รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

ฤทธิ์ของฮอร์โมนพาราธัยรอยด์และไฟโบรบลาสต์โกรทแฟคเตอร์-23 ต่อการดูดซึมแมกนีเซียมในลำไส้ของหนูแรท

Effects of Parathyroid hormone and FGF23 on Magnesium absorption in rat intestine

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ
รศ.ดร.ณรงค์ฤทธิ์ ทองอุ่น
สาขาวิชาชีวเวชศาสตร์ คณะสหเวชศาสตร์
รหัสโครงการ AHS11/2562

ผู้ร่วมวิจัย
นางสาวณศิสรณ์ สุขศรีเดชาศิลป์

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัย ประเภทเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ 2562
คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
กันยายน 2563

หัวข้อวิจัย ฤทธิ์ของฮอร์โมนพาราธัยรอยด์และไฟโบรบลาสต์โกรทแฟคเตอร์-23 ต่อการดูดซึมแมกนีเซียมในลำไส้ของหนูแรท

ชื่อผู้วิจัย รศ.ดร.ณรงค์ฤทธิ์ ทองอุ่น

หน่วยงาน สาขาวิชาชีวเวชศาสตร์ คณะสหเวชศาสตร์

ปีงบประมาณ 2562

บทคัดย่อ

แมกนีเซียม (Mg) เป็นไอออนบวกที่จำเป็นต่อกระบวนการสำคัญหลายประการในระดับเซลล์ซึ่งร่างกายได้รับมาจากการกินเท่านั้น ดังนั้นการดูดซึมที่ลำไส้นับเป็นส่วนสำคัญที่สุดในการรักษาสมดุล Mg อย่างไรก็ตามกลไกควบคุมการดูดซึม Mg ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด มีหลักฐานบ่งชี้ว่า PTH และ FGF23 ฮอร์โมนที่ใช้ควบคุมสมดุลแคลเซียมและฟอสเฟตมีผลต่อสมดุล Mg งานวิจัยนี้จึงมุ่งศึกษาฤทธิ์ระยะสั้นของฮอร์โมนดังกล่าวต่อการดูดซึม Mg ในลำไส้เล็ก โดยหลังจากฉีด PTH และ FGF23 5 ชม. เก็บลำไส้มาศึกษาการดูดซึมแมกนีเซียมรวมถึงการเปลี่ยนแปลงค่าไฟฟ้าทั้งแบบ *ex vivo* และ *in vivo* โดยใช้ Modified-Ussing chamber ซึ่งสามารถลดจำนวนการใช้สัตว์ทดลองได้มากกว่าเทคนิคอื่น ศึกษาการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการขนส่งแมกนีเซียมโดย western blot analysis ผลการศึกษาฤทธิ์โดยตรง แบบ ex vivo พบว่าการดูดซึมโดยรวมและการดูดซึมแบบ transcellular ของหนูกลุ่ม PTH และ FGF23 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ การแสดงออกของโปรตีน TRPM6 ในลำไส้เล็กส่วนดูโอดีนัมลดลงทั้งในกลุ่ม PTH และ FGF23 ในขณะที่ CNNM4 มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นในกลุ่ม FGF23 ในขณะที่การดูดซึมแบบ paracellular ในหนูทุกกลุ่มไม่แตกต่างกัน การศึกษาแบบ in vivo พบว่ามีการแสดงออกของ TRPM6 และ CNNM4 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ผลการทดลองบ่งชี้ว่าลำไส้เล็กส่วนดูโอดีนัมมีการควบคุมการดูดซึม Mg เกิดขึ้นจริง และเป็นไปได้ว่าสามารถควบคุมได้โดยใช้ฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับสมดุลไอออนบวกในร่างกาย อาทิเช่น PTH และ FGF23

Abstract

Magnesium (Mg) is an essential cation in cellular and enzymatic levels. Intestinal absorption plays a vital role in the regulation of normal Mg balance because dietary intake is the sole source of Mg in human However, the mechanism of Mg absorption and regulation remains elusive. Many observations indicate that PTH and FGF23 affects magnesium metabolism. The present study aimed to evaluate short-term effect of PTH and FGF23 on duodenal Mg absorption in rats. By performing a Modified-Ussing chamber experiment duodenal Mg absorption as well as electrical parameter were studied after 5 h of PTH and FGF23 injection (20 ug/kg). Study TRPM6 and CNNM6 which are necessary for transcellular Mg transport by western blot analysis Our result show that there was no changes in short-term systemin effects of PTH and FGF23 occurs. However, single-dose PTH and FGF23 injection significantly decreased total- and transcellular Mg transport directly, TRPM6 expression was decreased in *ex vivo* study whereas CNNM4 expression was increased. In vivo study showed the increased of TRPM6 and CNNM4 expression in duodenum. Our findings show that duodenum can be the regulatory site of intestinal Mg absorption control. PTH and FGF23 was shown to be a novel magnesium-regulating hormone that acted directly on the rat duodenal Mg absorption.

คำนำ

รายงานการวิจัย “ฤทธิ์ของฮอร์โมนพาราธัยรอยด์และไฟโบรบลาสต์โกรทแฟคเตอร์-23 ต่อการดูดซึมแมกนีเซียมในลำไส้ของหนูแรท” ฉบับนี้เปนรายงานฉบับสมบูรณ ซึ่งคณะผูวิจัยไดรวบรวมขอมูลและทำการวิเคราะหขอมูลที่ไดจาก 4 ภาคสวนรวมกัน ไดแก บทนำละความสำคัญ (introduction) ทบทวนวรรณกรรมและผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง (literature Review) ผลการศึกษา (results) นำผลการวิเคราะห์ดังกลาวมาประมวลพิจารณาออกมาจนได้ข้อสรุป (conclusion) ซึ่งก่อให้เกิดองค์ความรู้ทางวิทยาศาสตร์การแพทย์ในสาขาสรีรวิทยา (physiology) ในเรื่องการควบคุมสมดุลแมกนีเซียม (magnesium homeostasis) และการดูดซึมแมกนีเซียมในลำไส้ (intestinal magnesium absorption) ซึ่งปัจจุบันองค์ความรู้ในหัวข้อดังกล่าวยังไม่เพียงพอต่อการป้องกันภาวะความผิดปกติ อาทิ ภาวะแมกนีเซียมในเลือดต่ำ (hypomagnesemia) ซึ่งส่งผลกระทบต่อตัวผู้ป่วย รวมถึงเพิ่มความซับซ้อนของการรักษารวมถึงค่าใช้จ่ายให้สูงขึ้น หากสามารถอธิบายกลไกการควบคุมสมดุลแมกนีเซียมได้ นับเป็นประโยชน์อย่างมากต่อมนุษย์ในแง่ของการช่วยลดการสูญเสียงบประมาณในการรักษารวมถึงเป็นแนวทางหาวิธีป้องกันอันตรายจากความผิดปกติของระดับ Mg ในเลือดที่ต่ำ ซึ่งเป็นการป้องกันปัญหาสุขภาพตั้งแต่ในระดับชุมชนเนื่องจากเป็นภาวะแทรกซ้อนที่เกิดขึ้นมากถึงร้อยละ 12 ของผู้ป่วยที่รักษาตัวในโรงพยาบาลโดยเฉพาะผู้ป่วยโรคหัวใจและหลอดเลือด เบาหวานชนิดที่สอง

คณะผูวิจัย ขอขอบคุณคณะสหเวชศาสตร์ที่ใหการสนับสนุนคณะผูวิจัยอยางดียิ่งมาโดยตลอด ขอขอบคุณเจาหนาที่ทุกท่านของทางสถาบันที่ชวยดูแลงานดานเอกสารตาง ๆ และสุดทาย ขอขอบคุณคณะผูบริหารทุกทานทกรุณาใหขอมูลเพื่องานวิจัยครั้งนี้ จนสำเร็จลุลวงไปไดดวยดี

คณะผู้วิจัย

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานวิจัยทางวิทยาศาสตร์การแพทย์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยดี ด้วยความร่วมมือของนิสิตระดับปริญญาเอกและปริญญาโท ได้แก่ นางสาวณศิสรณ์ สุขศรีเดชาศิลป์ และนางสาวณัฐธิดา คำพวง รวมถึงนางสาวอติพร เจนจัดการ ผู้ช่วยวิจัยในห้องปฏิบัติการ MS212 ขอขอบคุณนักวิทยาศาสตร์การแพทย์ประจำคณะสหเวชศาสตร์ที่ช่วยดูแลการใช้ห้องปฏิบัติการ ให้คำแนะนำและอำนวยความสะดวกในการใช้เครื่องมือทุกชิ้นในคณะสหเวชศาสตร์ ขอขอบคุณผู้ใช้ห้องปฏิบัติการ MS213 ทุกท่าน ที่คอยช่วยเหลือซึ่งกันและกัน ทั้งการดูแลห้องปฏิบัติการให้สะอาดเรียบร้อย รวมไปถึงการเตรียมสารเคมีสำหรับใช้ในโครงงานวิจัย

สุดท้ายผู้วิจัยขอขอบพระคุณครอบครัว บุคคลอันเป็นที่รัก รวมถึงบุคคลที่มิได้เอ่ยนามที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการทำโครงงานวิจัยนี้ สำหรับกำลังใจและความห่วงใยตลอดจนความช่วยเหลือต่าง ๆ จนโครงงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

รศ.ดร.ณรงค์ฤทธิ์ ทองอุ่น

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ.....ก

Abstract .....ข

คำนำ.....ค

กิตติกรรมประกาศ .....ง

สารบัญ .....จ

สารบัญภาพ .....ฉ

บทที่ 1.....ฉ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....3

บทที่ 2.....5

2.1 การขนส่งแมกนีเซียมในลำไส้.....5

2.2 Fibroblast Growth Factor 23 (FGF-23).....9

2.3 Parathyroid hormone (PTH).....12

2.4 Klotho co-receptor.....15

2.4 Calcitriol (1,25$(OH)_2$D).....17

2.5 การขนส่ง Ca ในลำไส้.....17

2.6 สรุปความสัมพันธ์ระหว่าง PTH, FGF23 และ Mg.....20

บทที่ 3.....22

3.1 ประชากร 22

3.2 กลุ่มตัวอย่างและสุ่มตัวอย่าง.....22

3.3 การเก็บรวบรวมข้อมูล.....23

3.4 การวิเคราะห์ข้อมูล.....24

3.5 ระยะเวลาการวิจัย.....24

บทที่ 4.....25

4.1 ผลการวิจัย 25

4.2 อภิปรายผล 32

บทที่ 5.....35

5.1 สรุปผลการวิจัย 36

5.2 ข้อเสนอแนะ.....36

บรรณานุกรม 37

ภาคผนวก

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 1 : แสดงสมมติฐานงานวิจัย 3
ภาพที่ 2.1 : แสดงกลไกการดูดซึม Mg ในเซลล์เยื่อบุลำไส้ 5
ภาพที่ 2.2 : การควบคุมเซลล์เป้าหมายของ PTH 13
ภาพที่ 2.3 : แสดงยีน klotho, mRNA และโปรตีน 16
ภาพที่ 2.4 : ความสัมพันธุ์ของฮอร์โมน PTH, Vitamin D และ FGF23 (PTH-Vitamin D-FGF23 axis) .20
ภาพที่ 3.1 : แสดงการแบ่งกลุ่มสัตว์ทดลอง 22
ภาพที่ 3.2 : แสดงแผนการเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อของการทดลองที่ 1 23
ภาพที่ 3.3 : แสดงแผนการเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อของการทดลองที่ 2 24
ภาพที่ 4.1 : การดูดซึมแมกนีเซียมในลำไส้ของหนูกลุ่มควบคุม กลุ่ม PTH และกลุ่ม FGF23 ในศึกษาฤทธิ์ทั้งระบบ (systemic effect) แบบ *ex vivo* 25
ภาพที่ 4.2 : การดูดซึมแมกนีเซียมในลำไส้ของหนูกลุ่มควบคุม กลุ่ม PTH และกลุ่ม FGF23 ในศึกษาฤทธิ์โดยตรง (direct effect) แบบ e*x vivo* 26
ภาพที่ 4.3 : การดูดซึมแมกนีเซียมในลำไส้ของหนูกลุ่มควบคุม กลุ่ม PTH และกลุ่ม FGF23 ในศึกษาฤทธิ์ทั้งระบบ (systemic effect) แบบ *in vivo* 27
ภาพที่ 4.4 : การดูดซึมแมกนีเซียมในลำไส้ของหนูกลุ่มควบคุม กลุ่ม PTH และกลุ่ม FGF23 ในศึกษาฤทธิ์โดยตรง (direct effect) แบบ *in vivo* 28
ภาพที่ 4.5 : การเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางไฟฟ้าของหนูกลุ่มควบคุม กลุ่ม PTH และกลุ่ม FGF23 ในการศึกษาแบบ ex vivo 29
ภาพที่ 4.6 : การเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางไฟฟ้าของหนูกลุ่มควบคุม กลุ่ม PTH และกลุ่ม FGF23 ในการศึกษาแบบ in vivo 29
ภาพที่ 4.7 : แสดงการเปลี่ยนแปลงระดับแมกนีเซียมใน serum ของหนูกลุ่มควบคุม กลุ่ม PTH และกลุ่ม FGF23 ในการศึกษาแบบ *ex vivo* 30
ภาพที่ 4.8 : แสดงการเปลี่ยนแปลงระดับแมกนีเซียมใน serum ของหนูกลุ่มควบคุม กลุ่ม PTH และกลุ่ม FGF23 ในการศึกษาแบบ *in vivo* 30
ภาพที่ 4.9 : แสดงค่า pH ในทางเดินอาหารของหนูกลุ่มควบคุม กลุ่ม PTH และกลุ่ม FGF23 ในการศึกษาแบบ *ex vivo* 31
ภาพที่ 4.10 : แสดงค่า pH ในทางเดินอาหารของหนูกลุ่มควบคุม กลุ่ม PTH และกลุ่ม FGF23 ในการศึกษาแบบ *in vivo* 31
ภาพที่ 4.12 : การแสดงออกของโปรตีน TRPM6 ในลำไส้เล็กส่วนต่างๆ ของหนูกลุ่มควบคุม กลุ่ม PTH และกลุ่ม FGF23 (A) การทดลองที่ 1 ศึกษาแบบ e*x vivo* (B) การทดลองชุดที่ 2 ศึกษา i*n vivo* 32

ภาพที่ 4.13 : การแสดงออกของโปรตีน CNNM4 ในลำไส้เล็กส่วนต่างๆ ของหนูกลุ่มควบคุม กลุ่ม PTH และกลุ่ม FGF23 (A) การทดลองที่ 1 ศึกษาแบบ e*x vivo* (B) การทดลองชุดที่ 2 ศึกษา *in vivo* 32

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

Magnesium (Mg) เป็นไอออนบวกที่พบมากเป็นอันดับที่ 4 ในร่างกายมนุษย์ และเป็นอันดับ 2 ในเซลล์ (Glasdam et al., 2016) มีหน้าที่ควบคุมการทำงานของ ion channel การส่งสัญญาณในเซลล์ ควบคุมกระบวนการ energy metabolism และการเจริญเติบโตซึ่งเป็นกระบวนการพื้นฐานของเซลล์ (Saris et al., 2000) ระดับปกติของ Mg ในเลือด คือ 0.6-1.1 mmol/L หากต่ำกว่า 0.6 mmol/L เรียกว่า ภาวะแมกนีเซียมในเลือดต่ำ (hypomagnesemia) ซึ่งผู้ป่วยจะมีอาการซึมเศร้า เหนื่อยง่าย กล้ามเนื้อหดเกร็งหรืออ่อนแรง และอาจนำไปสู่อาการขั้นรุนแรง ได้แก่ หัวใจเต้นผิดจังหวะ และภาวะกล้ามเนื้อหดเกร็งและชักซึ่งเป็นอันตรายถึงชีวิต (de Baaij et al., 2015) จากรายงานทางการแพทย์พบว่าร้อยละ 12 ของผู้ป่วยที่รักษาตัวในโรงพยาบาลมีภาวะ hypomagnesemia ร่วมด้วย (Wong et al., 1983) ซึ่งส่งผลเพิ่มความรุนแรงของโรค เพิ่มความยากและงบประมาณในการรักษาโรค ดังนั้นการควบคุมระดับ Mg ในเลือดจึงมีความสำคัญ กลไกการรักษาสมดุล Mg ในร่างกายประกอบด้วยการขับออกทางไต เก็บสะสมไว้ที่กระดูกหรือกล้ามเนื้อ และดูดซึมทางลำไส้ซึ่งนับว่าสำคัญที่สุดในการรักษาสมดุล Mg เนื่องจากมนุษย์ได้รับ Mg ผ่านทางการบริโภคอาหารเท่านั้นและหากการดูดซึมบกพร่อง อาทิเช่น โรคความผิดปกติในระดับพันธุกรรมแต่กำเนิดที่เรียกว่า hypomagnesemia with secondary hypocalcemia (HSH) โดยมากทารกจะมีอาการชักเกร็งรุนแรงหากไม่ได้รับการรักษาจะส่งผลต่อพัฒนาการโดยสมองบางส่วนอาจถูกทำลายถาวร และเป็นอันตรายถึงชีวิต (Walder et al., 2002) แต่อย่างไรก็ตามกลไกควบคุมการดูดซึม Mg ในลำไส้นั้นยังไม่ทราบแน่ชัด

การดูดซึม Mg ของเซลล์ลำไส้เกิดขึ้นผ่าน 2 กระบวนการ คือ กลไกแบบผ่านเซลล์ (transcellular transport) และกลไกแบบผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์ (paracellular transport) ทั้งนี้ transcellular pathway ต้องอาศัยพลังงาน โดยใช้โปรตีน transient receptor potential melastatin (TRPM) 6 และ TRPM7 ที่วางตัวทางด้าน apical เป็น Mg channel ให้ Mg จาก luminal ไหลเข้าสู่ เซลล์ลำไส้ (enterocyte) ตามความแตกต่างของความเข้มข้น (concentration gradient) และใช้ ancient conserved domain protein 4 (CNNM4) ซึ่งเป็น Na^{+}/Mg^{2+} exchanger บริเวณ basolateral ขนส่ง Mg จาก enterocyte เข้าสู่กระแสเลือด ในรูปแบบ secondary active transport การ mutation ของยีน TRPM6 เป็นสาเหตุของโรค HSH ส่งผลให้การดูดซึม Mg ที่ลำไส้ผิดปกติ (Walder et al., 2002) ส่วน paracellular transport เป็นกระบวนการที่ไม่ต้องอาศัยพลังงาน ควบคุมโดยโปรตีนใน tight junction เช่น claudin (cldn) 16, -19 (de Baaij et al., 2015) ในลำไส้เล็กของหนูนั้นพบ cldn-2,-7,-12 และ cldn-15 แต่ยังไม่ทราบแน่ชัดว่า cldn ชนิดใดเกี่ยวข้องกับการขนส่ง Mg ในลำไส้

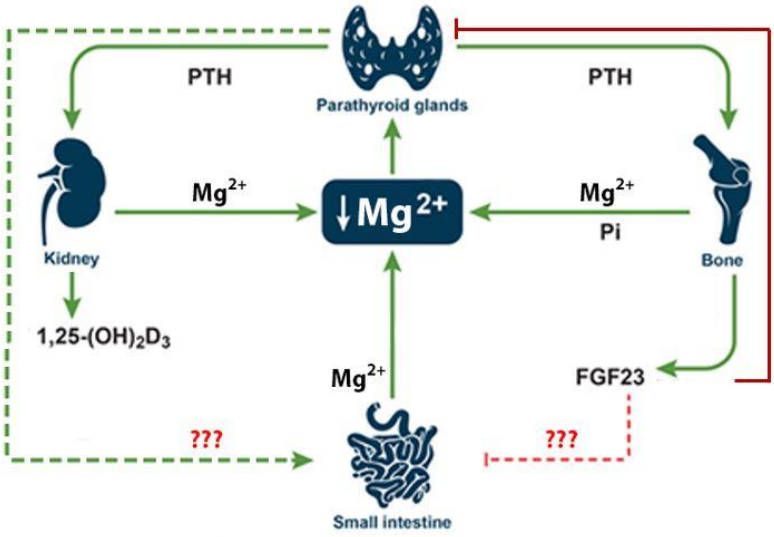
PTH เป็นฮอร์โมนหลักในการควบคุมระดับ divalent cation Calcium (Ca) ในกระแสเลือด ภาวะ Ca ในเลือดต่ำ (hypocalcemia) กระตุ้นให้ PTH หลั่งจากต่อม parathyroid ออกฤทธิ์กระตุ้นการสลายกระดูก เพิ่มการดูดกลับ Ca เพิ่มการขับ phosphate ที่ไต เพิ่มการดูดซึม Ca และ phosphate ลำไส้ โดยอาศัย $1,25(OH)_2D$ (calcitriol) ที่สังเคราะห์จากไต การเพิ่มขึ้นของระดับ phosphate ในกระแสเลือดกระตุ้นให้เซลล์กระดูกหลั่ง FGF23 ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการหลั่ง PTH ลดการสังเคราะห์ calcitriol ลดการดูดกลับ phosphate ทางไต ผ่าน FGF receptor/Klotho complex อย่างไรก็ตาม นอกจาก Ca แล้ว PTH ยังมีผลต่อสมดุล Mg อีกด้วย จากการศึกษาก่อนหน้าพบว่า PTH กระตุ้นให้เกิดการปล่อย Mg จากกระดูก เพิ่มการดูดกลับ Mg บริเวณ loop of Henle และท่อขดส่วนปลายของหน่วยไต กระตุ้นให้เกิดการสังเคราะห์ vitamin D ที่ไต (Bailly et al., 1985; Morel, 1981; Quamme, 1997) ส่วนฤทธิ์ต่อลำไส้นั้นยังไม่แน่ชัด แต่การศึกษาโดยฉีด PTH เข้าสู่ร่างกายในสุนัข (Durlach et al., 1959) หนูแรท (MacManus et al., 1971; Saris et al., 2000) และแฮมสเตอร์ (Harris et al., 1979) พบว่าความเข้มข้นของ Ca และ Mg ในเลือดสูงขึ้น และจากการทดลองตัดต่อม parathyroid พบว่าสัตว์ทดลองมีระดับ Mg ต่ำ ทั้งในกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติและกลุ่มที่ได้รับอาหาร Mg ต่ำ (Clark & Rivera-Cordero, 1974; Heaton, 1965) จากข้อมูลดังกล่าวเป็นไปได้ว่าการตัดต่อม parathyroid น่าจะส่งผลกดการดูดซึม Mg ในลำไส้ นอกจากนั้นการทดลองโดยฉีด PTH ให้หนูทดลองมีผลเพิ่มการดูดซึม Mg ในลำไส้ (MacIntyre & Robinson, 1969) แต่วิธี ligated loops ที่ใช้ในการทดลองนี้เป็นเทคนิคที่เก่า มีข้อจำกัดมาก อาจทำให้เกิดความผิดพลาดสูง แต่จากงานวิจัยที่ผ่านมา ยังไม่สามารถสรุปได้ว่า PTH ส่งผลต่อการดูดซึม Mg ในลำไส้อย่างไร

นอกจากฤทธิ์ขับ phosphate ที่ได้อธิบายไปข้างต้นแล้ว อย่างไรก็ตามมีงานวิจัยที่ศึกษาฤทธิ์ของ FGF23 ต่อการดูดซึม Ca ในลำไส้โดยตรง Khuituan และคณะพบว่า FGF23 ยับยั้งการเพิ่มขึ้นของโปรตีน TRPV5, TRPV6, calbindin-D9k ที่เป็นผลมาจากฤทธิ์ของ 1,25(OH)2D ใน duodenal epithelial cells ของหนูทดลอง ซึ่งโปรตีนดังกล่าวจำเป็นต่อการดูดซึม Ca ผ่าน transcellular active transport (Khuituan et al., 2012) บ่งชี้ได้ว่า FGF23 มีฤทธิ์ควบคุมการดูดซึมไอออนในลำไส้โดยตรง นอกจากนั้นยังพบการเพิ่มขึ้นของ FGF23 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในสัตว์ทดลองที่มีภาวะ hypomagnesemia (van den Broek et al., 2018) รวมถึงหนูกลุ่มที่มีการดูดซึม Mg ลดลง ได้แก่ กลุ่มที่ได้รับอาหาร Mg ต่ำ (Matsuzaki et al., 2013, 2016) และกลุ่มที่มีการกลายพันธุ์ของยีน TRPM7 (Elizondo et al., 2010) อย่างไรก็ตามฤทธิ์โดยตรงของ FGF23 ต่อการดูดซึม Mg ในลำไส้ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด แต่จากข้อมูลดังกล่าวอาจเป็นไปได้ว่า FGF23 กดการดูดซึม Mg ในลำไส้โดยลดการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการขนส่ง Mg เช่น TRPM6,7 เช่นเดียวกับฤทธิ์ของ FGF23 ต่อการรักษาสมดุล Ca

อย่างไรก็ตาม จากการศึกษาที่ผ่านมายังไม่สามารถสรุปกลไกการควบคุมการดูดซึม Mg ได้อย่างชัดเจนการศึกษาก่อนหน้ารวมถึงข้อมูลทางการแพทย์หลายฉบับ บ่งชี้ว่าการได้รับยา proton pump inhibitor (PPI) เป็นเวลานานทำให้ Mg ในเลือดต่ำ (Cundy & Dissanayake, 2008; Luk et al., 2013; Mackay & Bladon, 2010) โดยน่าจะเป็นผลมาจากการที่ PPI มีฤทธิ์กดการดูดซึม Mg ในลำไส้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทั้งในสัตว์ทดลองและแผ่นเซลล์เพาะเลี้ยง (Thongon et al., 2016; Thongon &

Krishnamra, 2011) นอกจากนั้นยังพบการเปลี่ยนแปลงของ FGF23 และ PTH ในหนูกลุ่มที่ได้รับยา PPI อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ การดูดซึม Mg นั้นเกิดในลำไส้เล็กเป็นส่วนใหญ่โดยเฉพาะในส่วนดูโอดีนัม (Ahmed & Mohammed, 2019; de Baaij et al., 2015) ในเซลล์วิลลัสของดูโอดีนัม มีการแสดงออกของ PTHR1 เป็นหลัก (Gentili et al., 2003; Laohapitakworn et al., 2011) และพบการแสดงออกของ FGFR1-4 ที่บริเวณ basolateral และ apical รวมถึงใน cytoplasm (Khuituan et al., 2012) เป็นไปได้ว่าฮอร์โมนดังกล่าวมีฤทธิ์ควบคุมการดูดซึม Mg แต่กลไกนั้นยังไม่ทราบแน่ชัด

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งศึกษาฤทธิ์ของ PTH และ FGF23 ต่อการดูดซึม Mg ในลำไส้เล็กของหนูทดลองส่วนดูโอดีนัมเป็นหลัก โดยศึกษาการขนส่ง Mg ทั้งแบบ transcellular และ paracellular pathway ร่วมกับคุณสมบัติทางไฟฟ้า และศึกษาโปรตีนที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ TRPM6,7 และ CNNM4 โดยสมมติฐานของงานวิจัยคือ PTH น่าจะมีฤทธิ์เพิ่มการดูดซึม Mg ผ่านการเพิ่มแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้อง FGF23 มีฤทธิ์กดการดูดซึม Mg ผ่านการลดการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้อง หรือฮอร์โมนทั้งสองเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางไฟฟ้าของเยื่อบุลำไส้เล็ก



ภาพที่ 1 แสดงสมมติฐานงานวิจัย

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. ศึกษาการแสดงออกของ TRPM6,7 และ CNNM4 ซึ่งเป็นโปรตีนที่ใช้ในการขนส่ง Mg ในลำไส้เล็กของหนูทดลอง
2. ศึกษาฤทธิ์ของฮอร์โมน PTH และ FGF23 ต่อการแสดงออกของ TRPM6,7 และ CNNM4
3. ศึกษาฤทธิ์ระยะสั้น (short term effect) ของ PTH และ FGF23 ต่อการขนส่ง Mg ในลำไส้เล็กของหนูทดลองแบบ *ex vivo*

3.1 ศึกษาฤทธิ์ทั้งระบบ (systemic effect)

3.2 ศึกษาฤทธิ์โดยตรง (direct effect)

3.3 ศึกษาฤทธิ์ต่อการการเปลี่ยนแปลงทางไฟฟ้า

4. ศึกษาฤทธิ์ระยะสั้น (short term effect) ของ PTH และ FGF23 แบบ *in vivo*

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ผู้ป่วยที่มีระดับ Mg ในเลือดต่ำ (Hypomagnesemia) จะมีอาการซึมเศร้า เหนื่อยง่าย กล้ามเนื้อหดเกร็งหรืออ่อนแรง และอาจนำไปสู่อาการขั้นรุนแรง ได้แก่ หัวใจเต้นผิดจังหวะ และภาวะกล้ามเนื้อหดเกร็งและชักซึ่งเป็นอันตรายถึงชีวิตต่อผู้ป่วย จากรายงานทางการแพทย์พบว่าร้อยละ 12 ของผู้ป่วยที่รักษาตัวในโรงพยาบาลมีภาวะ hypomagnesemia ร่วมด้วย โดยระดับของ Mg ในเลือดที่ต่ำนี้เกี่ยวข้องกับการพัฒนาของโรครวมทั้งเพิ่มความเสี่ยงในการเสียชีวิต โดยเฉพาะในผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 2 ผู้ป่วยโรคตับและผู้ป่วยโรคหัวใจและหลอดเลือด จะเห็นว่าระดับ Mg ที่ผิดปกติส่งผลเพิ่มความรุนแรงของโรค เพิ่มความยากและงบประมาณในการรักษาโรค ดังนั้นหากทราบกลไกการควบคุมสมดุล Mg จึงนับเป็นประโยชน์อย่างมากต่อมนุษย์ในแง่ของการช่วยลดการสูญเสียงบประมาณในการรักษารวมถึงเป็นแนวทางหาวิธีป้องกันอันตรายจากความผิดปกติของระดับ Mg ในเลือดที่ต่ำ

1.4 ขอบเขตของการวิจัย

กลุ่มตัวอย่าง ได้แก่ หนูทดลองสายพันธุ์ Sprague dawley (สปีชีส์ Rattus norvegicus) เพศผู้ อายุ 8 สัปดาห์ จำนวน 36 ตัว

ตัวแปรอิสระ ได้แก่ การให้ฮอร์โมน Parathyroid และ FGF23 เข้าสู่ร่างกายสัตว์ทดลองโดยการฉีด และการให้ MgO โดยการป้อนเข้าสู่ระบบทางเดินอาหารของสัตว์ทดลอง

ตัวแปรตาม ได้แก่ อัตราการดูดซึมแมกนีเซียมในลำไส้เล็ก, คุณสมบัติทางไฟฟ้าของลำไส้เล็ก, ระดับการแสดงออกโปรตีน TRPM6,7 และ CNNM4 ในลำไส้เล็ก

1.5 นิยามศัพท์

การดูดซึมแมกนีเซียม หมายถึง การขนส่งแมกนีเซียมจากฝั่งโพรงลำไส้ไปที่ระบบหลอดเลือด

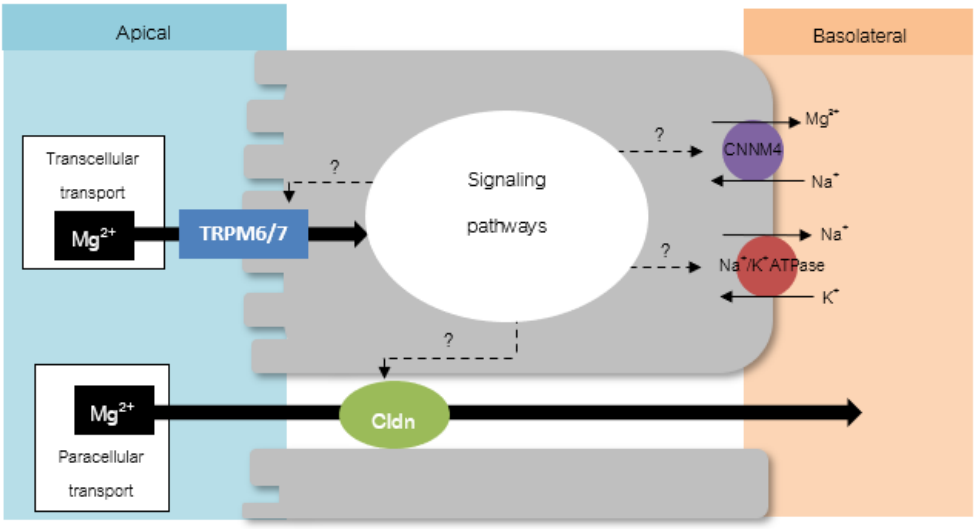
Hypomagnesemia หมายถึง ภาวะที่มีความเข้มข้นของแมกนีเซียมในเลือดต่ำกว่า 0.6 mM

บทที่ 2
วรรณกรรมและผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

โดยปกติร่างกายได้รับ Mg จากการกินประมาณ 300 mg ต่อวัน แต่ปริมาณเพียงร้อยละ 40-70 เท่านั้นที่ถูกดูดซึมในลำไส้ ทั้งนี้การดูดซึมขึ้นอยู่กับปริมาณ Mg ที่ถูกสะสมในร่างกายขณะนั้นและปริมาณในอาหารที่ได้รับ

2.1 การขนส่งแมกนีเซียมในลำไส้

ตลอดความยาวของลำไส้มีความสามารถในการดูดซึม Mg ผ่าน 2 กลไกหลักคือ passive paracellular transport และ active transcellular transport (de Baaij, Hoenderop, & Bindels, 2015; Rude & Gruber, 2004) (รูปที่ 2.1)



ภาพที่ 2.1 แสดงกลไกการดูดซึม Mg ในเซลล์เยื่อบุลำไส้

2.1.1 Passive paracellular transport – เป็นกระบวนการที่สำคัญมากเนื่องจากเกิดขึ้นถึงร้อยละ 90 ของการดูดซึม Mg ทั้งหมด (Thongon, Nakkrasae, Thongbunchoo, Krishnamra, & Charoenphandhu, 2009) จำเป็นต้องอาศัย 2 กลไก ได้แก่ concentration dependent อาศัยแรงขับเคลื่อนจากความแตกต่างของความเข้มข้น (concentration gradient) โดยด้านโพรงลำไส้มีความเข้มข้นประมาณ 5 mM ซึ่งมากกว่าด้าน basolateral ที่มีค่าประมาณ 1.1 mM (Lowenstein & Stanton, 1986) และกลไกแบบ voltage dependent อาศัยความแตกต่างของศักย์ไฟฟ้า (electrochemical gradient) โดยด้านโพรงลำไส้มีศักย์เป็นค่าบวกประมาณ 5 mV แต่ด้าน basolateral มีศักย์เป็นลบจึงเกิดการไหลของประจุจากศักย์สูงไปศักย์ต่ำ ทั้งนี้แรงขับเคลื่อนสองชนิด ส่งผลให้ Mg ในรูป

ธาตุอิสระ (Mg^{2+}) (Quamme, 2008) เคลื่อนที่จากฝั่งโพรงลำไส้ผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์ (paracellular space) เข้าสู่กระแสเลือดโดยไม่ต้องอาศัยพลังงานในกระบวนการขนส่ง (passive mechanism) จากการศึกษาพบว่าหาก luminal Mg มีความเข้มข้นมาก ความสามารถในการดูดซึม Mg ผ่าน paracellular transport จะเพิ่มขึ้นตาม โดยเฉพาะในลำไส้เล็กส่วนท้าย เช่น jejunum และ ileum (Hardwick, Jones, Brautbar, & Lee, 1991) ทั้งนี้การขนส่ง Mg แบบ paracellular transport สามารถควบคุม หรือปรับเปลี่ยนได้ ผ่านการทำงานของโปรตีนภายใน tight junction (TJ) ที่ยึดเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้แต่ละเซลล์เข้าด้วยกัน

TJ ทำให้เซลล์เกิดคุณสมบัติ polarization หมายถึงการแบ่งด้าน apical ออกจากด้าน basolateral ทั้งนี้ TJ แบ่งเป็น 2 กลุ่มได้แก่ cytoplasmic plaque และ transmembrane protein ซึ่งแบ่งเป็น claudin family, occludin family และ IgG-like family of junctional adhesion molecules (JAMs) (Niessen, 2007) จากการศึกษาพบ claudins (cldn) กว่า 24 ชนิด โครงสร้างของ cldn คือ 2 extracellular domain และ 1 intracellular domain ซึ่งมี N- และ C-terminal อยู่ฝั่ง cytoplasm (Van Itallie & Anderson, 2004) cldn จะมีการรวมตัวกันใน TJ แบบสุ่มทำให้เกิดคุณสมบัติหลายประการขึ้นอยู่กับสัดส่วนการรวมกัน โดยแบ่งเป็น กลุ่มที่ทำหน้าที่รักษาเสถียรภาพ (integrity) คงความแข็งแรงของ TJ กลุ่มที่ทำให้เกิดคุณสมบัติการคัดเลือดขนาดของโมเลกุล (size-selectivity) และกลุ่มที่ทำให้เกิดคุณสมบัติการคัดเลือกประจุ (charge-selectivity) เช่น cldn-2, -7, -10, -15, -16, และ -17 เป็นต้น (Tanaka et al., 2016) มีรายงานว่า cldn-2 และ -12 เป็น paracellular channels สำหรับ divalent cation เช่น Calcium (Ca) (Fujita et al., 2006) cldn-7 มี permeable ต่อ sodium (Na) (Alexandre, Lu, & Chen, 2005) และพบการแสดงออกของ cldn-2, -7, และ -12 มากในลำไส้เล็กส่วน jejunum, ileum, และ Caco-2 cells (Fujita et al., 2006; Fujita et al., 2008) ผลการศึกษาของ Thongon และคณะ พบว่า cldn-7 และ 12 มีส่วนช่วยเพิ่มการดูดซึม Mg ในแผ่นเซลล์เพาะเลี้ยงเยื่อบุลำไส้ (Thongon & Krishnamra, 2012) อย่างไรก็ตาม จากการศึกษาที่ผ่านมายังไม่สามารถสรุปกลไกการควบคุมการดูดซึม Mg ได้อย่างชัดเจน

โมเลกุลใน TJ ควบคุมโดย signaling molecule ที่หลากหลาย เช่น G proteins, phospholipase C, cAMP, protein kinase C, intracellular Ca^{2+}, diacylglycerol, and mitogen-activated protein kinase (MAPK) and MAPK/extracellular-signal-regulated kinase kinase 1 (MEK1) หากมีการจับของ receptor แล้วกระตุ้น signaling molecule เหล่านี้อาจทำให้เกิดการ

เปลี่ยนแปลงของ phosphorylation state ของ TJ protein ส่งผลต่อ permeability ของ paracellular transport (Van Itallie & Anderson, 2006)

การควบคุมการแสดงออกของ cldn ในลำไส้ ขึ้นอยู่กับ genes และโปรตีนที่เกี่ยวข้อง เช่น cldn-2 ควบคุมด้วย Cdx1 และ Cdx2 ซึ่งเป็น transcription factor (TF) โดยจะไปกระตุ้น cldn-2 promoter ใน caco-2 cell ซึ่งมักใช้ศึกษาระบบลำไส้ของมนุษย์ ที่ทำให้เกิดการ differentiation ของ intestinal epithelium (Sakaguchi et al., 2002) จากการศึกษาพบว่า cldn-2, -3, -7 และ -15 จะมารวมกลุ่มกันที่ TJ ของ mouse intestinal epithelium โดยการกระตุ้น EpCAM และหากมีการ mutation ของ EpCAM จะทำให้ cldn ในกลุ่มนี้แสดงออกน้อยลงและส่งผลรบกวนโครงสร้างของ TJ (Lei et al., 2012) นอกจากนั้นยังพบว่าหาก knockout Sodium proton exchangers (NHEs) ในหนู ทำให้การแสดงออกของ cldn-2 และ -15 ลดลง (Pan et al., 2012) จากการศึกษาพบว่าในลำไส้เล็กของหนูแรทนั้นพบเพียงการแสดงออกของ cldn-2,-7,-12,-5 แต่อย่างไรก็ตาม ยังไม่สามารถระบุได้ว่า cldn ชนิดใดเกี่ยวข้องกับการขนส่ง Mg ในลำไส้

2.1.2 Active transcellular transport – การดูดซึม Mg แบบ active transcellular เกิดทั้งในลำไส้เล็กและ colon (Schweigel & Martens, 2000; Thongon, Penguy, Kulwong, Khongmueang, & Thongma, 2016; Tong & Rude, 2005) มีบทบาทสำคัญเมื่อร่างกายได้รับอาหารที่มีระดับ Mg ต่ำ (Quamme, 2008) ดังนั้นการขนส่งแบบ transcellular epithelium จึงเป็นการขนส่ง ion ที่ต้าน concentration gradient ต้องอาศัย transporter protein และพลังงาน หรือเรียกว่า active transport อาศัยการทำงานของโปรตีนที่สำคัญคือ TRPM6 และ TRPM7 ที่วางตัวทางฝั่ง apical เป็น Mg channel ดึง Mg จากฝั่ง luminal เข้ามาใน enterocyte และใช้ CNNM4 ซึ่งเป็น Na^{+}/Mg^{2+} exchanger ทางฝั่ง basolateral ช่วยผลัก Mg จาก enterocyte เข้าสู่กระแสเลือด (Schlingmann, Waldegger, Konrad, Chubanov, & Gudermann, 2007) TRPM6 และ TRPM7 ในรูปที่ active จะถูกยับยั้งโดย free Mg และ MgATP ใน cytoplasm ที่เพิ่มขึ้น (Penner & Fleig, 2007) จากการศึกษาพบว่าการ mutation ของ TRPM6 เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคความผิดปกติทางพันธุกรรม ที่เรียกว่า hypomagnesemia with secondary hypocalcemia (HSH) โดยเกิดความบกพร่องของการดูดซึม Mg แบบ active transcellular absorption ทั้งในทางเดินอาหารและที่ไต ส่งผลให้ระดับ Mg ในกระแสเลือดต่ำ (Dudin & Teebi, 1987; Schlingmann et al., 2002; Walder et al., 2002) ตำแหน่งการแสดงออกพบว่า TRPM6 กระจายอยู่ในลำไส้เล็ก ลำไส้ใหญ่ส่วน colon และ distal convoluted tubule (DCT) ในหน่วยไต (Groenestege, Hoenderop, van den Heuvel, Knoers, & Bindels, 2006; Voets et al., 2004)

โครงสร้างของ TRPM6 ประกอบด้วย intracellular amino-terminus ขนาดใหญ่ membrane-spanning 6 domain ทำให้เกิดโครงสร้างเป็นช่องให้สารผ่าน บริเวณที่ยึดกับ carboxy-terminus คือ α-kinase domain (Montell, 2003) ในการศึกษา functional expression พบว่าการแสดงออกของ TRPM6 ที่ cell membrane จำเป็นต้องมีการแสดงออกของ TRPM7 ร่วมด้วย (co-expression) จะได้โครงสร้างแบบ heteromeric ion channels (Chubanov et al., 2004; Schmitz et al., 2005) TRPM7 นั้นพบการแสดงออกอยู่ทั่วไป มี permeability ต่อ divalent cation ที่หลากหลาย เช่น Zn, Co, Mn พบว่า TRPM7 มี permeability ต่อ Mg มากกว่า Ca เล็กน้อย (Monteilh-Zoller et al., 2003; Nadler et al., 2001; Schmitz et al., 2003) จากการศึกษาในปี 2016 ใน human embryonic kidney 293 (HEK293) cells พบว่า cAMP signaling กระตุ้นการสะสมของ TRPM6 ที่ plasma membrane รวมถึงเพิ่ม single-channel conductance ของ channel นี้ด้วย (Blanchard et al., 2016) TRMP6 และ TRPM7 ประกอบไปด้วย α-kinase domain ที่มีหน้าที่สำคัญในการควบคุม channel activity ในขณะที่ TRPM7 มีกระบวนการ auto-phosphorylation เป็นกลไกควบคุม channel activity (Cao et al., 2008; Schmitz et al., 2003) TRPM6 นั้นถูกยับยั้งได้ด้วย Co(III) hexaamine แบบ voltage-dependent manner

การควบคุม TRPM6 แบบเฉพาะที่ได้จากการศึกษาโรคทางพันธุกรรมชื่อ isolated autosomal recessive hypomagnesemia (IRH) ซึ่งทำให้เกิดการสูญเสีย Mg อย่างรุนแรง (Groenestege et al., 2006) พบว่าผู้ป่วยมีการ mutation ของยีนที่สร้าง epithelial growth factor (EGF) และ TRPM6 โดยการ mutation เกิดที่ cytosolic carboxy-terminus ในรูปแบบ conserved basolateral-sorting motif (PXXP) หากให้ EGF กับเซลล์ที่มีการแสดงออกของ TRPM6 พบว่าทำให้ channel นี้มี activity มากขึ้น แต่หากเลี้ยงเซลล์ด้วยอาหารที่มี mutant EGF พบว่า TRPM6 จะไม่ถูกกระตุ้น (Groenestege et al., 2006) การศึกษาการควบคุม TRPM6 ทั้งระบบ พบว่าหากได้รับ Mg จากอาหารน้อยลงจะเป็นการกระตุ้นให้มีการดูดกลับ Mg ตลอดท่อ DCT (Quamme, 1993; Shils, 1969) ในหนูที่ได้รับอาหารที่ไม่มี Mg พบว่ามีการแสดงออกของ TRPM6 มากขึ้นที่ colon, cecum, DCT (Groenestege et al., 2006) จากการศึกษาพบว่า vitamin D และ parathyroid hormone มีฤทธิ์เพิ่มการ influx ของ Mg ที่ DCT (Dai et al., 2001; Quamme, 1986) จากข้อมูลข้างต้นจะเห็นว่า TRPM6 และ TRPM7 นั้นมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการขนส่ง Mg แบบ transcellular transport แต่กลไกในการควบคุมการแสดงออกของโปรตีนดังกล่าว รวมถึงการส่งสัญญาณภายในเซลล์นั้นยังไม่ทราบแน่ชัด

2.2 Fibroblast Growth Factor 23 (FGF-23)

FGF23 เป็นสมาชิกของ FGF19 subfamily ถูกค้นพบครั้งแรกใน ventrolateral thalamic nucleus ของหนู mouse (Yamashita, Yoshioka, & Itoh, 2000) FGF23 ถูกสังเคราะห์มาจาก osteoblast และ osteocyte ในกระดูก มีหน้าที่หลักคือควบคุมสมดุล phosphate โดยถูกกระตุ้นด้วย Parathyroid hormone (PTH) และ $1,25(OH)_2D$ ซึ่งมีฤทธิ์กระตุ้นกระบวนการสลายกระดูกเพื่อเพิ่มระดับ Ca ในเลือด ทั้งนี้ส่งผลให้ระดับ phosphate สูงขึ้นด้วย FGF23 จึงมีฤทธิ์ขับ phosphate ออกทางปัสสาวะ ยับยั้งการหลั่ง PTH ที่ต่อม parathyroid ยับยั้งการสร้าง $1,25(OH)_2D_3$ โดยลดการแสดงออกของ 1α-hydroxylase และเพิ่มการแสดงออกของ 24-hydroxylase ในท่อไตส่วนต้น (proximal renal tubule) เพื่อรักษาสมดุล phosphate ในกระแสเลือด (Juppner, 2011; Martin, David, & Quarles, 2012) การมี FGF23 ในระบบไหลเวียนมากเกินไปก่อให้เกิดภาวะขับ phosphate ทิ้งมากกว่าปกติ เช่น tumorinduced osteomalacia (TIO), autosomal dominant hypophosphatemic rickets (ADHR), autosomal recessive hypophosphatemic rickets (ARHR) หรือ X-linked hypophosphatemic rickets (XLH) (Baroncelli, Toschi, & Bertelloni, 2012) จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า FGF23 นอกจากมีฤทธิ์ต่อสมดุล phosphate แล้วยังเกี่ยวข้องกับการควบคุมสมดุลแร่ธาตุตัวอื่น เช่น Ca และ Mg อีกด้วย

2.2.1 FGF-23 receptor และ signaling pathways

FGF receptor (FGFR) มีทั้งหมด 4 isoforms ได้แก่ FGFR1-4 ซึ่งเป็นประเภท tyrosine kinase receptor ทั้งหมด (Ornitz & Itoh, 2015) FGFs ที่ทำหน้าที่เป็นฮอร์โมน เช่น FGF23 นั้นไม่มี haparan sulfate binding domain และต้องการการแสดงออกของ Klotho เป็น co-receptor เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการจับกับ FGFR ที่แสดงออกอยู่บนเนื้อเยื่อเป้าหมายให้สูงขึ้น (Urakawa et al., 2006) เช่น FGFR1c/Klotho receptor complex มี binding affinity สูงกว่า FGFR1c ลำพัง (Goetz et al., 2012) Klotho เป็น transmembrane protein ที่มีการแสดงออกในเนื้อเยื่อหลายชนิด แต่มีการแสดงออกใน distal และ proximal tubule ในไต choroid plexus ในสมองและ parathyroid gland เป็นหลัก (Shiraki-Iida et al., 1998; Urakawa et al., 2006) เมื่อ FGF จับกับ FGFR-Klotho complex จะส่งสัญญาณผ่าน mitogen-activated protein kinase (MAPK) cascade และกระตุ้น signaling molecule ต่างๆ ได้แก่ FRS2, Gab1, Shc, PLC, หรือ STAT1 ส่งผลให้เกิดกระบวนการสำคัญในเซลล์ เช่น กระตุ้นให้เกิด gene expression ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของ FGFR ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการนั้นๆ (Martin et al., 2012)

2.2.2 FGF-23 และ electrolyte balance

2.2.2.1 ผลของ FGF-23 ต่อไต

ฤทธิ์ในการควบคุมระดับ phosphate ของ FGF23 เกิดขึ้นที่ท่อไตส่วนต้น (proximal renal tubule) FGF23 ลดการแสดงออกของ type IIa sodiumphosphate cotransporters (NaPi-2a) Weinman และคณะศึกษาการส่งสัญญาณภายในเซลล์โดยศึกษาในเซลล์เพาะเลี้ยง primary proximal

tubule cell พบว่า FGF ส่งสัญญาณผ่าน FGFR1c/Klotho receptor complex โดยกระตุ้นไปยัง extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 (ERK1/2) และ serum/glucocorticoid-regulated kinase 1 (SGK1) นำไปสู่การ internalization และ degradation ของ NaPi-2a/NHERF-1 (Na^+/H^+ Exchanger Regulatory Factor) complex โดยเกิด phosphorylation ที่ NHERF-1 ซึ่งเป็น anchoring protein (Weinman, Steplock, Shenolikar, & Biswas, 2011) การลดลงของ NaPi-2a ที่ apical membrane ส่งผลลดการดูดกลับ และเพิ่มการขับ phosphate ทางปัสสาวะ ส่วนฤทธิ์ในการลดระดับ $1,25(OH)_2D$ (calcitriol) ของ FGF23 เกิดขึ้นที่ proximal renal tubule เช่นกัน Shimada และคณะศึกษาฤทธิ์ของ FGF23 ในหนู mice พบว่า FGF23 มีฤทธิ์กดการสร้าง $1,25(OH)_2D$ โดยลดการแสดงออกของ 1α-hydroxylase และเพิ่มการแสดงออกของ 24-hydroxylase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ใช้สร้างและสลาย $1,25(OH)_2D$ ตามลำดับ ส่งผลให้ระดับ $1,25(OH)_2D$ ในระบบไหลเวียนต่ำลง (Shimada, Hasegawa, et al., 2004; Shimada et al., 2005)

นอกจากนั้นยังพบว่า FGF23 ควบคุมการขนส่ง Ca และ sodium (Na) ที่ distal renal tubule โดยเพิ่มการแสดงออกของ epithelial calcium channel transient receptor potential vanilloid-5 (TRPV5) และ Na^+:Cl co-transporter (NCC) ผ่าน Klotho-dependent signaling cascade ทำให้เกิดการ activation ของ ERK1/2, SGK1, และ with-no lysine kinase-4 (WNK4) *in vivo* ส่งผลเพิ่มการดูดกลับและลดการสูญเสีย Ca และ sodium ทางไต (Andrukhova, Slavic, et al., 2014; Andrukhova, Smorodchenko, et al., 2014) เช่นเดียวกับรายงานของ Han และคณะที่ศึกษาในหนูทดลองที่ถูก knockout *Fgfr1* ใน distal renal tubule พบว่าหนูทดลองมีการสูญเสีย Ca ทางไต (Han et al., 2016)

2.2.2.2 ผลของ FGF-23 ต่อกระดูก

FGF23 ส่งผลต่อ bone metabolism, cellular function และ mineralization โดยควบคุมผ่านทาง $1,25(OH)_2D$ และ PTH ซึ่งล้วนเป็นฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับกระดูกและระดับ Ca ในหนู mice ที่มีการ overexpression ของ FGF23 ส่งผลให้เกิด hypophosphatemia ระดับ $1,25(OH)_2D$ ลดลงและมีภาวะ rickets/osteomalacia หรือโรคกระดูกบาง (Shimada, Urakawa, et al., 2004) บริเวณ growth plate ของกระดูกหนาตัวขึ้นและมีการจัดเรียงตัวไม่เป็นระเบียบรวมถึงความหนาแน่นของมวลกระดูก (bone mineral density) ลดลง แม้ว่าความผิดปกติของการสะสมแร่ธาตุในกระดูก (skeletal mineralization) ที่พบในผู้ป่วยและสัตว์ทดลองที่มี FGF23 สูงคล้ายว่าเป็นผลมาจากระดับ phosphate และ $1,25(OH)_2D$ ต่ำ แต่การให้ FGF23 treatment แก่ primary calvarial osteoblast จากหนู wild-type (Sitara et al., 2008) และเซลล์เพาะเลี้ยง MC3TC-E1 ที่เป็น osteoblast-like cells (Shalhoub et al., 2011) ส่งผลยับยั้งกระบวนการ mineralization และกดการ differentiation และ proliferation ของ osteoblast (Wang et al., 2008) ส่วนในสัตว์ทดลองที่ FGF deficiency นั้นเกิดภาวะ hyperphosphatemia, hypervitaminosis D อย่างรุนแรง และมี Ca ในระบบไหลเวียนเพิ่มสูง (Shimada, Kakitani, et al., 2004; Sitara et al., 2004) โดยส่งผลให้ hypertrophic chondrocyte

บริเวณ growth plate ขาดหายไป รวมถึง mineralized bone mass ลดลง ในขณะที่ osteoid เพิ่มขึ้น (Shimada, Kakitani, et al., 2004; Stubbs et al., 2007)

2.2.2.3 ผลของ FGF-23 ต่อระบบทางเดินอาหาร

FGF23 ลดการดูดซึม phosphate ที่ลำไส้ เนื่องจาก FGF23 มีฤทธิ์ลดการสังเคราะห์ $1,25(OH)_2D$ ในไต ซึ่ง $1,25(OH)_2D$ เป็นฮอร์โมนที่เพิ่มการดูดซึม phosphate และ Ca ที่ลำไส้ เมื่อ $1,25(OH)_2D$ ในระบบไหลเวียนต่ำลง การดูดซึม phosphate จึงลดลง จากการศึกษาพบว่าในมนุษย์และหนูทดลอง $1,25(OH)_2D$ มีฤทธิ์เพิ่มการขนส่ง Ca แบบ transcellular active transport โดยเฉพาะใน duodenal villous epithelial cells (Bikle, Zolock, & Munson, 1984; Kellett, 2011) กล่าวได้ว่า FGF23 นั้นมีฤทธิ์ทางอ้อมต่อการควบคุมสมดุล Ca อย่างไรก็ตามมีงานวิจัยที่ศึกษาฤทธิ์ของ FGF23 ต่อการดูดซึม Ca ในลำไส้โดยตรง Khuituan และคณะพบว่า FGF23 ควบคุมการดูดซึม Ca ในลำไส้โดยตรง มีกลไกคือ FGF23 ยับยั้งการเพิ่มขึ้นของโปรตีนที่ TRPV5, TRPV6, calbindin-D9k ที่เป็นผลมาจากฤทธิ์ของ $1,25(OH)_2D$ ใน duodenal epithelial cells ของหนูทดลอง ซึ่งโปรตีนดังกล่าวจำเป็นต่อการดูดซึม Ca ผ่าน transcellular active transport (Khuituan et al., 2012) บ่งชี้ได้ว่า FGF23 มีฤทธิ์ควบคุมการดูดซึมไอออนในลำไส้ แม้ฤทธิ์โดยตรงของ FGF23 ต่อการขนส่งแร่ธาตุในลำไส้นั้นยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด แต่เป็นไปได้ว่า FGF23 ออกฤทธิ์ที่ intestinal epithelial cell ได้โดยตรงเนื่องจากพบการแสดงออกของ FGFR mRNA ใน intestinal epithelial cell (Hagiwara et al., 2009)

2.2.3 ผลของ FGF-23 ต่อ Mg ในเลือด

ถึงแม้ยังไม่มีงานวิจัยที่ศึกษาผลโดยตรงของ FGF23 ต่อสมดุล Mg แต่มีหลายรายงานที่พบว่า FGF23 น่าจะเกี่ยวข้องกับ Mg ในเลือด ข้อมูลทางการแพทย์หลายฉบับกล่าวว่าระดับ Mg ในเลือดมีความสัมพันธ์เชิงลบกับ FGF23 (Fragoso, Silva, Gundlach, Buchel, & Neves, 2014; Galassi & Cozzolino, 2014) พบว่าสัตว์ทดลองที่มีภาวะ hypomagnesemia มีการเพิ่มขึ้นของ FGF23 ร่วมด้วย (van den Broek, Chang, Elliott, & Jepson, 2018) นอกจากนั้นยังมีรายงานว่า FGF23 มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นในหนูทดลองที่ได้รับอาหาร Mg ต่ำ (Matsuzaki, Kajita, & Miwa, 2013; Matsuzaki, Katsumata, Maeda, & Kajita, 2016) และหนูทดลองที่มีการกลายพันธุ์ของ TRPM7 ซึ่งสำคัญต่อ Mg transport ร่วมกับการเกิด kidney stone (Elizondo, Budi, & Parichy, 2010) บ่งชี้ว่า FGF23 อาจมีอาจมีอิทธิพลในการควบคุมสมดุล cation homeostasis ซึ่งรวมถึง Mg ด้วย โดย FGF23 อาจออกฤทธิ์ที่ intestinal epithelial cell ได้โดยตรงเนื่องจากพบการแสดงออกของ FGFR mRNA ใน intestinal epithelial cell (Hagiwara et al., 2009) แต่อย่างไรก็ตามฤทธิ์โดยตรงของ FGF23 ต่อการขนส่ง Mg ใน

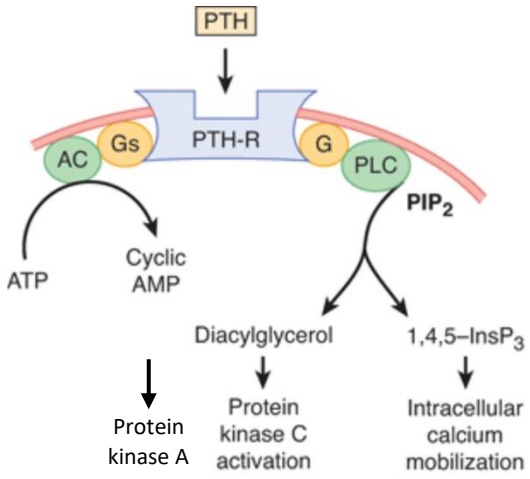
ลำไส้นั้นยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด เป็นไปได้ว่าการเพิ่มขึ้นของ FGF23 นั้นส่งผลกดการดูดซึม Mg ในลำไส้เช่นเดียวกับฤทธิ์กดการดูดซึม divalent cation Ca ของ FGF23

2.3 Parathyroid hormone (PTH)

Parathyroid hormone (PTH) ประกอบด้วยกรดอะมิโน 84 ตัว สังเคราะห์และหลั่งจาก chief cell ใน parathyroid glands หน้าที่หลักคือควบคุมสมดุลแคลเซียมโดยออกฤทธิ์ที่กระดูกและไต PTH ตอบสนองต่อระดับ extracellular Ca ที่ต่ำลง หรือตอบสนองต่อระดับ phosphate ที่สูงขึ้น (Brewer & Ronan, 1970; Niall et al., 1970)

2.3.1 PTH receptor และ signaling pathways

PTH ออกฤทธิ์ผ่าน PTH1 receptor (PTHR1) ซึ่งเป็น class B G-protein coupled receptor นอกจากนั้นยังพบ PTH2 receptor ซึ่งมีความใกล้เคียงกับ PTHR1 มาก (มีกรดอะมิโนเหมือนกันร้อยละ 51) PTH เป็น agonist ต่อ PTHR2 ในมนุษย์ แต่ไม่พบฤทธิ์ agonist ในหนูหรือปลา (Usdin, Gruber, & Bonner, 1995) การที่ PTH จับกับ PTHR2 แล้วไม่ตอบสนองในหนูทดลอง รวมถึงตำแหน่งการกระจายของ receptor นี้ อยู่ที่ hypothalamus ทำให้ตั้งข้อสังเกตได้ว่าหน้าที่ของ PTHR2 อาจไม่เกี่ยวข้องกับการควบคุมสมดุล Ca (Usdin et al., 1995) การส่งสัญญาณในเซลล์เกิดขึ้นเมื่อ PTH receptor ถูกกระตุ้นโดยกระบวนการหลักคือกระตุ้นผ่าน α-subunit ของ G-protein-couple receptor หรือ Gsα (Schwindinger et al., 1998) ซึ่งต่อมาจะเพิ่มการสังเคราะห์ cAMP และกระตุ้น protein kinase (Abou-Samra et al., 1992) อย่างไรก็ตามยังมี signaling pathway อื่นที่ PTH receptor กระตุ้นได้ เช่น receptor ส่ง signal ผ่าน Gqα แล้วไปกระตุ้น phospholipase C (Offermanns, Iida-Klein, Segre, & Simon, 1996) เพิ่ม intracellular inositol trisphosphate (IP_3) และเพิ่มระดับ intracellular free calcium (Abou-Samra et al., 1992) นอกจากนั้นจากการศึกษายังพบว่า PTH receptor กระตุ้น mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway ได้ในหลายเนื้อเยื่อ (Chan, Deckelbaum, Bolivar, Goltzman, & Karaplis, 2001; Miao et al., 2001)



ภาพที่ 2.2 การควบคุมเซลล์เป้าหมายของ PTH

(Source: Chapter 17. Disorders of the Parathyroids & Calcium & Phosphorus Metabolism, Pathophysiology of Disease, 6e

Citation: McPhee SJ, Hammer GD. Pathophysiology of Disease, 6e; 2010

Available at: Copyright © 2018 McGraw-Hill Education. All rights reserved)

2.3.2 PTH and electrolyte balance

2.3.1.1 ผลของ PTH ต่อไต

PTH มีฤทธิ์เพิ่มการขับทิ้ง phosphate ที่ proximal renal tubule โดยทำงานร่วมกับ FGF23 จากการศึกษาในปี 1996 และ 1997 ในสัตว์ทดลองพบว่า PTH ทำให้เกิดการ internalization และ degradation ของ NaPi-2a และ NaPi-2c (Murer et al., 1996; Pfister et al., 1997) การศึกษาต่อมาในเซลล์เพาะเลี้ยงพบว่า PTH มีเป้าหมายที่ NHERF-1 เช่นเดียวกันกับ FGF23 โดยส่งสัญญาณผ่าน PTHR1 ทำให้มีการเพิ่มขึ้นของ cAMP มีฤทธิ์ขับ phosphate โดยลดการแสดงออกของ NaPi-2a และ NaPi-2c ที่ luminal membrane ผ่านการกระตุ้น PKA- และ PKC-mediated phosphorylation of NHERF-1 (Bacic et al., 2003; Weinman et al., 2007) นอกจากนั้น PTH ยังมีฤทธิ์กระตุ้นการสังเคราะห์ 1,25$(OH)_2$D ที่ proximal renal tubule ผ่านการเพิ่มเอนไซม์ 1α-hydroxylase และลดเอนไซม์ 24-hydroxylase จากรายงานในปี 1980 พบว่าประมาณร้อยละ 50 ของผู้ป่วย primary hyperparathyroidism มีระดับ serum calcitriol สูงซึ่งเป็นผลมาจากฤทธิ์ของ PTH (Broadus, Horst, Lang, Littledike, & Rasmussen, 1980)

ฤทธิ์ที่ distal renal tubule ของ PTH คือเพิ่มการดูดกลับ Ca โดย Ca ส่วนใหญ่ที่ถูกกรองออกที่หน่วยไต (nephron) จะถูกดูดกลับแบบ passive transport บริเวณ proximal tubule ตาม electrochemical gradient ที่สร้างขึ้นจากการดูดกลับน้ำและ sodium ส่วนการดูดกลับแบบ active transport เกิดขึ้นที่ distal nephron ได้แก่ส่วน cortical thick ascending limb of the loop of Henle (cTAL), distal convoluted tubule (DCT) และ adjacent connecting segment ตามความต้องการของร่างกายขณะนั้นๆ (Friedman & Gesek, 1993; van Abel et al., 2005) จากการศึกษาในเซลล์เพาะเลี้ยงพบว่า PTH ออกฤทธิ์เพิ่มการดูดกลับ Ca ที่ distal renal tubule ผ่านทาง PTHR1 ไปกระตุ้น TRPV5-mediated calcium reabsorption โดยทำให้เกิดการ phosphorylation และ activation ที่ TRPV5 ผ่าน PKA-mediated pathway และเพิ่ม Trpv5 transcription ผ่านทาง ERK1/2-mediated pathway (Andrukhova et al., 2012; de Groot et al., 2009)

2.3.1.2 ผลของ PTH ต่อกระดูก

PTH เพิ่มระดับ Ca ในกระแสเลือดโดยกระตุ้นกระบวนการ bone resorption จากการศึกษาพบว่าบน osteoblast มีการแสดงออกของ PTH receptor แต่ไม่พบบน osteoclast (Murray, Rao, Divieti, & Bringhurst, 2005) ฤทธิ์ของ PTH ต่อกระดูกคือเพิ่มกระบวนการ bone remodeling โดย

PTH กระตุ้นการเจริญของ preosteoblast ไปเป็น bone-forming osteoblast ที่สร้าง collagen และ bone matrix (Black et al., 2003) กระบวนการ bone remodeling ประกอบด้วยการสร้างกระดูก (bone formation) และการสลายกระดูก (bone resorption) เมื่อ preosteoblast ถูกกระตุ้น จะสร้าง cytokine ที่สามารถกระตุ้นการทำงานของ osteoclast ซึ่งเป็นเซลล์สลายกระดูก ส่งผลให้เกิด bone resorption กระบวนการดังกล่าวต้องอาศัยการติดต่อสื่อสารระหว่างเซลล์ เช่น receptor activator of nuclear factor kB (RANK) ซึ่งเป็น receptor บน osteoclast precursor เมื่อจับกับ RANK ligand (RANKL) ที่อยู่บน osteoblast จะทำให้ osteoclast ถูก activation และเกิด bone resorption ส่วน osteoprotegerin (OPG) จะแย่งจับ RANKL นำไปสู่กระบวนการ bone formation จากการศึกษาของ Lee และคณะพบว่า PTH กระตุ้นการแสดงออกของ RANKL และยับยั้งการแสดงออกของ OPG mRNA ในเซลล์เพาะเลี้ยง (Lee & Lorenzo, 1999) การศึกษาการส่งสัญญาณภายในเซลล์พบว่า PTH กระตุ้น osteoclastic bone resorption โดยเพิ่มการแสดงออกของ RANKL ใน osteoblastic cells ผ่านทาง PKA-, PKC- และ ERK1/2-mediated pathway (Andrukhova, Streicher, Zeitz, & Erben, 2016)

2.3.1.3 ผลของ PTH ต่อระบบทางเดินอาหาร

จากฤทธิ์ของ PTH ที่ส่งผลเพิ่มการสังเคราะห์ $1,25(OH)_2D$ ในไต ซึ่ง $1,25(OH)_2D$ จะเพิ่มการดูดซึม Ca ในลำไส้ ดังนั้น PTH จึงมีผลทางอ้อมต่อการควบคุมการดูดซึม Ca ในลำไส้ จากการศึกษาพบว่า PTH ควบคุมการขนส่งไอออนหลายชนิด เช่น Na, Cl^- และ HCO_3^- โดยเฉพาะใน gastric mucosa และ renal proximal tubule (Bezerra, Girardi, Carraro-Lacroix, & Reboucas, 2008; Laverty, McWilliams, Sheldon, & Arnason, 2003) ใน amphibian gastric epithelium พบว่า PTH ยับยั้งการหลั่ง HCO_3^- ทำให้เกิดการสภาวะกรดใน gastric lumen ทำให้เกิดการแตกตัวของ Ca^{2+} จาก insoluble complex กลายเป็นไอออนซึ่งเป็นการเพิ่มความสามารถในการดูดซึม Ca ในลำไส้เล็ก (Flemstrom & Garner, 1981) จากการศึกษาของ Macintyre ด้วยวิธี ligated loops พบว่าหลังฉีดฮอร์โมน PTH ทำให้การดูดซึม Mg ในลำไส้ของหนูทดลองเพิ่มขึ้น (MacIntyre & Robinson, 1969) นอกจากนั้นยังมีทฤษฎีที่ใช้อธิบายความสัมพันธ์ระหว่าง PTH และการดูดซึม Mg ในอีกแง่มุมหนึ่ง การศึกษาก่อนหน้าพบว่ายากลุ่ม PPI เพิ่มการหลั่ง HCO_3^- ทั้งใน proximal duodenum และเซลล์เพาะเลี้ยง (Mertz-Nielsen, Hillingso, Bukhave, & Rask-Madsen, 1996; Thongon et al., 2016) HCO_3^- ส่งผลลดความเป็นกรดในโพรงลำไส้ ซึ่งจำเป็นต่อการดูดซึมแร่ธาติในรูป ionized form เมื่อ pH ในโพรงลำไส้สูงขึ้น Mg ในรูปไอออนอิสระ (Mg^{2+}) จึงตกตะกอนกลายเป็น $MgCO_3$ ทำให้ soluble Mg ลดลง การดูดซึม Mg ที่ลำไส้จึงลดลง (Ben-Ghedalia, Tagari, Zamwel, & Bondi, 1975; Kurita et al., 2008) จากการศึกษาของ Laohapitakworn และคณะพบว่า PTH เพิ่มการหลั่ง HCO_3^- จาก cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) ซึ่งเป็น Cl- และ HCO_3^- channel ใน intestinal epithelium-like Caco-2 monolayer โดยจับกับตัวรับ PTRH1 และไปกระตุ้น PKA และ PI3K pathway (Laohapitakworn, Thongbunchoo, Nakkrasae, Krishnamra, & Charoenphandhu, 2011) เป็นไป

ได้ว่าอิทธิพลของ PTH ต่อการดูดซึม Mg อาจมาจาก HCO_3^- ที่หลั่งมากขึ้น อย่างไรก็ตามไม่มีงานใดที่ศึกษาผลโดยตรงของ PTH ต่อการดูดซึม Mg ในลำไส้ จึงยังคงไม่สามารถสรุปได้ว่าแท้จริงแล้ว PTH มีอิทธิพลต่อการดูดซึม Mg อย่างไร

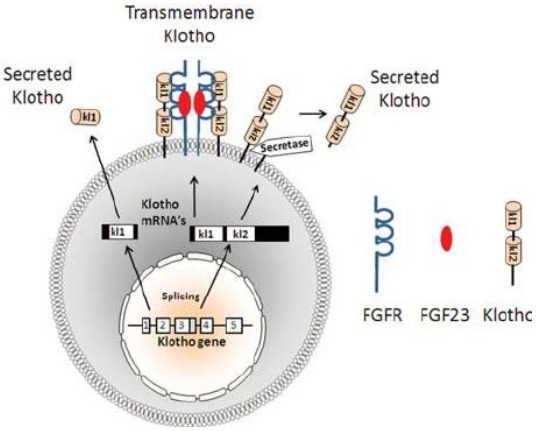
2.3.2 ผลของ PTH ต่อ Mg ในเลือด

นอกจากหน้าที่หลักในการควบคุมสมดุล Ca แล้ว ยังมีรายงานถึงความสัมพันธ์ระหว่าง PTH และ Mg หลายฉบับ รายงานทางการแพทย์บ่งชี้ว่า ผู้ป่วยที่มีภาวะ hypomagnesemia มีระดับของ PTH ที่เพิ่มสูงกว่าปกติ (Kanazawa et al., 2007) เป็นไปได้ว่า PTH ที่หลั่งออกมานั้นไปออกฤทธิ์ที่อวัยวะเป้าหมายเพื่อเพิ่มระดับ Mg ในเลือดให้กลับเป็นปกติ สอดคล้องกับการศึกษาโดยฉีด PTH เข้าไปในร่างกายในสุนัข (Durlach, Stoliaroff, Gauduchon, Leluc, & Thuong Cong, 1959) หนูแรท (MacManus, Heaton, & Lucas, 1971; Saris, Mervaala, Karppanen, Khawaja, & Lewenstam, 2000) และแฮมสเตอร์ (Harris et al., 1979) พบว่าความเข้มข้นของ Ca และ Mg ในเลือดสูงขึ้น จากการศึกษาก่อนหน้าพบว่า PTH กระตุ้นให้เกิดการปล่อย Mg จากกระดูก เพิ่มการดูดกลับ Mg บริเวณ loop of Henle และ distal tubule ของหน่วยไต กระตุ้นให้เกิดการสังเคราะห์ vitamin D ที่ไต (Bailly, Roinel, & Amiel, 1985; Morel, 1981; Quamme, 1997) แต่ผลของ PTH ต่อการดูดซึม Mg ที่ลำไส้นั้นยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด อย่างไรก็ตามมีการศึกษาโดยตัดต่อม parathyroid (parathyroidectomy) พบว่าสัตว์ทดลองมีระดับ Mg ในเลือดต่ำ ทั้งในกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติและกลุ่มที่ได้รับอาหาร Mg ต่ำ (Clark & Rivera-Cordero, 1974; Heaton, 1965) จากข้อมูลดังกล่าวเป็นไปได้ว่าการตัดต่อม parathyroid ส่งผลกดการดูดซึม Mg ในลำไส้ ในปี 1969 คณะวิจัยของ MacIntyre ได้ศึกษาฤทธิ์ของ PTH ต่อการดูดซึม Mg ในลำไส้ด้วยวิธี ligated loops พบว่าการฉีด PTH ให้หนูทดลองมีผลเพิ่มการดูดซึม Mg ในลำไส้ (MacIntyre & Robinson, 1969) แต่วิธี ligated loops นี้เป็นเทคนิคที่เก่า มีข้อจำกัดมาก อาจทำให้เกิดความผิดพลาดสูงในการประมวลผลการทดลอง เช่น การวัดการดูดซึมโดยอ้างอิงพื้นที่ในลำไส้ที่มีการพับแบบไม่เรียงตัว จึงไม่มีความแม่นยำ จากหลักฐานดังกล่าวเป็ไปได้ว่า PTH อาจส่งผลกระตุ้นการดูดซึม Mg ในลำไส้ได้โดยตรง เช่นอาจเพิ่มการแสดงออกของโปรตีนที่จำเป็นสำหรับการขนส่ง Mg เช่นเดียวกับฤทธิ์กระตุ้นการดูดซึม divalent cation Ca ในลำไส้ อย่างไรก็ตามจากข้อมูลข้างต้นทั้งหมด ยังไม่มีงานวิจัยที่ศึกษาฤทธิ์ของ PTH ต่อการดูดซึม Mg ในลำไส้โดยตรง จึงไม่สามารถสรุปได้ว่าแท้จริงแล้ว PTH มีอิทธิพลต่อการดูดซึม Mg อย่างไร

2.4 Klotho co-receptor

ในมนุษย์และสัตว์จำพวกหนู (rodents) มียีน Klotho ที่ประกอบด้วย exon 5 ส่วน ถูกสังเคราะห์ออกมาเป็นโปรตีน klotho ในรูป secreted klotho และ membrane klotho ผ่านกระบวนการ alternative splicing ที่ exon ส่วนที่ 3 โปรตีนสายสั้นหรือ secreted klotho ที่ถูกสังเคราะห์และหลั่งออกมานอกเซลล์มีขนาดประมาณ 60-70 kD และประกอบด้วยส่วน Kl1 เท่านั้น ส่วนโปรตีนสายยาวในรูปของ transmembrane protein เป็น membrane protein type I ที่มี single transmembrane

protein ใกล้กับฝั่ง c-terminus และมีปลายฝั่ง n-terminus ที่ประกอบด้วย Kl1 และ Kl2 ยื่นออกไปนอกเซลล์ ซึ่งส่วนดังกล่าวสามารถถูกตัดด้วยเอนไซม์ ADAM10/17 และเข้าสู่กระแสเลือด ดังนั้น klotho ที่พบในระบบไหลเวียน (soluble klotho) จะพบทั้ง secreted klotho ที่เกิดการกระบวนการ alternative splicing และ klotho ที่ถูกตัดจาก plasma membrane (Hu, Kuro-o, & Moe, 2012; Razzaque, 2009) จากการศึกษาพบว่า soluble klotho นั้นจะลดลงเมื่ออายุเพิ่มขึ้น และยีน klotho นั้นมีความสัมพันธุ์กับโรคความเสื่อมตามอายุ โปรตีน klotho แต่ละรูปแบบนี้มีบทบาทต่อร่างกายแตกต่างกัน membrane klotho จะวางตัวอยู่กับ FGFR โดยทำหน้าที่เป็น co-receptor ซึ่งเกี่ยวข้องกับภาวะชราและการดำเนินไปของโรคชนิดเรื้อรังโดยผ่านการควบคุม Pi และ vitamin D metabolism ส่วน secreted klotho ที่พบในสารน้ำมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการควบคุม oxidative stress การส่งสัญญาณของ growth factor signaling ควบคุมสมดุลไอออน นอกจากนั้นยังพบว่า klotho ที่อยู่ในเซลล์ (intracellular klotho) นั้นมีฤทธิ์กดการอักเสบที่เกิดจากภาวะชราของเซลล์ รวมถึงควบคุม กระบวนการ metabolism แร่ธาตุ (Kim, Hwang, Park, Kong, & Cha, 2015)



ภาพที่ 2.3 แสดงยีน klotho, mRNA และโปรตีน (Hu et al., 2012)

โปรตีนใน klotho family ประกอบด้วย α-, β- และ γ-klotho ซึ่งแต่ละชนิดมีการจัดเรียงกรดอะมิโนแตกต่างกัน **α**-klotho มีการศึกษามากเนื่องจากมีความเกี่ยวข้องกับโรคและภาวะชราในมนุษย์ **α**-klotho มีการแสดงออกอยู่ที่หลายตำแหน่งในร่างกาย โดยพบมากที่ distal convoluted tubule ในไตต่อม parathyroid และ epithelium ของ choroid plexus ในสมอง อวัยวะสืบพันธุ์ รวมถึงในชั้น adventitia ของหลอดเลือด aorta ซึ่งการแสดงออกของ klotho บริเวณดังกล่าวมีฤทธิ์ปกป้องหลอดเลือด (Ritter, Zhang, Delmez, Finch, & Slatopolsky, 2015) β-klotho แสดงออกมากที่ตับ ทางเดินอาหาร ม้าม และไต (Yahata et al., 2000) ส่วน γ-Klotho มีการแสดงออกมากที่ไต ผิวหนังและดวงตา (Fon Tacer et al., 2010; Ito, Fujimori, Hayashizaki, & Nabeshima, 2002)

จากการศึกษาพบว่าในหนูที่ถูก knockout ยีน Kl มีการแสดงออกของโปรตีนที่ทำหน้าที่ดูดกลับ phosphate ในท่อไต ได้แก่ NaPi-2a และ NaPi2c เพิ่มขึ้น นำไปสู่ภาวะ hyperphosphatemia ซึ่งหนูกลุ่มดังกล่าวมีลักษณะอาการแสดงเหมือนกับหนูกลุ่มที่ถูก knockout ยีน Fgf23 จึงเป็นหลักฐานว่า

Klotho ทำหน้าทีเป็น cofactor ใน FGF23 signaling pathway (Hu et al., 2012; Razzaque, 2009) แต่ลำไส้ส่วน duodenum นั้นไม่พบการแสดงออกของโปรตีน transmembrane klotho เป็นไปได้ว่าการส่งสัญญาณในเซลล์ของ FGF23/FGFR นั้นเป็นแบบ klotho independent เช่น ฤทธิ์ยับยั้ง osteoblast differentiation ของ FGF23 ต่อกระดูก (Kawata et al., 2007; Wang et al., 2008) หรือเป็นไปได้ว่าอาศัย klotho ที่ลอยในกระแสเลือด เซลล์ที่สร้าง klotho ในรูปแบบนี้ เช่น renal tubule cells (Kurosu et al., 2006)

2.4 Calcitriol ($1,25(OH)_2D$)

Vitamin D ที่ได้รับจากการกินและจากคอเลสเตอรอลที่ผิวหนังนั้นอยู่ในรูปที่ไม่พร้อมทำงาน (inactive form) ซึ่งจำเป็นต้องอาศัยเอนไซม์ 25-hydroxylation ที่ตับเพื่อเปลี่ยน vitamin D3 ให้เป็น 25-hydroxycholecalciferol (calcifedol) และถูกเปลี่ยนเป็น 1,25(OH)2D3 ด้วยเอนไซม์ 1α-hydroxylation (calcitriol) ที่ไต ซึ่งอยู่ในรูปพร้อมใช้งาน (active form) Calcitriol ออกฤทธิ์ผ่านการจับกับ vitamin D receptor (VDR) ซึ่งเป็นตัวรับที่นิวเคลียส (nuclear receptor) (Pike & Christakos, 2017) การจับกันส่งผลให้ VRD ทำหน้าที่เป็น transcription factor ควบคุมการแสดงออกของยีนเกี่ยวกับโปรตีนที่ใช้ขนส่งสารผ่านเซลล์ เช่น TRPV6 และ calbindin ซึ่งจำเป็นต่อการขนส่ง Ca ที่ลำไส้ (Bouillon, Van Cromphaut, & Carmeliet, 2003) VDR นั้นมีการแสดงออกในเซลล์หลายชนิด เช่น สมอง หัวใจ ผิวหนัง อวัยวะสืบพันธุ์ เต้านม กระดูก ลำไส้ ไต ต่อม parathyroid ซึ่งหน้าที่หลักของ calcitriol คือ ควบคุมสมดุล Ca โดยเพิ่มการดูดซึม Ca ที่ลำไส้ และกระตุ้นการสลายกระดูก (Holick, 2004)

2.5 การขนส่ง Ca ในลำไส้

Calcium (Ca) เป็นธาตุที่พบมากในร่างกายมนุษย์ ประมาณ 99% ของ Ca อยู่ในรูปผลึก calcium phosphate และฝังตัวอยู่ในกระดูก มีเพียงร้อยละ 1 ที่อยู่ในรูปไอออน โดยละลายอยู่ใน intracellular และ extracellular fluid ความสำคัญต่อ Ca ต่อการทำงานของเซลล์ ได้แก่ กระตุ้นให้เกิดการหดตัวของกล้ามเนื้อ กระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ cell differentiation การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน programed cell death และ neuron activity (Zhou, Xue, & Yang, 2013) ระดับของ Ca ในเลือดถูกควบคุมให้อยู่ในระดับที่เหมาะสมกับการทำงาน มีค่าประมาณ 1.16 – 1.32 mmol/L (Karbach, 1991) สมดุล Ca ในเลือดอาศัยการทำงานร่วมกันของการดูดซึม Ca ในลำไส้ การดูดกลับที่ไต และการสร้างหรือสลายกระดูก ลำไส้เป็นอวัยวะหลักในการดูดซึม Ca โดยผ่าน 2 กระบวนการหลัก ได้แก่ active transport และ passive transport (Hoenderop, Nilius, & Bindels, 2005)

2.5.1 Active transport

2.5.1.1 Transcellular active calcium transport

ในลำไส้ส่วน duodenum เกิด transcellular active calcium transport ถึง 80% ในสภาวะที่ได้รับอาหาร Ca ต่ำ และทำงานน้อยกว่า 10% ในสภาวะที่ได้รับอาหาร Ca สูง (Khanal & Nemere, 2008) ขั้นเริ่มต้นของกระบวนการดูดซึม Ca ผ่าน transcellular active transport ต้องอาศัย transient potential vanilloid type 6 (TRPV6) ซึ่งเป็น transmembrane calcium selective channel ที่วางตัวอยู่ที่ brush border รับผิดชอบในการนำ Ca เข้าเซลล์ (van de Graaf, Boullart, Hoenderop, & Bindels, 2004; van de Graaf, Hoenderop, & Bindels, 2006) TRPV6 เป็นโปรตีนใน transient receptor potential (TRP) family ซึ่งประกอบด้วยโปรตีน 6 ชนิด TRPV1-4 เป็น non-selective cation channels ซึ่งจะถูกกระตุ้นโดย protons, lipids, การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ ความดันและ osmolarity ส่วน TRPV5 และ TRPV6 เกี่ยวข้องกับ renal calcium absorption และ intestinal calcium absorption ตามลำดับ (Boros, Bindels, & Hoenderop, 2009; van de Graaf et al., 2004; van de Graaf et al., 2006) TRPV6 ประกอบด้วย long intracellular N-terminal และ C-terminal domain และ 6 transmembrane domain (Lieben et al., 2010) การแสดงออกของ TRPV6 ในเซลล์หลายชนิดรวมถึงเซลล์มะเร็งถูกควบคุมโดย vitamin D, low calcium diet และช่วงหย่านม (weaning) (Christakos, 2012a; Song et al., 2003) จากการศึกษาพบว่าหนูทดลองที่ถูกตัดต่อพันธุกรรมให้มี TRPV6 overexpression เกิดภาวะ hypercalcemia และ soft tissue calcification ซึ่งสนับสนุนหน้าที่หลักของ TRPV6 ในการดูดซึม Ca (Christakos, 2012a; Cui, Li, Johnson, & Fleet, 2012) นอกจากนั้น TRPV6 ยังมีบริเวณ phosphorylation sites ชี้ให้เห็นว่า TRPV6 ควบคุมโดย kinases (Khanal & Nemere, 2008) ขั้นต่อไปของ transcellular absorption สำหรับ Ca ต้องอาศัย calbindin D9k ซึ่งเป็น intracellular calcium-binding protein ที่มี 1 classical EF-hand และ 1 pseudo EF-hand ซึ่งทั้งสองฝั่งทำงานประสานกันเพื่อจับ Ca แบบ high affinity (Chen et al., 2009; Kragelund et al., 1998) calbindin D9k มี affinity ต่อ Mg ต่ำ เมื่อเทียบกับ parvalbumin (Henzl, Larson, & Agah, 2003; Xue et al., 2015) ระดับการแสดงออกของ calbindin D9k ในลำไส้ควบคุมโดย 1,25-hydroxyvitamin D3, ภาวะที่ได้รับ Ca จากอาหารในปริมาณต่ำ หรือช่วงหย่านม (weaning) (Christakos, 2012a; Peng, Brown, & Hediger, 2003; Song et al., 2003) ขั้นสุดท้ายควบคุมโดย plasma membrane ATPase1b (PMCA1b) ที่วางตัวฝั่ง basolateral membrane มีกลไกคือ ขนส่ง transcellular calcium ไปสู่กระแสเลือดในลักษณะของ energy-dependent manner หากในร่างกายอยู่ในภาวะ Ca และ phosphorus ต่ำ หรือถูกกระตุ้นด้วย vitamin D สามารถเพิ่มการแสดงออกของ PMCA1b ใน intestinal cell ได้ (Cai, Chandler, Wasserman, Kumar, & Penniston, 1993; Johnson & Kumar, 1994) นอกจากนั้น sodium-calcium exchanger ได้แก่ NCX1 ยังเกี่ยวข้องกับ calcium extrusion ใน basolateral membrane อีกด้วย (Khanal & Nemere, 2008)

2.5.1.2 Solvent drag-induced calcium transport

Solvent drag-induced calcium transport ขึ้นกับ paracellular sodium gradient ที่สร้างโดย Na^+/K^+ ATPase ที่วางตัวบริเวณ lateral membrane (Contreras, Shoshani, Flores-Maldonado, Lazaro, & Cereijido, 1999; Diamond & Bossert, 1967; Larsen, Nedergaard, & Ussing, 2000) ดังนั้น gradient นี้ถูกยับยั้งโดยลด transepithelial sodium uptake ซึ่งควบคุม paracellular hyperosmotic environment (Charoenphandhu, Limlomwongse, & Krishnamra, 2001; Tanrattana, Charoenphandhu, Limlomwongse, & Krishnamra, 2004) นอกจากนั้นความกว้างของ tight junction และการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติ charge selectivity ยังส่งผลถึงการขนส่ง ion ขนาดเล็กและสารอาหารแบบ solvent drag-induced paracellular transport ด้วย (Fihn, Sjoqvist, & Jodal, 2000; Madara, 1998; Madara, Barenberg, & Carlson, 1986) โปรตีนหลายตัวใน tight junction ของ duodenum ซึ่งประกอบด้วย zonular occludens (ZO)-1, occludin และ claudins ล้วนเกี่ยวข้องกับ size และ charge activity (Angelow, Kim, & Yu, 2006; Hou, Paul, & Goodenough, 2005; Ikari et al., 2004) osmotic force ที่เกิดขึ้นทำให้เกิดการเคลื่อนของน้ำผ่าน TJ ไปที่ paracellular space นั่นทำให้โมเลกุลที่เป็น water-soluble แร่ธาตุ และ ions รวมถึง Ca เคลื่อนที่ไปพร้อมกับน้ำได้ (Larsen et al., 2000)

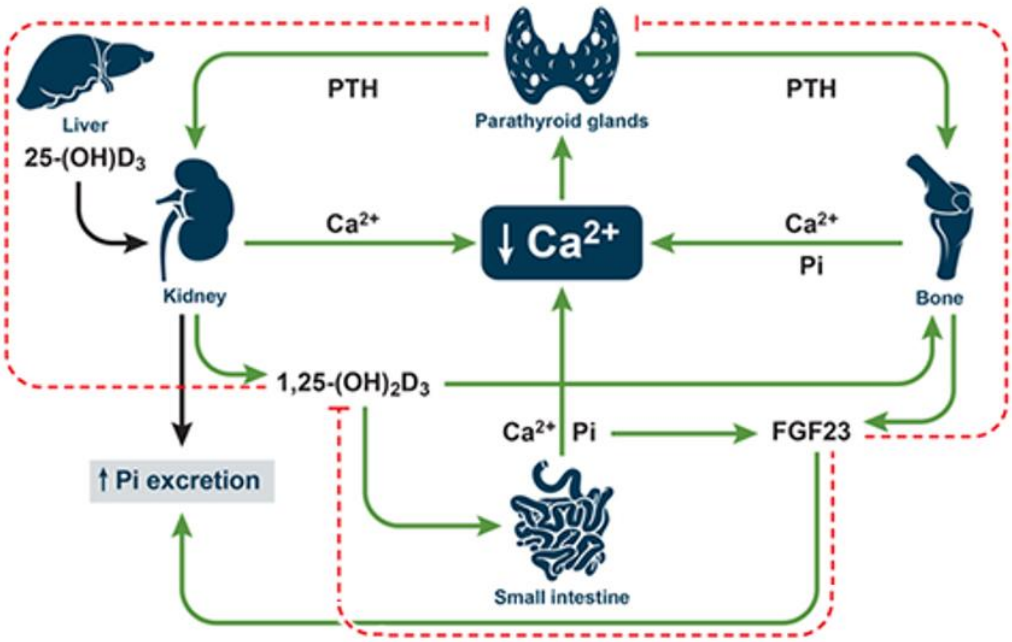
2.5.1.3 Voltage-dependent calcium transport

จัดเป็น paracellular calcium transport แบบ secondary active transport ซึ่งจำเป็นต้องใช้พลังงานจาก cellular energy metabolism (Charoenphandhu et al., 2001) และต้องอาศัย electrogenic activity ของ Na^+/K^+ ATPase ที่สามารถสร้าง charge ระหว่างสองด้านของ epithelial sheet ให้ต่างกันได้ (Contreras et al., 1989) ในลำไส้หนูส่วน duodenum และ jejunum พบว่า transepithelial potential different มีค่าประมาณ 5-6 และ 6-7 mV ตามลำดับ โดยด้าน luminal เป็นลบเมื่อเทียบกับด้าน serosal (Tanrattana et al., 2004)

2.5.2 Paracellular passive transport

การดูดซึม Ca แบบ paracellular passive transport ต่างจาก transcellular transport เนื่องจากเป็นการดูดซึม Ca แบบ non-saturable, energy independent pathway ซึ่งเกิดขึ้นตลอดลำไส้เล็กและเป็นกลไกหลักในการดูดซึม Ca โดยเฉพาะในภาวะที่ได้รับอาหาร Ca สูงกลไกการทำงานในระดับโมเลกุลของ paracellular pathway นั้นยังไม่ทราบแน่ชัด แต่อย่างไรก็ตามพบว่า TJ มีบทบาทสำคัญในการควบคุมกลไกนี้ permeability ของ TJ ควบคุมโดยโปรตีนหลายชนิด รวมถึง claudin 2 และ 12 (Christakos, 2012a; Khanal & Nemere, 2008) นอกจากนั้น 1,25-hydroxyvitamin D3 ควบคุม paracellular transport โดยลดการแสดงออกของ claudin 3, aquaporin 8, cadherin 17 และ RhoA ส่งผลให้ permeability ของ TJ เพิ่มขึ้น (Christakos, 2012b; Kutuzova & Deluca, 2004)

2.6 สรุปความสัมพันธ์ระหว่าง PTH, FGF23 และ Mg



ภาพที่ 2.4 ความสัมพันธุ์ของฮอร์โมน PTH, Vitamin D และ FGF23 (PTH-Vitamin D-FGF23 axis)

(Source : Courtesy of Kevin Martin, MB, Bch)

PTH เป็นฮอร์โมนหลักในการควบคุมระดับ Ca ในกระแสเลือด ภาวะ Ca ในเลือดต่ำ (Hypocalcemia) กระตุ้นให้ PTH หลั่งจากต่อม parathyroid ออกฤทธิ์อย่างรวดเร็วต่อกระดูกโดยกระตุ้นการปลดปล่อย Ca จากเซลล์สร้างกระดูก (osteoblast) เข้าสู่ ECF และออกฤทธิ์กระตุ้นการสลายกระดูกอย่างช้า ๆ โดยกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์สลายกระดูก (osteoclastogenesis) ส่งผลเพิ่มระดับ Ca และ phosphate ในกระแสเลือด ฤทธิ์ของ PTH ต่อไต คือเพิ่มกระบวนการดูดกลับ Ca ที่ distal renal tubule แต่ยับยั้งการดูดกลับ phosphate ที่ท่อ proximal tubule ที่หน่วยไต นอกจากนั้น PTH ยังกระตุ้นการเปลี่ยนสารตั้งต้นจากตับให้เป็น 1,25$(OH)_2$D (Calcitriol) โดยเพิ่มเอนไซม์ 1α-hydroxylase และลดเอนไซม์ 24-hydroxylase ซึ่งมีหน้าที่สร้าง และสลาย Calcitriol ตามลำดับ Calcitriol ยับยั้งการหลั่ง PTH ที่ต่อม parathyroid และออกฤทธิ์เพิ่มการดูดซึม Ca แบบ transcellular transport ที่ลำไส้เล็กส่วน duodenum ฤทธิ์ของ Calcitriol ที่กระดูกนั้นเหมือนกับฤทธิ์ของ PTH คือกระตุ้น osteoclastogenesis และกระตุ้นการสลายกระดูก จากฤทธิ์ของฮอร์โมนดังกล่าวส่งผลให้ระดับ Ca และ phosphate ในเลือดสูงขึ้น การเพิ่มขึ้นของระดับ phosphate ในกระแสเลือดกระตุ้นให้เซลล์กระดูกหลั่ง FGF23 ฤทธิ์ของ FGF23 คือยับยั้งการหลั่ง PTH ที่ parathyroid gland ลดการสังเคราะห์ Calcitriol โดยลดการแสดงออกของ 1α-hydroxylase และเพิ่มการแสดงออกของ 24-hydroxylase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ใช้สร้างและสลาย calcitriol ตามลำดับ ลดการดูดกลับ phosphate ทางไตโดยยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน NaPi-2a และ NaPi-2c ที่ renal proximal tubular cells ผ่าน FGF receptor/Klotho complex ซึ่งโปรตีนดังกล่าวใช้

ขนส่ง phosphate กลับเข้าเซลล์ เมื่อมีการแสดงออกลดลงส่งผลให้มีการขับ phosphate ออกทางปัสสาวะมากขึ้น

นอกจาก Ca แล้ว PTH ยังมีผลต่อสมดุล Mg อีกด้วย จากการศึกษาก่อนหน้าพบว่า PTH กระตุ้นให้เกิดการปล่อย Mg จากกระดูก เพิ่มการดูดกลับ Mg บริเวณ loop of Henle และ distal tubule ของหน่วยไต กระตุ้นให้เกิดการสังเคราะห์ vitamin D ที่ไต ส่วนฤทธิ์ต่อลำไส้นั้นยังไม่แน่ชัด แต่การศึกษาโดยฉีด PTH เข้าไปในร่างกายในสุนัข หนูแรท และแฮมสเตอร์ พบว่าความเข้มข้นของ Ca และ Mg ในเลือดสูงขึ้น การทดลองตัดต่อม parathyroid จะส่งผลกดการดูดซึม Mg ในลำไส้เนื่องจากพบว่าระดับ Mg ในเลือดของสัตว์ทดลองต่ำลง ทั้งในหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติและได้รับอาหาร Mg ต่ำ การฉีด PTH ให้หนูทดลองมีผลเพิ่มการดูดซึม Mg ในลำไส้ แต่วิธี ligated loops ที่ใช้ในการทดลองนี้เป็นเทคนิคที่เก่า มีข้อจำกัดมาก อาจทำให้เกิดความผิดพลาดสูง อย่างไรก็ตามเป็นไปได้ว่า PTH อาจมีฤทธิ์กระตุ้นการดูดซึม Mg ที่ลำไส้โดยเพิ่มการทำงานของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการขนส่ง Mg เช่น TRPM6 และ TRPM7 ซึ่งจำเป็นในการดูดซึม Mg แบบ transcellular หรือโปรตีน cldn ซึ่งจำเป็นต่อการดูดซึม Mg แบบ paracellular หรือ PTH อาจส่งผลต่อ cation selectivity ซึ่งเป็นสมบัติหนึ่งที่มีอิทธิพลต่อการเลือกดูดซึมสารผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์

นอกจากฤทธิ์ขับ phosphate ที่ได้อธิบายไปข้างต้นแล้ว อย่างไรก็ตามมีงานวิจัยที่ศึกษาฤทธิ์ของ FGF23 ต่อการดูดซึม Ca ในลำไส้โดยตรง Khuituan และคณะพบว่า FGF23 ยับยั้งการเพิ่มขึ้นของโปรตีน TRPV5, TRPV6, calbindin-D9k ที่เป็นผลมาจากฤทธิ์ของ 1,25$(OH)_2$D ใน duodenal epithelial cells ของหนูทดลอง ซึ่งโปรตีนดังกล่าวจำเป็นต่อการดูดซึม Ca ผ่าน transcellular active transport บ่งชี้ได้ว่า FGF23 มีฤทธิ์ควบคุมการดูดซึมไอออนในลำไส้โดยตรง นอกจากนั้นยังพบการเพิ่มขึ้นของ FGF23 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในสัตว์ทดลองที่มีภาวะ hypomagnesemia รวมถึงหนูกลุ่มที่มีมีการดูดซึม Mg ลดลง ได้แก่กลุ่มที่ได้รับอาหาร Mg ต่ำและกลุ่มที่มีการกลายพันธุ์ของยีน TRPM7 จากข้อมูลดังกล่าวอาจเป็นไปได้ว่า FGF23 กดการดูดซึม Mg ในลำไส้โดยลดการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการขนส่ง Mg เช่น TRPM6,7 หรือโปรตีนกลุ่ม cldn หรืออาจส่งผลต่อ cation selectivity

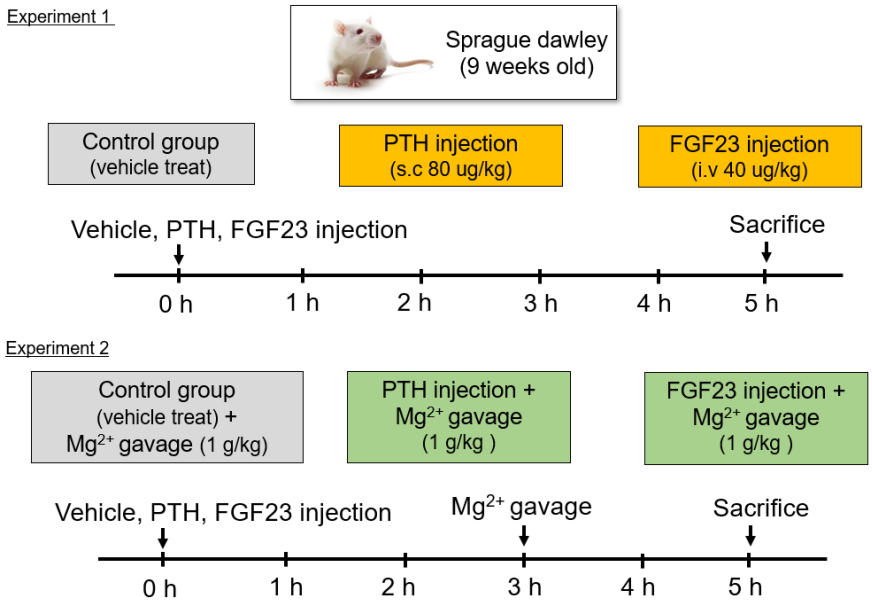
บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 ประชากร

หนูทดลองสายพันธุ์ Sprague dawley เพศผู้อายุ 8 สัปดาห์ น้ำหนักตัวประมาณ 200-300 กรัม โดยสั่งซื้อจากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ปรับสภาพหนูก่อนทำการทดลอง 7 วัน โดยเลี้ยงในห้องสัตว์ทดลองของคณะสหเวชศาสตร์มหาวิทยาลัยบูรพา ควบคุมอุณหภูมิที่ 24 °C ระยะเวลาการให้แสงสว่าง 12 ชั่วโมง และมืด 12 ชั่วโมง ใช้อาหารสำเร็จรูปที่ผลิตจากบริษัท เพอร์เฟค คอมพาเนียนกรุ๊ป จำกัด โดยปริมาณการกินอาหาร 15-30 กรัม/ตัว/วัน (โตเต็มวัย) ปริมาณการกินน้ำ 20-45 มิลลิลิตร/ตัว/วัน (โตเต็มวัย) วัสดุรองนอนที่ใช้เลี้ยงสัตว์ทดลองทำจากแกนข้าวโพด (corn cob) ผสมผักตบชวา (water hyacinth)

3.2 กลุ่มตัวอย่างและสุ่มตัวอย่าง

โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 2 ชุด การทดลองชุดที่ 1 หนูทดลองจะถูกแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม กลุ่มละ 6 ตัว ได้แก่ กลุ่มควบคุม (vehicle control ฉีด PBS) กลุ่ม PTH (s.c.) และกลุ่ม FGF23 (i.v.) 5 ชม.หลังฉีดสาร หนูทดลองจะถูก terminate ส่วนการทดลองชุดที่ 2 แบ่งหนูออกเป็น 3 กลุ่ม กลุ่มละ 6 ตัว เช่นเดียวกัน แต่ทุกกลุ่มจะได้ถูกป้อน MgO 3 ชม.หลังฉีดสารส่วนกลุ่มควบคุมป้อนน้ำกลั่น (distilled water)



ภาพที่ 3.1 แสดงการแบ่งกลุ่มสัตว์ทดลอง

3.3 การเก็บรวบรวมข้อมูล

3.3.1 ศึกษาการแสดงออกของโปรตีนที่ใช้ในการขนส่ง Mg ในลำไส้เล็กของหนูทดลอง

ศึกษาการแสดงออกของโปรตีน TRPM6/7 และ CNNM4 โดยลำไส้เล็กของหนูกลุ่มควบคุมจากการทดลองชุดที่ 1 ถูกขูดเก็บเนื้อเยื่อส่วน luminal ไปทำ western blot analysis เพื่อศึกษาการแสดงออกในภาวะปกติของโปรตีน TRPM6/7 และ CNNM4

3.3.2 ศึกษาฤทธิ์ของฮอร์โมน PTH และ FGF23 ต่อการแสดงออกของ โปรตีน TRPM6/7 และ CNNM4 โดยใช้ในหนูจากการทดลองชุดที่ 1 ทั้งกลุ่มที่ถูกฉีด PTH และกลุ่มฉีด FGF23 โดยทำการ sacrifice แล้วเก็บลำไส้เล็กมาศึกษาการแสดงออกของโปรตีน TRPM6/7 และ CNNM4

ภาพที่ 3.2 แสดงแผนการเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อของการทดลองที่ 1

3.3.3 ศึกษาฤทธิ์ระยะสั้น (short term effect) ของ PTH และ FGF23 ต่อการขนส่ง Mg ในลำไส้เล็กของหนูทดลองแบบ ex vivo

3.3.3.1 ศึกษาฤทธิ์ทั้งระบบ (systemic effect)

ศึกษาในหนูกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ฉีด PTH หรือ FGF23 จากการทดลองชุดที่ 1 โดยหลังจาก sacrifice แล้ว เก็บลำไส้เล็กแช่ใน 4% normal bathing solution เพื่อรักษาสภาพและการทำงานของเนื้อเยื่อ จากนั้นนำไปขึงใน using chamber แช่ใน 37% normal bathing solution เพื่อกระตุ้นให้เนื้อเยื่อกลับมาทำงาน วัด electrical parameter ประมาณ 20 นาที จากนั้นแทนที่ normal bathing solution ด้วย bathing solution สำหรับ dilution potential คุณสมบัติคัดเลือกประจุ (charge selectivity) ของลำไส้เล็กจะถูกศึกษาด้วย dilution potential experiment ซึ่งการเก็บค่าทางไฟฟ้าใช้เวลาประมาณ 6 นาที จากนั้น ฝั่ง apical ด้วย apical Mg-bathing solution ประกอบไปด้วย $MgCl_2$ 40 mM เพื่อเลียนแบบฝั่งโพรงลำไส้ที่มีความเข้มข้นของ Mg สูงกว่าฝั่งหลอดเลือด ส่วนฝั่ง basolateral แทนที่ด้วย Mg-free bathing solution เก็บตัวอย่างสารละลายจากฝั่ง basolateral ของ ussing chamber ประมาณ 100 ul ทุก 30, 60, 90, 120 นาที ค่า Mg flux ที่ได้คือการขนส่ง Mg ทั้งหมด (total Mg flux) สำหรับ สำหรับการศึกษาการขนส่ง Mg แบบไม่อาศัย Mg channel หรือ paracellular transport จะใช้ BS ที่มี MgCl ความเข้มข้น 40 mM + Co(III)hexaammine ความเข้มข้น 1 mM แทนที่

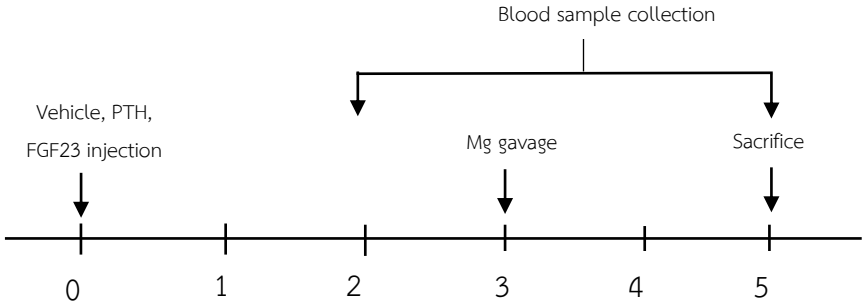
ฝั่ง apical โดย co(III)hexaammine ทำหน้าที่ยับยั้งการดูดซึม Mg ในรูปแบบ transcellular transport ทำให้สามารถวิเคราะห์หา paracellular transport ได้

3.3.3.2 ศึกษาฤทธิ์โดยตรง (direct effect)

ศึกษาโดยใช้ลำไส้ของหนูกลุ่มควบคุมจากการทดลองชุดที่ 1 โดยลำไส้จะถูกศึกษา Mg flux เพื่อหาอัตราการขนส่ง Mg ทั้งแบบ transcellular และ paracellular และวัด electrical parameter หลังจาก expose กับ FGF23 หรือ PTH 20 ng/mL ที่ฝั่ง serosal โดยตรง

3.3.4. ศึกษาฤทธิ์ระยะสั้น (short term effect) ของ PTH และ FGF23 แบบ in vivo

ศึกษาฤทธิ์ของ PTH และ FGF ต่อการดูดซึม Mg แบบ *in vivo* โดยใช้หนูจากการทดลองชุดที่ 2 โดยหนูทุกกลุ่มทั้งกลุ่มควบคุม, กลุ่ม PTH, และกลุ่ม FGF23 จะถูกป้อน (oral gavage) magnesium oxide (MgO) 1 g/kg หลังผ่านไป 3 ชม. นับจากที่ถูกฉีดสาร เลือดปริมาตร 0.7 mL จะถูกเก็บทาง femoral artery จากนั้น 2 ชั่วโมง หนูจะถูก sacrifice ตามแผนภาพและนำไปวัดระดับ Mg ในเลือด



ภาพที่ 3.3 แสดงแผนการเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อของการทดลองที่ 2

3.4 การวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลทั้งหมดที่ได้จะถูกนำเสนอในรูปของค่า mean ± standard error of mean (SEM) โดยที่ความแตกต่างของข้อมูล 2 ชุด จะถูกทดสอบด้วย unpaired student t-test ส่วนความแตกต่างของข้อมูลที่ มากกว่า 2 ชุด จะถูกทดสอบด้วย One way analysis of variance (ANOVA) ร่วมกับ Dunnett's Multiple Comparison Test ซึ่งความแตกต่างทางสถิติของทุกการทดสอบจะต้องมีค่า $p < 0.05$ โดยใช้โปรแกรม Graphpad Prism5 ในการประมวลผล

3.5 ระยะเวลาการวิจัย

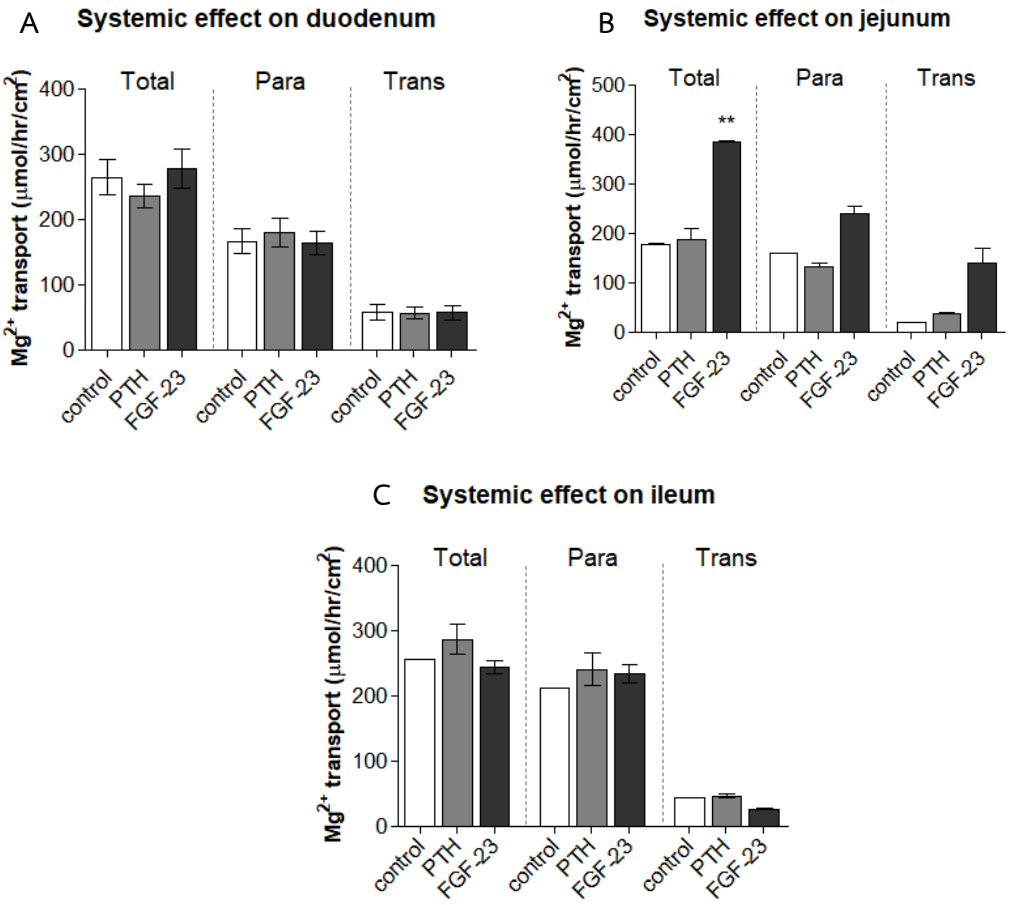
12 เดือน

บทที่ 4
ผลการวิจัยและอภิปรายผล

4.1 ผลการวิจัย

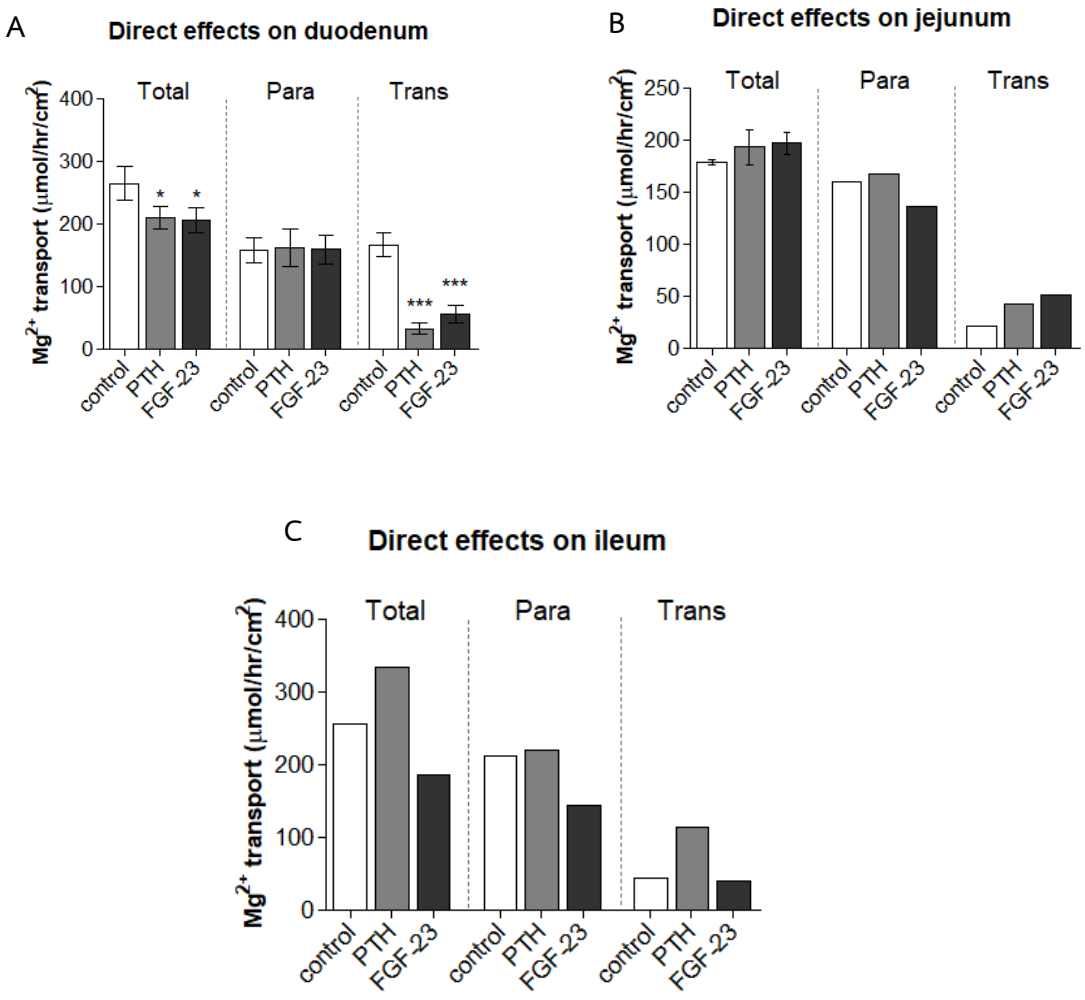
4.1.1 ฤทธิ์ระยะสั้น (short term effect) ของ PTH และ FGF23 ต่อการขนส่ง Mg ในลำไส้เล็กของหนูทดลองแบบ *ex vivo*

4.1.1.1 ศึกษาฤทธิ์ทั้งระบบ (systemic effect)



ภาพที่ 4.1 การดูดซึมแมกนีเซียมในลำไส้ของหนูกลุ่มควบคุม กลุ่ม PTH และกลุ่ม FGF23 ในศึกษาฤทธิ์ทั้งระบบ (systemic effect) แบบ *ex vivo* โดยแสดงลำไส้ส่วน Duodenum (A) Jejunum (B) และ Ileum (C)

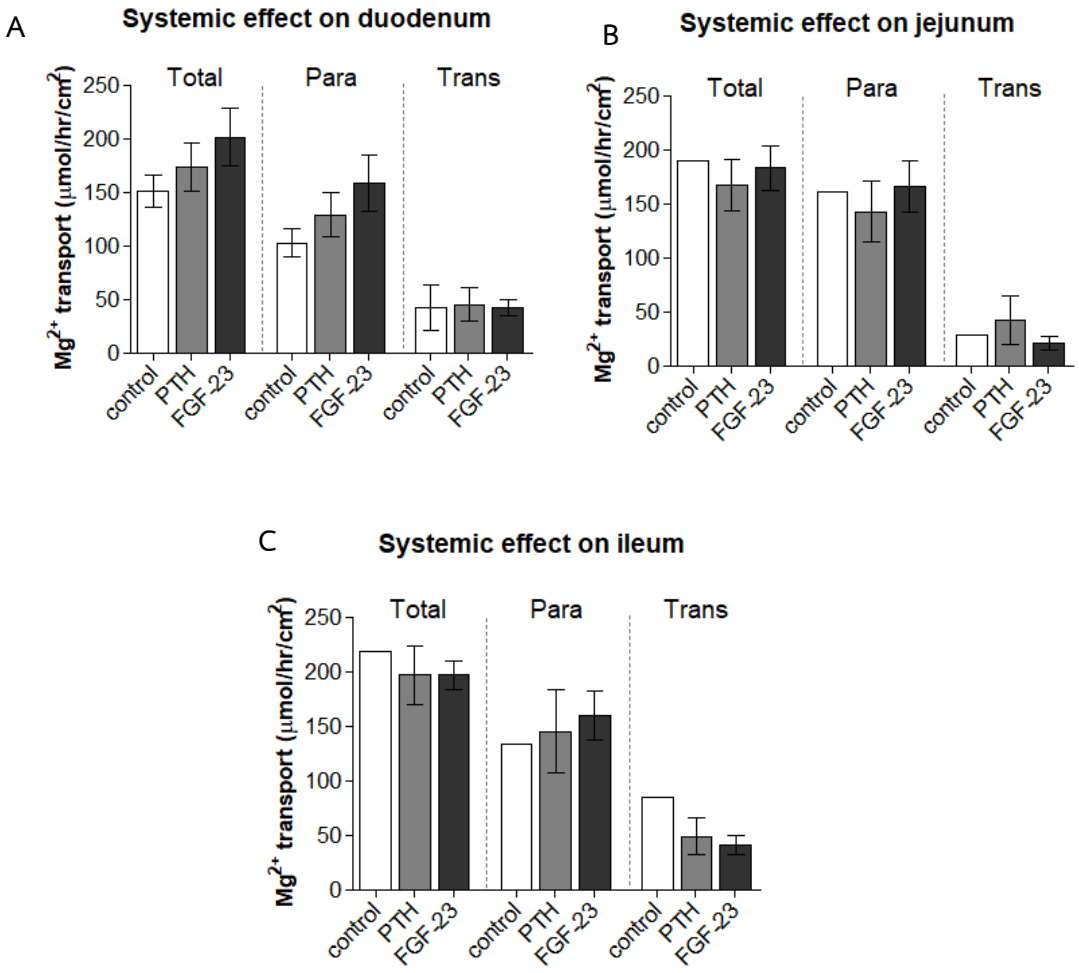
4.1.1.2 ศึกษาฤทธิ์โดยตรง (direct effect)



ภาพที่ 4.2 การดูดซึมแมกนีเซียมในลำไส้ของหนูกลุ่มควบคุม กลุ่ม PTH และกลุ่ม FGF23 ในศึกษาฤทธิ์โดยตรง (direct effect) แบบ ex *vivo* โดยแสดงลำไส้ส่วน Duodenum (A) Jejunum (B) และ Ileum (C)

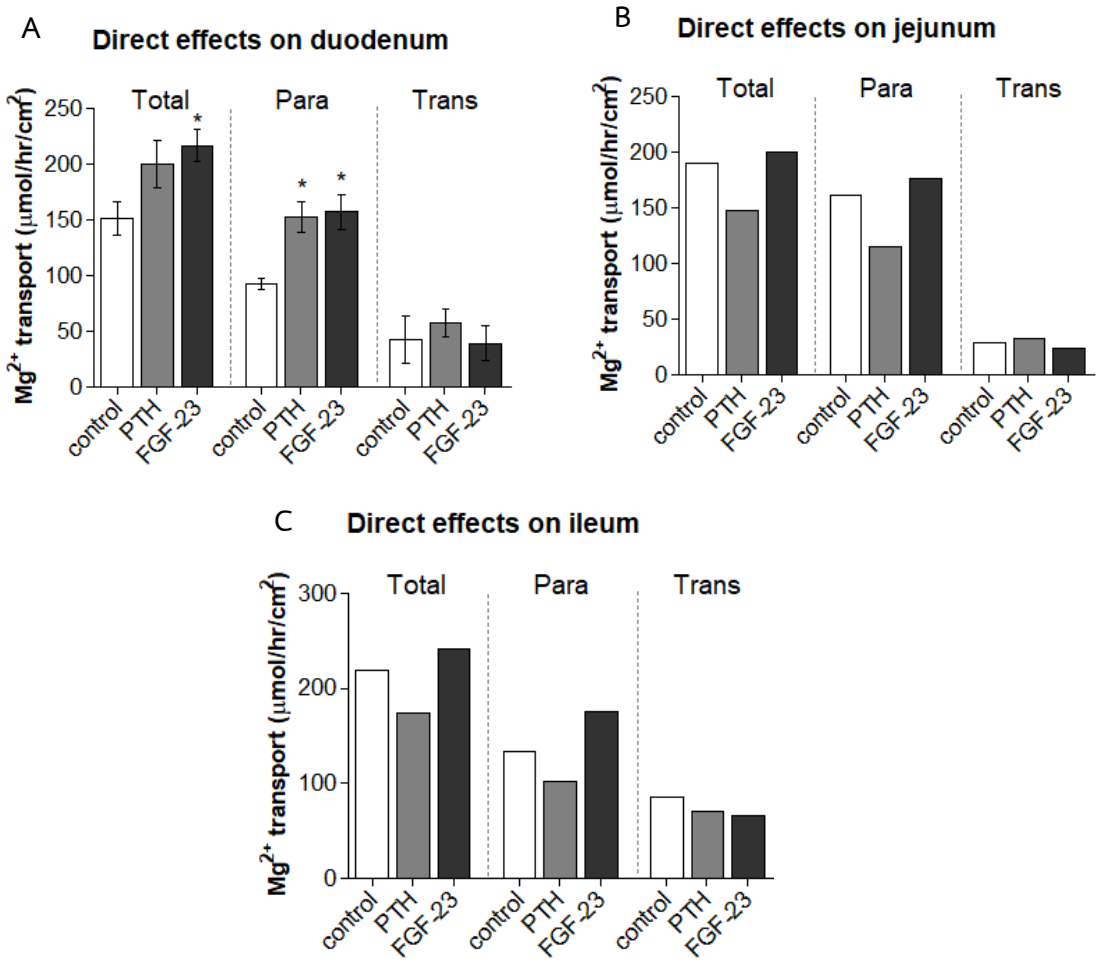
4.1.2 ฤทธิ์ระยะสั้น (short term effect) ของ PTH และ FGF23 แบบ in vivo

4.1.1.1 ศึกษาฤทธิ์ทั้งระบบ (systemic effect)



ภาพที่ 4.3 การดูดซึมแมกนีเซียมในลำไส้ของหนูกลุ่มควบคุม กลุ่ม PTH และกลุ่ม FGF23 ในศึกษาฤทธิ์ทั้งระบบ (systemic effect) แบบ *in vivo* โดยแสดงลำไส้ส่วน Duodenum (A) Jejunum (B) และ Ileum (C)

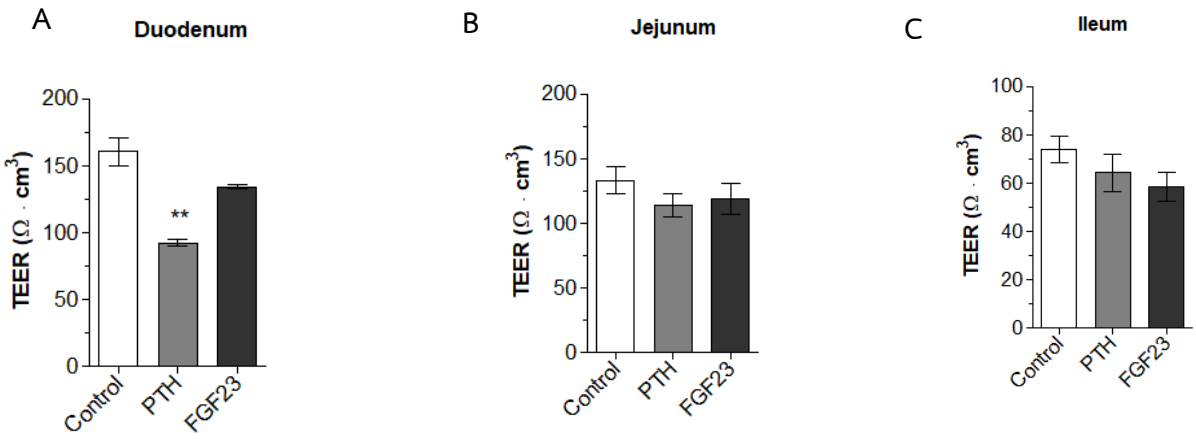
4.1.1.2 ศึกษาฤทธิ์โดยตรง (direct effect)



ภาพที่ 4.4 การดูดซึมแมกนีเซียมในลำไส้ของหนูกลุ่มควบคุม กลุ่ม PTH และกลุ่ม FGF23 ในศึกษาฤทธิ์โดยตรง (direct effect) แบบ *in vivo* โดยแสดงลำไส้ส่วน Duodenum (A) Jejunum (B) และ Ileum (C)

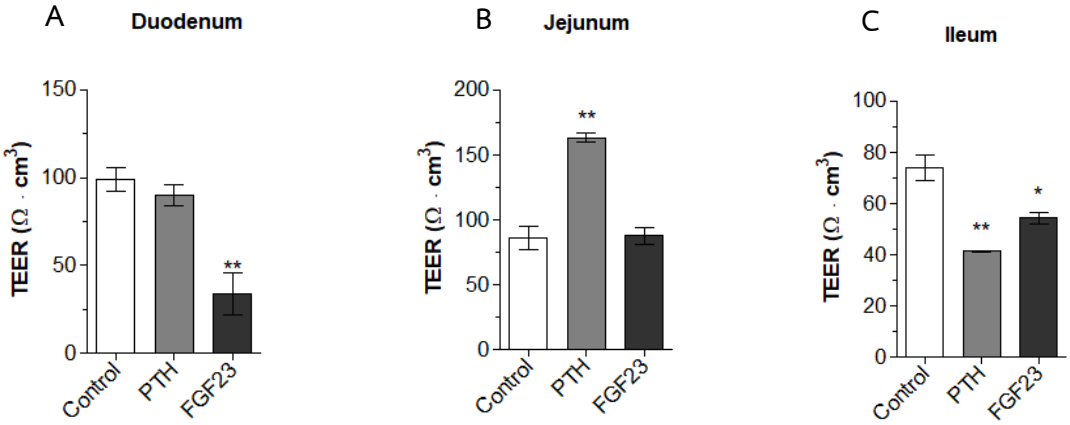
4.1.3 การเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางไฟฟ้า (Electrical parameter)

4.1.3.1 *ex vivo*



ภาพที่ 4.5 การเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางไฟฟ้าของหนูกลุ่มควบคุม กลุ่ม PTH และกลุ่ม FGF23 แบบ *ex vivo* ในลำไส้ส่วน Duodenum (A) Jejunum (B) และ Ileum (C)

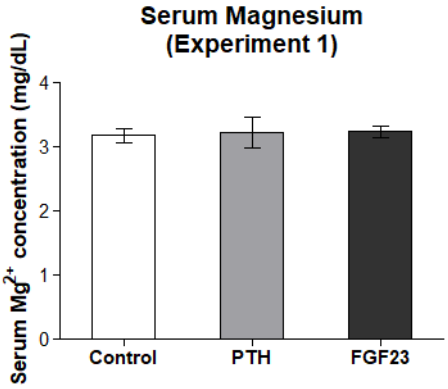
4.1.3.2 *in vivo*



ภาพที่ 4.6 การเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางไฟฟ้าของหนูกลุ่มควบคุม กลุ่ม PTH และกลุ่ม FGF23 แบบ *in vivo* ในลำไส้ส่วน Duodenum (A) Jejunum (B) และ Ileum (C)

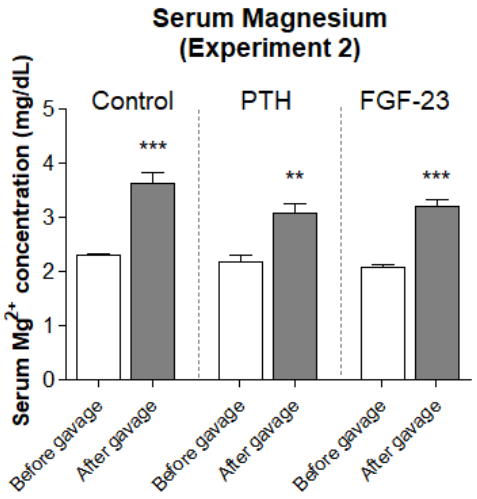
4.1.4 ระดับแมกนีเซียมใน serum

4.1.4.1 ex vivo



ภาพที่ 4.7 แสดงการเปลี่ยนแปลงระดับแมกนีเซียมใน serum ของหนูกลุ่มควบคุม กลุ่ม PTH และกลุ่ม FGF23 ในการศึกษาแบบ *ex vivo*

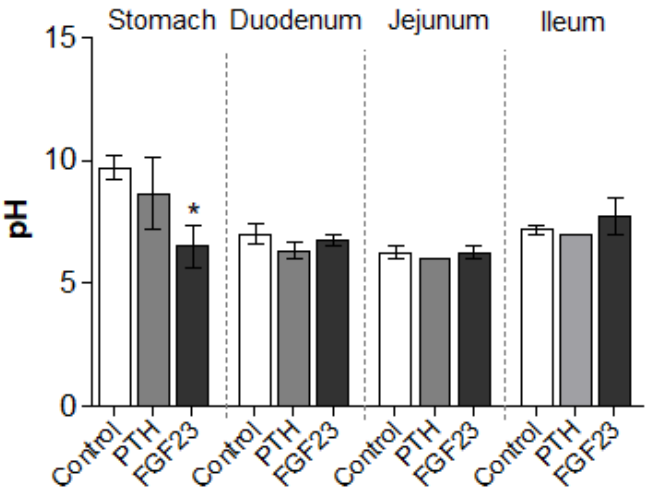
4.1.4.2 in vivo



ภาพที่ 4.8 แสดงการเปลี่ยนแปลงระดับแมกนีเซียมใน serum ของหนูกลุ่มควบคุม กลุ่ม PTH และกลุ่ม FGF23 ในการศึกษาแบบ *in vivo*

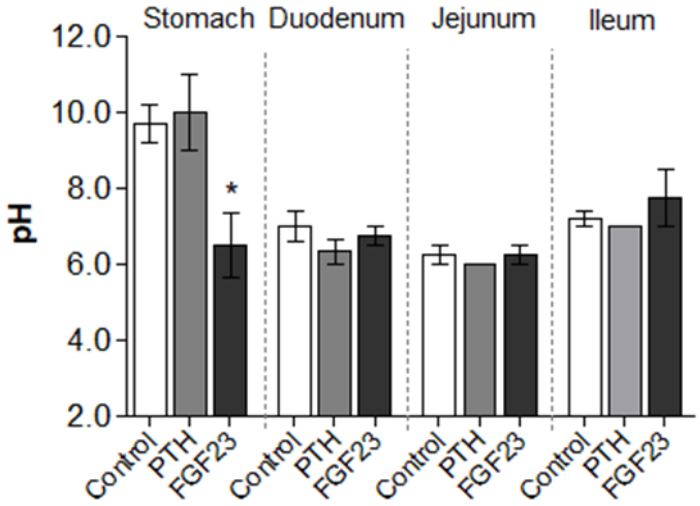
4.1.5 Gastrointestinal pH

4.1.5.1 *ex vivo*



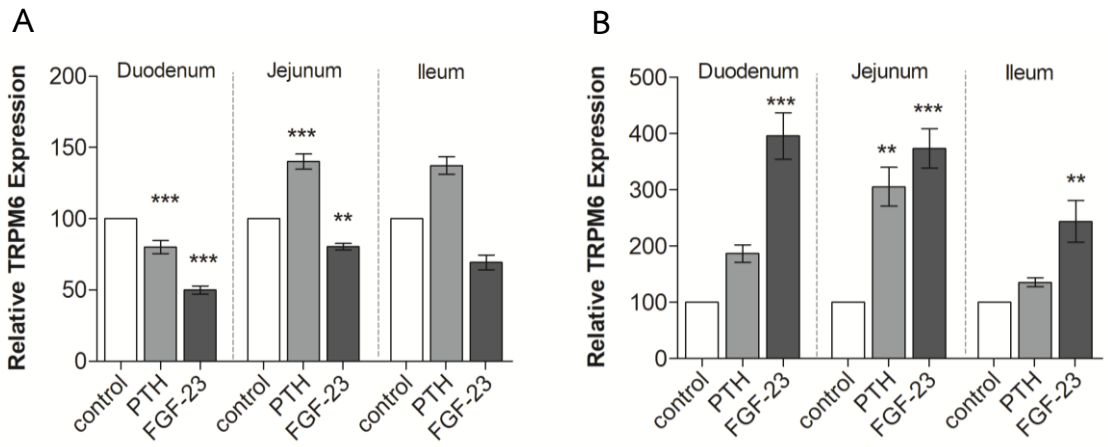
ภาพที่ 4.9 แสดงค่า pH ในทางเดินอาหารของหนูกลุ่มควบคุม กลุ่ม PTH และกลุ่ม FGF23 ในการศึกษาแบบ *ex vivo*

4.1.5.2 *in vivo*



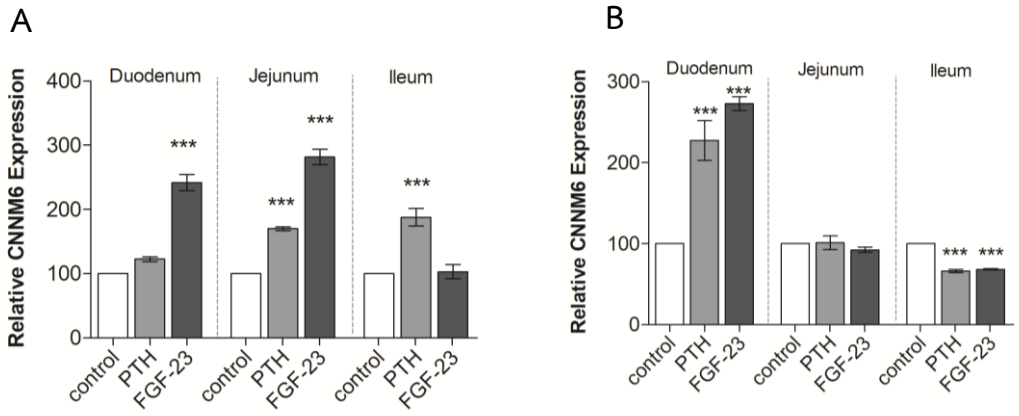
ภาพที่ 4.10 แสดงค่า pH ในทางเดินอาหารของหนูกลุ่มควบคุม กลุ่ม PTH และกลุ่ม FGF23 ในการศึกษาแบบ *in vivo*

4.1.6 การแสดงออกของโปรตีน TRPM6



ภาพที่ 4.11 การแสดงออกของโปรตีน TRPM6 ในลำไส้เล็กส่วนต่างๆ ของหนูกลุ่มควบคุม กลุ่ม PTH และกลุ่ม FGF23 (A) การทดลองที่ 1 ศึกษาแบบ e*x vivo* (B) การทดลองชุดที่ 2 ศึกษา i*n vivo*

4.1.7 การแสดงออกของโปรตีน CNNM4



ภาพที่ 4.12 การแสดงออกของโปรตีน CNNM4 ในลำไส้เล็กส่วนต่างๆ ของหนูกลุ่มควบคุม กลุ่ม PTH และกลุ่ม FGF23 (A) การทดลองที่ 1 ศึกษาแบบ e*x vivo* (B) การทดลองชุดที่ 2 ศึกษา *in vivo*

4.2 อภิปรายผล

ผลการศึกษาฤทธิ์ทั้งระบบของ PTH และ FGF23 ต่อการขนส่ง Mg ในลำไส้เล็กส่วน duodenum และ ileum ของหนูทดลองแบบ *ex vivo* (ภาพที่ 4.1) พบว่าแต่ละกลุ่มมีการดูดซึมไม่แตกต่างกัน ในขณะที่ jejunum มีการดูดซึมแบบ total transport เพิ่มขึ้น แนวโน้มของของการดูดซึมแบบ trans- และ

paracellular เพิ่มขึ้นเช่นกัน แต่เนื่องจากกลุ่มตัวอย่างของลำไส้ส่วนดังกล่าวมีจำนวนน้อยเกินไปจึงไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนการศึกษาแบบ *in vivo* (ภาพที่ 4.3) ไม่พบการปลี่ยนแปลงการดูดซึมในดูลำไส้ทุกส่วน อาจเป็นเพราะทำการศึกษาโดยใช้ single-dose injection ในระยะสั้น (5 ชั่วโมง) ร่างกายสามารถใช้กลไกอื่นในการควบคุมการดูดซึม Mg ร่วมด้วยทำให้การดูดซึมยังเป็นปกติ หรือ PTH เองอาจไปออกฤทธิ์ที่เซลล์เป้าหมายอื่นในระบบสมดุล Mg ซึ่งการกระตุ้นดังกล่าวสามารถควบคุมการดูดซึม Mg ที่ลำไส้ให้เป็นปกติได้

ผลการศึกษาฤทธิ์โดยตรง (direct effect) (รูปที่ 4.2) ของ PTH และ FGF23 ต่อการขนส่ง Mg ในลำไส้เล็กส่วนดูโอดีนัมของหนูทดลองแบบ *ex vivo* พบว่าการดูดซึมแบบ total และ transcellular ของหนูกลุ่ม PTH และ FGF23 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่การดูดซึมแบบ paracellular ในหนูทุกกลุ่มไม่แตกต่างกัน งานวิจัยก่อนหน้าพบว่าการให้ PPI เป็นเวลานานกระตุ้นการหลั่งของ HCO3- จากเซลล์ลำไส้ส่วนดูโอดีนัมในมนุษย์ (Mertz-Nielsen et al., 1996) หนูแรทและเซลล์เพาะเลี้ยง (Thongon et al., 2016) ซึ่ง HCO^{3-} ที่หลั่งมานั้นส่งผลให้ Mg ตกตะกอนเป็น $MgCO_3$ เมื่อ Mg ในรูปไอออนอิสระลดลง การดูดซึม Mg จึงลดลงทั้งในแบบ para- และ transcellular (Ben-Ghedalia et al., 1975; Kurita et al., 2008) Laohapitakworn และคณะ ศึกษาฤทธิ์โดยตรงของ PTH ต่อเซลล์เยื่อบุลำไส้เล็ก Caco-2 ของ พบว่า PTH กระตุ้นการหลั่ง HCO^{3-} ทาง cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) ผ่าน PKA and PI3K-dependent manner (Laohapitakworn et al., 2011) สภาวะความเป็นกรดที่ลดลงกดการแสดงออกของ Cldn 7, 12 ซึ่งเป็นโปรตีนสำคัญที่ใช้ในการดูดซึม Mg ด้วยวิธี paracellular (Thongon & Krishnamra, 2012) การทดลองในหนูแรท พบว่าการให้ PPI เป็นเวลานานทำให้ pH ในลำไส้สูงขึ้น และกดการขนส่ง Mg ในลำไส้เล็กส่วนดูโอดีนัมทั้งแบบ total, para และ transcellular (Suksridechacin et al., 2020) เป็นไปได้ว่าฤทธิ์กดการดูดซึม Mg แบบ total และ transcellular ของ PTH ในลำไส้นี้เกิดจากสภาพความเป็นกรดในโพรงลำไส้ที่ลดลง รวมถึงเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของโปรตีนที่ใช้ในการดูดซึมแบบ transcellular อาทิ TRPM6/7, CNNM4

ผลการศึกษาฤทธิ์โดยตรง (direct effect) (รูปที่ 4.4) ของ PTH และ FGF23 ต่อการขนส่ง Mg ในลำไส้เล็กส่วนของหนูทดลองแบบ *in vivo* พบว่าการขนส่งแบบ trans- และ paracellular ในหนูกลุ่ม PTH และ FGF23 สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนใน jejunum และ ileum เป็นการศึกษาแนวโน้มการดูดซึมเบื้องต้น (preliminary study) ดังนั้นการจำนวน n ที่ใช้ในการทดลองที่ต่ำ ส่งผลให้เห็นความแตกต่างทางสถิติไม่ชัดเจน เป็นไปได้ว่าการขนส่ง Mg ที่เพิ่มขึ้นนี้อาจส่งผลให้ระดับ Mg ในเลือดกลับเข้าสู่ค่ะปกติซึ่งเป็นกลไกการควบคุมสมดุล Mg ที่เกิดจากฮอร์โมนโดยตรง โดยฮอร์โมนดังกล่าวอาจไปเพิ่มการแสดงออกของโปรตีนีที่เกี่ยวข้องกับการขนส่ง Mg แบบ paracellular

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางไฟฟ้า (Electrical parameter) (ภาพที่ 4.5) พบว่าค่า Isc และ PD ลดต่ำลงในหนูกลุ่ม PTH และ FGF23 ส่วนค่า TEER ของลำไส้เล็กส่วนดูโอดีนัมพบว่ามีค่าต่ำลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในหนูกลุ่ม PTH บ่งชี้ว่ามีการเคลื่อนที่ของไอออนบางชนิดผ่านดูโอดีนัมได้ดีขึ้นเนื่องจากค่าความต้านทานที่ต่ำลง ในขณะที่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของ TEER ในหนูกลุ่ม FGF23

พิจารณาจากผลการทดลองทั้งในส่วนของการศึกษาการดูดซึมแมกนีเซียมในลำไส้ การศึกษาค่าทางไฟฟ้า การศึกษาแมกนีเซียมในเลือด รวมถึงการศึกษาการเปลี่ยนแปลงค่า pH บ่งชี้ว่า PTH และ FGF23 มีผลต่อสมดุลแมกนีเซียมในร่างกาย ส่วนการศึกษาแบบ in vivo (ภาพ 4.6) พบว่า TEER ในกลุ่ม FGF23 ของหนูกลุ่ม Duodenum มีค่าลดต่ำลง สื่อถึงประสิทธิภาพการเคลื่อนที่ของ Mg จากฝั่งโพรงลำไส้เข้ามาในฝั่งหลอกเลือดที่มากขึ้น เป็นไปได้ว่า FGF23 มีฤทธิ์ลด TEEER ในลำไส้ส่วน duodenum เพื่อเพิ่มการดูดซึม Mg ในส่วน jejunum และ ileum นั้นเป็นการศึกษาเบื้องต้น แสดงให้เห็นแนวโน้มการตอบสนองต่อฮอร์โมนซึ่งทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางไฟฟ้า อย่างไรก็ตามยังจำเป็นต้องอาศัยข้อมูลอื่นประกอบซึ่งผู้วิจัยวางแผนทำการศึกษาต่อไปในอนาคต

ระดับแมกนีเซียมใน serum (ภาพที่ 4.7 และ 4.8) แสดงให้เห็นว่าการป้อน MgO ทางปากนั้นส่งผลเพิ่มระดับ Mg ในเลือดจริงในหนูทั้ง 3 กลุ่ม สอดคล้องกับงานวิจัยของ Hardwick และคณะที่ชี้ให้เห็นว่าการดูดซึม Mg จะเกิดขึ้นหลังได้รับจากการกิน 1 ชั่วโมง และเข้าสู่ plateau phase ที่ 2-2.5 ชั่วโมง (Hardwick et al., 1990)

ภาพที่ 4.9 และ 4.10 แสดงค่า pH ในทางเดินอาหารของหนูทุกกลุ่ม จะเห็นว่ากระเพาะอาหารของหนูในกลุ่ม FGF23 ทั้งในการศึกษาแบบ *ex vivo* และ *in vivo* มี pH ที่ต่ำลง มีความเป็นกรดสูงขึ้น เป็นไปได้ว่า นอกจากที่ลำไส้เล็ก FGF23 อาจควบคุมสมดุลไอออนที่กระเพาะอาหารได้

การดูดซึม Mg แบบ transcellular pathway ซึ่งเกิดในลำไส้เล็กเป็นหลัก เป็นกระบวนการที่อาศัยพลังงาน โดยใช้โปรตีน TRPM6 และ TRPM7 ที่วางตัวทางด้าน apical เป็น Mg channel ให้ Mg จาก luminal ไหลเข้าสู่ เซลล์ลำไส้ (enterocyte) ตามความแตกต่างของความเข้มข้น (concentration gradient) และใช้ ancient conserved domain protein 4 (CNNM4) ซึ่งเป็น Na^{+}/Mg^{2+} exchanger บริเวณ basolateral ขนส่ง Mg จาก enterocyte เข้าสู่กระแสเลือด ในรูปแบบ secondary active transport การ mutation ของยีน TRPM6 เป็นสาเหตุของโรค HSH ส่งผลให้การดูดซึม Mg ที่ลำไส้ผิดปกติ (Walder et al., 2002) ผลการศึกษาแบบ ex vivo พบว่าในลำไส้ส่วน duodenum ของหนูกลุ่ม PTH และ FGF23 มีการแสดงออกของ TRPM6 ต่ำลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่มีแนวโน้มการแสดงออกของ CNNM4 ที่สูงขึ้นโดยเฉพาะในกลุ่ม FGF23 เป็นไปได้ว่า FGF23 กระตุ้นการดูดซึม Mg ผ่านการเพิ่มการแสดงออกของ CNNM4 เพื่อคงสมดุล Mg ไว้ในระดับปกติดังแสดงในผลการศึกษาฤทธิ์ทั้งระบบ ส่วนการศึกษาแบบ in vivo พบว่า หากมีการป้อน MgO เข้าสู่ทางเดินอาหาร การแสดงออกของ TRPM และ CNNM4 ใน duodenum ของหนูกลุ่ม FGF23 และ PTH จะเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เป็นไปได้ว่าบทบาทของฮอร์โมนทั้งสองจะโดดเด่นเมื่อร่างกายได้รับ Mg ในปริมาณมาก ส่วน TRPM7 นั้นไม่พบการแสดงออกในลำไส้เล็กทุกส่วน

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ของ PTH และ FGF23 ต่อการดูดซึม Mg ในลำไส้เล็กของหนูทดลอง โดยศึกษาการขนส่ง Mg ทั้งแบบ transcellular และ paracellular pathway ร่วมกับคุณสมบัติทางไฟฟ้า โดยสมมติฐานของงานวิจัยคือ PTH น่าจะมีฤทธิ์เพิ่มการดูดซึม Mg และ FGF23 มีฤทธิ์กดการดูดซึม Mg หนูทดลองสายพันธุ์ Sprague dawley *(สปีชีส์ Rattus norvegicus)* เพศผู้อายุ 8 สัปดาห์ น้ำหนัก 200-300 g เลี้ยงในสภาพแวดล้อมปิดเวลา 1 สัปดาห์ จากนั้นศึกษาฤทธิ์ระยะสั้นของ PTH และ FGF23 ต่อการขนส่ง Mg ในลำไส้เล็กของหนูทดลองแบบ *ex vivo* ศึกษาฤทธิ์ทั้งระบบ (systemic effect) โดยแบ่งหนูออกเป็นกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ฉีด PTH หรือ FGF23 (n = 6) หลังฉีด 5 ชั่วโมง หนูจะถูก terminate ด้วยวิธี cardiac puncture เก็บลำไส้เล็กแต่ละส่วนแบ่งออกเป็น 6 ชิ้น เพื่อศึกษาการขนส่ง Mg ทั้งแบบ total transport แบบผ่านเซลล์และแบบผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์โดยใช้ ใน 6-chambers Ussing chamber setup อุปกรณ์ดังกล่าวสามารถศึกษาการขนส่ง Mg ในลำไส้ได้พร้อมกันได้ถึง 6 ชิ้นเพื่อเป็นการลดจำนวนการใช้สัตว์ทดลอง เมื่อขึงลำไส้กับอุปรณ์แล้ว ใช้เวลาเก็บค่า electrical parameter ประมาณ 15 นาที จากนั้นฝั่ง apical ถูกแทนที่ด้วย apical Mg-bathing solution ($MgCl_2$ 40 mM) เพื่อเลียนแบบฝั่งโพรงลำไส้ที่มีความเข้มข้นของ Mg สูงกว่าฝั่งหลอดเลือด ส่วนฝั่ง basolateral แทนที่ด้วย Mg-free bathing solution เก็บตัวอย่างสารละลายจากฝั่ง basolateral ปริมาตร 120 ul ทุก 30, 60, 90, 120 นาที ค่า Mg flux ที่ได้คือการขนส่ง Mg ทั้งหมด (total Mg flux) สำหรับ สำหรับการศึกษาการขนส่ง Mg แบบไม่อาศัย Mg channel หรือ paracellular transport จะใช้ bathing solution ที่มี $MgCl_2$ ความเข้มข้น 40 mM + Co(III)hexaammine ความเข้มข้น 1 mM ซึ่งทำหน้าที่ยับยั้งการดูดซึม Mg ในรูปแบบ transcellular transport ทำให้สามารถวิเคราะห์หา paracellular transport ได้ ส่วนการศึกษาฤทธิ์โดยตรง (direct effect) จะใช้ลำไส้ของหนูกลุ่มควบคุมจากการทดลองชุดที่ 1 โดยลำไส้จะถูกศึกษา Mg flux เพื่อหาอัตราการขนส่ง Mg ทั้งแบบ transcellular และ paracellular และวัด electrical parameter หลังจาก expose กับ FGF23 , PTH 20 ng/mL, FGF23 Inhibitor และ PTH inhibitor ที่ฝั่ง serosal โดยตรง ในการศึกษาแบบ *in vivo* นั้นจะเพิ่มขั้นตอนการป้อน MgO 1 g/kg ณ ชั่วโมงที่ 3 หลังจากหนูถูกฉีดด้วยน้ำกลั่น หรือฮอร์โมน แล้วเก็บตัวอย่างด้วยวิธีการเดียวกัน ข้อมูลทั้งหมดที่ได้จะถูกนำเสนอในรูปของค่า mean ± standard error of mean (SEM) ความแตกต่างของข้อมูล 2 ชุด จะถูกทดสอบด้วย unpaired student t-test ส่วนความแตกต่างของข้อมูลที่มากกว่า 2 ชุด จะถูกทดสอบด้วย One way analysis of variance (ANOVA) ร่วมกับ Dunnett's Multiple Comparison Test ซึ่งความแตกต่างทางสถิติของทุกการทดสอบจะต้องมีค่า $p < 0.05$ โดยใช้โปรแกรม Graphpad Prism5 ในการประมวลผล

5.1 สรุปผลการวิจัย

งานวิจัยนี้ชี้ให้เห็นว่าลำไส้เล็กส่วนดูโอดีนัมมีการควบคุมการดูดซึม Mg เกิดขึ้นจริง และเป็นไปได้ว่าสามารถควบคุมได้โดยใช้ฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับสมดุลไอออนบวกในร่างกาย อาทิเช่น PTH และ FGF23 ผลการวิจัยให้ข้อสรุปได้ดังนี้

1. duodenum ตอบสนองต่อการได้รับ PTH และ FGF23 ทั้งฤทธิ์โดยตรง (direct effect) และฤทธิ์ทั้งระบบ (systemic effect) โดย PTH และ FGF23
2. PTH และ FGF23 ปรับเปลี่ยนค่า TEER ซึ่งแสดงถึงความต้านทานของเนื้อเยื่อต่อไอออนบวกในโพรงลำไส้
3. ในการศึกษา *ex vivo* พบว่า FGF23 มีฤทธิ์กด transcellular โดยตรง (direct effect) สอดคล้องกับผลกดการแสดงออกของ TRPM6 ในลำไส้ส่วน duodenum
4. PTH และ FGF23 เพิ่มการแสดงออกของโปรตีน TRPM6 และ CNNM4 ในการศึกษาแบบ *in vivo* ส่งผลคงสมดุล Mg ให้อยู่ในระดับปกติ
5. FGF23 เพิ่มค่าความเป็นกรดในกระเพาะอาหารซึ่งอาจส่งผลต่อการดูดซึม Mg ในลำไส้ต่อมา
6. บทบาทของฮอร์โมน PTH และ FGF23 นั้นเด่นชัดเมื่อร่างกายได้รับ Mg ในปริมาณมาก

หากทราบกลไกที่ชัดเจนของการควบคุมสมดุล Mg จึงนับเป็นประโยชน์อย่างมากต่อมนุษย์ในแง่ของการช่วยลดการสูญเสียรวมถึงเป็นแนวทางหาวิธีป้องกันอันตรายจากความผิดปกติของระดับ Mg ในเลือดที่ต่ำ ส่วนฤทธิ์โดยตรงของฮอร์โมนทั้งสอง ต่อลำไส้ส่วน jejunum และ ileum นั้นยังต้องศึกษาต่อไป ...

5.2 ข้อเสนอแนะ

ผลจากโครงการวิจัยดังกล่าว นำมาซึ่งข้อเสนอแนะดังนี้

1. ศึกษาการแสดงออกของ mRNA และตำแหน่งของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการขนส่งแมกนีเซียมในลำไส้เพิ่มเติม
2. ศึกษาฤทธิ์โดยตรง (Direct effect) ในลำไส้เล็กส่วนอื่นเพิ่มเติม ได้แก่ Jejunum และ Ileum
3. ศึกษาโปรตีนที่เป็นตัวรับ (receptor) subtype อื่นๆ ของฮอร์โมนพาราธัยรอยด์และไฟโปรบลาสต์โกรธแฟคเตอร์-23 รวมถึง co-receptor ร่วมด้วย
4. ศึกษา signaling pathway ที่ตอบสนองต่อฮอร์โมนพาราธัยรอยด์และไฟโปรบลาสต์โกรธแฟคเตอร์-23 ในเซลล์ลำไส้

บรรณานุกรม

Abou-Samra, A. B., Juppner, H., Force, T., Freeman, M. W., Kong, X. F., Schipani, E., . . . et al. (1992). Expression cloning of a common receptor for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide from rat osteoblast-like cells: a single receptor stimulates intracellular accumulation of both cAMP and inositol trisphosphates and increases intracellular free calcium. **Proc Natl Acad Sci U S A**, *89*(7), 2732-2736.

Alexandre, M. D., Lu, Q., & Chen, Y. H. (2005). Overexpression of claudin-7 decreases the paracellular Cl- conductance and increases the paracellular Na^+ conductance in LLC-PK1 cells. **J Cell Sci**, *118*(Pt 12), 2683-2693.

Andrukhova, O., Slavic, S., Smorodchenko, A., Zeitz, U., Shalhoub, V., Lanske, B., . . . Erben, R. G. (2014). FGF23 regulates renal sodium handling and blood pressure. **EMBO Mol Med**, *6*(6), 744-759.

Andrukhova, O., Smorodchenko, A., Egerbacher, M., Streicher, C., Zeitz, U., Goetz, R., . . . Erben, R. G. (2014). FGF23 promotes renal calcium reabsorption through the TRPV5 channel. **EMBO J**, *33*(3), 229-246.

Andrukhova, O., Streicher, C., Zeitz, U., & Erben, R. G. (2016). Fgf23 and parathyroid hormone signaling interact in kidney and bone. **Mol Cell Endocrinol**, *436*, 224-239.

Andrukhova, O., Zeitz, U., Goetz, R., Mohammadi, M., Lanske, B., & Erben, R. G. (2012). FGF23 acts directly on renal proximal tubules to induce phosphaturia through activation of the ERK1/2-SGK1 signaling pathway. **Bone**, *51*(3), 621-628.

Angelow, S., Kim, K. J., & Yu, A. S. (2006). Claudin-8 modulates paracellular permeability to acidic and basic ions in MDCK II cells. **J Physiol**, *571*(Pt 1), 15-26.

Bacic, D., Schulz, N., Biber, J., Kaissling, B., Murer, H., & Wagner, C. A. (2003). Involvement of the MAPK-kinase pathway in the PTH-mediated regulation of the proximal tubule type IIa Na^+/Pi cotransporter in mouse kidney. **Pflugers Arch**, *446*(1), 52-60.

Bailly, C., Roinel, N., & Amiel, C. (1985). Stimulation by glucagon and PTH of Ca and Mg reabsorption in the superficial distal tubule of the rat kidney. **Pflugers Arch**, *403*(1), 28-34.

Baroncelli, G. I., Toschi, B., & Bertelloni, S. (2012). Hypophosphatemic rickets. **Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes**, *19*(6), 460-467.

Ben-Ghedalia, D., Tagari, H., Zamwel, S., & Bondi, A. (1975). Solubility and net exchange of calcium, magnesium and phosphorus in digesta flowing along the gut of the sheep. **Br J Nutr**, *33*(1), 87-94.

Bezerra, C. N., Girardi, A. C., Carraro-Lacroix, L. R., & Reboucas, N. A. (2008). Mechanisms underlying the long-term regulation of NHE3 by parathyroid hormone. **Am J Physiol Renal Physiol**, *294*(5), F1232-1237.

Bikle, D. D., Zolock, D. T., & Munson, S. (1984). Differential response of duodenal epithelial cells to 1,25-dihydroxyvitamin D3 according to position on the villus: a comparison of calcium uptake, calcium-binding protein, and alkaline phosphatase activity. **Endocrinology**, *115*(6), 2077-2084.

Black, D. M., Greenspan, S. L., Ensrud, K. E., Palermo, L., McGowan, J. A., Lang, T. F., . . . Pa, T. H. S. I. (2003). The effects of parathyroid hormone and alendronate alone or in combination in postmenopausal osteoporosis. **N Engl J Med**, *349*(13), 1207-1215.

Blanchard, M. G., Kittikulsuth, W., Nair, A. V., de Baaij, J. H., Latta, F., Genzen, J. R., . . . Hoenderop, J. G. (2016). Regulation of Mg^{2+} Reabsorption and Transient Receptor Potential Melastatin Type 6 Activity by cAMP Signaling. **J Am Soc Nephrol**, *27*(3), 804-813.

Boros, S., Bindels, R. J., & Hoenderop, J. G. (2009). Active Ca(2+) reabsorption in the connecting tubule. **Pflugers Arch**, *458*(1), 99-109.

Bouillon, R., Van Cromphaut, S., & Carmeliet, G. (2003). Intestinal calcium absorption: Molecular vitamin D mediated mechanisms. **J Cell Biochem**, *88*(2), 332-339.

Brewer, H. B., Jr., & Ronan, R. (1970). Bovine parathyroid hormone: amino acid sequence. **Proc Natl Acad Sci U S A**, *67*(4), 1862-1869.

Broadus, A. E., Horst, R. L., Lang, R., Littledike, E. T., & Rasmussen, H. (1980). The importance of circulating 1,25-dihydroxyvitamin D in the pathogenesis of hypercalciuria and renal-stone formation in primary hyperparathyroidism. **N Engl J Med**, *302*(8), 421-426.

Cai, Q., Chandler, J. S., Wasserman, R. H., Kumar, R., & Penniston, J. T. (1993). Vitamin D and adaptation to dietary calcium and phosphate deficiencies increase intestinal plasma membrane calcium pump gene expression. **Proc Natl Acad Sci U S A**, *90*(4), 1345-1349.

Cao, G., Thebault, S., van der Wijst, J., van der Kemp, A., Lasonder, E., Bindels, R. J., & Hoenderop, J. G. (2008). RACK1 inhibits TRPM6 activity via phosphorylation of the fused alpha-kinase domain. **Curr Biol**, *18*(3), 168-176.

Chan, G. K., Deckelbaum, R. A., Bolivar, I., Goltzman, D., & Karaplis, A. C. (2001). PTHrP inhibits adipocyte differentiation by down-regulating PPAR gamma activity via a MAPK-dependent pathway. **Endocrinology**, *142*(11), 4900-4909.

Charoenphandhu, N., Limlomwongse, L., & Krishnamra, N. (2001). Prolactin directly stimulates transcellular active calcium transport in the duodenum of female rats. **Can J Physiol Pharmacol**, *79*(5), 430-438.

Chen, N., Ye, Y., Zou, J., Li, S., Wang, S., Martin, A., . . . Yang, J. J. (2009). Fluorescence complementation via EF-hand interactions. **J Biotechnol**, *142*(3-4), 205-213.

Christakos, S. (2012a). Mechanism of action of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on intestinal calcium absorption. **Rev Endocr Metab Disord**, *13*(1), 39-44.

Christakos, S. (2012b). Recent advances in our understanding of 1,25-dihydroxyvitamin D(3) regulation of intestinal calcium absorption. **Arch Biochem Biophys**, *523*(1), 73-76.

Chubanov, V., Waldegger, S., Mederos y Schnitzler, M., Vitzthum, H., Sassen, M. C., Seyberth, H. W., . . . Gudermann, T. (2004). Disruption of TRPM6/TRPM7 complex formation by a mutation in the TRPM6 gene causes hypomagnesemia with secondary hypocalcemia. **Proc Natl Acad Sci U S A**, *101*(9), 2894-2899.

Clark, I., & Rivera-Cordero, F. (1974). Effects of endogenous parathyroid hormone on calcium, magnesium and phosphate metabolism in rats. II. Alterations in dietary phosphate. **Endocrinology**, *95*(2), 360-369.

Contreras, R. G., Avila, G., Gutierrez, C., Bolivar, J. J., Gonzalez-Mariscal, L., Darzon, A., . . . Cereijido, M. (1989). Repolarization of Na^+-K^+ pumps during establishment of epithelial monolayers. **Am J Physiol**, *257*(5 Pt 1), C896-905.

Contreras, R. G., Shoshani, L., Flores-Maldonado, C., Lazaro, A., & Cereijido, M. (1999). Relationship between Na^+,K^+-ATPase and cell attachment. **J Cell Sci**, *112 (Pt 23)*, 4223-4232.

Cui, M., Li, Q., Johnson, R., & Fleet, J. C. (2012). Villin promoter-mediated transgenic expression of transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 6 (TRPV6) increases intestinal calcium absorption in wild-type and vitamin D receptor knockout mice. **J Bone Miner Res**, *27*(10), 2097-2107.

Dai, L. J., Ritchie, G., Kerstan, D., Kang, H. S., Cole, D. E., & Quamme, G. A. (2001). Magnesium transport in the renal distal convoluted tubule. **Physiol Rev**, *81*(1), 51-84.

de Baaij, J. H., Hoenderop, J. G., & Bindels, R. J. (2015). Magnesium in man: implications for health and disease. **Physiol Rev**, *95*(1), 1-46.

de Groot, T., Lee, K., Langeslag, M., Xi, Q., Jalink, K., Bindels, R. J., & Hoenderop, J. G. (2009). Parathyroid hormone activates TRPV5 via PKA-dependent phosphorylation. **J Am Soc Nephrol**, *20*(8), 1693-1704.

Diamond, J. M., & Bossert, W. H. (1967). Standing-gradient osmotic flow. A mechanism for coupling of water and solute transport in epithelia. **J Gen Physiol**, *50*(8), 2061-2083.

Dudin, K. I., & Teebi, A. S. (1987). Primary hypomagnesaemia. A case report and literature review. **Eur J Pediatr**, *146*(3), 303-305.

Durlach, J., Stoliaroff, M., Gauduchon, J., Leluc, R., & Thuong Cong, T. (1959). [Effects of thyroparathyroidectomy and of parathyroid extract load on the magnesium in the blood of the dog]. **C R Seances Soc Biol Fil**, *153*, 1976-1977.

Elizondo, M. R., Budi, E. H., & Parichy, D. M. (2010). trpm7 regulation of in vivo cation homeostasis and kidney function involves stanniocalcin 1 and fgf23. **Endocrinology**, *151*(12), 5700-5709.

Fihn, B. M., Sjoqvist, A., & Jodal, M. (2000). Permeability of the rat small intestinal epithelium along the villus-crypt axis: effects of glucose transport. **Gastroenterology**, *119*(4), 1029-1036.

Flemstrom, G., & Garner, A. (1981). Effect of parathyroid hormone on bicarbonate secretion in the guinea-pig stomach and the amphibian isolated gastric mucosa. **Clin Sci (Lond)**, *60*(4), 427-433.

Fon Tacer, K., Bookout, A. L., Ding, X., Kurosu, H., John, G. B., Wang, L., . . . Kliewer, S. A. (2010). Research resource: Comprehensive expression atlas of the fibroblast growth factor system in adult mouse. **Mol Endocrinol**, *24*(10), 2050-2064.

Fragoso, A., Silva, A. P., Gundlach, K., Buchel, J., & Neves, P. L. (2014). Magnesium and FGF-23 are independent predictors of pulse pressure in pre-dialysis diabetic chronic kidney disease patients. **Clin Kidney J**, *7*(2), 161-166.

Friedman, P. A., & Gesek, F. A. (1993). Calcium transport in renal epithelial cells. **Am J Physiol**, *264*(2 Pt 2), F181-198.

Fujita, H., Chiba, H., Yokozaki, H., Sakai, N., Sugimoto, K., Wada, T., . . . Sawada, N. (2006). Differential expression and subcellular localization of claudin-7, -8, -12, -13, and -15 along the mouse intestine. **J Histochem Cytochem**, *54*(8), 933-944.

Fujita, H., Sugimoto, K., Inatomi, S., Maeda, T., Osanai, M., Uchiyama, Y., . . . Chiba, H. (2008). Tight junction proteins claudin-2 and -12 are critical for vitamin D-dependent Ca^{2+} absorption between enterocytes. **Mol Biol Cell**, *19*(5), 1912-1921.

Galassi, A., & Cozzolino, M. (2014). Magnesium: a renewed player of vascular ageing in diabetic CKD patients? **Clin Kidney J**, *7*(2), 93-96.

Goetz, R., Ohnishi, M., Kir, S., Kurosu, H., Wang, L., Pastor, J., . . . Mohammadi, M. (2012). Conversion of a paracrine fibroblast growth factor into an endocrine fibroblast growth factor. **J Biol Chem**, *287*(34), 29134-29146.

Groenestege, W. M., Hoenderop, J. G., van den Heuvel, L., Knoers, N., & Bindels, R. J. (2006). The epithelial Mg^{2+} channel transient receptor potential melastatin 6 is regulated by dietary Mg^{2+} content and estrogens. **J Am Soc Nephrol**, *17*(4), 1035-1043.

Hagiwara, A., Nakayama, F., Motomura, K., Asada, M., Suzuki, M., Imamura, T., & Akashi, M. (2009). Comparison of expression profiles of several fibroblast growth factor receptors in the mouse jejunum: suggestive evidence for a differential radioprotective effect among major FGF family members and the potency of FGF1. **Radiat Res**, *172*(1), 58-65.

Han, X., Yang, J., Li, L., Huang, J., King, G., & Quarles, L. D. (2016). Conditional Deletion of Fgfr1 in the Proximal and Distal Tubule Identifies Distinct Roles in Phosphate and Calcium Transport. **PLoS One**, *11*(2), e0147845.

Hardwick, L. L., Jones, M. R., Brautbar, N., & Lee, D. B. (1990). Site and mechanism of intestinal magnesium absorption. **Mineral and electrolyte metabolism**, 16(2-3), 174–180.

Hardwick, L. L., Jones, M. R., Brautbar, N., & Lee, D. B. (1991). Magnesium absorption: mechanisms and the influence of vitamin D, calcium and phosphate. **J Nutr**, *121*(1), 13-23.

Harris, C. A., Burnatowska, M. A., Seely, J. F., Sutton, R. A., Quamme, G. A., & Dirks, J. H. (1979). Effects of parathyroid hormone on electrolyte transport in the hamster nephron. **Am J Physiol**, *236*(4), F342-348.

Heaton, F. W. (1965). The Parathyroid Glands and Magnesium Metabolism in the Rat. **Clin Sci**, *28*, 543-553.

Henzl, M. T., Larson, J. D., & Agah, S. (2003). Estimation of parvalbumin Ca^{2+}- and Mg^{2+}-binding constants by global least-squares analysis of isothermal titration calorimetry data. **Anal Biochem**, *319*(2), 216-233.

Hoenderop, J. G., Nilius, B., & Bindels, R. J. (2005). Calcium absorption across epithelia. **Physiol Rev**, *85*(1), 373-422.

Holick, M. F. (2004). Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers, and cardiovascular disease. **Am J Clin Nutr**, *80*(6 Suppl), 1678S-1688S.

Hou, J., Paul, D. L., & Goodenough, D. A. (2005). Paracellin-1 and the modulation of ion selectivity of tight junctions. **J Cell Sci**, *118*(Pt 21), 5109-5118.

Hu, M. C., Kuro-o, M., & Moe, O. W. (2012). The emerging role of Klotho in clinical nephrology. **Nephrol Dial Transplant**, *27*(7), 2650-2657.

Ikari, A., Hirai, N., Shiroma, M., Harada, H., Sakai, H., Hayashi, H., . . . Takagi, K. (2004). Association of paracellin-1 with ZO-1 augments the reabsorption of divalent cations in renal epithelial cells. **J Biol Chem**, *279*(52), 54826-54832.

Ito, S., Fujimori, T., Hayashizaki, Y., & Nabeshima, Y. (2002). Identification of a novel mouse membrane-bound family 1 glycosidase-like protein, which carries an atypical active site structure. **Biochim Biophys Acta**, *1576*(3), 341-345.

Johnson, J. A., & Kumar, R. (1994). Renal and intestinal calcium transport: roles of vitamin D and vitamin D-dependent calcium binding proteins. **Semin Nephrol**, *14*(2), 119-128.

Juppner, H. (2011). Phosphate and FGF-23. **Kidney Int Suppl**(121), S24-27.

Kanazawa, I., Yamamoto, M., Yamaguchi, T., Yamauchi, M., Yano, S., & Sugimoto, T. (2007). A case of magnesium deficiency associated with insufficient parathyroid hormone action and severe osteoporosis. **Endocr J**, *54*(6), 935-940.

Karbach, U. (1991). Segmental heterogeneity of cellular and paracellular calcium transport across the rat duodenum and jejunum. **Gastroenterology**, *100*(1), 47-58.

Kawata, T., Imanishi, Y., Kobayashi, K., Miki, T., Arnold, A., Inaba, M., & Nishizawa, Y. (2007). Parathyroid hormone regulates fibroblast growth factor-23 in a mouse model of primary hyperparathyroidism. **J Am Soc Nephrol**, *18*(10), 2683-2688.

Kellett, G. L. (2011). Alternative perspective on intestinal calcium absorption: proposed complementary actions of Ca(v)1.3 and TRPV6. **Nutr Rev**, *69*(7), 347-370.

Khanal, R. C., & Nemere, I. (2008). Regulation of intestinal calcium transport. **Annu Rev Nutr**, *28*, 179-196.

Khuituan, P., Teerapornpuntakit, J., Wongdee, K., Suntornsaratoon, P., Konthapakdee, N., Sangsaksri, J., . . . Charoenphandhu, N. (2012). Fibroblast growth factor-23 abolishes 1,25-dihydroxyvitamin D(3)-enhanced duodenal calcium transport in male mice. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, *302*(8), E903-913.

Kim, J. H., Hwang, K. H., Park, K. S., Kong, I. D., & Cha, S. K. (2015). Biological Role of Anti-aging Protein Klotho. **J Lifestyle Med**, *5*(1), 1-6.

Kragelund, B. B., Jonsson, M., Bifulco, G., Chazin, W. J., Nilsson, H., Finn, B. E., & Linse, S. (1998). Hydrophobic core substitutions in calbindin D9k: effects on Ca^{2+} binding and dissociation. **Biochemistry**, *37*(25), 8926-8937.

Kurita, Y., Nakada, T., Kato, A., Doi, H., Mistry, A. C., Chang, M. H., . . . Hirose, S. (2008). Identification of intestinal bicarbonate transporters involved in formation of carbonate precipitates to stimulate water absorption in marine teleost fish. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, *294*(4), R1402-1412.

Kurosu, H., Ogawa, Y., Miyoshi, M., Yamamoto, M., Nandi, A., Rosenblatt, K. P., . . . Kuro-o, M. (2006). Regulation of fibroblast growth factor-23 signaling by klotho. **J Biol Chem**, *281*(10), 6120-6123.

Kutuzova, G. D., & Deluca, H. F. (2004). Gene expression profiles in rat intestine identify pathways for 1,25-dihydroxyvitamin D(3) stimulated calcium absorption and clarify its immunomodulatory properties. **Arch Biochem Biophys**, *432*(2), 152-166.

Laohapitakworn, S., Thongbunchoo, J., Nakkrasae, L. I., Krishnamra, N., & Charoenphandhu, N. (2011). Parathyroid hormone (PTH) rapidly enhances CFTR-mediated HCO(3)(-) secretion in intestinal epithelium-like Caco-2 monolayer: a novel ion regulatory action of PTH. **Am J Physiol Cell Physiol**, *301*(1), C137-149.

Larsen, E. H., Nedergaard, S., & Ussing, H. H. (2000). Role of lateral intercellular space and sodium recirculation for isotonic transport in leaky epithelia. **Rev Physiol Biochem Pharmacol**, *141*, 153-212.

Laverty, G., McWilliams, C., Sheldon, A., & Arnason, S. S. (2003). PTH stimulates a Cl^--dependent and EIPA-sensitive current in chick proximal tubule cells in culture. **Am J Physiol Renal Physiol**, *284*(5), F987-995.

Lee, S. K., & Lorenzo, J. A. (1999). Parathyroid hormone stimulates TRANCE and inhibits osteoprotegerin messenger ribonucleic acid expression in murine bone marrow cultures: correlation with osteoclast-like cell formation. **Endocrinology**, *140*(8), 3552-3561.

Lei, Z., Maeda, T., Tamura, A., Nakamura, T., Yamazaki, Y., Shiratori, H., . . . Hamada, H. (2012). EpCAM contributes to formation of functional tight junction in the intestinal epithelium by recruiting claudin proteins. **Dev Biol**, *371*(2), 136-145.

Lieben, L., Benn, B. S., Ajibade, D., Stockmans, I., Moermans, K., Hediger, M. A., . . . Carmeliet, G. (2010). Trpv6 mediates intestinal calcium absorption during calcium restriction and contributes to bone homeostasis. **Bone**, *47*(2), 301-308.

Lowenstein, F. W., & Stanton, M. F. (1986). Serum magnesium levels in the United States, 1971-1974. **J Am Coll Nutr**, *5*(4), 399-414.

MacIntyre, I., & Robinson, C. J. (1969). Magnesium and the gut: experimental and clinical observations. **Ann N Y Acad Sci**, *162*(2), 865-873.

MacManus, J., Heaton, F. W., & Lucas, P. W. (1971). A decreased response to parathyroid hormone in magnesium deficiency. **J Endocrinol**, *49*(2), 253-258.

Madara, J. L. (1998). Regulation of the movement of solutes across tight junctions. **Annu Rev Physiol**, *60*, 143-159.

Madara, J. L., Barenberg, D., & Carlson, S. (1986). Effects of cytochalasin D on occluding junctions of intestinal absorptive cells: further evidence that the cytoskeleton may influence paracellular permeability and junctional charge selectivity. **J Cell Biol**, *102*(6), 2125-2136.

Martin, A., David, V., & Quarles, L. D. (2012). Regulation and function of the FGF23/klotho endocrine pathways. **Physiol Rev**, *92*(1), 131-155.

Matsuzaki, H., Kajita, Y., & Miwa, M. (2013). Magnesium deficiency increases serum fibroblast growth factor-23 levels in rats. **Magnes Res**, *26*(1), 18-23.

Matsuzaki, H., Katsumata, S., Maeda, Y., & Kajita, Y. (2016). Changes in circulating levels of fibroblast growth factor 23 induced by short-term dietary magnesium deficiency in rats. **Magnes Res**, *29*(2), 48-54.

Mertz-Nielsen, A., Hillingso, J., Bukhave, K., & Rask-Madsen, J. (1996). Omeprazole promotes proximal duodenal mucosal bicarbonate secretion in humans. **Gut**, *38*(1), 6-10.

Miao, D., Tong, X. K., Chan, G. K., Panda, D., McPherson, P. S., & Goltzman, D. (2001). Parathyroid hormone-related peptide stimulates osteogenic cell proliferation through protein kinase C activation of the Ras/mitogen-activated protein kinase signaling pathway. **J Biol Chem**, *276*(34), 32204-32213.

Monteilh-Zoller, M. K., Hermosura, M. C., Nadler, M. J., Scharenberg, A. M., Penner, R., & Fleig, A. (2003). TRPM7 provides an ion channel mechanism for cellular entry of trace metal ions. **J Gen Physiol**, *121*(1), 49-60.

Montell, C. (2003). Mg^{2+} homeostasis: the Mg^{2+}nificent TRPM chanzymes. **Curr Biol**, *13*(20), R799-801.

Morel, F. (1981). Sites of hormone action in the mammalian nephron. **Am J Physiol**, *240*(3), F159-164.

Murer, H., Lotscher, M., Kaissling, B., Levi, M., Kempson, S. A., & Biber, J. (1996). Renal brush border membrane Na/Pi-cotransport: molecular aspects in PTH-dependent and dietary regulation. **Kidney Int**, *49*(6), 1769-1773.

Murray, T. M., Rao, L. G., Divieti, P., & Bringhurst, F. R. (2005). Parathyroid hormone secretion and action: evidence for discrete receptors for the carboxyl-terminal region and related biological actions of carboxyl- terminal ligands. **Endocr Rev**, *26*(1), 78-113.

Nadler, M. J., Hermosura, M. C., Inabe, K., Perraud, A. L., Zhu, Q., Stokes, A. J., . . . Fleig, A. (2001). LTRPC7 is a Mg.ATP-regulated divalent cation channel required for cell viability. **Nature**, *411*(6837), 590-595.

Niall, H. D., Keutmann, H., Sauer, R., Hogan, M., Dawson, B., Aurbach, G., & Potts, J., Jr. (1970). The amino acid sequence of bovine parathyroid hormone I. **Hoppe Seylers Z Physiol Chem**, *351*(12), 1586-1588.

Niessen, C. M. (2007). Tight junctions/adherens junctions: basic structure and function. **J Invest Dermatol**, *127*(11), 2525-2532.

Offermanns, S., Iida-Klein, A., Segre, G. V., & Simon, M. I. (1996). G alpha q family members couple parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide and calcitonin receptors to phospholipase C in COS-7 cells. **Mol Endocrinol**, *10*(5), 566-574.

Ornitz, D. M., & Itoh, N. (2015). The Fibroblast Growth Factor signaling pathway. **Wiley Interdiscip Rev Dev Biol**, *4*(3), 215-266.

Pan, W., Borovac, J., Spicer, Z., Hoenderop, J. G., Bindels, R. J., Shull, G. E., . . . Alexander, R. T. (2012). The epithelial sodium/proton exchanger, NHE3, is necessary for renal

and intestinal calcium (re)absorption. **Am J Physiol Renal Physiol**, *302*(8), F943-956.

Peng, J. B., Brown, E. M., & Hediger, M. A. (2003). Apical entry channels in calcium-transporting epithelia. **News Physiol Sci**, *18*, 158-163.

Penner, R., & Fleig, A. (2007). The Mg^{2+} and Mg^{2+}-nucleotide-regulated channel-kinase TRPM7. **Handb Exp Pharmacol**(179), 313-328.

Pfister, M. F., Lederer, E., Forgo, J., Ziegler, U., Lotscher, M., Quabius, E. S., . . . Murer, H. (1997). Parathyroid hormone-dependent degradation of type II Na^{+}/Pi cotransporters. **J Biol Chem**, *272*(32), 20125-20130.

Pike, J. W., & Christakos, S. (2017). Biology and Mechanisms of Action of the Vitamin D Hormone. **Endocrinol Metab Clin North Am**, *46*(4), 815-843.

Quamme, G. A. (1986). Renal handling of magnesium: drug and hormone interactions. **Magnesium**, *5*(5-6), 248-272.

Quamme, G. A. (1993). Laboratory evaluation of magnesium status. Renal function and free intracellular magnesium concentration. **Clin Lab Med**, *13*(1), 209-223.

Quamme, G. A. (1997). Renal magnesium handling: new insights in understanding old problems. **Kidney Int**, *52*(5), 1180-1195.

Quamme, G. A. (2008). Recent developments in intestinal magnesium absorption. **Curr Opin Gastroenterol**, *24*(2), 230-235.

Razzaque, M. S. (2009). The FGF23-Klotho axis: endocrine regulation of phosphate homeostasis. **Nat Rev Endocrinol**, *5*(11), 611-619.

Ritter, C. S., Zhang, S., Delmez, J., Finch, J. L., & Slatopolsky, E. (2015). Differential expression and regulation of Klotho by paricalcitol in the kidney, parathyroid, and aorta of uremic rats. **Kidney Int**, *87*(6), 1141-1152.

Rude, R. K., & Gruber, H. E. (2004). Magnesium deficiency and osteoporosis: animal and human observations. **J Nutr Biochem**, *15*(12), 710-716.

Sakaguchi, T., Gu, X., Golden, H. M., Suh, E., Rhoads, D. B., & Reinecker, H. C. (2002). Cloning of the human claudin-2 5'-flanking region revealed a TATA-less promoter with conserved binding sites in mouse and human for caudal-related homeodomain proteins and hepatocyte nuclear factor-1alpha. **J Biol Chem**, *277*(24), 21361-21370.

Saris, N. E., Mervaala, E., Karppanen, H., Khawaja, J. A., & Lewenstam, A. (2000). Magnesium. An update on physiological, clinical and analytical aspects. **Clin Chim Acta**, *294*(1-2), 1-26.

Schlingmann, K. P., Waldegger, S., Konrad, M., Chubanov, V., & Gudermann, T. (2007). TRPM6 and TRPM7--Gatekeepers of human magnesium metabolism. **Biochim Biophys Acta**, *1772*(8), 813-821.

Schlingmann, K. P., Weber, S., Peters, M., Niemann Nejsum, L., Vitzthum, H., Klingel, K., . . . Konrad, M. (2002). Hypomagnesemia with secondary hypocalcemia is caused by mutations in TRPM6, a new member of the TRPM gene family. **Nat Genet**, *31*(2), 166-170.

Schmitz, C., Dorovkov, M. V., Zhao, X., Davenport, B. J., Ryazanov, A. G., & Perraud, A. L. (2005). The channel kinases TRPM6 and TRPM7 are functionally nonredundant. **J Biol Chem**, *280*(45), 37763-37771.

Schmitz, C., Perraud, A. L., Johnson, C. O., Inabe, K., Smith, M. K., Penner, R., . . . Scharenberg, A. M. (2003). Regulation of vertebrate cellular Mg2+ homeostasis by TRPM7. **Cell**, *114*(2), 191-200.

Schweigel, M., & Martens, H. (2000). Magnesium transport in the gastrointestinal tract. **Front Biosci**, *5*, D666-677.

Schwindinger, W. F., Fredericks, J., Watkins, L., Robinson, H., Bathon, J. M., Pines, M., . . . Levine, M. A. (1998). Coupling of the PTH/PTHrP receptor to multiple G-proteins. Direct demonstration of receptor activation of Gs, Gq/11, and Gi(1) by [alpha-32P]GTP-gamma-azidoanilide photoaffinity labeling. **Endocrine**, *8*(2), 201-209.

Shalhoub, V., Ward, S. C., Sun, B., Stevens, J., Renshaw, L., Hawkins, N., & Richards, W. G. (2011). Fibroblast growth factor 23 (FGF23) and alpha-klotho stimulate osteoblastic MC3T3.E1 cell proliferation and inhibit mineralization. **Calcif Tissue Int**, *89*(2), 140-150.

Shils, M. E. (1969). Experimental human magnesium depletion. **Medicine (Baltimore)**, *48*(1), 61-85.

Shimada, T., Hasegawa, H., Yamazaki, Y., Muto, T., Hino, R., Takeuchi, Y., . . . Yamashita, T. (2004). FGF-23 is a potent regulator of vitamin D metabolism and phosphate homeostasis. **J Bone Miner Res**, *19*(3), 429-435.

Shimada, T., Kakitani, M., Yamazaki, Y., Hasegawa, H., Takeuchi, Y., Fujita, T., . . . Yamashita, T. (2004). Targeted ablation of Fgf23 demonstrates an essential physiological role of FGF23 in phosphate and vitamin D metabolism. **J Clin Invest**, *113*(4), 561-568.

Shimada, T., Urakawa, I., Yamazaki, Y., Hasegawa, H., Hino, R., Yoneya, T., . . . Yamashita, T. (2004). FGF-23 transgenic mice demonstrate hypophosphatemic rickets with reduced expression of sodium phosphate cotransporter type IIa. **Biochem Biophys Res Commun**, *314*(2), 409-414.

Shimada, T., Yamazaki, Y., Takahashi, M., Hasegawa, H., Urakawa, I., Oshima, T., . . . Yamashita, T. (2005). Vitamin D receptor-independent FGF23 actions in regulating phosphate and vitamin D metabolism. **Am J Physiol Renal Physiol**, *289*(5), F1088-1095.

Shiraki-Iida, T., Aizawa, H., Matsumura, Y., Sekine, S., Iida, A., Anazawa, H., . . . Nabeshima, Y. (1998). Structure of the mouse klotho gene and its two transcripts encoding membrane and secreted protein. **FEBS Lett**, *424*(1-2), 6-10.

Sitara, D., Kim, S., Razzaque, M. S., Bergwitz, C., Taguchi, T., Schuler, C., . . . Lanske, B. (2008). Genetic evidence of serum phosphate-independent functions of FGF-23 on bone. **PLoS Genet**, *4*(8), e1000154.

Sitara, D., Razzaque, M. S., Hesse, M., Yoganathan, S., Taguchi, T., Erben, R. G., . . . Lanske, B. (2004). Homozygous ablation of fibroblast growth factor-23 results in hyperphosphatemia and impaired skeletogenesis, and reverses hypophosphatemia in Phex-deficient mice. **Matrix Biol**, *23*(7), 421-432.

Song, Y., Peng, X., Porta, A., Takanaga, H., Peng, J. B., Hediger, M. A., . . . Christakos, S. (2003). Calcium transporter 1 and epithelial calcium channel messenger ribonucleic acid are differentially regulated by 1,25 dihydroxyvitamin D3 in the intestine and kidney of mice. **Endocrinology**, *144*(9), 3885-3894.

Stubbs, J. R., Liu, S., Tang, W., Zhou, J., Wang, Y., Yao, X., & Quarles, L. D. (2007). Role of hyperphosphatemia and 1,25-dihydroxyvitamin D in vascular calcification and mortality in fibroblastic growth factor 23 null mice. **J Am Soc Nephrol**, *18*(7), 2116-2124.

Suksridechacin, N., Kulwong, P., Chamniansawat, S., & Thongon, N. (2020). Effect of prolonged omeprazole administration on segmental intestinal Mg^{2+} absorption in male Sprague-Dawley rats. **World Journal of Gastroenterology**, 26(11), 1142–1155.

Tanaka, H., Yamamoto, Y., Kashihara, H., Yamazaki, Y., Tani, K., Fujiyoshi, Y., . . . Tsukita, S. (2016). Claudin-21 Has a Paracellular Channel Role at Tight Junctions. **Mol Cell Biol**, *36*(6), 954-964.

Tanrattana, C., Charoenphandhu, N., Limlomwongse, L., & Krishnamra, N. (2004). Prolactin directly stimulated the solvent drag-induced calcium transport in the duodenum of female rats. **Biochim Biophys Acta**, *1665*(1-2), 81-91.

Thongon, N., & Krishnamra, N. (2012). Apical acidity decreases inhibitory effect of omeprazole on Mg^{2+} absorption and claudin-7 and -12 expression in Caco-2 monolayers. **Exp Mol Med**, *44*(11), 684-693.

Thongon, N., Nakkrasae, L. I., Thongbunchoo, J., Krishnamra, N., & Charoenphandhu, N. (2009). Enhancement of calcium transport in Caco-2 monolayer through PKCzeta-dependent Cav1.3-mediated transcellular and rectifying paracellular pathways by prolactin. **Am J Physiol Cell Physiol**, *296*(6), C1373-1382.

Thongon, N., Penguy, J., Kulwong, S., Khongmueang, K., & Thongma, M. (2016). Omeprazole suppressed plasma magnesium level and duodenal magnesium absorption in male Sprague-Dawley rats. **Pflugers Arch**, *468*(11-12), 1809-1821.

Tong, G. M., & Rude, R. K. (2005). Magnesium deficiency in critical illness. **J Intensive Care Med**, *20*(1), 3-17.

Urakawa, I., Yamazaki, Y., Shimada, T., Iijima, K., Hasegawa, H., Okawa, K., . . . Yamashita, T. (2006). Klotho converts canonical FGF receptor into a specific receptor for FGF23. **Nature**, *444*(7120), 770-774.

Usdin, T. B., Gruber, C., & Bonner, T. I. (1995). Identification and functional expression of a receptor selectively recognizing parathyroid hormone, the PTH2 receptor. **J Biol Chem**, *270*(26), 15455-15458.

van Abel, M., Hoenderop, J. G., van der Kemp, A. W., Friedlaender, M. M., van Leeuwen, J. P., & Bindels, R. J. (2005). Coordinated control of renal Ca(2+) transport proteins by parathyroid hormone. **Kidney Int**, *68*(4), 1708-1721.

van de Graaf, S. F., Boullart, I., Hoenderop, J. G., & Bindels, R. J. (2004). Regulation of the epithelial Ca^{2+} channels TRPV5 and TRPV6 by 1alpha,25-dihydroxy Vitamin D3 and dietary Ca^{2+}. **J Steroid Biochem Mol Biol**, *89-90*(1-5), 303-308.

van de Graaf, S. F., Hoenderop, J. G., & Bindels, R. J. (2006). Regulation of TRPV5 and TRPV6 by associated proteins. **Am J Physiol Renal Physiol**, *290*(6), F1295-1302.

van den Broek, D. H. N., Chang, Y. M., Elliott, J., & Jepson, R. E. (2018). Prognostic importance of plasma total magnesium in a cohort of cats with azotemic chronic kidney disease. **J Vet Intern Med**, *32*(4), 1359-1371.

Van Itallie, C. M., & Anderson, J. M. (2004). The molecular physiology of tight junction pores. **Physiology (Bethesda)**, *19*, 331-338.

Van Itallie, C. M., & Anderson, J. M. (2006). Claudins and epithelial paracellular transport. **Annu Rev Physiol**, *68*, 403-429.

Voets, T., Nilius, B., Hoefs, S., van der Kemp, A. W., Droogmans, G., Bindels, R. J., & Hoenderop, J. G. (2004). TRPM6 forms the Mg^{2+} influx channel involved in intestinal and renal Mg^{2+} absorption. **J Biol Chem**, *279*(1), 19-25.

Walder, R. Y., Landau, D., Meyer, P., Shalev, H., Tsolia, M., Borochowitz, Z., . . . Sheffield, V. C. (2002). Mutation of TRPM6 causes familial hypomagnesemia with secondary hypocalcemia. **Nat Genet**, *31*(2), 171-174.

Wang, H., Yoshiko, Y., Yamamoto, R., Minamizaki, T., Kozai, K., Tanne, K., . . . Maeda, N. (2008). Overexpression of fibroblast growth factor 23 suppresses osteoblast differentiation and matrix mineralization in vitro. **J Bone Miner Res**, *23*(6), 939-948.

Weinman, E. J., Biswas, R. S., Peng, G., Shen, L., Turner, C. L., E, X., . . . Cunningham, R. (2007). Parathyroid hormone inhibits renal phosphate transport by phosphorylation of serine 77 of sodium-hydrogen exchanger regulatory factor-1. **J Clin Invest**, *117*(11), 3412-3420.

Weinman, E. J., Steplock, D., Shenolikar, S., & Biswas, R. (2011). Fibroblast growth factor-23-mediated inhibition of renal phosphate transport in mice requires sodium-hydrogen exchanger regulatory factor-1 (NHERF-1) and synergizes with parathyroid hormone. **J Biol Chem**, *286*(43), 37216-37221.

Xue, S., Yang, H., Qiao, J., Pu, F., Jiang, J., Hubbard, K., . . . Yang, J. J. (2015). Protein MRI contrast agent with unprecedented metal selectivity and sensitivity for liver cancer imaging. **Proc Natl Acad Sci U S A**, *112*(21), 6607-6612.

Yahata, K., Mori, K., Arai, H., Koide, S., Ogawa, Y., Mukoyama, M., . . . Nakao, K. (2000). Molecular cloning and expression of a novel klotho-related protein. **J Mol Med (Berl)**, *78*(7), 389-394.

Yamashita, T., Yoshioka, M., & Itoh, N. (2000). Identification of a novel fibroblast growth factor, FGF-23, preferentially expressed in the ventrolateral thalamic nucleus of the brain. **Biochem Biophys Res Commun**, *277*(2), 494-498.

Zhou, Y., Xue, S., & Yang, J. J. (2013). Calciomics: integrative studies of Ca^{2+}-binding proteins and their interactomes in biological systems. **Metallomics**, *5*(1), 29-42.

ภาคผนวก

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ขอมอบเกียรติบัตรเพื่อรับรองว่าผลงานวิจัยเรื่อง

ฤทธิ์ของฮอร์โมนพาราไทรอยด์และไฟโบรบลาสต์โกรทแฟคเตอร์-23
ต่อการดูดซึมแมกนีเซียมในลำไส้ส่วนดูโอดีนัม

โดย

ณศิสรณ์ สุขศรีเดชาศิลป์, ณรงค์ฤทธิ์ ทองอุ่น

ได้ผ่านการพิจารณาจากคณะกรรมการผู้ทรงคุณวุฒิ และได้นำเสนอผลงานประเภท Oral Presentation ในงานประชุมวิชาการ
นำเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาแห่งชาติ ครั้งที่ 50 (The 50th National Graduate Research Conference)
วันที่ 6-7 มิถุนายน พ.ศ. 2563

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรัญญา วลัยรัชต์
รองอธิการบดีฝ่ายวิชาการและต่างประเทศ
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

137

ที่ 28/2562

ใบรับรองการอนุมัติให้ดำเนินการเลี้ยงและใช้สัตว์

คณะกรรมการกำกับดูแลการดำเนินการต่อสัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ได้พิจารณาโครงการวิจัย

รหัสโครงการวิจัย IACUC 017/2562

ชื่อข้อเสนอการวิจัย

ภาษาไทย ฤทธิ์ของฮอร์โมน Parathyroid และ FGF23 ต่อการดูดซึมแมกนีเซียมในลำไส้ของหนูแรท

หัวหน้าโครงการวิจัย	รองศาสตราจารย์ ดร.ณรงค์ฤทธิ์ ทองอุ่น
ผู้ร่วมโครงการวิจัย	นางสาวณศิสรณ์ สุขศรีเดชาศิลป์
หน่วยงานที่สังกัด	คณะสหเวชศาสตร์
มหาวิทยาลัย	มหาวิทยาลัยบูรพา

ข้อเสนอการวิจัยนี้ได้ผ่านการพิจารณาจากคณะกรรมการกำกับดูแลการดำเนินการต่อสัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพาแล้ว เห็นว่ามีความสอดคล้องกับจรรยาบรรณการใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ สภาวิจัยแห่งชาติ คณะกรรมการกำกับดูแลการดำเนินการต่อสัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา จึงเห็นสมควรให้ดำเนินการเลี้ยงและใช้สัตว์ตามข้อเสนอการวิจัยนี้ได้ ตั้งแต่วันที่ออกเอกสารรับรองผลการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในสัตว์ ฉบับนี้ จนถึงวันที่ 28 ตุลาคม พ.ศ. 2563

ออกให้ ณ วันที่ 29 ตุลาคม พ.ศ. 2562

ลงนาม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รชนิมุข หิรัญสัจจาเลิศ)
ประธานคณะกรรมการกำกับดูแลการดำเนินการต่อสัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยบูรพา