



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัย

กลไกการออกฤทธิ์ของโอเมปราโซลยับยั้งการดูดซึมแมกนีเซียมในลำไส้เล็กของหนูขาว
เพศผู้สายพันธุ์ Sprague- Dawley

Mechanism of omeprazole suppressed intestinal magnesium absorption
in male Sprague-Dawley rats

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน
รองศาสตราจารย์ ดร. ณรงค์ฤทธิ์ ทองอ่อน

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้
จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๖๑
มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ ๖๙๒๔๐๔
เลขที่สัญญา ๑๗๒/๒๕๖๑

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัย

กลไกการออกฤทธิ์ของโอเมปราโซลยับยั้งการดูดซึมแมกนีเซียมในลำไส้เล็กของ
หนูขาวเพศผู้สายพันธุ์ Sprague- Dawley

Mechanism of omeprazole suppressed intestinal magnesium
absorption in male Sprague-Dawley rats

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน
รองศาสตราจารย์ ดร. ณรงค์ฤทธิ์ ทองอ่อน
คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๖๑ มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา ๑๗๒/๒๕๖๑

Acknowledgment

This work was financially supported by the Research Grant of Burapha University through National Research Council of Thailand (Grant no. 172/2561)

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 ผลการทดลองจากโครงการวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าการให้ยา omeprazole ซึ่งเป็นยาที่ยับยั้งการหลั่งกรดในกระเพาะอาหาร ติดต่อกันเป็นระยะเวลานานมีผลทำให้ปริมาณ Mg^{2+} ในกระแสเลือดของหนูลดต่ำกว่าปกติจริง คล้ายคลึงกับที่พบเจอในมนุษย์ เมื่อศึกษาระดับ Mg^{2+} ในปัสสาวะก็พบว่ามียกระดับต่ำเช่นเดียวกัน บ่งชี้ว่าไม่มีการสูญเสีย Mg^{2+} ในปัสสาวะ จึงน่าจะมาจากการลดการดูดซึม Mg^{2+} ในลำไส้ และเมื่อทำการศึกษากการดูดซึม Mg^{2+} ในลำไส้ก็พบว่า omeprazole มีฤทธิ์กีดการดูดซึม Mg^{2+} ในลำไส้จริง เป็นการยืนยันสมมุติฐานคือ omeprazole มีฤทธิ์กีดการดูดซึม Mg^{2+} ในลำไส้ สัตว์กลุ่มที่มีระดับ Mg^{2+} ต่ำยังมีระดับ Vitamin D และ FGF-23 ในกระแสเลือดเพิ่มขึ้น แต่มีระดับ EGF ในกระแสเลือดลดลง แต่เมื่อศึกษาฤทธิ์ของฮอร์โมนต่อการดูดซึม Mg^{2+} พบว่า Vitamin D มีฤทธิ์เพิ่มการดูดซึม แต่ FGF-23 มีฤทธิ์กีดการดูดซึม เป็นการศึกษาครั้งแรกที่บ่งชี้ว่าฮอร์โมนมีฤทธิ์ควบคุมการดูดซึม Mg^{2+} โดยตรง ควรศึกษาต่อเนื่องเกี่ยวกับกลไกควบคุมการดูดซึม Mg^{2+} ของ Vitamin D และ FGF-23 ต่อลำไส้เล็กต่อไป

จากนั้นผู้วิจัยทำการศึกษากลไกที่ omeprazole กีดการดูดซึม Mg^{2+} ในลำไส้ โดยศึกษาการขับ HCO_3^- ในลำไส้เล็กส่วน duodenum และยังศึกษาในแผ่นเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 พบว่า omeprazole มีฤทธิ์เพิ่มการขับ HCO_3^- ในลำไส้เล็กส่วน duodenum และในแผ่นเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 ทั้งนี้ HCO_3^- จะมีฤทธิ์ลดความเป็นกรดด้านโพรงลำไส้ ทำให้เกิดการตกตะกอนของ $MgCO_3$ ทำให้ free Mg^{2+} ลดปริมาณ ส่งผลให้การดูดซึม Mg^{2+} ลดลง นอกจากนั้นจากการศึกษาก่อนหน้านี้ผู้วิจัยพบว่าลำไส้เล็กของหนูขาวที่ได้รับ omeprazole มีการหดสั้นลงของ villous การศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยจึงศึกษาการแสดงออกของ CD3 protien ซึ่งเป็น T cell receptor เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ พบว่า omeprazole เพิ่มการแสดงออกของ CD3 บ่งชี้ว่ามีการอักเสบ และเป็นสาเหตุหลักที่ส่งผลให้มีการหดสั้นลงของ villous และส่งผลให้ลดการดูดซึม Mg^{2+} ในลำไส้

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 male 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 duodenal Mg^{2+} absorptions. Omeprazole increased vitamin-D and FGF-23, but decreased EGF, in plasma of rats. Vitamin-D and FGF-23 could modulate duodenal Mg^{2+} transport in control, but not omeprazole-treated, animal. Omeprazole markedly enhanced duodenal HCO_3^- secretion. We hypothesized that a higher luminal HCO_3^- secretion could lead to a suppression of small intestinal Mg^{2+} absorption. Secreted HCO_3^- could increased luminal pH and decreased Mg^{2+} solubility, since luminal soluble Mg^{2+} decreased from 79.61 to 8.71% when luminal pH increased from ~ 5 to 7.8. Histological study revealed that omeprazole increased T-cell receptor CD3 expression. Indicated omeprazole induced duodenal inflammation.

Keyword: hypomagnesemia, intestinal absorption, proton pump inhibitor

สารบัญเรื่อง (Table of Contents)

	หน้า
ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	1
ขอบเขตของโครงการวิจัย	2
ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย	2
การทบทวนวรรณกรรม	3
วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	6
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	6
วิธีการดำเนินการวิจัย และสถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล	7
ผลการวิจัย (Results)	13
อภิปราย/วิจารณ์ (Discussion) ผลการทดลอง/ผลการวิจัย ที่ได้ทั้งหมด	19
สรุปและเสนอแนะเกี่ยวกับการวิจัยในขั้นต่อไป	20
ผลผลิต (Output)	20
รายงานการเงิน	21
ประวัตินักวิจัยและคณะ พร้อมหน่วยงานสังกัด	22
เอกสารอ้างอิง	25

สารบัญภาพ (List of illustrations)

	หน้า
รูปที่ 1. กลไกการรักษาสมดุล Mg^{2+} ในร่างกายมนุษย์	4
รูปที่ 2. กลไกการดูดซึม Mg^{2+} ในเซลล์เยื่อบุลำไส้	4
รูปที่ 3. ภาพแสดงช่วงเวลาการฉีด omeprazole ในสัตว์ทดลอง	8
รูปที่ 4. ภาพแสดงช่วงเวลาการเก็บตัวอย่างในสัตว์ทดลอง	9
รูปที่ 5. ภาพแสดง high throughput Ussing chamber setup	9
รูปที่ 6 แสดงน้ำหนักสัตว์ทดลองกลุ่มควบคุม กลุ่มที่ได้รับ omeprazole 12 สัปดาห์ และกลุ่มที่ได้รับ omeprazole 20 สัปดาห์	13
รูปที่ 7 ลักษณะทางเมตาโบลิซึมของสัตว์ทดลอง คือ การบริโภคน้ำ (a) การบริโภคน้ำ (b) การขับถ่ายอุจจาระ (c) และการขับถ่ายปัสสาวะ (d)	13
รูปที่ 8 ระดับ Mg^{2+} (a), Ca^{2+} (b), และ PO_4^{3-} (c) ในกระแสเลือด และระดับ Mg^{2+} (d), Ca^{2+} (e), และ PO_4^{3-} (f) ในปัสสาวะ.	14
รูปที่ 9 ระดับ vitamin D (a), parathyroid hormone (PTH) (b), fibroblast growth factor-23 (c), epidermal growth factor (EGF) (d), และ insulin (e) ในกระแสเลือดของหนูขาว.	15
รูปที่ 10 การขับ HCO_3^- ในเซลล์เยื่อบุลำไส้เล็กส่วน duodenum ของหนูขาว.	16
รูปที่ 11 การขับ HCO_3^- ในแผ่นเซลล์เยื่อบุเพาะเลี้ยง Caco-2	17
รูปที่ 12 การขับดูดซึม Mg^{2+} ในลำไส้เล็กส่วน duodenum ของหนูขาว.	17
รูปที่ 13. อิทธิพลของ PTH, vitamin D, insulin, EGF, และ FGF-23 ต่อการดูดซึม Mg^{2+} ในเซลล์ลำไส้เล็กของหนูขาวกลุ่มควบคุม (a) และกลุ่มที่ได้รับ omeprazole (b).	18
รูปที่ 14. ระดับการแสดงออกของ CD3 ในลำไส้เล็กของหนูขาว	19

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย (List of Abbreviations)

ASIC1a	acid-sensing ion channel 1a
CA	carbonic anhydrase
Cldn	claudin
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

บทนำ (Introduction)

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

แมกนีเซียม (Mg^{2+}) เป็นไอออนที่มีความสำคัญต่อการทำงานของเซลล์ทั่วร่างกายมนุษย์ โดยมีอิทธิพลควบคุมการทำงานของ ion channel ควบคุมการคงรูปของโปรตีนภายในเซลล์ ควบคุมกระบวนการเผาผลาญพลังงานภายในเซลล์ และยังเป็นโคเอนไซม์หรือตัวกระตุ้นของเอนไซม์สำคัญภายในเซลล์มากกว่า 800 ชนิด [6, 24, 33] ดังนั้นหากเกิดภาวะพร่อง Mg^{2+} ย่อมส่งผลกระทบต่อการทำงานของระดับเซลล์ และก่อให้เกิดปัญหาทางสุขภาพมากมาย อาทิเช่น โรคกระดูกพรุน [34] Alzheimer's disease [7] และความดันโลหิตสูง [42] ร่างกายมนุษย์จึงจำเป็นต้องรักษาระดับ Mg^{2+} ในกระแสเลือดให้อยู่ในระดับที่เหมาะสมคือประมาณ 0.7-1.1 mM โดยอาศัยการทำงานของลำไส้ในการดูดซึม Mg^{2+} เข้าสู่ร่างกาย ใต้ในการขับ Mg^{2+} ส่วนเกินออกจากร่างกาย กระดูกและเซลล์เนื้อเยื่อต่างๆ เป็นแหล่งสะสม Mg^{2+} ในร่างกายมนุษย์ ภายใต้การควบคุมของ parathyroid hormone (PTH), vitamin D, insulin และ epidermal growth factor (EGF) [6, 17, 24, 33, 43] ในขณะที่กลไกการทำงานของไต และกลไกควบคุมการขับ Mg^{2+} ในท่อไตมีการศึกษาวิจัยอย่างมาก แต่กลไกการดูดซึม และกลไกควบคุมการดูดซึม Mg^{2+} ในลำไส้กลับยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด [6, 36]

Acid peptic disorders คือความผิดปกติของระบบทางเดินอาหารอันเนื่องมาจากการหลั่งกรดในกระเพาะอาหารที่มากเกินไป หรือสูญเสียกลไก mucosal defense ของทางเดินอาหารและกระเพาะอาหาร อาทิเช่น โรคกรดไหลย้อน กระเพาะอาหารอักเสบ และลำไส้เล็กส่วนต้นอักเสบ เป็นต้น ทั้งนี้มีรายงานทางการแพทย์บ่งชี้ว่าประชากรหลายล้านคนทั่วโลกที่ป่วยด้วย acid peptic disorders [25] และการรักษาที่มีประสิทธิภาพที่สุดคือการให้ยาที่ยับยั้งการหลั่งกรด โปรตอนปั๊มอินฮิบิเตอร์ (proton pump inhibitors; PPIs) จึงทำให้ยากกลุ่ม PPIs นี้เป็นยาที่ขายดี 5 อันดับแรกทั่วโลก [29] อย่างไรก็ตามนับตั้งแต่ปี ค.ศ. 2006 จนปัจจุบันมีรายงานทางการแพทย์หลายฉบับบ่งชี้ว่าผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาด้วย omeprazole ซึ่งเป็นยาในกลุ่ม PPIs ติดต่อกันมากกว่า 1 ปี ส่งผลให้ระดับ Mg^{2+} ในกระแสเลือดต่ำกว่าระดับปกติอย่างรุนแรง (severe hypomagnesaemia) ร่วมกับภาวะผิดปกติอื่นๆ อาทิเช่น สับสน เชื่องซึม สั่นอย่างรุนแรง ฝ่ามือฝ่าเท้าเกร็ง ลมชัก และหมดสติ [2, 4, 8, 14, 18, 23, 35, 45] ผลการทดสอบพิเศษบ่งชี้ว่าผู้ป่วยข้างต้นมีภาวะพร่อง Mg^{2+} ในแหล่งสะสมในร่างกายอย่างรุนแรง ผลการทดสอบการทำงานของไตบ่งชี้ว่าไตทำงานได้ปกติ โดยผู้ป่วยไม่ได้มีภาวะสูญเสีย Mg^{2+} ทางปัสสาวะ แต่เป็นที่น่าสนใจว่าการรักษาโดยให้ Mg^{2+} เสริมทางการแพทย์รับประทานไม่สามารถเพิ่มระดับ Mg^{2+} ในกระแสเลือดได้ แต่การให้ Mg^{2+} ทางหลอดเลือดสามารถรักษาระดับ Mg^{2+} ในกระแสเลือดให้กลับเป็นปกติได้อย่างรวดเร็ว บ่งชี้ว่าผู้ป่วยข้างต้นน่าจะมีการดูดซึม Mg^{2+} ในลำไส้บกพร่อง [2, 4, 8, 14, 18, 23, 35, 45]

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 [10, 11, 32] และ active Mg^{2+} absorption เป็นการขนส่งแบบผ่านเซลล์ อาศัยการทำงานของ transient receptor potential melastatin 6 (TRPM6) และ basolateral cyclin M4 (CNNM4) [6, 30, 36] หากคิดเป็นร้อยละการดูดซึม Mg^{2+} ทั้งหมดโดยลำไส้ ลำไส้เล็กส่วน duodenum ดูดซึม 15% ส่วน jejunum ดูดซึม 22% ส่วน ileum ดูดซึม 56% และลำไส้ใหญ่ ดูดซึม 56% [24] การศึกษา ก่อนหน้าของคณะผู้วิจัยพบว่า 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) และเพิ่มการขับ HCO_3^- ในแผ่นเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 [38–40] Mertz-Nielsen และคณะรายงานผลการทดลองในมนุษย์พบว่า omeprazole เพิ่มการหลั่ง HCO_3^- ในลำไส้เล็กส่วน duodenum อย่างมีนัยสำคัญ [26] เนื่องจาก omeprazole ยับยั้งการขับ HCO_3^- จากตับอ่อน เป็นไปได้ว่า omeprazole มีฤทธิ์กระตุ้นการขับ HCO_3^- จากเซลล์เยื่อบุลำไส้เล็กโดยตรง [44] ในปี ค.ศ. 2013 Lameris และคณะรายงานผลของ omapraole เพิ่มการแสดงออกของ TRPM6 ในลำไส้ใหญ่หนูสายพันธุ์ C57BL/J6 [20] ต่อมาปี ค.ศ. 2015 Hess และคณะพบว่า omapraole ลดระดับ Mg^{2+} ในกระแสเลือด และเพิ่มการแสดงออกของ TRPM6 ในลำไส้ใหญ่หนูสายพันธุ์ C57BL/J6 [13] อย่างไรก็ตามการกระตุ้นการดูดซึม Mg^{2+} ในลำไส้ใหญ่ กลับไม่สามารถรักษาระดับ Mg^{2+} ของหนูสายพันธุ์ C57BL/J6 ได้ [13] บ่งชี้ว่าลำไส้ใหญ่อาจไม่ใช่ส่วนสำคัญในการควบคุมระดับ Mg^{2+} ในร่างกาย จากการศึกษาล่าสุดของกลุ่มวิจัยของข้าพเจ้า พบว่า omeprazole มีฤทธิ์ลดระดับ Mg^{2+} ในเลือด ปัสสาวะ กระดูก และกล้ามเนื้อ ของหนูขาวสายพันธุ์ Sprague-Dawley [41] บ่งชี้ว่า omeprazole มีฤทธิ์ลดระดับ Mg^{2+} ทั่วทั้งร่างกายสัตว์ทดลอง (systemic Mg^{2+} deficiency) นอกจากนี้ยังพบว่า omeprazole กัดการดูดซึม Mg^{2+} ทั้งแบบผ่านเซลล์ และผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์ลำไส้เล็ก [41] อย่างไรก็ตามกลไกการกัดการดูดซึม Mg^{2+} ในลำไส้เล็ก และการเนี่ยวนำให้เกิด systemic Mg^{2+} deficiency ในสัตว์ทดลอง โดย omeprazole นั้นยังไม่มีการศึกษาวิจัย ผลการศึกษาจากโครงการวิจัยนี้จะเป็นข้อมูลสำคัญต่อการศึกษาวิจัยต่อเนื่องเพื่อพัฒนาวิธีการป้องกัน และรักษาผลข้างเคียงของยา omeprazole ในผู้ป่วยที่จำเป็นต้องได้รับการรักษาด้วยยาชนิดนี้ติดต่อกันเป็นเวลานาน

เพื่อศึกษาอิทธิพลของการได้รับ omeprazole ต่อการรักษาสมดุล Mg^{2+} ในร่างกายการศึกษาคั้งนี้ จึงเลือกใช้หนูขาวเพศผู้สายพันธุ์ Sprague-Dawley เนื่องจากเภสัชจลนศาสตร์ของ omeprazole ในหนูขาวสายพันธุ์ Sprague-Dawley [21] คล้ายคลึงกับในร่างกายมนุษย์ การรักษาสมดุล Mg^{2+} โดยอาศัยการทำงานของลำไส้ ไต กระดูกและเนื้อเยื่อทั่วร่างกาย [9] คล้ายคลึงกับกลไกของมนุษย์ [5] นอกจากนี้เมื่อพิจารณาจากอายุขัยเฉลี่ย และระยะการเจริญของมนุษย์และหนูขาว พบว่าระยะเวลา 1 ปีของมนุษย์ มีค่าโดยเฉลี่ยเท่ากับ 16.7 วันในหนูขาว [31] ดังนั้นหนูขาวจึงมีความเหมาะสมจะใช้ในการศึกษาอิทธิพลของการได้รับ omeprazole ติดต่อกันเป็นเวลานาน

ขอบเขตของโครงการวิจัย

การศึกษาทั้งหมดในโครงการวิจัยนี้ครอบคลุมการศึกษาศรีรวิทยาการควบคุมสมดุล Mg^{2+} ในร่างกาย และการดูดซึม Mg^{2+} ในลำไส้

ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

1 การให้ omeprazole ติดต่อกันเป็นเวลานาน มีฤทธิ์ลดปริมาณ Mg^{2+} ในกระแสเลือด ในปัสสาวะ ในกระดูก 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 มีฤทธิ์กัดการดูดซึมแบบ passive Mg^{2+} absorption และ active Mg^{2+} absorption ในลำไส้ของหนูขาว

4 omeprazole มีฤทธิ์เพิ่มขับ HCO_3^- จากเซลล์เยื่อบุลำไส้เล็กส่วน duodenum ของหนูขาว ซึ่งมีส่วนเกี่ยวข้องกับการลดการดูดซึม Mg^{2+} ในลำไส้ส่วน duodenum

5 parathyroid hormone (PTH), vitamin D, insulin, epidermal growth factor (EGF), และ fibroblast growth factor-23 (FGF-23) มีฤทธิ์เปลี่ยนแปลงการดูดซึม Mg^{2+} แบบผ่านเซลล์ และแบบผ่านช่องว่างระหว่างลำไส้ของหนูขาวปกติ และที่ได้รับ omeprazole ติดต่อกันเป็นเวลานาน

6 omeprazole มีฤทธิ์เปลี่ยนแปลงการแสดงออกของ parathyroid hormone (PTH) receptor, vitamin D receptor, insulin receptor, epidermal growth factor (EGF) receptor และ fibroblast growth factor-23 (FGF-23) receptor ในลำไส้เล็กของหนูขาวที่ได้รับ omeprazole ติดต่อกันเป็นเวลานาน

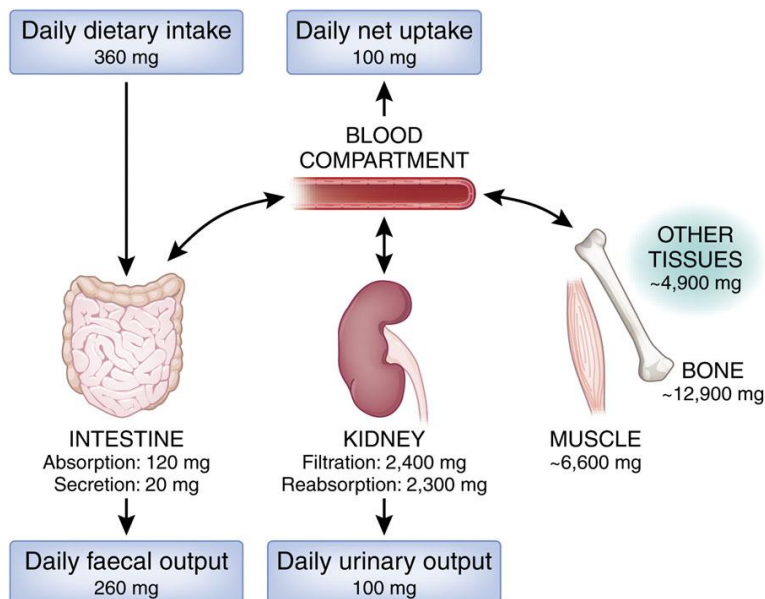
การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง

1 สมดุลของ Mg^{2+} ในร่างกายมนุษย์

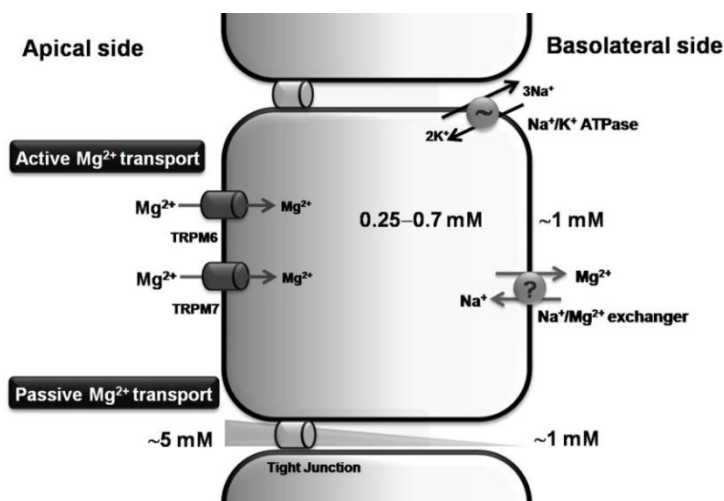
ร่างกายของมนุษย์มี Mg^{2+} อยู่ทั้งหมดประมาณ 24 g [43] ส่วนใหญ่จะสะสมในกระดูก (~53%) และอยู่ในเซลล์เนื้อเยื่อต่างๆ ทั่วร่างกาย (~46%) ถือเป็นแหล่งสะสม Mg^{2+} ของร่างกายมนุษย์ ส่วนที่เหลือประมาณ 1% อยู่ในกระแสเลือดและของเหลวนอกเซลล์ [24, 33, 43] หากพิจารณาเฉพาะภายในเซลล์ Mg^{2+} จะรวมอยู่กับ adenosine triphosphate (ATP) ประมาณ 80–90% อีกประมาณ 6.5–9% จะรวมอยู่กับโปรตีนภายในเซลล์ และส่วนที่เหลือประมาณ 1–3.5% หรือ 0.25–0.7 mM อยู่ในรูปอิสระ [12] ทั้งนี้ Mg^{2+} มีความสำคัญต่อการทำงานของเซลล์ทั่วร่างกาย เนื่องจาก Mg^{2+} เป็นไอออนที่ควบคุมการทำงานของ ion channel การคงรูปของโปรตีนภายในเซลล์ กระบวนการเผาผลาญพลังงานภายในเซลล์ และยังเป็นโคเอนไซม์ของเอนไซม์สำคัญภายในเซลล์มากกว่า 300 ชนิด [24, 33] หากเกิดภาวะพร่อง Mg^{2+} ย่อมส่งผลกระทบต่อการทำงานของระดับเซลล์ และก่อให้เกิดปัญหาทางสุขภาพมากมาย อาทิเช่น โรคกระดูกพรุน [34] Alzheimer's disease [7] และความดันโลหิตสูง [42] เป็นต้น ดังนั้นปริมาณ Mg^{2+} ในกระแสเลือดจึงจำเป็นต้องถูกควบคุมให้อยู่ในระดับที่เหมาะสมดังแสดงในรูปที่ 1 คือประมาณ 0.7–1.1 mM โดยอาศัยการทำงานของลำไส้ในการดูดซึม Mg^{2+} เข้าสู่ร่างกาย ใต้ในการขับ Mg^{2+} ส่วนเกินออกจากร่างกาย ในขณะที่กระดูกและอยู่ในเซลล์เนื้อเยื่อต่างๆ ทั่วร่างกายจะปล่อย Mg^{2+} ออกมาเมื่อปริมาณ Mg^{2+} ในการสเล็ดลดต่ำกว่าระดับปกติ เพื่อรักษาระดับ Mg^{2+} ในกระแสเลือด [5, 17] มีรายงานวิจัยหลายฉบับบ่งชี้ว่า parathyroid hormone (PTH), vitamin D, insulin และ epidermal growth factor (EGF) นั้นมีส่วนเกี่ยวข้องกับการรักษาสมดุล Mg^{2+} ในร่างกาย [6, 17, 24, 33, 43] นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า fibroblast growth factor-23 (FGF-23) มีฤทธิ์ควบคุมสมดุล Ca^{2+} และการดูดซึม Ca^{2+} ในลำไส้เล็กของสัตว์ทดลอง [16] แต่ยังไม่มีการศึกษาวิจัยถึงความเกี่ยวข้องระหว่าง FGF-23 กับการรักษาสมดุล Mg^{2+}

การดูดซึม Mg^{2+} แบบผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์นั้นเป็นกระบวนการที่ไม่ใช้พลังงาน (passive Mg^{2+} transport) อาศัยความลาดเอียงทางความเข้มข้นของ Mg^{2+} ซึ่งปริมาณ Mg^{2+} อิสระในโพรงลำไส้มีค่ามากกว่าหรือประมาณ 5 mM ซึ่งสูงกว่าความเข้มข้นของ Mg^{2+} อิสระในกระแสเลือด และศักย์ไฟฟ้าที่เป็นบวกด้านโพรงลำไส้ (+5 mV) เหนี่ยวนำให้ Mg^{2+} แพร่จากโพรงลำไส้ผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์เยื่อลำไส้ก่อนเข้าสู่กระแสเลือด [30] กลไกการดูดซึมแบบผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์นี้ถือเป็นกลไกหลักของร่างกาย เนื่องจากดูดซึม ~90% ของปริมาณ Mg^{2+} ทั้งหมดที่ดูดซึมที่ลำไส้ [30] การศึกษาก่อนหน้าของผู้วิจัยพบว่า Cldn-7 และ Cldn-12 มีหน้าที่เป็น paracellular Mg^{2+} channel ในลำไส้ [39] การศึกษากลไกควบคุมการแสดงออกของ Cldn-7 และ Cldn-12 จึงอาจเป็นแนวทางสำคัญ ที่จะทำให้เข้าใจกลไกการดูดซึมแมกนีเซียมแบบผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์ นอกจากนี้เซลล์เยื่อลำไส้ยังมีการแสดงออกของ Cldn-2, -4, -5, -8, -13 และ -15 ที่

[10, 11, 32] ซึ่งยังไม่มีการศึกษาวิจัยว่าโปรตีนเหล่านี้มีส่วนเกี่ยวข้องกับการดูดซึม Mg^{2+} แบบผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์ในลำไส้หรือไม่



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



รูปที่ 2. กลไกการดูดซึม Mg^{2+} ในเซลล์เยื่อบุลำไส้ [37]

2 omeprazole

omeprazole เป็นยาในกลุ่ม proton pump inhibitors ที่ประกอบด้วยสารเคมีสำคัญคือ pyridyl methyl sulfinylbenzimidazole เมื่อถูกกระตุ้นด้วยภาวะที่เป็นกรดในกระเพาะอาหาร จะเปลี่ยนเป็น sulphenamides ซึ่งจะจับกับหมู่ sulphydryl ของกรดอะมิโน cysteine ตำแหน่งที่ 813 ของ H^+/K^+ -ATPase ด้วยพันธะโควาเลนต์ และยับยั้งการทำงานของ H^+/K^+ -ATPase ของ parietal cells ในกระเพาะอาหาร [22] ดังนั้น omeprazole จึงนิยมใช้รักษาโรคของระบบทางเดินอาหารที่จำเป็นต้องยับยั้งการหลั่งกรดจาก parietal cells ในกระเพาะอาหาร อาทิเช่น Barrett's esophagitis, gastro-esophageal reflux disease, gastritis เนื่องจากเป็นยาที่มีรายงานผลข้างเคียงน้อย และหาซื้อได้ง่ายโดยไม่ต้องมีใบสั่งยา

จากแพทย์กำกับจึงทำให้ omeprazole เป็นยาที่นิยมและใช้อย่างแพร่หลาย และเป็นยาในกลุ่มยาที่ขายดีที่สุดทั่วโลก [3, 28] เมื่อรับประทาน omeprazole 40 mg จะทำให้มีระดับ omeprazole ในกระแสเลือดสูงสุดที่ 200–400 ng/ml [22] 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, 8, 14, 19, 23, 35] จากการทดสอบพิเศษที่เรียกว่า Mg^{2+} retention test บ่งชี้ว่าผู้ป่วยข้างต้นมีภาวะพร่อง Mg^{2+} ในแหล่งสะสมของร่างกายอย่างรุนแรง [4] แต่ผู้ป่วยมีการทำงานของไตในการจัดการ Mg^{2+} เป็นปกติ มิได้มีการสูญเสีย Mg^{2+} ไปกับปัสสาวะ [2, 4, 8, 14, 19, 23, 35, 45] เป็นที่น่าสนใจว่าการรักษาโดยการให้ Mg^{2+} ปริมาณสูงเสริมทางการแพทย์รับประทานนั้นไม่สามารถรักษาระดับของ Mg^{2+} ในกระแสเลือดให้กลับเป็นปกติได้ ในทางตรงกันข้ามการให้ Mg^{2+} เสริมทางหลอดเลือดโดยตรงกลับทำให้ระดับ Mg^{2+} ในกระแสเลือดกลับสู่ระดับปกติอย่างรวดเร็ว บ่งชี้ว่า omeprazole มีฤทธิ์รบกวนการดูดซึม Mg^{2+} ในลำไส้ [2, 4, 8, 14, 19, 23, 35] ยิ่งไปกว่านั้นเมื่อแพทย์หยุดจ่ายยา omeprazole ให้คนไข้เพียง 1 – 2 สัปดาห์ พร้อมกับให้ Mg^{2+} เสริมทางการแพทย์รับประทาน ส่งผลให้ระดับ Mg^{2+} ในกระแสเลือดกลับสู่ระดับปกติได้ แต่เนื่องจากคนไข้ข้างต้นมักเป็นผู้ป่วยเรื้อรัง การหยุดใช้ omeprazole จึงทำให้อาการของระบบทางเดินอาหารกลับแย่ลงจึงจำเป็นต้องให้แพทย์ต้องจ่ายยาตัวนี้อีกครั้ง หรือยาในกลุ่มยาที่ยับยั้งการหลั่งกรดตัวอื่น และเมื่อมีการกลับมาใช้ omeprazole อีกเพียง 1 – 2 สัปดาห์ พร้อมกับให้ Mg^{2+} เสริมทางการแพทย์รับประทาน กลับทำให้ระดับ Mg^{2+} ในกระแสเลือดต่ำลงอีกครั้ง [2, 4, 8, 14, 19, 23, 35] บ่งชี้ได้ว่า omeprazole มีฤทธิ์กีดขวางการดูดซึม Mg^{2+} เพียง 7 – 14 วันหลังได้รับยา ดังนั้นการพัฒนาของภาวะปริมาณ Mg^{2+} ในกระแสเลือดต่ำที่ใช้เวลานานนั้นน่าจะเกิดจากการสูญเสียการดูดซึม Mg^{2+} ในลำไส้ จึงทำให้ร่างกายต้องใช้ Mg^{2+} จากแหล่งสะสมของร่างกาย แต่เมื่อมีการนำ Mg^{2+} จากแหล่งสะสมมาใช้ติดต่อกันเป็นระยะเวลาจนถึงทำให้เกิดการพร่องของ Mg^{2+} ในแหล่งสะสมของร่างกาย และไม่สามารถช่วยรักษาระดับ Mg^{2+} ในกระแสเลือดได้ จนเกิดภาวะปริมาณ Mg^{2+} ในกระแสเลือดต่ำกว่าปกติ [4] การศึกษากลไกควบคุมการดูดซึม Mg^{2+} ในเซลล์เยื่อบุลำไส้ และกลไกการออกฤทธิ์ระดับเซลล์ของ omeprazole ต่อการดูดซึม Mg^{2+} ในลำไส้จึงเป็นสิ่งจำเป็นยิ่งในการป้องกันภาวะ hypomagnesaemia ในคนไข้ที่ต้องใช้ยากลุ่มนี้ติดต่อกันเป็นเวลานาน และเพื่อเป็นองค์ความรู้ต่อการรักษาต่อพัฒนาวิธีการเพิ่มการดูดซึม 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 เพิ่มพลังงานก่อกัมมันต์

ของการขนส่ง Mg^{2+} ผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์ ลดการแสดงออกของ Cldn-7 และ -12 เพิ่มการแสดงออกของ ASIC1a, TRPV4, และ OGR1 และเพิ่มการจับ HCO_3^- ในแผ่นเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 [38-40] Mertz-Nielsen และคณะรายงานผลการทดลองในมนุษย์พบว่า omeprazole เพิ่มการหลั่ง HCO_3^- ในลำไส้เล็กส่วน duodenum อย่างมีนัยสำคัญ [26] เนื่องจาก omeprazole ยับยั้งการจับ HCO_3^- จากตับอ่อน เป็นไปได้ว่า omeprazole มีฤทธิ์กระตุ้นการจับ HCO_3^- จากเซลล์เยื่อบุลำไส้เล็กโดยตรง [44] ในปี ค.ศ. 2013 Lameris และคณะรายงานผลของ omeprazole เพิ่มการแสดงออกของ TRPM6 ในลำไส้ใหญ่หนูสายพันธุ์ C57BL/J6 [20] ซึ่งน่าจะเป็นกลไกการปรับตัวของสัตว์ทดลองจากภาวะ systemic Mg^{2+} deficiency ต่อมาในปี ค.ศ. 2015 Hess และคณะพบว่า omeprazole ลดระดับ Mg^{2+} ในกระแสเลือด และเพิ่มการแสดงออกของ TRPM6 ในลำไส้ใหญ่หนูสายพันธุ์ C57BL/J6 [13] อย่างไรก็ตามการกระตุ้นการดูดซึม Mg^{2+} ในลำไส้ใหญ่ กลับไม่สามารถรักษาระดับ Mg^{2+} ของหนูสายพันธุ์ C57BL/J6 ได้ [13] บ่งชี้ว่าลำไส้ใหญ่อาจไม่ใช่ส่วนสำคัญในการควบคุมระดับ Mg^{2+} ในร่างกาย จากการศึกษาล่าสุดของกลุ่มวิจัยของข้าพเจ้าพบว่า omeprazole มีฤทธิ์ลดระดับ Mg^{2+} ในเลือด ปัสสาวะ กระดูก และกล้ามเนื้อ ของหนูขาวสายพันธุ์ Sprague-Dawley [41] บ่งชี้ว่า omeprazole มีฤทธิ์ลดระดับ Mg^{2+} ทั่วทั้งร่างกายสัตว์ทดลอง นอกจากนี้ยังพบว่า omeprazole กัดการดูดซึม Mg^{2+} ทั้งแบบผ่านเซลล์ และผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์ลำไส้ ทั้งนี้เซลล์เยื่อบุลำไส้มีการปรับตัวโดยเพิ่มการแสดงออกของ Cldn-2, -7, -12, -15, TRPM6, และ CNNM4 [41]

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

- 1 เพื่อศึกษาผลของการได้รับ omeprazole ติดต่อกันเป็นเวลานาน ต่อระดับ Mg^{2+} ในกระแสเลือด ในปัสสาวะ ในกระดูก และกล้ามเนื้อของหนูขาว
- 2 เพื่อศึกษาผลของการได้รับ omeprazole ติดต่อกันเป็นเวลานาน ต่อระดับ parathyroid hormone (PTH), vitamin D, insulin, epidermal growth factor (EGF), และ fibroblast growth factor-23 (FGF-23) ในกระแสเลือดของหนูขาว
- 3 เพื่อศึกษาผลของการได้รับ omeprazole ติดต่อกันเป็นเวลานาน ต่อการดูดซึม Mg^{2+} แบบผ่านเซลล์ และแบบผ่านช่องว่างระหว่างลำไส้เล็กของหนูขาว
- 4 เพื่อศึกษาผลของการได้รับ omeprazole ติดต่อกันเป็นเวลานาน จับ HCO_3^- จากเซลล์เยื่อบุลำไส้เล็กส่วน duodenum ของหนูขาว
- 5 เพื่อศึกษาอิทธิพลของ parathyroid hormone (PTH), vitamin D, insulin, epidermal growth factor (EGF), และ fibroblast growth factor-23 (FGF-23) ต่อการดูดซึม Mg^{2+} แบบผ่านเซลล์ และแบบผ่านช่องว่างระหว่างลำไส้เล็กของหนูขาวที่ได้รับ omeprazole ติดต่อกันเป็นเวลานาน
- 6 เพื่อศึกษาผลของการได้รับ omeprazole ติดต่อกันเป็นเวลานาน ต่อการแสดงออกของ parathyroid hormone (PTH) receptor, vitamin D receptor, insulin receptor, epidermal growth factor (EGF) receptor และ fibroblast growth factor-23 (FGF-23) receptor ในลำไส้เล็กของหนูขาวที่ได้รับ omeprazole ติดต่อกันเป็นเวลานาน

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ผลการศึกษาจากโครงการวิจัยนี้จะเพิ่มองค์ความรู้ด้านสรีรวิทยาการรักษาสสมดุล Mg^{2+} และกลไกควบคุมการดูดซึม Mg^{2+} ในลำไส้ ซึ่งจะเป็นข้อมูลสำคัญต่อการศึกษาย่อยเพื่อการพัฒนาวิธีการป้องกัน และ

รักษาผลข้างเคียงของยา omeprazole ในผู้ป่วยที่จำเป็นต้องได้รับการรักษาด้วยยาชนิดนี้ติดต่อกันเป็นเวลานาน

ผู้วิจัยมีแผนที่จะให้นิสิตระดับบัณฑิตศึกษาในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตรการแพทย์) และปรัชญาดุษฎีบัณฑิต (วิทยาศาสตรการแพทย์) ที่ผู้วิจัยเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วมทำการวิจัยภายใต้การควบคุมของผู้วิจัย ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการสร้างนักวิจัยรุ่นใหม่ในสาขาวิชาสรีรวิทยา

ผลการวิจัยจากโครงการวิจัยนี้คาดว่าจะตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารวิจัยระดับนานาชาติคือ Journal of General Physiology ในหัวข้อเรื่อง Mechanism of omeprazole suppressed intestinal Mg^{2+} absorption of male Sprague-Dawley rats

ผลงานวิจัยจากโครงการวิจัยนี้ที่ได้รับการเผยแพร่ในวารสารวิชาการนานาชาติจะถูกนำไปเป็นหัวข้อเรียนของนิสิตระดับบัณฑิตศึกษาในรายวิชาการวิเคราะห์บทความวิจัยทางวิทยาศาสตร์ และรายวิชาหัวข้อเลือกสรรคทางวิทยาศาสตรการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

เนื้อเรื่อง (Main body)

วิธีการดำเนินการวิจัย และสถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล

การดำเนินการวิจัยทั้งหมดในโครงการวิจัยนี้ ดำเนินการ ณ อาคารวิทยาศาสตรการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา โดยมีวิธีการดำเนินการวิจัยดังนี้

1 สัตว์ทดลอง

1.1 การเลี้ยงสัตว์ทดลอง

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

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

จากนั้นสัตว์ทดลองทั้งหมดจะถูกเลี้ยงในสภาพแวดล้อมเดียวกันจนกว่าจะมีอายุครบ 30 สัปดาห์ก่อนทำการเก็บตัวอย่าง และกำจัดสัตว์ทดลองตามข้อปฏิบัติจริยธรรมการวิจัยในสัตว์ทดลอง

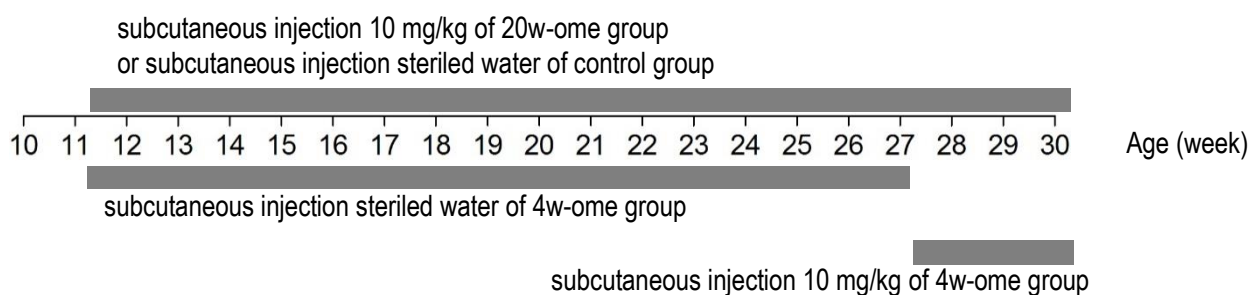
1.2 การให้ยา omeprazole แก่สัตว์ทดลอง

การศึกษาครั้งนี้เลือกใช้ omeprazole ชนิดฉีดเข้าหลอดเลือด (Ocid[®] IV, Zydus Cadila, India) ซึ่งตัวทำละลายของยาเป็นน้ำปลอดเชื้อมีค่า pH 6-7 ช่วยลดการการระคายเคืองจากการฉีดโดยฉีดเข้าชั้นใต้ผิวหนัง (subcutaneous injection) ที่ความเข้มข้น 10 mg/kg [12] เนื่องจากบริเวณชั้นใต้ผิวหนังเป็นบริเวณที่มีหลอดเลือดฝอยจำนวนมาก ตัวยาจึงถูกดูดซึมเข้ากระแสเลือดได้อย่างรวดเร็ว ลดการบาดเจ็บต่ออวัยวะภายในจากการฉีดเข้าช่องท้อง ลดการบาดเจ็บของหลอดเลือดจากการฉีดเข้าหลอดเลือดโดยตรง และสามารถฉีดได้ต่อเนื่องเป็นเวลานานโดยมีผลกระทบต่อสัตว์ทดลองน้อยที่สุด [27] และจากการศึกษานำร่องของคณะผู้วิจัยพบว่าการฉีด omeprazole เข้าชั้นใต้ผิวหนังติดต่อกัน 20 สัปดาห์ ไม่

ก่อให้เกิดการระคายเคือง หรือการอักเสบของผิวหนัง และชั้นใต้ผิวหนังของหนูขาว ยิ่งไปกว่านั้นประสิทธิภาพในการยับยั้งการหลั่งกรดในกระเพาะอาหาร หลังจากให้ omeprazole โดยฉีดเข้าชั้นใต้ผิวหนัง ก็ทัดเทียมกับการให้ omeprazole โดยการฉีดเข้าหลอดเลือดดำทั้งในหนูขาว [15] และในมนุษย์ [1]

- กลุ่มควบคุม จะได้รับการฉีดน้ำปลอดเชื้อที่ใช้ในการละลาย omeprazole ในสัปดาห์ที่ 11 ถึง สัปดาห์ที่ 30
- กลุ่มที่ได้รับโอมิพราโซล 4 สัปดาห์ (4w-ome group) จะได้รับการฉีดน้ำปลอดเชื้อที่ใช้ในการละลาย omeprazole ในสัปดาห์ที่ 11 ถึง 26 จึงทำการฉีด omeprazole ที่ความเข้มข้น 20 mg/kg ในสัปดาห์ที่ 27, 28, 29, และ 30
- กลุ่มที่ได้รับโอมิพราโซล 20 สัปดาห์ (20w-ome group) จะได้รับการฉีด omeprazole ที่ความเข้มข้น 20 mg/kg ในสัปดาห์ที่ 11 ถึง สัปดาห์ที่ 30 (รูปที่ 3)

ทั้งนี้ตลอดระยะเวลาที่ทำการฉีด ผู้วิจัยจะสังเกตผลข้างเคียงของการฉีด omeprazole เข้าชั้นใต้ผิวหนัง ได้แก่ การระคายเคือง ผลจากการฉีด ปริมาณอาหารและน้ำที่สัตว์ทดลองบริโภค ซึ่งหากพบว่ามี ความผิดปกติกับสัตว์ทดลองตัวใดผู้วิจัยจะทำการแก้ไข หรือคัดสัตว์ทดลองตัวนั้นๆ ออกจากการทดลอง

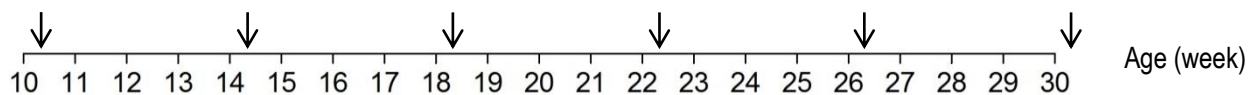


รูปที่ 3. ภาพแสดงช่วงเวลาการฉีด omeprazole ในสัตว์ทดลอง

1.3 การเก็บตัวอย่างในสัตว์ทดลอง

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

ในสัปดาห์ที่ 30 สัตว์ทดลองจะถูกทำให้สลบโดยใช้ thiopental ความเข้มข้น 70 mg/kg ฉีดเข้าช่องท้อง จากนั้นจึงเปิดช่องอกเพื่อเก็บเลือดจากหัวใจปริมาตร 4 – 5 ml และถือเป็นการ terminate สัตว์ทดลอง เพื่อนำไปวัดระดับ Mg^{2+} , parathyroid hormone (PTH), vitamin D, insulin, epidermal growth factor (EGF), และ fibroblast growth factor-23 (FGF-23) ซึ่งส่งตรวจที่ห้องปฏิบัติการเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลมหาวิทยาลัยบูรพา จากนั้นรีบทำการเปิดช่องท้องเพื่อเก็บลำไส้เล็ก โดยแบ่งลำไส้ออกเป็น 3 ส่วน คือ (1) duodenum เก็บลำไส้ส่วนที่ต่อจากกระเพาะอาหารความยาวประมาณ 12 เซนติเมตร (2) ilium 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+}

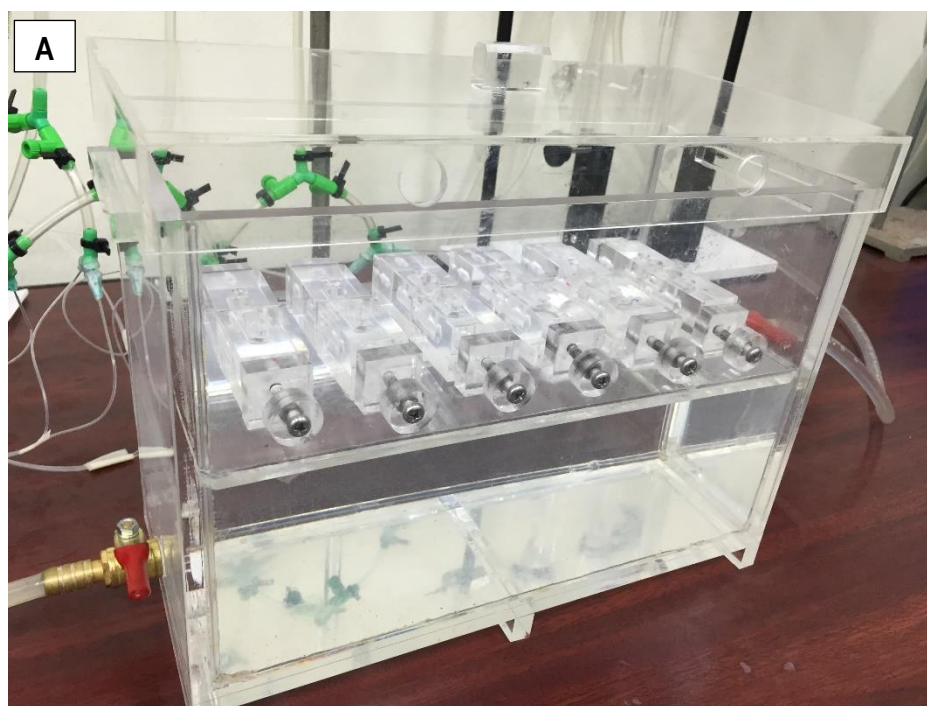


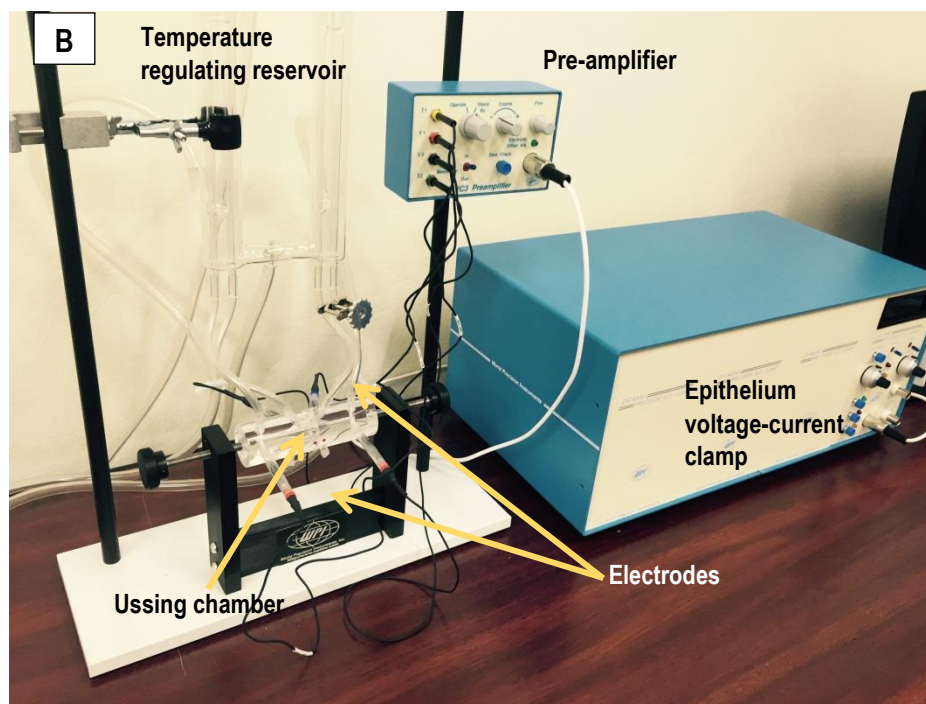
รูปที่ 4. ภาพแสดงช่วงเวลาการเก็บตัวอย่างในสัตว์ทดลอง (ลูกคร)

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 $290-295 \text{ mmol kg}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$ 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 5A) มีประสิทธิภาพทัดเทียมกับ standard Ussing chamber system (World Precision Instrument, Sarasota, FL, USA) (รูปที่ 5B) นอกจากนี้ผู้วิจัยยังมีแผนผลิต high throughput Ussing chamber setup เพิ่ม เพื่อให้สามารถทำการทดลองได้หลายการทดลองในเวลาเดียวกัน และลดจำนวนการใช้สัตว์ทดลองได้อีกด้วย





รูปที่ 5. 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 แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 nm โดยใช้เครื่อง UV spectrophotometer (model UV-2550; Shimadzu, Kyoto, Japan) [38] ความเข้มข้นของ Mg^{2+} จะถูกคำนวณโดยนำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปเทียบกับเส้นกราฟความเข้มข้นมาตรฐานซึ่งเกิดจากการนำ $50 \mu\text{L}$ ของ MgCl_2 ที่ความเข้มข้น 0, 2, 8, 20, 40 หรือ 80 mM ผสมกับ Xylidyl-Blue reagent 1 mL แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 nm เช่นเดียวกับวิธีการข้างต้น จากนั้นจึงหากราฟเส้นตรงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของ Mg^{2+} ก่อนนำค่าความเข้มข้นของ Mg^{2+} ไปคำนวณหาค่าอัตราการขนส่ง Mg^{2+} [38]

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 ผลที่ได้

จึงเป็นอัตราการขนส่งแบบ 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 ยังกระทำภายใต้การใช้ agonist และ antagonist ต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 1 เพื่อศึกษาอิทธิพลของโปรตีนแต่ละชนิดต่อการขนส่ง Mg^{2+} ในลำไส้

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

ทำการศึกษาร่วมกับการศึกษาการขนส่ง Mg^{2+} ซึ่งค่า P_{Mg} สามารถคำนวณได้โดยการนำค่าอัตราการขนส่ง Mg^{2+} ที่ได้จากการทดลอง 13.2.1 ทารด้วยค่าความต่างความเข้มข้นของ Mg^{2+} ใน bathing solution ด้าน apical และ basolateral [38]

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, $CaCl_2$ 1.25mM, $NaHCO_3$ 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} ที่ได้จะถูกนำไปคำนวณเพื่อหาค่าความต้านทานไฟฟ้าของแผ่นลำไส้โดยใช้กฎของโอห์ม [38]

นอกจากนี้การศึกษาค่าทางไฟฟ้า ยังกระทำภายใต้การใช้ agonist และ antagonist ต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 1

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}) [39] เพื่อศึกษาการคัดเลือกประจุของแผ่นลำไส้ว่าขนส่งไอออนประจุบวก หรือประจุลบ มากกว่า

นอกจากนี้การศึกษา charge selectivity โดย dilution potential technique ยังกระทำภายใต้การใช้ agonist และ antagonist ต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 1

2.5 การศึกษาการขับ HCO_3^- ของลำไส้ส่วน duodenum

ทำการทดลองใน high throughput Ussing chamber setup (รูปที่ 5A) โดยก่อนเริ่มทำการศึกษาแผ่นลำไส้จะแช่อยู่ใน physiological bathing solution ประมาณ 15 นาที เมื่อเริ่มทำการทดลอง bathing solution ด้าน apical จะถูกเปลี่ยนด้วย NaHCO_3 -free solution ซึ่งประกอบด้วย (หน่วย mM) 1.25 CaCl_2 , 4.5 KCl , 1 MgCl_2 , 12 D-glucose, 2.5 L-glutamine, 230 D-mannitol, และ 10 HEPES pH 7.4 และด้าน basolateral จะถูกเปลี่ยนด้วย NaHCO_3 -containing solution ซึ่งประกอบด้วย (หน่วย mM) 25 NaHCO_3 , 1.25 CaCl_2 , 4.5 KCl , 1 MgCl_2 , 12 D-glucose, 2.5 L-glutamine, 200 D-mannitol, และ 10 HEPES pH 7.4. เพื่อป้องกันการสลายของ HCO_3^- สารละลายด้าน apical จึงถูกเติมด้วย membrane-bound carbonic anhydrase (CA) IX/XII inhibitor [45 nM 4-[[[(4-Fluorophenyl)amino]carbonyl]amino]-benzenesulfonamide; U-104; Sigma] เก็บตัวอย่างจากสารละลายด้าน apical ทุก 10 นาที เป็นเวลา 30 นาที ทำการวัดระดับ HCO_3^- โดยใช้เทคนิค total CO_2 ด้วยเครื่อง chemistry analyzer (ILab Taurus; Instrumentation Laboratory, Bedford, MA, USA).

2.6 Western blot analysis

สกัดโปรตีนจากเซลล์เซลล์เยื่อบุลำไส้โดยใช้ 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 parathyroid hormone (PTH) receptor, vitamin D receptor, insulin receptor, epidermal growth factor (EGF) receptor และ fibroblast growth factor-23 (FGF-23) receptor (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) ทำการศึกษาปริมาณการแสดงผลของโปรตีนโดยใช้ 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)

3 การวัดระดับ Mg^{2+} 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).

4 วิธีการประเมินผล/ สัจเคราะห์ข้อมูล

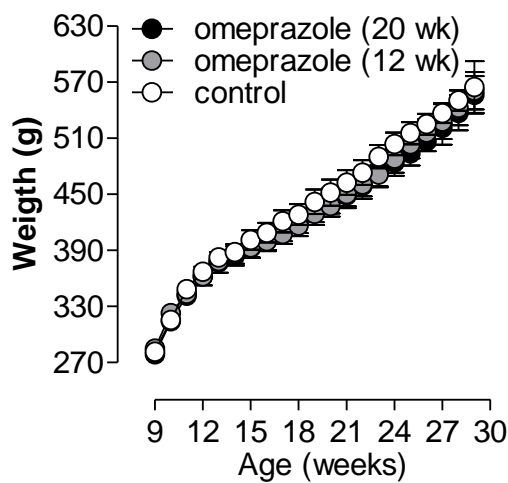
ข้อมูลทั้งหมดจะถูกนำเสนอเป็นค่า means \pm SE ความแตกต่างทางสถิติของข้อมูลสองชุดจะทดสอบโดย unpaired Student's t-test ความแตกต่างทางด้านสถิติของข้อมูลมากกว่าสองชุดจะทดสอบโดย One-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison test ความแตกต่างทางด้านสถิติของการทดสอบต้องมีค่า $P \leq 0.05$ ประเมินผลข้อมูลโดย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

ผลการวิจัย (Results)

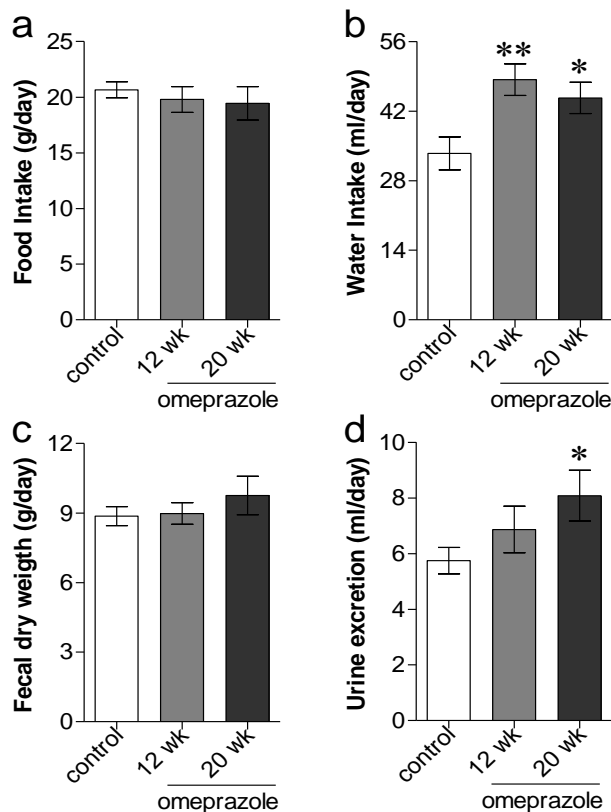
1 ลักษณะทางเมตาโบลิซึม

สัตว์ทดลองทั้ง 3 กลุ่มถูกเลี้ยงเป็นเวลา 20 สัปดาห์ เมื่อตรวจสอบอัตราการเจริญเติบโตโดยวัดการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักพบว่า สัตว์ทดลองทั้ง 3 กลุ่มมีการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัวเท่าเทียมกันตลอดระยะเวลาการทดลอง บ่งชี้ได้ว่าสัตว์ทดลองมีการเจริญเติบโตที่เท่าเทียมกัน (รูปที่ 6)

จากนั้นทำการศึกษาลักษณะทางเมตาโบลิซึมของสัตว์ทดลอง พบว่าการบริโภคมอาหาร (รูปที่ 7a) การขับถ่ายอุจจาระ (รูปที่ 7c) ของสัตว์ทดลองทั้ง 3 กลุ่มนั้นไม่แตกต่างกัน แต่เมื่อศึกษาพบว่าการบริโภคน้ำ (รูปที่ 7b) การขับถ่ายปัสสาวะ (รูปที่ 2d) พบว่า กลุ่มที่ได้รับ omeprazole 12 และ 20 สัปดาห์ มีการบริโภคน้ำ และการขับถ่ายปัสสาวะสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



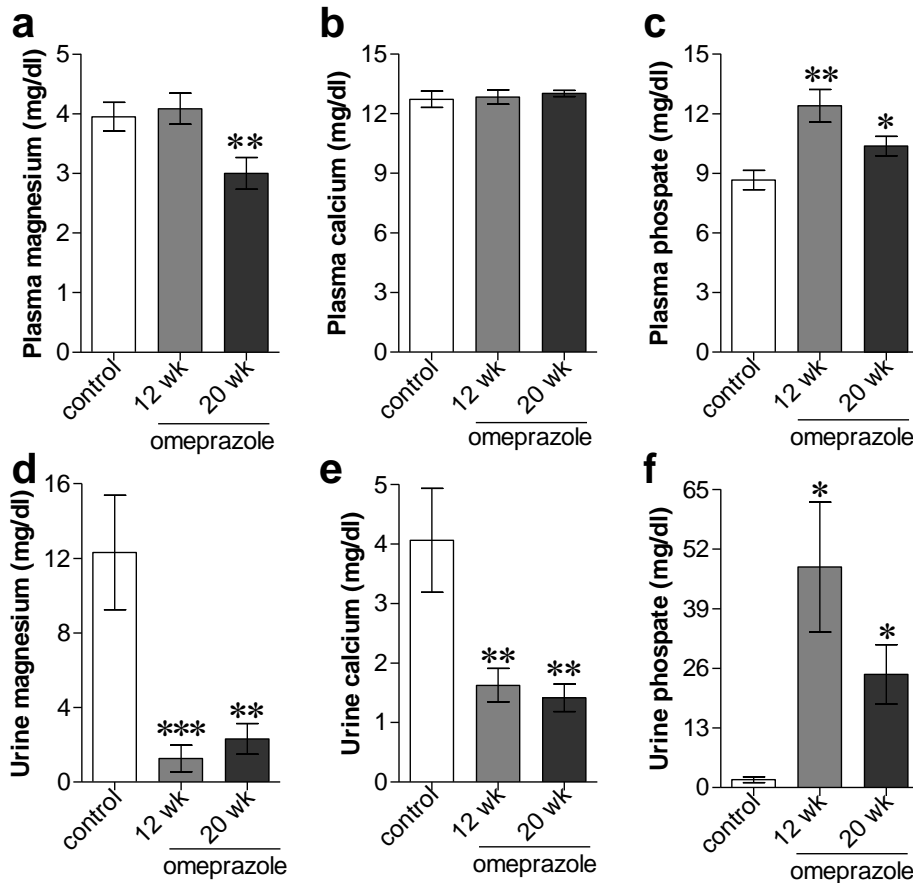
รูปที่ 6 แสดงน้ำหนักสัตว์ทดลองกลุ่มควบคุม (วงกลมขาว) กลุ่มได้รับ omeprazole 12 สัปดาห์ (วงกลมเทา) และกลุ่มได้รับ omeprazole 20 สัปดาห์ (วงกลมดำ) (n = 5).



รูปที่ 7 ลักษณะทางเมตาโบลิซึมของสัตว์ทดลอง คือ การบริโภคมอาหาร (a) การบริโภคน้ำ (b) การขับถ่ายอุจจาระ (c) และการขับถ่ายปัสสาวะ (d), * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (n = 5).

2 อิทธิพลของ omeprazole ต่อปริมาณไอออน

จากผลการศึกษาระดับ Mg^{2+} , Ca^{2+} , และ PO_4^{3-} ในกระแสเลือด และในปัสสาวะของสัตว์ทดลองพบว่า กลุ่มที่ได้รับ omeprazole มีระดับ Mg^{2+} ในกระแสเลือดลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 8a) และระดับ PO_4^{3-} ในกระแสเลือดเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 8c) แต่ omeprazole ไม่มีผลต่อระดับ Ca^{2+} ในกระแสเลือด (รูปที่ 8b) เมื่อศึกษาในปัสสาวะพบว่าระดับ Mg^{2+} (รูปที่ 8d) และ Ca^{2+} (รูปที่ 8e) ในปัสสาวะของกลุ่มที่ได้รับ omeprazole มีระดับลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ระดับ PO_4^{3-} (รูปที่ 8f) ในปัสสาวะของกลุ่มที่ได้รับ omeprazole มีระดับเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

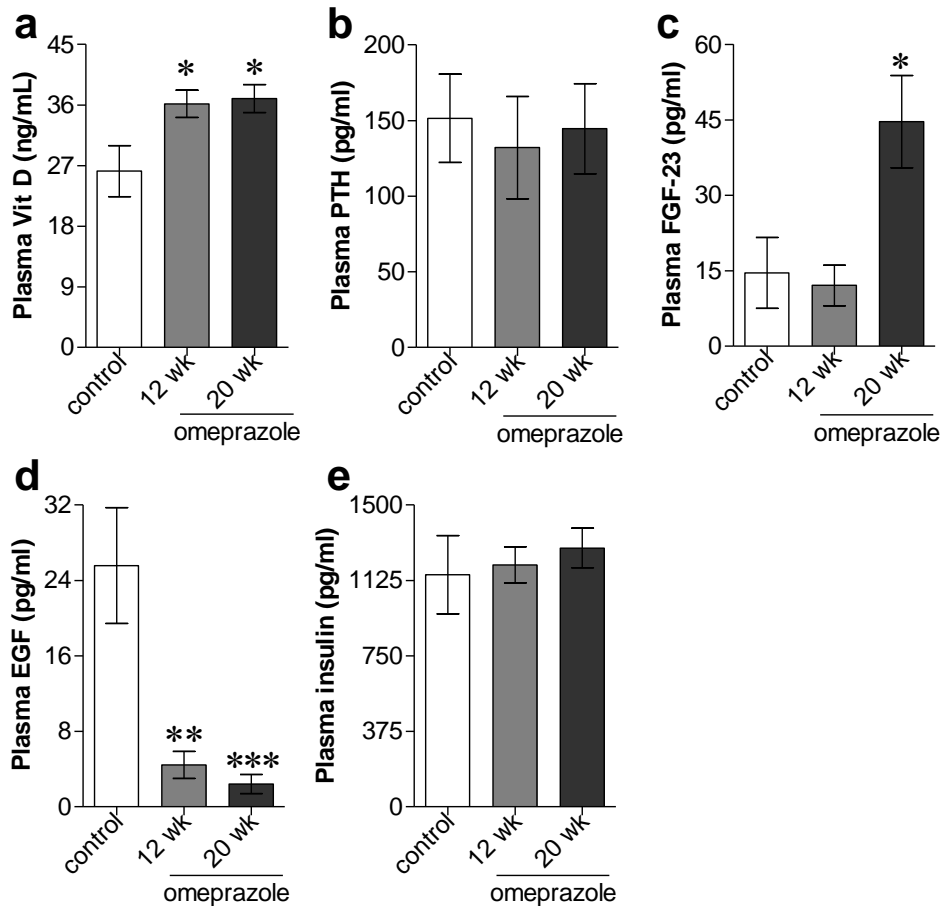


รูปที่ 8 ระดับ Mg^{2+} (a), Ca^{2+} (b), และ PO_4^{3-} (c) ในกระแสเลือด และระดับ Mg^{2+} (d), Ca^{2+} (e), และ PO_4^{3-} (f) ในปัสสาวะ. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (n = 5).

วิเคราะห์ผลการทดลองในส่วนนี้ สัตว์ทดลองที่ได้รับ omeprazole เป็นเวลา 12 และ 20 สัปดาห์ น่าจะมีผลรบกวนสมดุล Ca^{2+} และ Mg^{2+} ทำให้ร่างกายสัตว์ทดลองพยายามรักษาระดับไอออนทั้ง 2 ชนิด โดยเพิ่มการดูดกลับที่ท่อไต เป็นผลให้ระดับ Ca^{2+} และ Mg^{2+} ในปัสสาวะนั้นลดต่ำลงอย่างมาก อย่างไรก็ตามในกลุ่มที่ได้รับ omeprazole เป็นเวลา 20 สัปดาห์ มีระดับ Mg^{2+} ต่ำกว่าปกติ หรือเรียกว่า hypomagnesaemia ส่วนระดับ Ca^{2+} นั้นอาจจะมีผลมาจากการเพิ่มการสลายกระดูก เพื่อรักษาระดับ Ca^{2+} ในกระแสเลือด แต่ก็มีผลให้ระดับ PO_4^{3-} ในกระแสเลือดเพิ่มสูงขึ้น จึงต้องเพิ่มการขับทิ้งทางปัสสาวะ

3 อิทธิพลของ omeprazole ต่อระดับฮอร์โมนในกระแสเลือด

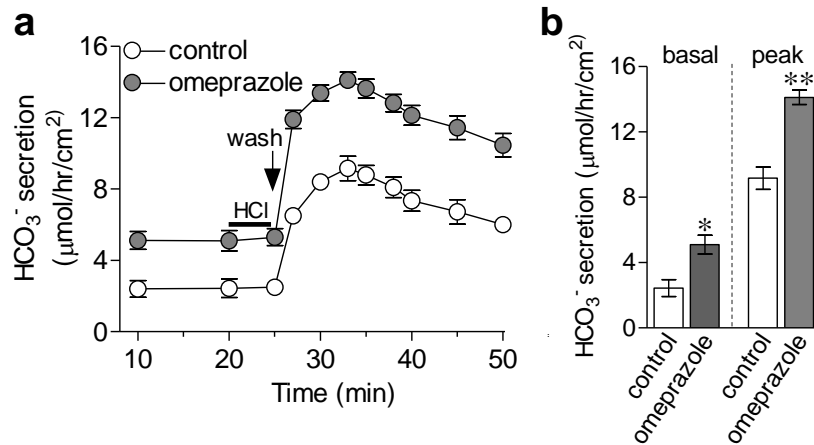
จากผลการศึกษาระดับ vitamin D (รูปที่ 9a), parathyroid hormone (PTH) (รูปที่ 9b), fibroblast growth factor-23 (รูปที่ 9c) epidermal growth factor (EGF) (รูปที่ 9d), และ insulin (รูปที่ 9e) ในกระแสเลือดของหนูขาว พบว่า omeprazole มีฤทธิ์เพิ่มระดับ Vitamin D และ FGF-23 ในกระแสเลือดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในทางตรงกันข้าม omeprazole มีฤทธิ์ลดระดับ EGF อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



รูปที่ 9 ระดับ vitamin D (a), parathyroid hormone (PTH) (b), fibroblast growth factor-23 (c) epidermal growth factor (EGF) (d), และ insulin (e) ในกระแสเลือดของหนูขาว. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (n = 5).

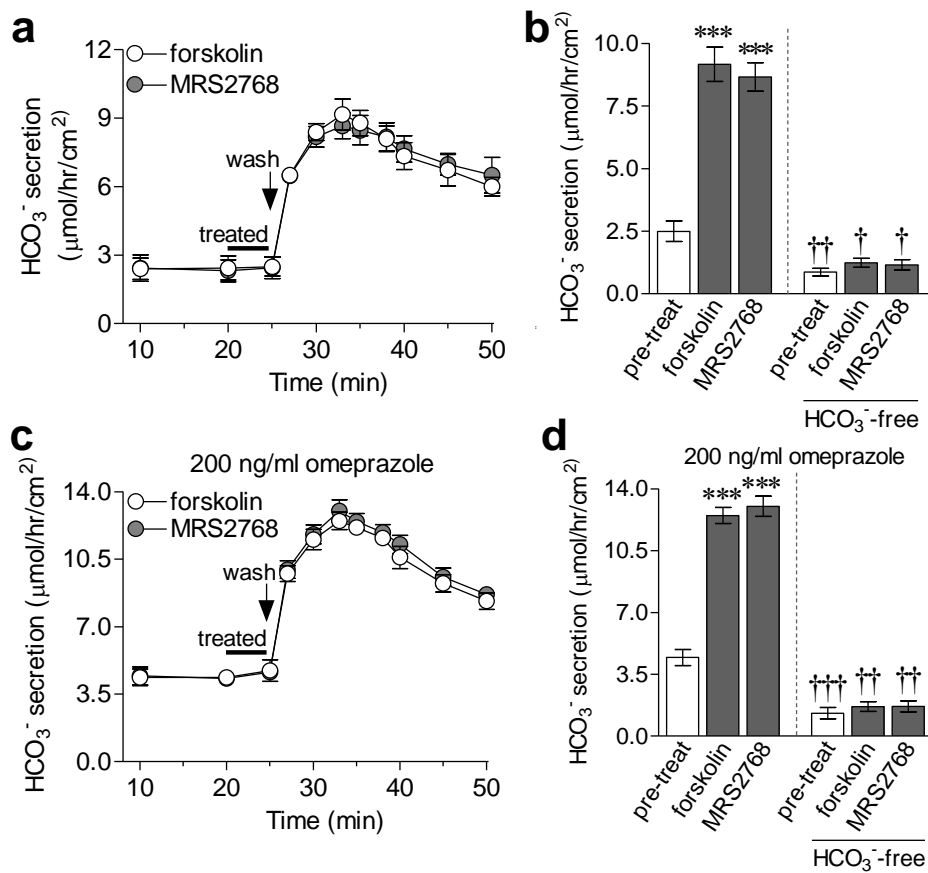
4 อิทธิพลของ omeprazole ต่อการขับ HCO_3^- จากเซลล์เยื่อบุลำไส้เล็กของหนูขาว

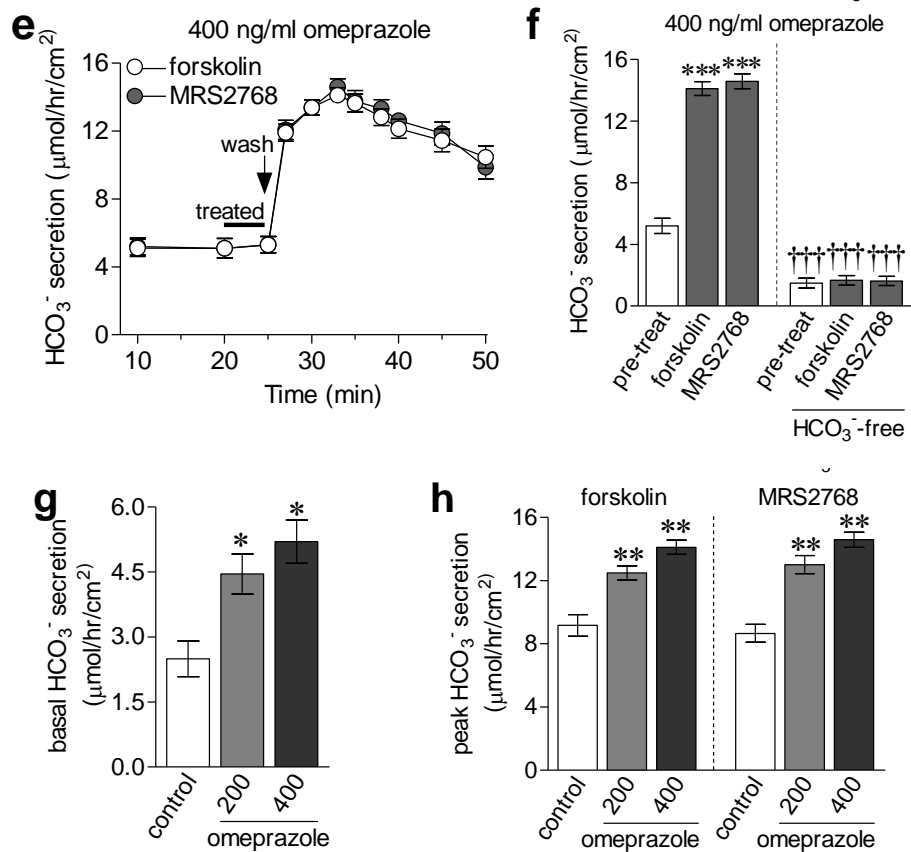
จากผลการศึกษาอิทธิพลของ omeprazole ต่อการขับ HCO_3^- จากเซลล์เยื่อบุลำไส้เล็กส่วน duodenum ของหนูขาว พบว่า omeprazole มีฤทธิ์เพิ่มการขับ HCO_3^- ทั้งในภาวะปกติ (basal) หรือหลังจากได้รับการกระตุ้น (peak) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 10)



รูปที่ 10 การขับ HCO_3^- ในเซลล์เยื่อบุลำไส้เล็กส่วน duodenum ของหนูขาว. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($n = 5$).

นอกจากนี้ผู้วิจัยยังศึกษาอิทธิพลของ omeprazole ต่อการขับ HCO_3^- จากแผ่นเซลล์เยื่อบุเพาะเลี้ยง Caco-2 ซึ่งนิยมใช้เป็นแบบจำลองเยื่อบุลำไส้เล็กของมนุษย์ พบว่า omeprazole มีฤทธิ์เพิ่มการขับ HCO_3^- ทั้งในภาวะปกติ (basal) หรือหลังจากได้รับการกระตุ้น (peak) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 11)

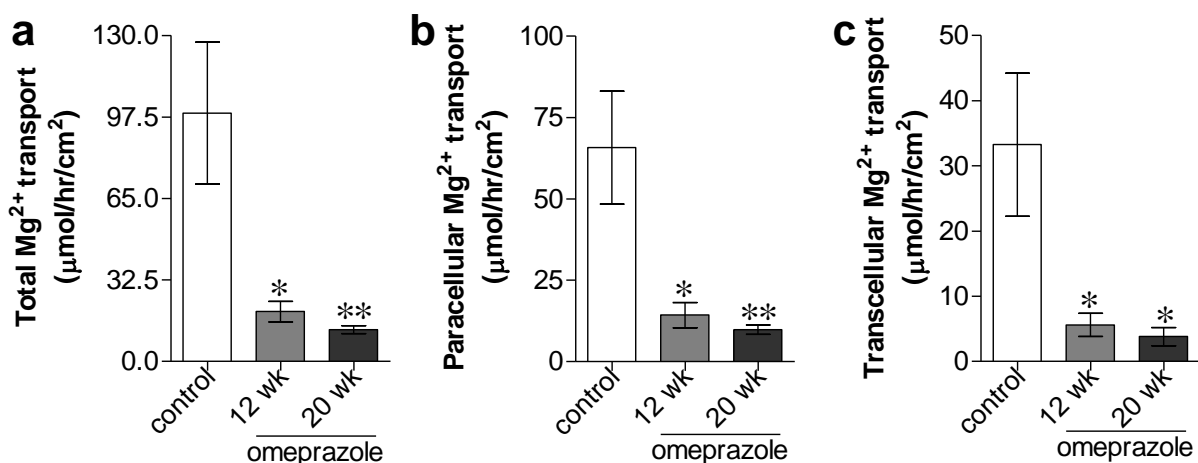




รูปที่ 11 การขับ HCO_3^- ในแผ่นเซลล์เยื่อเพาะเลี้ยง Caco-2. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (n = 5).

5. อิทธิพลของ omeprazole ต่อการดูดซึมเซลล์ลำไส้เล็กของหนูขาว

ดังแสดงในรูปที่ 12 การดูดซึม Mg^{2+} แบบ total transport, paracellular transport, และ transcellular transport ในหนูกลุ่มที่ได้รับ omeprazole ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

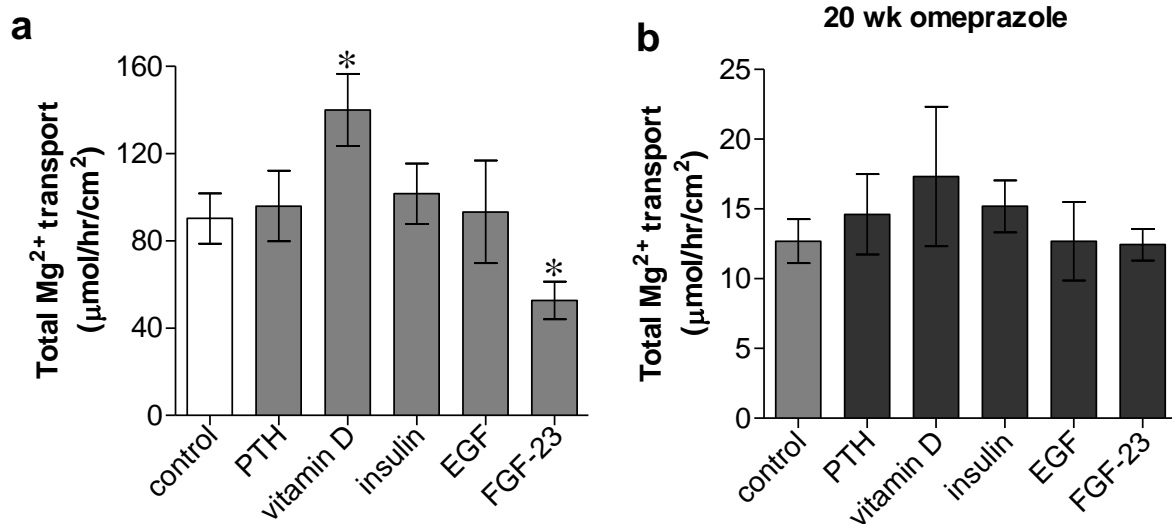


รูปที่ 12 การขับดูดซึม Mg^{2+} ในลำไส้เล็กส่วน duodenum ของหนูขาว. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (n = 5).

6. อิทธิพลของ PTH, vitamin D, insulin, EGF, และ FGF-23 ต่อการดูดซึม Mg^{2+} ในเซลล์ลำไส้เล็กของหนูขาวกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับ omeprazole

ดังแสดงในรูปที่ 13a แสดงการดูดซึมในกลุ่มควบคุม พบว่า vitamin D มีฤทธิ์เพิ่มการดูดซึม Mg^{2+} อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ FGF-23 มีฤทธิ์ลดการดูดซึม Mg^{2+} อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

แต่เมื่อศึกษาในกลุ่มที่ได้รับ omeprazole เป็นระยะเวลา 20 สัปดาห์ พบว่าฮอร์โมนทั้งหมดไม่มีผลต่อการดูดซึม Mg^{2+} ในลำไส้ของหนูขาว

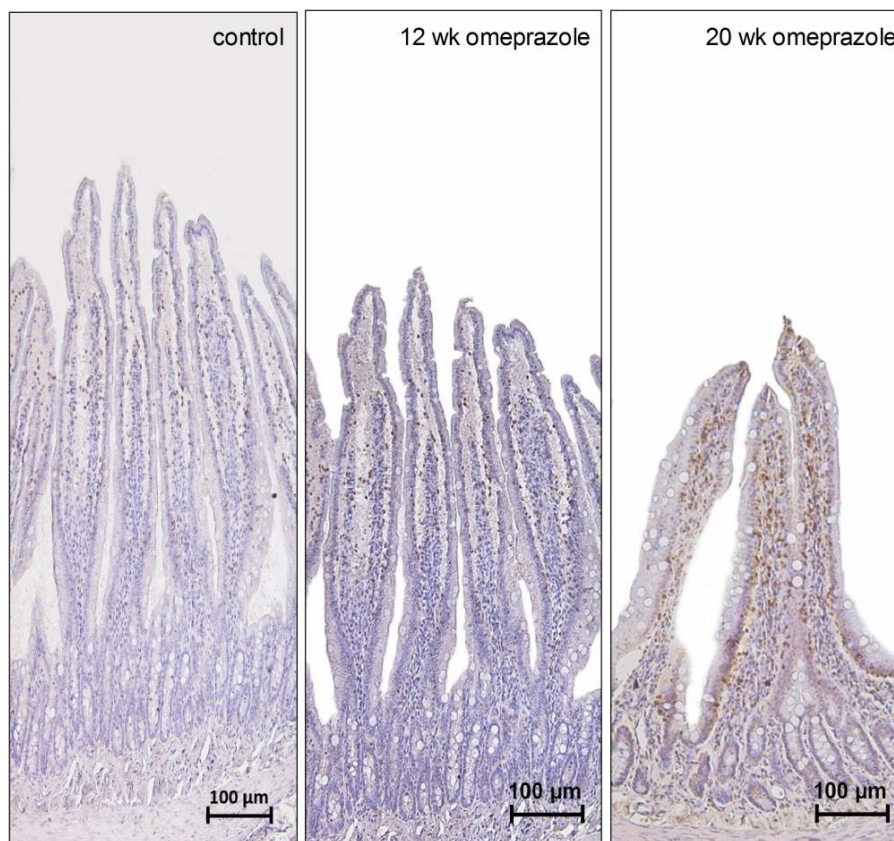


รูปที่ 13 อิทธิพลของ PTH, vitamin D, insulin, EGF, และ FGF-23 ต่อการดูดซึม Mg^{2+} ในเซลล์ลำไส้เล็กของหนูขาวกลุ่มควบคุม (a) และกลุ่มที่ได้รับ omeprazole (b). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (n = 5).

7. อิทธิพลของ omeprazole ต่อการแสดงออกของ parathyroid hormone (PTH) receptor, vitamin D receptor, insulin receptor, epidermal growth factor (EGF) receptor และ fibroblast growth factor-23 (FGF-23) receptor ในลำไส้ของหนูขาวที่ได้รับ omeprazole ติดต่อกันเป็นเวลานาน

พบว่า omeprazole ไม่มีผลต่อระดับการแสดงออกของ ของ parathyroid hormone (PTH) receptor, vitamin D receptor, insulin receptor, epidermal growth factor (EGF) receptor และ fibroblast growth factor-23 (FGF-23) receptor

สืบเนื่องจากการศึกษาก่อนหน้านี้ผู้วิจัยพบว่าลำไส้เล็กของหนูขาวที่ได้รับ omeprazole มีการลดลงของ villous ผู้วิจัยจึงศึกษาการแสดงออกของ CD3 protien โดยวิธี IHC ซึ่งเป็น T cell receptor เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ หากมีการแสดงออกของ CD3 มากขึ้น ย่อมบ่งชี้ว่ามีการอักเสบของเซลล์ลำไส้เพิ่มขึ้นเช่นกัน ดังแสดงในรูปที่ 14 พบว่า ลำไส้เล็กส่วน duodenum ของหนูขาวที่ได้รับ omeprazole เป็นเวลา 12 และ 20 สัปดาห์มีระดับการแสดงของ CD3 ที่เพิ่มมากขึ้น จากการติดสีน้ำตาลที่มากกว่า เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม บ่งชี้ว่าหนูที่ได้รับ omeprazole มีระดับการอักเสบของเซลล์เยื่อลำไส้เพิ่มขึ้น ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้ villous ของลำไส้มีการหดสั้นลง



รูปที่ 14 ระดับการแสดงออกของ CD3 ในลำไส้เล็กของหนูขาว

อภิปราย/วิจารณ์ (Discussion) ผลการทดลอง/ผลการวิจัย ที่ได้ทั้งหมด

ผลการทดลองจากโครงการวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าการให้ยา omeprazole ซึ่งเป็นยายับยั้งการหลั่งกรดในกระเพาะอาหาร ติดต่อกันเป็นระยะเวลาอนานมีผลทำให้ปริมาณ Mg^{2+} ในกระแสเลือดของหนูลดต่ำกว่าปกติจริง คล้ายคลึงกับที่พบเจอในมนุษย์ เมื่อศึกษาในระดับ Mg^{2+} ในปัสสาวะก็พบว่ามึระดับต่ำเช่นเดียวกัน บ่งชี้ว่าไม่มีการสูญเสีย Mg^{2+} ในปัสสาวะ จึงน่าจะมาจากการลดการดูดซึม Mg^{2+} ในลำไส้ และเมื่อทำการศึกษาการดูดซึม Mg^{2+} ในลำไส้ก็พบว่า omeprazole มีฤทธิ์กีดการดูดซึม Mg^{2+} ในลำไส้จริง เป็นการยืนยันสมมุติฐานคือ omeprazole มีฤทธิ์กีดการดูดซึม Mg^{2+} ในลำไส้ สัตว์กลุ่มที่มีระดับ Mg^{2+} ต่ำยังมีระดับ Vitamin D และ FGF-23 ในกระแสเลือดเพิ่มขึ้น แต่มีระดับ EGF ในกระแสเลือดลดลง แต่เมื่อศึกษาฤทธิ์ของฮอร์โมนต่อการดูดซึม Mg^{2+} พบว่า Vitamin D มีฤทธิ์เพิ่มการดูดซึม แต่ FGF-23 มีฤทธิ์กีดการดูดซึม เป็นการศึกษาครั้งแรกที่บ่งชี้ว่าฮอร์โมนมีฤทธิ์ควบคุมการดูดซึม Mg^{2+} โดยตรง ควรศึกษาต่อเนื่องเกี่ยวกับกลไกควบคุมการดูดซึม Mg^{2+} ของ Vitamin D และ FGF-23 ต่อลำไส้เล็กต่อไป

จากนั้นผู้วิจัยทำการศึกษากลไกที่ omeprazole กีดการดูดซึม Mg^{2+} ในลำไส้ โดยศึกษาการขับ HCO_3^- ในลำไส้เล็กส่วน duodenum และยังศึกษาในแผ่นเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 พบว่า omeprazole มีฤทธิ์เพิ่มการขับ HCO_3^- ในลำไส้เล็กส่วน duodenum และในแผ่นเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 ทั้งนี้ HCO_3^- จะมีฤทธิ์ลดความเป็นกรดด้านโพรงลำไส้ ทำให้เกิดการตกตะกอนของ $MgCO_3$ ทำให้ free Mg^{2+} ลดปริมาณส่งผลให้การดูดซึม Mg^{2+} ลดลง นอกจากนั้นจากการศึกษาก่อนหน้านี้ผู้วิจัยพบว่าลำไส้เล็กของหนูขาวที่ได้รับ omeprazole มีการหดสั้นลงของ villous การศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยจึงศึกษาการแสดงออกของ CD3 protien

โดยวิธี IHC ซึ่งเป็น T cell receptor เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ พบว่า omeprazole เพิ่มการแสดงออกของ CD3 บ่งชี้ว่ามีการอักเสบ และเป็นสาเหตุหลักที่ส่งผลให้มีการหดสั้นลงของ villous และส่งผลให้ลดการดูดซึม Mg^{2+} ในลำไส้

สรุปและเสนอแนะเกี่ยวกับการวิจัยในขั้นตอนต่อไป ตลอดจนประโยชน์ในทางประยุกต์ของผลการวิจัยที่ได้

ผลการวิจัยของโครงการวิจัยนี้ยืนยันผลข้างเคียงของการใช้ omeprazole ติดต่อกันเป็นระยะเวลานาน ซึ่งก่อกำเนิดการทำงานของลำไส้ทั้งในระดับโครงสร้างและระดับเซลล์ โดยพบว่าน่าจะมีการอักเสบที่เพิ่มมากขึ้นเป็นผลให้ villous หดสั้นลง ดังนั้นควรมีการศึกษาต่อเนื่องเกี่ยวกับกระบวนการอักเสบของเซลล์เยื่อลำไส้จากการได้รับยา omeprazole

นอกจากนี้ยังพบว่า Vitamin D และ FGF-23 มีฤทธิ์เปลี่ยนแปลงอัตราการดูดซึม Mg^{2+} ในลำไส้เล็ก ซึ่งเป็นงานวิจัยแรกๆ ที่แสดงผลของฮอร์โมนต่อการดูดซึม Mg^{2+} ในลำไส้โดยตรง อย่างไรก็ตามยังต้องมีการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของ Vitamin D และ FGF-23 ต่อไป

ผลผลิต (Output)

อยู่ในระหว่างการเตรียม manuscript เพื่อส่งขอรับการตีพิมพ์

ส่วนประกอบตอนท้าย

รายงานการเงิน

เลขที่โครงการระบบบริหารงานวิจัย 2560A10802080 สัญญาเลขที่ 172/2561
โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2561 มหาวิทยาลัยบูรพา

ชื่อโครงการ กลไกการออกฤทธิ์ของโอมิพราโซลยับยั้งการดูดซึมแมกนีเซียมในลำไส้เล็กของหนูขาวเพศผู้สายพันธุ์ Sprague- Dawley

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม 2560 ถึงวันที่ 30 กันยายน 2561

ระยะเวลาดำเนินการ...1...ปี เดือน ตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม 2560

รายรับ

จำนวนเงินที่ได้รับ

งวดที่ 1 (50%)	307,500 บาท	เมื่อ ธันวาคม 2561
งวดที่ 2 (40%)	246,000 บาท	เมื่อ มิถุนายน 2561
งวดที่ 3 (10%)	61,500 บาท	เมื่อ รอบเบิกจ่าย
รวม	615,000 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	291,000	291,000	-
3. ค่าวัสดุ	262,500	262,500	-
4. ค่าใช้สอย	-	-	-
5. ค่าครุภัณฑ์			-
6. ค่าใช้จ่ายอื่น ๆ - ค่าสาธารณูปโภค	61,500	61,500	-
รวม	615,000	615,000	-

(.....)

ลงนามหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน

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: i15–i24
6. de Baaij JHF, Hoenderop JG, Bindels RJM. Magnesium in man: implications for health and disease. *Physiol Rev* 2015; 95(1):1–46.
7. Durlach J. Magnesium depletion and pathogenesis of Alzheimer's disease. *Magnes Res* 1990; 3(3): 217-218.
8. Epstein M, McGrath S, Law F. Proton-pump inhibitors and hypomagnesemic hypoparathyroidism. *N Engl J Med* 2006; 355(17): 1834-1836.
9. 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.
10. Fujita H, Sugimoto K, Inatomi S, Maeda T, Osanai M, Uchiyama Y, Yamamoto Y, Wada T, Kojima T, Yokozaki H, Yamashita T, Kato S, Sawada N, Chiba H. Tight junction proteins claudin-2 and -12 are critical for vitamin D-dependent Ca^{2+} absorption between enterocytes. *Mol Biol Cell* 2008;19:1912-1921.
11. 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
12. Grubbs RD. Intracellular magnesium and magnesium buffering. *Biometals* 2002; 15(3): 251-259.
13. Hess MW, de Baaij JHF, Gommers LMM, Hoenderop JGJ, Bindels RJM. Dietary Inulin Fibers Prevent Proton-Pump Inhibitor (PPI)-Induced Hypocalcemia in Mice. *PLoS One* 2015;10(9):e0138881
14. 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.

15. 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.
16. Khuituan P, Teerapornpuntakit J, Wongdee K, Suntornsaratoon P, Konthapakdee N, Sangsaksri J, Sripong C, Krishnamra N, Charoenphandhu N. Fibroblast growth factor-23 abolishes 1,25-dihydroxyvitamin D₃-enhanced duodenal calcium transport in male mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2012; 302(8):E903-E913.
17. Konrad M, Schlingmann KP, Gudermann T. Insights into the molecular nature of magnesium homeostasis. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004; 286(4): F599-F605.
18. 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.
19. Kuipers MT, Thang HD, Arntzenius AB. Hypomagnesaemia due to use of proton pump inhibitors: a review. *Neth J Med* 2009;67:169-172
20. 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.
21. 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.
22. 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.
23. Mackay JD, Bladon PT. Hypomagnesaemia due to proton-pump inhibitor therapy: a clinical case series. *QJM* 2010;103(6):387-395
24. McCarthy JM, Kumar R. Divalent cation metabolism: Magnesium, In: Glassock RJ, Cohen AH, Grunfeld JP, eds. *The Schrier Atlas of Diseases of the Kidney*. Philadelphia: Current Medicine Inc. 1999: 4.1-4.12.
25. Mejia A, Kraft WK. Acid peptic diseases: pharmacological approach to treatment. *Expert Rev Clin Pharmacol* 2009; 2(3):295–314.
26. Mertz-Nielsen A, Hillingsø J, Bukhave K, Rask-Madsen J. Omeprazole promotes proximal duodenal mucosal bicarbonate secretion in humans. *Gut* 1996;38:6–10.
27. 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.

28. 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.
29. Patterson Burdsall D, Flores HC, Krueger J, Garretson S, Gorbien MJ, Iacch A, Dobbs V, Homa T. Use of proton pump inhibitors with lack of diagnostic indications in 22 Midwestern US skilled nursing facilities. *J Am Med Dir Assoc* 2013; 14(6):429-432.
30. Quamme GA. Recent developments in intestinal magnesium absorption. *Curr Opin Gastroenterol* 2008; 24(2): 230-235.
31. Quinn R. Comparing rat's to human's age: how old is my rat in people years? *Nutrition* 2005;21(6):775-7.
32. 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.
33. Rude RK. Magnesium deficiency: a cause of heterogeneous disease in humans. *J Bone Miner Res* 1998; 13(4): 749-758.
34. Rude RK, Gruber HE. Magnesium deficiency and osteoporosis: animal and human observations. *J Nutr Biochem* 2004; 15(12): 710-716
35. Shabajee N, Lamb EJ, Sturgess I, Sumathipala RW. Omeprazole and refractory hypomagnesaemia. *BMJ* 2008;337:a425
36. Swaminathan R. Magnesium metabolism and its disorders. *Clin Biochem Rev* 2003; 24(2):47-66.
37. Thongon N. Hypomagnesemia from long-term omeprazole administration. *Burapha Sci J* 2010; 15(2):116-121.
38. Thongon N, Krishnamra N. Omeprazole decreases magnesium transport across Caco-2 monolayers. *World J Gastroenterol* 2011;17:1574-1583
39. Thongon N, Krishnamra N. Apical acidity decreases inhibitory effect of omeprazole on Mg²⁺ absorption and claudin-7 and -12 expression in Caco-2 monolayers. *Exp Mol Med* 2012; 44(11): 684-693.
40. Thongon N, Ketkeaw P, Nuekchob C. The roles of acid-sensing ion channel 1a and ovarian cancer G protein-coupled receptor 1 on passive Mg²⁺ transport across intestinal epithelium-like Caco-2 monolayers. *J Physiol Sci* 2014; 64(2):129-139.
41. Thongon N, Penguy J, Kulwong S, Khongmueang K, Thongma M. Omeprazole suppressed plasma magnesium level and duodenal magnesium absorption in male Sprague-Dawley rats. *Pflugers Arch Eur J Physiol* 2016 (Revised)
42. Touyz RM. Role of magnesium in the pathogenesis of hypertension. *Mol Aspects Med* 2003; 24(1-3): 107-136.

43. Vormann J. Magnesium: nutrition and metabolism. *Mol Aspects Med* 2003; 24(1-3): 27-37.
44. Wang J, Barbuskaite D, Tozzi M, Giannuzzo A, Sørensen CE, Novak I. Proton pump inhibitors inhibit pancreatic secretion: Role of gastric and non-gastric H⁺/K⁺-ATPases. *PLoS One* 2015; 18;10(5):e0126432.
45. William JH, 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.