ใช่ส่วนสำคัญในการควบคุมระดับ Mg^{2+} ในร่างกาย จากการศึกษาของกลุ่มวิจัยของข้าพเจ้าพบว่า omeprazole มีฤทธิ์ลดระดับ Mg^{2+} ในเลือด ปัสสาวะ กระดูก และกล้ามเนื้อ

ของหนูขาวสายพันธุ์ Sprague- Dawley [46] บ่งชี้ว่า omeprazole มีฤทธิ์ลดระดับ Mg^{2+} ทั่วทั้งร่างกาย สัตว์ทดลอง นอกจากนี้ยังพบว่า omeprazole กดการดูดซึม Mg^{2+} ทั้งแบบผ่านเซลล์ และผ่านช่องว่าง ระหว่างเซลล์ลำไส้ส่วน duodenum ทั้งนี้เซลล์เยื่อบุลำไส้มีการปรับตัวโดยเพิ่มการแสดงออกของ Clcn-2, -7, -12, -15, TRPM6, และ CNNM4 [46] การศึกษาล่าสุดของกลุ่มข้าพเจ้าพบว่า omeprazole มีฤทธิ์กดการดูดซึม Mg^{2+} ในลำไส้ส่วน jejunum ileum และ colon อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ [48] นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์เปลี่ยนแปลงโครงสร้าง และ absorptive area ของลำไส้ส่วน duodenum jejunum ileum และ colon [47] บ่งชี้ได้ว่า omeprazole มีฤทธิ์กดการทำงานของลำไส้ และรบกวนสมดุล Mg^{2+}

4 ข้อจำกัดการศึกษาสมดุลแมกนีเซียม และการดูดซึมแมกนีเซียม

การศึกษาสมดุลแมกนีเซียม และการดูดซึมในลำไส้ นั้น มีข้อจำกัดจากธรรมชาติของ Mg^{2+} เองที่มีค่า hydration energy ประมาณ $-1,922 \text{ kJ/mol}$ ซึ่งสูงที่สุดในบรรดาไอออนประจุบวกในร่างกายมนุษย์ ทำให้ Mg 1 อะตอม จะรวมกับน้ำสูงถึง 7-8 อะตอม และมีชั้นของน้ำมากถึง 3 ชั้นล้อมรอบ การศึกษาการกระจายตัวและการเคลื่อนที่ของ Mg^{2+} ผ่านเนื้อเยื่อต่างๆ จึงเป็นเรื่องยาก อีกทั้งการศึกษารายการขนส่งไอออนใดๆ นิยมใช้ radioactive isotope ของไอออนนั้นๆ เพื่อติดตามการเคลื่อนที่ แต่สำหรับ radioisotope ^{28}Mg ซึ่งเป็นไอโซโทปที่มี half-life ยาวนานที่สุดของ Mg^{2+} แต่ก็มีอายุเพียง 20.92 ชั่วโมง จึงเป็นไปได้ยากมากที่จะนำ ^{28}Mg มาใช้ศึกษาวิจัย เพราะเมื่อผลิตขึ้นมาแล้ว รวมขั้นตอนการตรวจสอบ และการขนส่ง ก็เกินระยะเวลา 20 ชั่วโมงแล้ว ทำให้ไม่สามารถนำ ^{28}Mg มาศึกษาได้ หรือหากจะใช้ก็ต้องทำการทดลองใกล้กับห้องปฏิบัติการผลิต ^{28}Mg ด้วยเหตุนี้การศึกษารายการขนส่ง Mg^{2+} ในเนื้อเยื่อต่างๆ จึงเต็มไปด้วยข้อจำกัด ดังนั้นข้อมูลกลไกการดูดซึม Mg^{2+} ในลำไส้เบื้องต้นเองก็ยังไม่มีการศึกษาวิจัยอย่างชัดเจน การศึกษาที่ผ่านมาของผู้วิจัยนั้นศึกษารายการขนส่ง Mg^{2+} ลำไส้ส่วน duodenum jejunum ileum และ colon และทราบเพียงแค่ว่า omeprazole มีผลต่อการกดการดูดซึม Mg^{2+} ทั้งแบบใช้พลังงานและไม่ใช้พลังงานในลำไส้ แต่กลไกระดับเซลล์นั้นยังไม่มีการศึกษาวิจัย

5 ชิง (*Zingiber officinale*)

ชิง (*Zingiber officinale*) เปรนพืชที่นิยมปลูกและพบได้ทั่วไปในทุกภาคของประเทศไทย นิยมใช้เป็นเครื่องเทศในการประกอบอาหาร และใช้เป็นยาสมุนไพรในบัญชียาจากสมุนไพร แบบท้ายประกาศบัญชียาหลักแห่งชาติ พ.ศ. 2559 รักษาโรคหลายกลุ่มอาการ [1] จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า สารประกอบฟีนอลิกที่สกัดจากชิง (*Zingiber officinale*) ได้แก่ cinnamic acid และ gallic acid มีฤทธิ์กดการทำงานของ H^+/K^+ ATPase ในกระเพาะอาหาร และมีประสิทธิภาพเทียบเท่า PPIs คือ lansoprazole [29, 40] โดยสารประกอบฟีนอลิกจะขัดขวางส่วนเอนไซม์ที่ละลายพลังงานใน H^+/K^+ ATPase [38] จึงสามารถยับยั้งการทำงานของ H^+/K^+ ATPase ในกระเพาะอาหาร

2. เนื้อเรื่อง (Main body)

วิธีการดำเนินการวิจัย และสถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล

1 การสกัดสารประกอบฟีนอลิกจากชิง

นำชิงแก่มาหั่นบางและตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ ก่อนนำไปอบให้แห้งในอุณหภูมิ $65 \text{ }^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 3 วัน ก่อนนำมาบดให้เป็นผง (powdered air-dried) จากนั้นนำมาสกัดสารสำคัญด้วย aqueous acetone (Acetone: water, 80:20 v/v; AAE), aqueous methanol (methanol: water, 80:20 v/v; AME) และ mix solvent (ethanol: hexane: water, 80:10:10 MSE) homogenize ก่อนนำเข้าเครื่องเขย่าเป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นจึงนำไป centrifuge เพื่อเก็บ supernatants แล้วนำไปประเหยด้วย rotary evaporator

ที่ 45°C หลังจาก organic solvents ระเหยเรียบร้อยแล้ว phenolic extract sample ถูกนำมาละลายใน distilled water (1:100w/v) เก็บ ที่ 4 °C

2 สัตว์ทดลอง

2.1 การเลี้ยงสัตว์ทดลอง

หนูขาวเพศผู้สายพันธุ์ Sprague-Dawley อายุ 9 สัปดาห์ จำนวน 25 ตัว ได้รับจาก ศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล และเลี้ยงในสภาพแวดล้อมปิดเป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์ก่อนเริ่ม ดำเนินการทดลองเพื่อให้สัตว์ทดลองปรับสภาพต่อสภาพแวดล้อมของสถานที่เลี้ยงใหม่ จากนั้นในสัตว์ทดลอง จะถูกแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่

1. กลุ่มควบคุม จำนวน 5 ตัว
2. กลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากขิง จำนวน 5 ตัว
3. กลุ่มที่ได้รับ cinnamic acid จำนวน 5 ตัว
4. กลุ่มที่ได้รับ gallic acid จำนวน 5 ตัว
5. กลุ่มที่ได้รับ omeprazole จำนวน 5 ตัว

จากนั้นสัตว์ทดลองทั้งหมดจะถูกเลี้ยงในสภาพแวดล้อมเดียวกันจนกว่าจะมีอายุครบ 30 สัปดาห์ก่อน ทำการเก็บตัวอย่าง และกำจัดสัตว์ทดลองตามข้อปฏิบัติจริยธรรมการวิจัยในสัตว์ทดลอง

2.2 การให้สาร และยาแก่สัตว์ทดลอง

สำหรับ PPIs ในการศึกษาครั้งนี้เลือกใช้ omeprazole ชนิดฉีดเข้าหลอดเลือด (Ocid[®] IV, Zydus Cadila, India) ซึ่งตัวทำละลายของยาเป็นน้ำปลอดเชื้อมีค่า pH 6-7 ช่วยลดการการ ระคายเคืองจากการฉีด โดยฉีดเข้าชั้นใต้ผิวหนัง (subcutaneous injection) ที่ความเข้มข้น 20 mg/kg [14] เนื่องจากบริเวณชั้นใต้ผิวหนังเป็นบริเวณที่มีหลอดเลือดฝอยจำนวนมาก ตัวยาจึงถูกดูดซึมเข้ากระแสเลือดได้ อย่างรวดเร็ว ลดการบาดเจ็บต่ออวัยวะภายในจากการฉีดเข้าช่องท้อง ลดการบาดเจ็บของหลอดเลือดจากการ ฉีดเข้าหลอดเลือดโดยตรง และสามารถฉีดได้ต่อเนื่องเป็นเวลานานโดยมีผลกระทบต่อสัตว์ทดลองน้อย ที่สุด [30] และจากการศึกษานำร่องของคณะผู้วิจัยพบว่าการฉีด omeprazole เข้าชั้นใต้ผิวหนังติดต่อกัน 20 สัปดาห์ ไม่ก่อให้เกิดการระคายเคือง หรือการอักเสบของผิวหนัง และชั้นใต้ผิวหนังของหนูขาว ยิ่งไปกว่านั้น ประสิทธิภาพในการยับยั้งการหลั่งกรดในกระเพาะอาหาร หลังจากให้ omeprazole โดยฉีดเข้าชั้นใต้ผิวหนัง ก็ทัดเทียมกับการให้ omeprazole โดยการฉีดเข้าหลอดเลือดดำทั้งในหนูขาว [17] และในมนุษย์ [2] สำหรับการให้สารสกัดจากขิง, commercial cinnamic acid, commercial gallic acid ให้โดยการป้อนทางปาก เข้าไปถึงกระเพาะ (gavage) สำหรับกลุ่มควบคุมจะได้รับการฉีดด้วยน้ำปลอดเชื้อเข้าชั้นใต้ผิวหนัง ทุกกลุ่มจะ ได้รับสารหรือยา 1 ครั้งต่อวัน ต่อเนื่องกัน 20 สัปดาห์

2.3 การเก็บตัวอย่างในสัตว์ทดลอง

เก็บปัสสาวะในสัปดาห์สุดท้ายก่อน terminate สัตว์ทดลอง โดยเลี้ยงสัตว์ทดลองใน metabolic cage และเก็บปัสสาวะในระยะเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อนำไปวัดระดับ Mg^{2+} ซึ่งส่งตรวจที่ ห้องปฏิบัติการเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลมหาวิทยาลัยบูรพา

เมื่อสิ้นสุดการให้ยาและสารแก่สัตว์ทดลอง สัตว์ทดลองจะถูกทำให้สลบโดยใช้ thiopental ความเข้มข้น 70 mg/kg ฉีดเข้าช่องท้อง จากนั้นจึงเปิดช่องอกเพื่อเก็บเลือดจากหัวใจปริมาตร 5-6 ml และถือเป็นการ terminate สัตว์ทดลอง เพื่อนำไปวัดระดับ Mg^{2+} , PTH, vitamin D, insulin, EGF และ FGF-23 ซึ่งส่ง ตรวจที่ศูนย์ตรวจทางห้องปฏิบัติการ แล็บเฮาส์ (ชลบุรี) จากนั้นรีบทำการเปิดช่องท้องเพื่อเก็บลำไส้ โดยแบ่ง ลำไส้ออกเป็น 3 ส่วน คือ (1) duodenum เก็บลำไส้ส่วนที่ต่อจากกระเพาะอาหารความยาวประมาณ 12

เซนติเมตร (2) ileum เก็บลำไส้ส่วนที่อยู่เหนือต่อ cecum ความยาวประมาณ 12 เซนติเมตร และ (3) jejunum คือส่วนที่อยู่ระหว่าง duodenum จากนั้นลำไส้ทั้ง 3 ส่วนจะถูกนำไปศึกษาการดูดซึม Mg^{2+} คุณสมบัติทางชีวฟิสิกส์ การแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการขนส่ง Mg^{2+} และเก็บกล้ามเนื้อ gastrosoleus ข้างขวา และกระดูก femur ด้านขวา เพื่อศึกษาปริมาณ Mg^{2+}

3 การศึกษาค่า pH ในกระเพาะอาหาร และลำไส้ส่วน

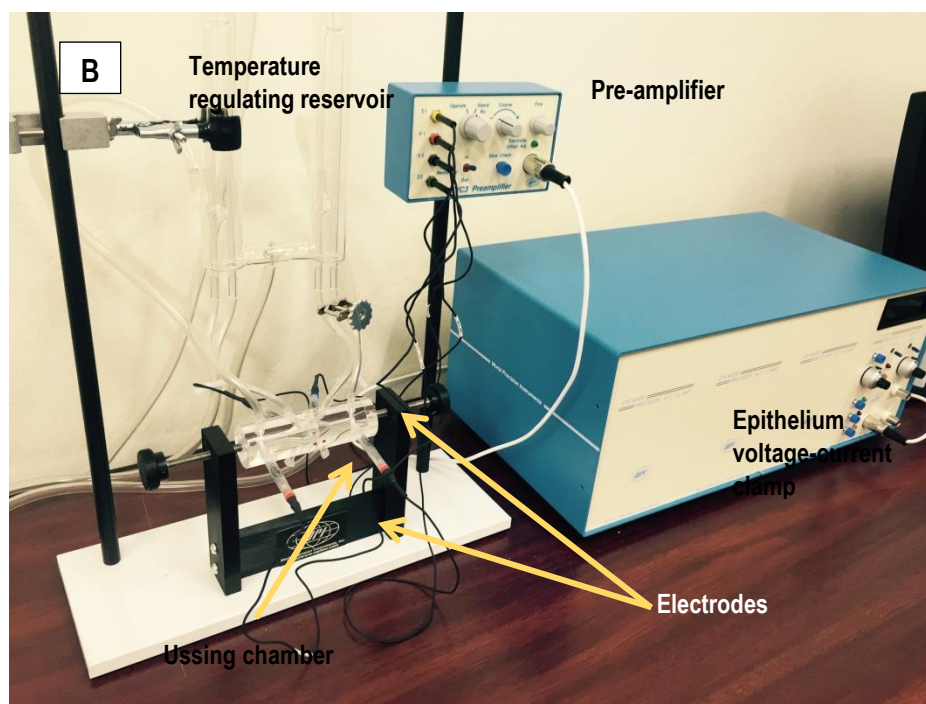
องค์ประกอบในกระเพาะอาหาร ลำไส้ส่วน duodenum jejunum ileum cecum และ colon ของหนูขาว จะถูกเก็บใน centrifuge tube ขนาด 2 ml นำไปปั่นด้วยเครื่อง micro-centrifuge เพื่อแยกส่วนตะกอนและของเหลว จากนั้นทำการวัดค่า pH ในส่วนของเหลวโดยใช้แผ่นทดสอบค่า pH (MColorpHast™ pH-Indicator Strips, Merck-Millipore, German)

4 การศึกษาลำไส้ของหนูขาว

4.1 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 $290-295 \text{ mmol kg}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$ 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 3A) มีประสิทธิภาพทัดเทียมกับ standard Ussing chamber system (World Precision Instrument, Sarasota, FL, USA) (รูปที่ 3B) นอกจากนี้ผู้วิจัยยังมีแผนส่งผลิต high throughput Ussing chamber setup เพิ่ม เพื่อให้สามารถทำการทดลองได้หลายการทดลองในเวลาเดียวกัน และลดจำนวนการใช้สัตว์ทดลองได้อีกด้วย





รูปที่ 3. ภาพแสดง high throughput Ussing chamber setup (A) และ standard Ussing chamber system (B)

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 $290\text{--}295 \text{ mmol kg}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$) 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 $290\text{--}295 \text{ mmol kg}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$) ทั้งนี้เพื่อให้เกิดความลาดเอียงทางความเข้มข้นและเหนี่ยวนำให้เกิดการขนส่ง Mg^{2+} แบบผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์ จากนั้นจึงเก็บตัวอย่าง $50 \mu\text{L}$ 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 แล้วนำไปวัดหาค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 nm โดยใช้เครื่อง UV spectrophotometer (model UV-2550; Shimadzu, Kyoto, Japan) [43] ความเข้มข้นของ Mg^{2+} จะถูกคำนวณโดยนำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้เทียบกับเส้นกราฟความเข้มข้นมาตรฐาน ซึ่งเกิดจากการนำ $50 \mu\text{L}$ ของ MgCl_2 ที่ความเข้มข้น 0, 2, 8, 20, 40 หรือ 80 mM ผสมกับ Xylidyl-Blue reagent 1 mL

อัตราการขนส่ง Mg^{2+} ข้างต้นถือเป็น total Mg^{2+} absorption คือเกิดจากการขนส่งแบบ passive และ active Mg^{2+} absorption รวมกัน ผู้วิจัยจะทำการทดลองการขนส่ง Mg^{2+} ดังวิธีการข้างต้น โดยใช้ลำไส้ส่วนเดียวกันและจากสัตว์ตัวเดียวกัน แต่เติม 1 mM Co(III)hexaammine ด้านโพรงลำไส้ เพื่อหยุดการทำงานของ Mg^{2+} channel ในเซลล์เยื่อบุลำไส้ทั้งหมด 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

นอกจากนี้การศึกษา total Mg^{2+} absorption, passive Mg^{2+} absorption และ active Mg^{2+} absorption ยังกระทำภายใต้การบ่มด้วย PTH, vitamin D, insulin, และ EGF เพื่อศึกษาอิทธิพลของฮอร์โมนแต่ละชนิดต่อการขนส่ง Mg^{2+} ในลำไส้แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 nm เช่นเดียวกับวิธีการข้างต้น จากนั้นจึงหากราฟเส้นตรงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของ Mg^{2+} ก่อนนำค่าความเข้มข้นของ Mg^{2+} ไปคำนวณหาค่าอัตราการขนส่ง Mg^{2+} [43]

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

ทำการศึกษาร่วมกับการศึกษาการขนส่ง Mg^{2+} ซึ่งค่า P_{Mg} สามารถคำนวณได้โดยการนำค่าอัตราการขนส่ง Mg^{2+} ที่ได้จากการทดลอง 12.4.1 หารด้วยค่าความต่างความเข้มข้นของ Mg^{2+} ใน bathing solution ด้าน apical และ basolateral [43]

4.3 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, $CaCl_2$ 1.25mM, $NaHCO_3$ 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 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 (V_t) (รูปที่ 5B) โดยปลายอีกด้านของ electrode ที่วัดค่าความต่างศักย์ไฟฟ้านั้นจะต่อพ่วงกับ pre-amplifier ของเครื่อง epithelium voltage-current clamp (model ECV-4000; World Precision Instrument, Sarasota, FL, USA) ส่วน electrode อีกคู่นั้นจะต่อเข้ากับปลายแต่ละด้านของ 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 [43]

4.4 การศึกษา charge selectivity โดย dilution potential technique

ทำการทดลองใน Ussing chamber setup โดยก่อนเริ่มทำการศึกษาแผ่นลำไส้จะแช่อยู่ใน physiological bathing solution ซึ่งมีความเข้มข้นของ NaCl ที่ 145 mM เช่นเดียวกับการศึกษาในข้อ 12.4.1 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}) [35] เพื่อศึกษาการคัดเลือกประจุของแผ่นลำไส้ว่าขนส่งไอออนประจุบวก หรือประจุลบ มากกว่า

4.5 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 Ussing chamber setup เช่นเดียวกับการศึกษาในข้อ 13.2.3 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 osmolarity เท่ากับ 290-295 mmol kg⁻¹ H₂O จากนั้นจึงวัดค่าทางไฟฟ้าที่เปลี่ยนไป แล้วนำค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าที่เปลี่ยนไป และ I_{sc} ไปใช้ในการคำนวณด้วย Goldman-Hodgkin-Katz equation และ Kimizuka-Koketsu equation [27] เพื่อหาค่า absolute permeability ของไอออนแต่ละชนิด ก่อนนำค่า P_{Li} , P_{Na} , P_K , P_{Rb} และ P_{Cs} มาศึกษาลักษณะสนามไฟฟ้าภายในช่องว่างระหว่างเซลล์ของแผ่นลำไส้โดยเทียบเคียงตาม Eisenman selective sequence [34]

4.6 Western blot analysis

สกัดโปรตีนจากเซลล์เซลล์เยื่อลำไส้โดยใช้ Pierce® Ripa Buffer (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL, USA) และเครื่อง ultrasonicator จากนั้นนำโปรตีน (35 µg) ที่สกัดได้ไปแยกด้วยกระแสไฟฟ้าใน 10% SDS-PAGE gel จากนั้นทำการย้ายโปรตีนไปยัง nitrocellulose membrane (Amersham, Buckinghamshire, UK) และนำ membrane ไปบ่มใน primary antibody ที่มีความจำเพาะต่อโปรตีน TRPM6 และ CNNM4 (Santa Cruz Biotechnology, California, USA) หรือ actin เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4°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)

4.7 Transmission electron microscopy (TEM)

นำแผ่นลำไส้มาบ่มด้วย 2.5% glutaraldehyde ที่ละลายใน 0.1 mmol/L PBS ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย 0.1 mmol/L PBS 3 ครั้ง จากนั้นจึง บ่มด้วย 1% OsO₄ ที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 1 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย 0.1 mmol/L PBS 6 ครั้ง นำตัวอย่างมา dehydrate ด้วย 50%, 70%, 80%, 95% ethyl alcohol ขึ้นตอนละ 1 ครั้ง ครั้งละ 30 นาที และ 100% ethyl alcohol 3 ครั้ง ครั้งละ 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 หลังจากนั้นนำตัวอย่างไปฝังใน araldite 502 บริสุทธิ์นาน 24 ชั่วโมง แล้วนำไป polymerize ที่อุณหภูมิ 45 และ 60 °C ขึ้นตอนละ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ นำตัวอย่างที่ได้มาตัด ultrathin section วางบน copper grid แล้วย้อมด้วย uranyl acetate และ lead citrate ขึ้นตอนละ 30 นาที ตามลำดับ แล้วนำไปศึกษาภายในกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM)

5 การวัดระดับ Mg²⁺ ในกระดูก และกล้ามเนื้อ

นำกระดูก femur มาอบภายใต้อุณหภูมิ 75 °C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง นำไปชั่งน้ำหนัก ก่อนนำไปเผาให้ได้แก่กระดูก และละลายด้วย 2.5 ml nitric acid ส่วนกล้ามเนื้อ gastrosoleus นั้นนำมาชั่งน้ำหนัก

ก่อนจะตัดให้เป็นชิ้นเล็กๆ และย่อยใน nitric acid จากนั้นทำการวัดระดับ Mg^{2+} ด้วยเครื่อง atomic absorption spectrophotometer (Shimadzu, Tokyo, Japan) [46]

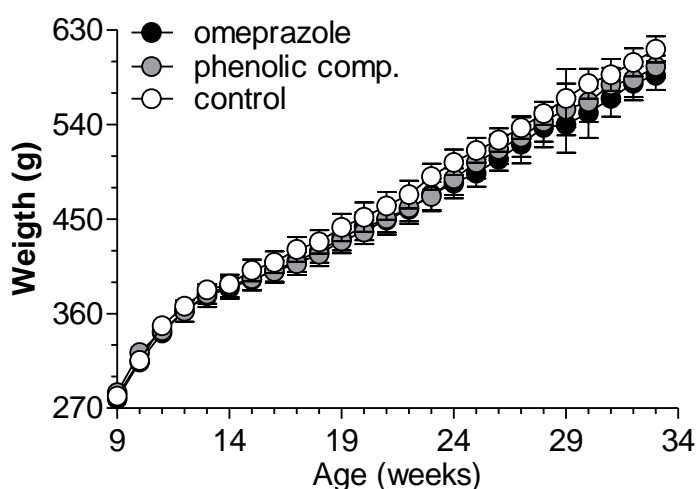
6 วิธีการประเมินผล/ สังเคราะห์ข้อมูล

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

ผลการวิจัย (Results)

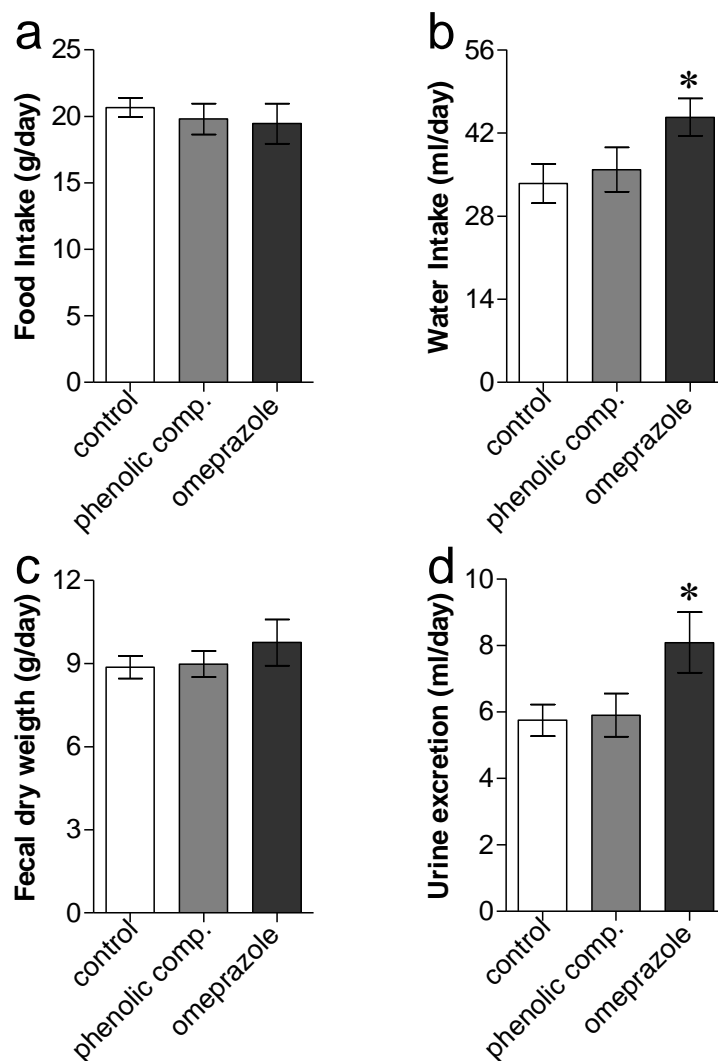
1 ลักษณะทางเมตะโบลีซึม

ตลอดระยะเวลาที่สัตว์ทดลองถูกเลี้ยงและให้สารติดต่อกันเป็นเวลา 24 สัปดาห์ ผู้วิจัยได้ทำการติดตามและตรวจสุขภาพสัตว์ทดลองวันละ 2 ครั้ง โดยพบว่าสัตว์ทดลองมีสุขภาพดี ไม่มีอาการแสดงถึงความผิดปกติใด ๆ และทำการติดตามตรวจสอบอัตราการเจริญเติบโตอย่างต่อเนื่อง พบว่าการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักพบว่าสัตว์ทดลองทั้ง 3 กลุ่ม คือกลุ่มควบคุม (control) กลุ่มที่ได้รับสารประกอบฟีนอลิก (phenolic comp.) และกลุ่มที่ได้รับ omeprazole มีการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัวเท่าเทียมกันตลอดระยะเวลาการทดลอง บ่งชี้ได้ว่าสัตว์ทดลองมีการเจริญเติบโตที่เท่าเทียมกัน (รูปที่ 4)



รูปที่ 4 แสดงน้ำหนักสัตว์ทดลองกลุ่มควบคุม (วงกลมขาว) กลุ่มที่ได้รับกลุ่มที่ได้รับสารประกอบฟีนอลิก (วงกลมเทา) และกลุ่มที่ได้รับ omeprazole (วงกลมดำ) (n = 6).

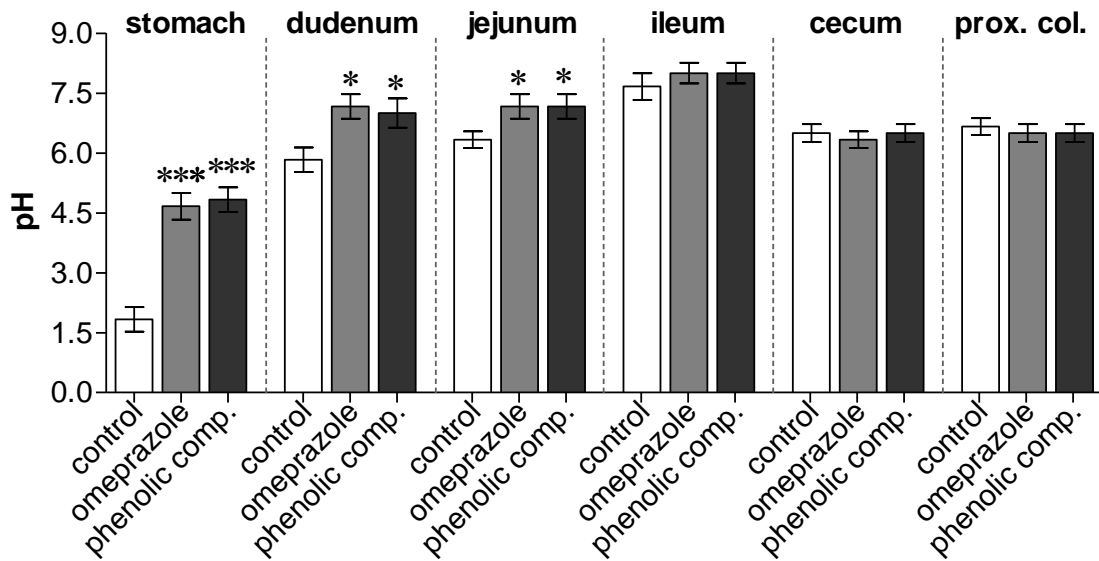
จากนั้นทำการศึกษาลักษณะทางเมตะโบลีซึมของสัตว์ทดลองในกรงเมตะโบลีคเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าปริมาณการบริโภคน้ำ (รูปที่ 5a) และการขับถ่ายอุจจาระ (รูปที่ 5c) ของสัตว์ทดลองทั้ง 3 กลุ่มนั้นไม่แตกต่างกัน แต่เมื่อศึกษาการบริโภคน้ำ (รูปที่ 5b) และการขับถ่ายปัสสาวะ (รูปที่ 5d) พบว่ากลุ่มที่ได้รับ omeprazole มีการบริโภคน้ำและการขับถ่ายปัสสาวะสูงกว่ากลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ได้รับสารสกัด phenolic อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



รูปที่ 5 ลักษณะทางเมตาโบลิซึมของสัตว์ทดลอง คือ การบริโภคอาหาร (a) การบริโภคน้ำ (b) การขับถ่ายอุจจาระ (c) และการขับถ่ายปัสสาวะ (d), * $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (n = 6).

2 อิทธิพลของสารประกอบฟีนอลิกต่อการยับยั้งการหลั่งกรดในกระเพาะอาหาร

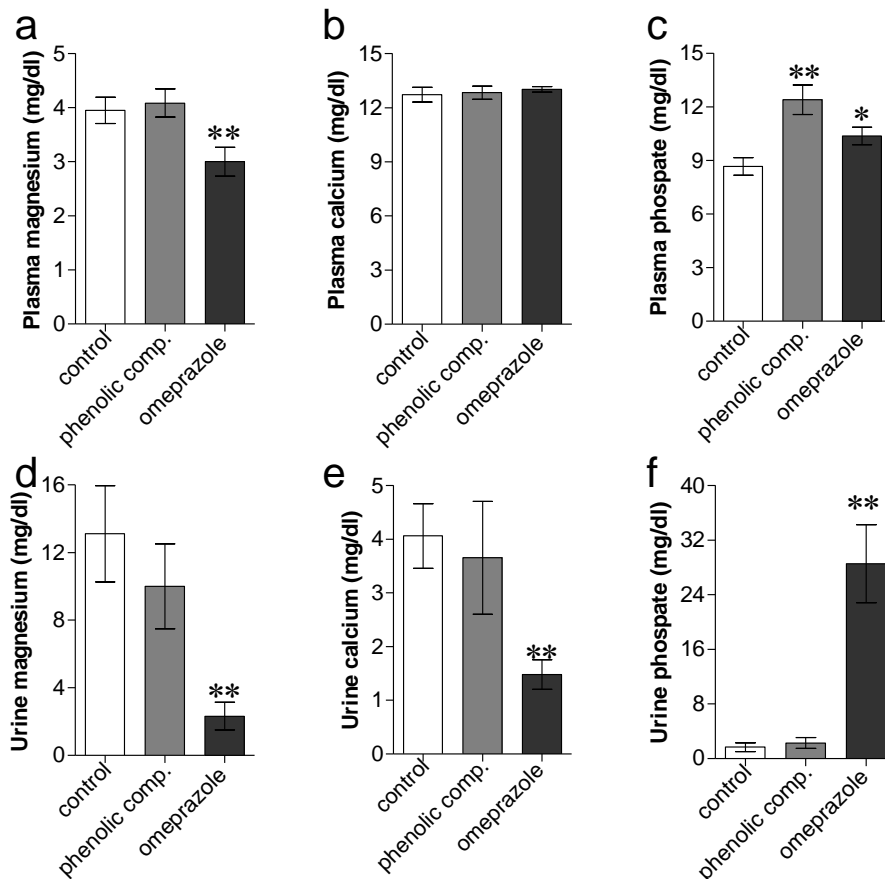
ผู้วิจัยได้ทำการบ้อนสารประกอบฟีนอลิก หรือฉีดยา omeprazole เป็นเวลา 30 นาที ก่อนให้อาหารแก่สัตว์ทดลอง เมื่อเวลาผ่านไป 2 ชั่วโมง หลังจากทำการ terminate สัตว์ทดลอง แล้วเก็บกระเพาะอาหาร duodenum jejunum ileum cecum และ colon เก็บ luminal contents ก่อนทำการปั่นที่ 1500 rpm เป็นเวลา 5 นาที แล้ววัดค่า pH ในส่วนที่เป็นสารน้ำโดยใช้ MColorpHast™ pH-Indicator Strips ผลการศึกษาพบว่า สารประกอบฟีนอลิก และ omeprazole มีฤทธิ์เพิ่มค่า pH ใน กระเพาะอาหาร duodenum และ jejunum อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 6) บ่งชี้ได้ว่า สารประกอบฟีนอลิกที่สกัดจากสมุนไพร มีฤทธิ์ยับยั้งการหลั่งกรดในกระเพาะอาหารได้จริง และมีประสิทธิภาพทัดเทียมกับยา omeprazole



รูปที่ 6 แสดงค่า pH ภายในกระเพาะอาหาร duodenum jejunum ileum cecum และ colon, $*P < 0.05$, $***P < 0.001$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (n = 6).

3 อิทธิพลของสารประกอบฟีนอลิก และ omeprazole ต่อสมดุลอิออน

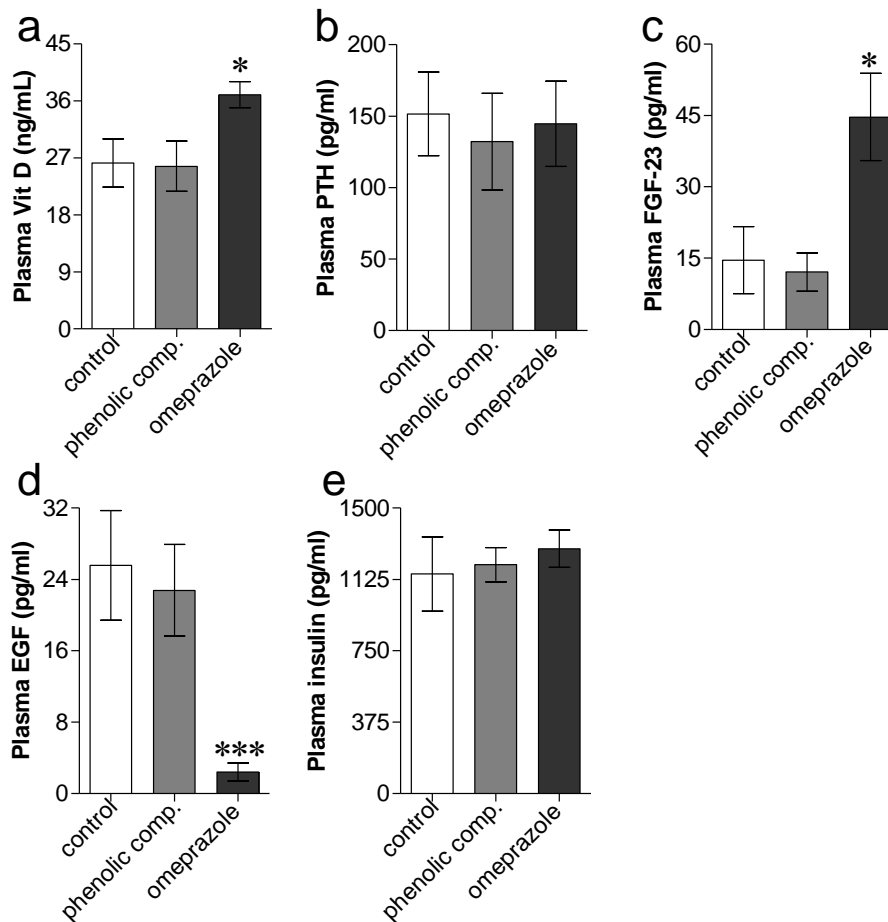
เมื่อศึกษาปริมาณ Mg^{2+} Ca^{2+} และ Mg^{2+} ทั้งในเลือดและในปัสสาวะ (รูปที่ 7) พบว่า omeprazole มีฤทธิ์ลดระดับ Mg^{2+} ในกระแสเลือดจนต่ำกว่าปกติ เกิดภาวะ hypomagnesaemia แต่สัตว์ทดลองที่ได้รับสารประกอบฟีนอลิกมีระดับ Mg^{2+} ในกระแสเลือดปกติ นอกจากนี้ omeprazole มีฤทธิ์ลดระดับ Mg^{2+} และ Ca^{2+} ในปัสสาวะ บ่งชี้ได้ว่าสารประกอบฟีนอลิกไม่มีผลต่อสมดุลอิออน โดยเฉพาะสมดุล Mg^{2+}



รูปที่ 7 แสดงค่า Mg^{2+} Ca^{2+} และ Mg^{2+} ทั้งในเลือดและในปัสสาวะ, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (n = 6).

4 อิทธิพลของสารประกอบฟีนอลิก และ omeprazole ต่อระดับ PTH, vitamin D, insulin, EGF, และ FGF-23 ในกระแสเลือดของหนูขาว

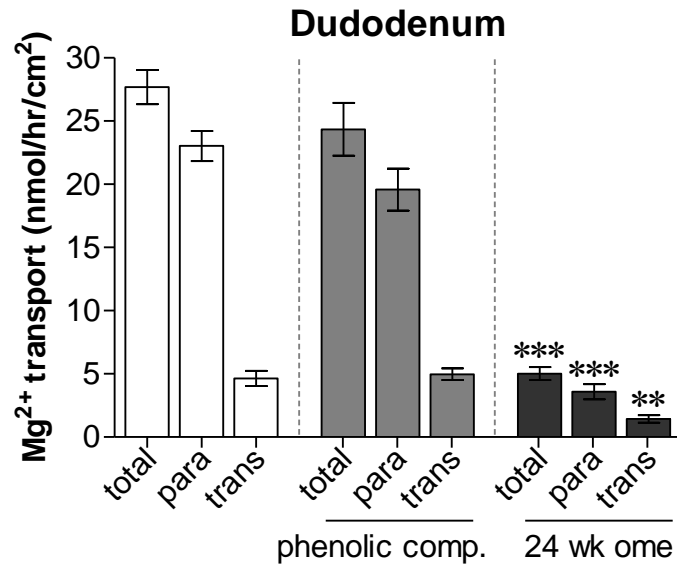
เมื่อศึกษาปริมาณ PTH, vitamin D, insulin, EGF, และ FGF-23 พบว่า omeprazole มีฤทธิ์เพิ่มระดับ vitamin D และ FGF-23 แต่ลดระดับ PTH อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 8) อย่างไรก็ตาม สารประกอบฟีนอลิกไม่มีผลต่อระดับฮอร์โมนในกระแสเลือดของสัตว์ทดลอง



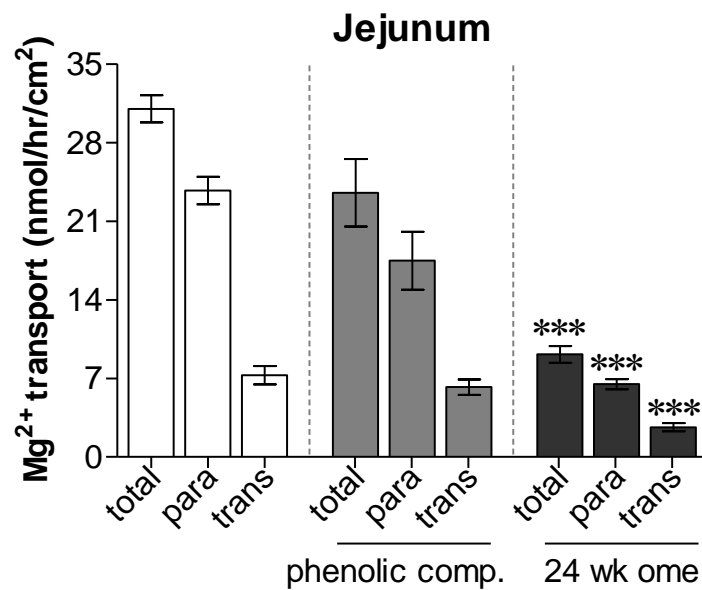
รูปที่ 8 แสดงค่า PTH, vitamin D, insulin, EGF, และ FGF-23 ในกระแสเลือดของหนูขาว, $*P < 0.05$, $***P < 0.001$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (n = 6).

4 อิทธิพลของสารประกอบฟีนอลิก และ omeprazole ต่อการดูดซึมแมกนีเซียมในลำไส้

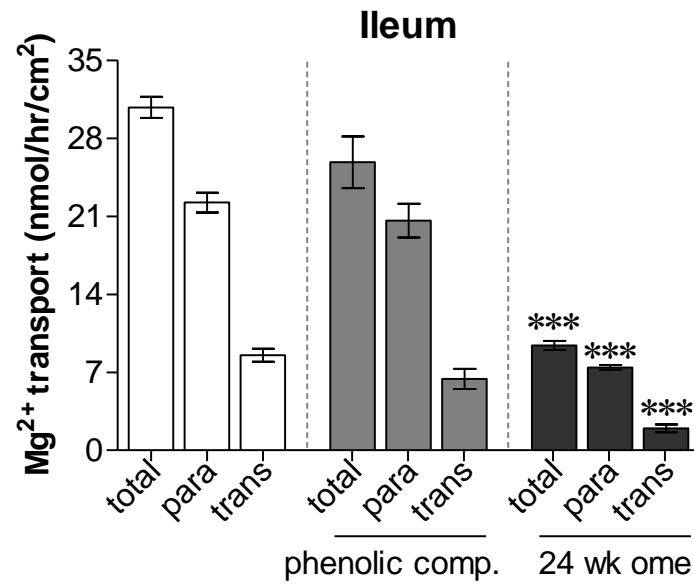
เมื่อศึกษาอัตราการดูดและการทราบผ่าน ของแมกนีเซียมผ่านลำไส้ พบว่า omeprazole มีฤทธิ์กีดการดูดซึม Mg^{2+} ทั้งแบบ total Mg^{2+} transport (total), paracellular passive Mg^{2+} transport (para), และ transcellular active Mg^{2+} transport (trans) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในลำไส้ส่วน duodenum (รูปที่ 9) jejunum (รูปที่ 10) ileum (รูปที่ 11) และ colon (รูปที่ 12) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 13 และ 14) แต่สารประกอบฟีนอลิกไม่มีผลต่อการดูดซึม Mg^{2+} ในลำไส้ทุกส่วน และทกกลไกการดูดซึม (รูปที่ 9-14)



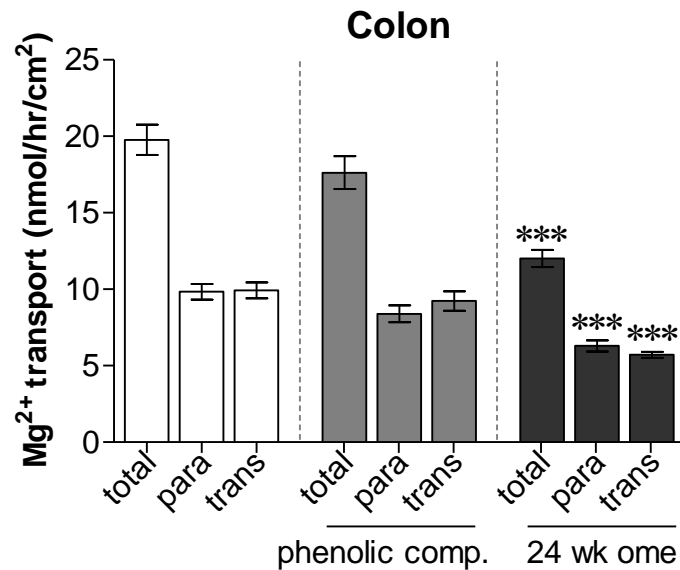
รูปที่ 9 แสดงค่าอัตราการดูดซึม Mg^{2+} แบบ total Mg^{2+} transport (total), paracellular passive Mg^{2+} transport (para), และ transcellular active Mg^{2+} transport (trans) ในลำไส้ส่วน duodenum ของหนูขาว, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (n = 6).



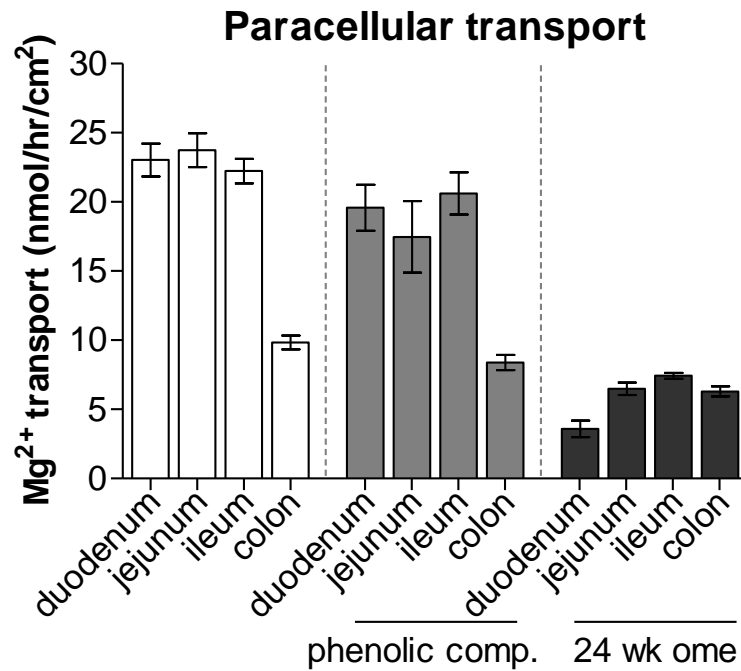
รูปที่ 10 แสดงค่าอัตราการดูดซึม Mg^{2+} แบบ total Mg^{2+} transport (total), paracellular passive Mg^{2+} transport (para), และ transcellular active Mg^{2+} transport (trans) ในลำไส้ส่วน jejunum ของหนูขาว, $***P < 0.001$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (n = 6).



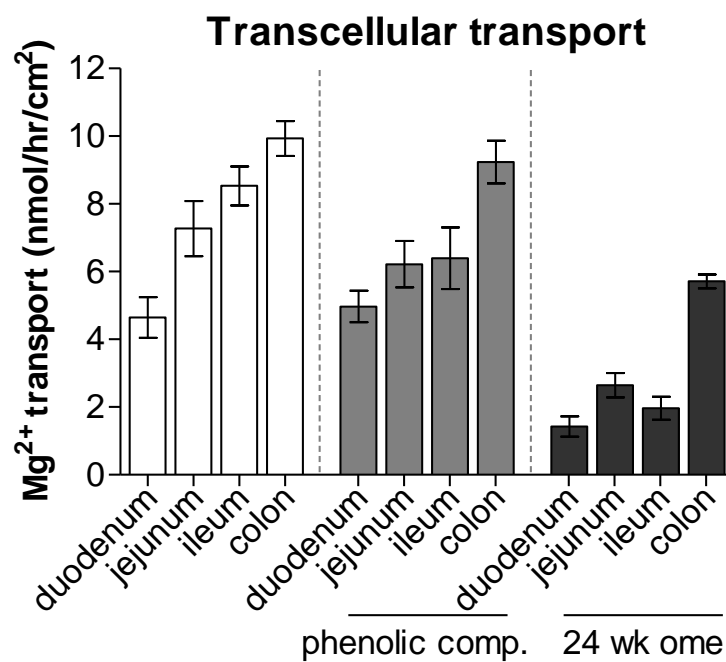
รูปที่ 11 แสดงค่าอัตราการดูดซึม Mg^{2+} แบบ total Mg^{2+} transport (total), paracellular passive Mg^{2+} transport (para), และ transcellular active Mg^{2+} transport (trans) ในลำไส้ส่วน ileum ของหนูขาว, *** $P < 0.001$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (n = 6).



รูปที่ 12 แสดงค่าอัตราการดูดซึม Mg^{2+} แบบ total Mg^{2+} transport (total), paracellular passive Mg^{2+} transport (para), และ transcellular active Mg^{2+} transport (trans) ในลำไส้ส่วน colon ของหนูขาว, *** $P < 0.001$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (n = 6).



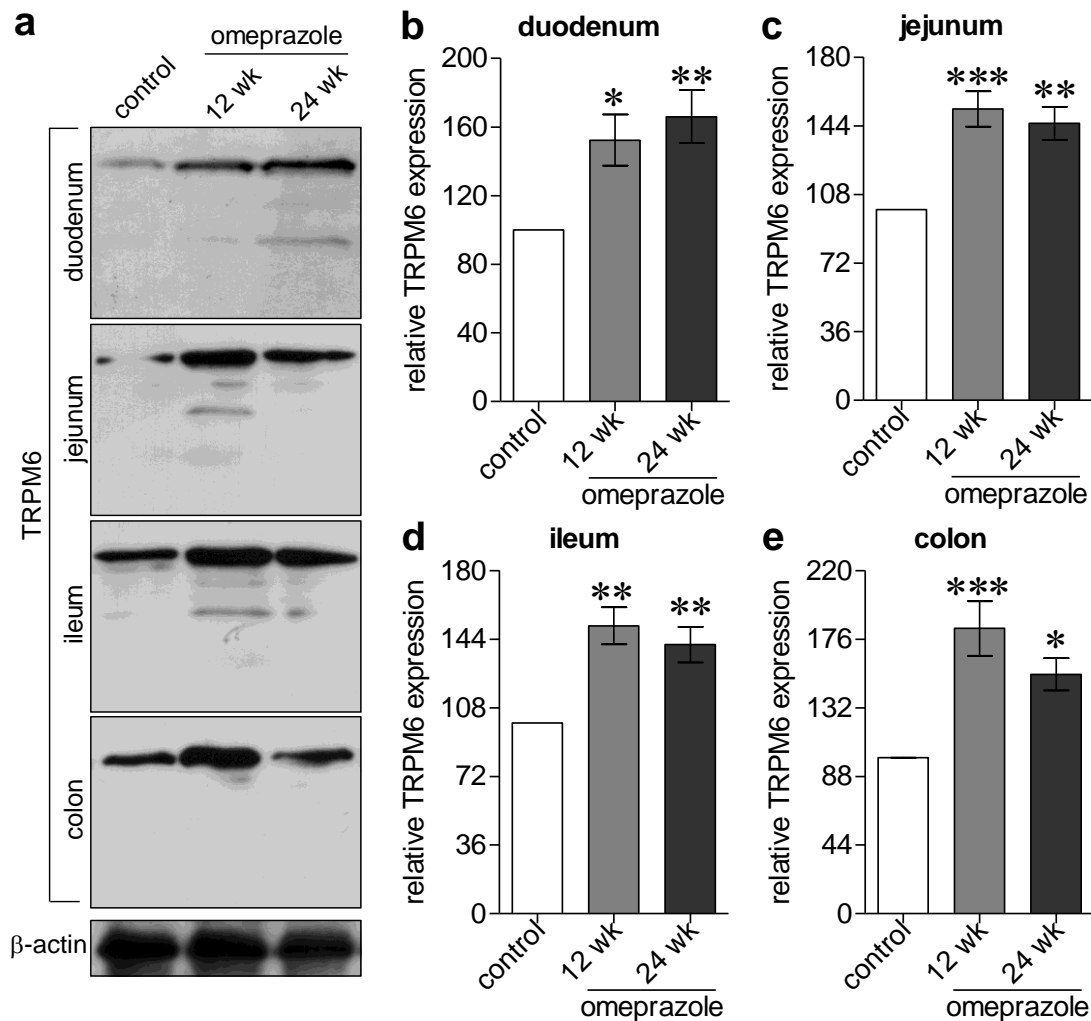
รูปที่ 13 แสดงค่าอัตราการดูดซึม Mg^{2+} แบบ paracellular passive Mg^{2+} transport ในลำไส้ส่วน duodenum, jejunum, ileum และ colon ของหนูขาว (n = 6).



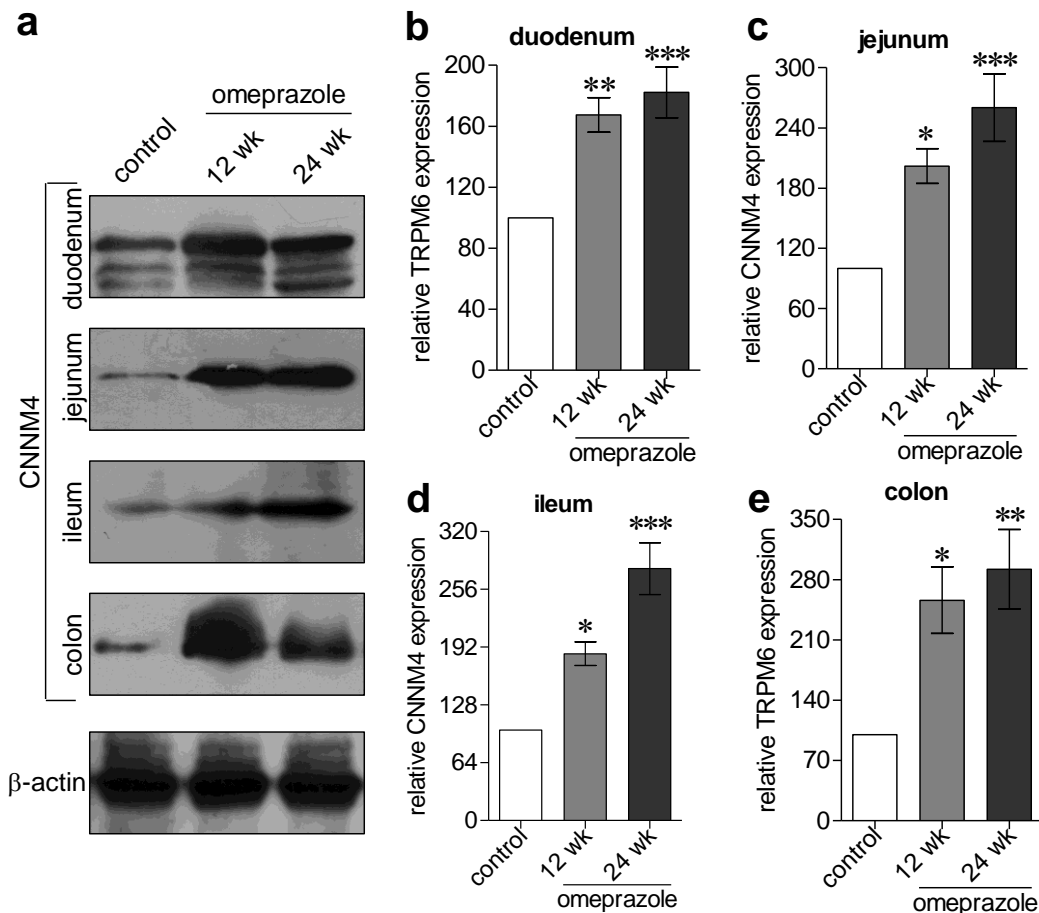
รูปที่ 14 แสดงค่าอัตราการดูดซึม Mg^{2+} แบบ transcellular active Mg^{2+} transport ในลำไส้ส่วน duodenum, jejunum, ileum และ colon ของหนูขาว (n = 6).

5 อิทธิพลของสารประกอบฟีนอลิก และ omeprazole ต่อการแสดงออกของ TRPM6 และ CNNM4

จากการศึกษาด้วยเทคนิค western blot พบว่าสารประกอบฟีนอลิกไม่มีผลต่อระดับการแสดงออกของ TRPM6 และ CNNM4 ตลอดความยาวลำไส้ แต่ omeprazole มีฤทธิ์เพิ่มระดับการแสดงออกของ TRPM6 (รูปที่ 15) และ CNNM4 (รูปที่ 16) ในลำไส้ส่วน duodenum, jejunum, ileum และ colon ของหนูขาวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



รูปที่ 15 ระดับการแสดงออกของ TRPM6 ในลำไส้ส่วน duodenum, jejunum, ileum และ colon
 $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (n = 6).



รูปที่ 16 ระดับการแสดงออกของ CNNM4 ในลำไส้ส่วน duodenum, jejunum, ileum และ colon * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (n = 6).

3. อภิปราย/วิจารณ์ (Discussion) ผลการทดลอง/ผลการวิจัย ที่ได้ทั้งหมด

ผลการทดลองจากโครงการวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าการให้ยา omeprazole ซึ่งเป็นยายับยั้งการหลั่งกรดในกระเพาะอาหาร และสารสกัด phenolic มีฤทธิ์กีดการหลั่งกรดในกระเพาะอาหารได้ทัดเทียมกัน และสารทั้งสองไม่มีผลต่อการบริโภคอาหาร และเติบโตของสัตว์ทดลอง omeprazole เพิ่มการดื่มน้ำและการขับปัสสาวะ แต่การได้รับ omeprazole ติดต่อกันเป็นระยะเวลานานมีผลทำให้ปริมาณ Mg^{2+} ในกระแสเลือดของหนูลดต่ำกว่าปกติจริง คล้ายคลึงกับที่พบเจอในมนุษย์ เมื่อศึกษาในระดับ Mg^{2+} ในปัสสาวะก็พบว่ามีระดับต่ำเช่นเดียวกัน บ่งชี้ว่าไม่มีการสูญเสีย Mg^{2+} ในปัสสาวะ ทั้งนี้สารสกัด phenolic ไม่มีผลต่อสมดุล Mg^{2+} ในสัตว์ทดลอง สัตว์กลุ่มที่มีระดับ Mg^{2+} ต่ำยังมีระดับ Vitamin D และ FGF-23 ในกระแสเลือดเพิ่มขึ้น แต่มีระดับ EGF ในกระแสเลือดลดลง ทั้งนี้สารสกัด phenolic ไม่มีผลต่อระดับฮอร์โมนในกระแสเลือด เมื่อศึกษาการดูดซึม Mg^{2+} ในลำไส้พบว่า omeprazole กีดการดูดซึม Mg^{2+} ในลำไส้ทุกส่วน แต่สารสกัด phenolic ไม่มีผลต่อการดูดซึม Mg^{2+} ในลำไส้ เป็นการยืนยันสมมุติฐานงานวิจัยคือ สารสกัด phenolic ไม่มีผลต่อการทำงานของลำไส้ แตกต่างจาก omeprazole ที่มีฤทธิ์กีดการดูดซึม Mg^{2+} ในลำไส้ เป็นข้อมูลสำคัญเพื่อการศึกษาต่อเนื่อง

4. สรุปและเสนอแนะเกี่ยวกับการวิจัยในขั้นตอนต่อไป ตลอดจนประโยชน์ในทางประยุกต์ของผลการวิจัยที่ได้

ผลการวิจัยของโครงการวิจัยนี้นำเสนอผลของ สารสกัด phenolic ที่มีฤทธิ์กดการหลั่งกรดในกระเพาะอาหารได้ทัดเทียมกับ omeprazole แต่ไม่มีผลรบกวนสมดุล Mg^{2+} และการทำงานของลำไส้ต่อการดูดซึม Mg^{2+} เป็นข้อมูลสำคัญเพื่อการวิจัยต่อยอด และพัฒนาสารสกัดธรรมชาติเพื่อใช้เป็นการรักษาทางเลือกในผู้ป่วยกลุ่ม chronic acid peptic disorders

5. ผลผลิต (Output)

ผลงานวิจัยนี้ได้จัดทำ manuscript เรียบร้อยแล้ว และส่งให้สำนักพิมพ์นานาชาติ และอยู่ในระหว่างการ review ของผู้ประเมินอิสระ

ส่วนประกอบตอนท้าย

รายงานการเงิน

ระหัสรหัสโครงการ 23468 เลขที่สัญญา 15/2562

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2562 มหาวิทยาลัยบูรพา

ชื่อโครงการ ผลของการให้สารประกอบฟีนอลิกที่สกัดจากสมุนไพรไทยต่อสมดุลแมกนีเซียม และการทำงานของลำไส้ในหนูขาวเพศผู้สายพันธุ์ Sprague-Dawley: เพื่อพัฒนาการรักษาทางเลือกในผู้ป่วยที่ต้องใช้ยาโปรตอนปั๊มอินฮิบิเตอร์ติดต่อกันเป็นระยะเวลานาน

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม 2561 ถึงวันที่ 30 กันยายน 2562

ระยะเวลาดำเนินการ...1...ปี เดือน ตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม 2561

รายรับ

จำนวนเงินที่ได้รับ

งวดที่ 1 (50%)	336,800 บาท	เมื่อ ธันวาคม 2562
งวดที่ 2 (40%)	269,440 บาท	เมื่อ พฤษภาคม 2563
งวดที่ 3 (10%)	67,360 บาท	เมื่อ รอบเบิกจ่าย
รวม	673,600 บาท	

รายจ่าย

รายการ	งบประมาณที่ตั้งไว้	งบประมาณที่ใช้จริง	จำนวนเงินคงเหลือ/เกิน
1. ค่าตอบแทน	-	-	-
2. ค่าจ้าง - ค่าตอบแทน ผู้ช่วยวิจัย - ค่าจ้างเหมาตรวจวัด ปริมาณ Mg^{2+} , parathyroid hormone (PTH), vitamin D, insulin, epidermal growth factor (EGF), และ fibroblast growth factor- 23 (FGF-23) - ค่าขนส่งสัตว์ทดลอง พร้อม กล่องบรรจุสัตว์ทดลอง - ค่าจ้างเหมาเลี้ยง สัตว์ทดลอง	373,240	373,240	-
3. ค่าวัสดุ	233,000	233,000	-
4. ค่าใช้สอย	-	-	-
5. ค่าครุภัณฑ์			-
6. ค่าใช้จ่ายอื่น ๆ - ค่าสาธารณูปโภค	67,360	67,360	-
รวม	673600	673600	-

(.....)

ลงนามหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน