



การศึกษาโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการควบคุม Mg^{2+} ในเยื่อลำไส้หนูขาวที่อยู่ในภาวะ
Hypomagnesemia จากการได้รับ Omeprazole

ณัฐธิดา คำพวง

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์

คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

2565

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยบูรพา

การศึกษาโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการควบคุม Mg^{2+} ในเยื่อลำไส้หนูขาวที่อยู่ในภาวะ
Hypomagnesemia จากการได้รับ Omeprazole



ณัฐธิดา คำพวง

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์

คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

2565

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยบูรพา

THE STUDY OF MAGNESIOTROPIC PROTEIN ON INTESTINAL EPITHELIUM IN
OMEPRAZOLE - INDUCED HYPOMAGNESEMIA RATS



NATTIDA KAMPUANG

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENTS FOR THE MASTER DEGREE OF SCIENCE
IN MEDICAL SCIENCE
FACULTY OF ALLIED HEALTH SCIENCES
BURAPHA UNIVERSITY

2022

COPYRIGHT OF BURAPHA UNIVERSITY

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์และคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ได้พิจารณา
วิทยานิพนธ์ของ ณิชฐิตา คำพวง ฉบับนี้แล้ว เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตาม
หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์ ของมหาวิทยาลัยบูรพาได้

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร.ณรงค์ฤทธิ์ ทองอ่อน)

..... ประธาน
(ศาสตราจารย์ ดร.ฉัตรชัย เหมือนประสาทย)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริพร จำเนียรสวัสดิ์)

..... กรรมการ
(ดร.ชนพรรณ เลียงแจ่ม)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ณรงค์ฤทธิ์ ทองอ่อน)

..... คณบดีคณะสหเวชศาสตร์

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. มารุต ตั้งวัฒนาชูลิพร)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยบูรพา อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของ
การศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์ ของมหาวิทยาลัย
บูรพา

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ ดร.นุจรี ไชยมงคล)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

61910121: สาขาวิชา: วิทยาศาสตร์การแพทย์; วท.ม. (วิทยาศาสตร์การแพทย์)
 คำสำคัญ: PPIs, TRPM6, TRPM7, CNNM4, Omeprazole, TRPM6/7 dimerization, mass spectrometry, Immunoprecipitation, การดูดซึมแมกนีเซียมในลำไส้, PPIH rat models

นั้ฐริดา คำพวง : การศึกษาโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการควบคุม Mg^{2+} ในเยื่อลำไส้หนูขาวที่อยู่ในภาวะ Hypomagnesemia จากการได้รับ Omeprazole. (THE STUDY OF MAGNESIOTROPIC PROTEIN ON INTESTINAL EPITHELIUM IN OMEPRAZOLE - INDUCED HYPOMAGNESEMIA RATS) คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: ณรงค์ฤทธิ์ ทองอุ่น ปี พ.ศ. 2565.

ยาในกลุ่ม proton pump inhibitors (PPIs) เป็นยาที่ยับยั้งการหลั่งกรดในกระเพาะอาหารที่ใช้กันแพร่หลาย ข้อมูลทางการแพทย์บ่งชี้การใช้ยา PPIs มีผลให้ระดับ Mg^{2+} ในเลือดต่ำกว่าปกติ (PPIs-induced hypomagnesemia, PPIH) โดยน่าจะเกิดจากการกีดการดูดซึม Mg^{2+} ในลำไส้ การศึกษาก่อนหน้านี้ของคณะผู้วิจัยพบว่าการฉีดยา Omeprazole ซึ่งเป็น PPIs ที่ได้รับความนิยมมากที่สุด เป็นเวลา 12 และ 24 สัปดาห์ในหนูขาว เหนี่ยวนำให้เกิดภาวะระดับ Mg^{2+} ในเลือดต่ำกว่าปกติ โดยพบว่ามี การกีดการดูดซึม Mg^{2+} ในลำไส้ส่วน duodenum jejunum ileum และ colon โดยมีการกีดการดูดซึมในลำไส้ส่วน duodenum มากที่สุด นอกจากนี้ยังพบว่ามี การแสดงของโปรตีนที่สำคัญต่อการดูดซึม Mg^{2+} คือ transient receptor potential melastatin 6 (TRPM6) และ ancient conserved domain protein 4 (CNM4) เพิ่มขึ้นในลำไส้ทุกส่วน อย่างไรก็ตาม มีคำถามสำคัญเกิดขึ้นคือ เหตุใดการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของโปรตีนข้างต้น กลับไม่สามารถเพิ่มการดูดซึม Mg^{2+} ในลำไส้ และลดภาวะ PPIH ได้ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นศึกษาดำเนินการแสดงออก และความผิดปกติของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการขนส่ง Mg^{2+} ในลำไส้ของหนูขาวที่มีภาวะ PPIH โดยใช้ตัวอย่างจากลำไส้ของหนูขาวกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ได้รับ Omeprazole 12 และ 24 สัปดาห์ ทำการศึกษาด้วยเทคนิค Western blot พบว่า โปรตีน TRPM6 TRPM7 และ CNM4 ในลำไส้ส่วน duodenum jejunum ileum และ colon กลุ่มที่ได้รับยา Omeprazole เป็นเวลา 12 และ 24 สัปดาห์มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นมากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อศึกษาดำเนินการแสดงออกของโปรตีน โดยทำการแยกโปรตีนที่ผิวเซลล์ และโปรตีนภายใน cytoplasm พบว่าโปรตีน TRPM6 มีการแสดงออกในเยื่อหุ้มเซลล์เพิ่มมากขึ้น แต่มีการแสดงออก TRPM6 ภายใน cytoplasm ลดลง ในลำไส้ส่วน duodenum jejunum ileum และ colon ของกลุ่มที่ได้รับยา Omeprazole เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ สำหรับโปรตีน TRPM7 พบว่ามี การ

แสดงออกของโปรตีนในเยื่อหุ้มเซลล์ลดลง แต่มีการแสดงออกของ TRPM7 ภายในเซลล์เพิ่มมากขึ้นในลำไส้ส่วน duodenum และ jejunum เมื่อศึกษาโปรตีน TRPM6 (TRPM6-IP) ในเยื่อหุ้มเซลล์ด้วยวิธี immunoprecipitation จากนั้นศึกษาการแสดงออกของโปรตีน TRPM7 ใน TRPM6-IP พบว่าการแสดงออกของโปรตีน TRPM7 ลดลงในลำไส้ส่วน duodenum และ jejunum ของหนูกลุ่มที่ได้รับยา Omeprazole ทั้ง 2 กลุ่ม บ่งชี้ว่ามีการลดลงของ TRPM6/7 heterodimer เมื่อศึกษาด้วยวิธี liquid chromatography coupled with electrospray ionization-quadrupole-time of flight-mass spectrometry (LC-ESI-QTOF-MS/MS) พบว่าโปรตีน TRPM6 มีการกลายพันธุ์โดยลำดับโปรตีน W1814-C1838 มีการขาดหายไปในส่วนของ α -kinase ด้วยกลไกเหล่านี้จึงทำให้การดูดซึม Mg^{2+} ในลำไส้เล็กของหนู PPIH ลดต่ำลง แม้จะมีการแสดงออกของโปรตีนเพิ่มขึ้น สำหรับการแสดงออกของ CNNM4 มีการแสดงออกในเยื่อหุ้มเซลล์เพิ่มขึ้น ในขณะที่ภายในเซลล์มีการแสดงออกของ CNNM4 ลดลงในลำไส้ส่วน duodenum jejunum ileum และ colon ของกลุ่มที่ได้รับยา Omeprazole ทั้ง 2 กลุ่ม งานวิจัยนี้ แสดงให้เห็นว่าลำไส้มีกลไกการปรับตัวในการดูดซึมแมกนีเซียม

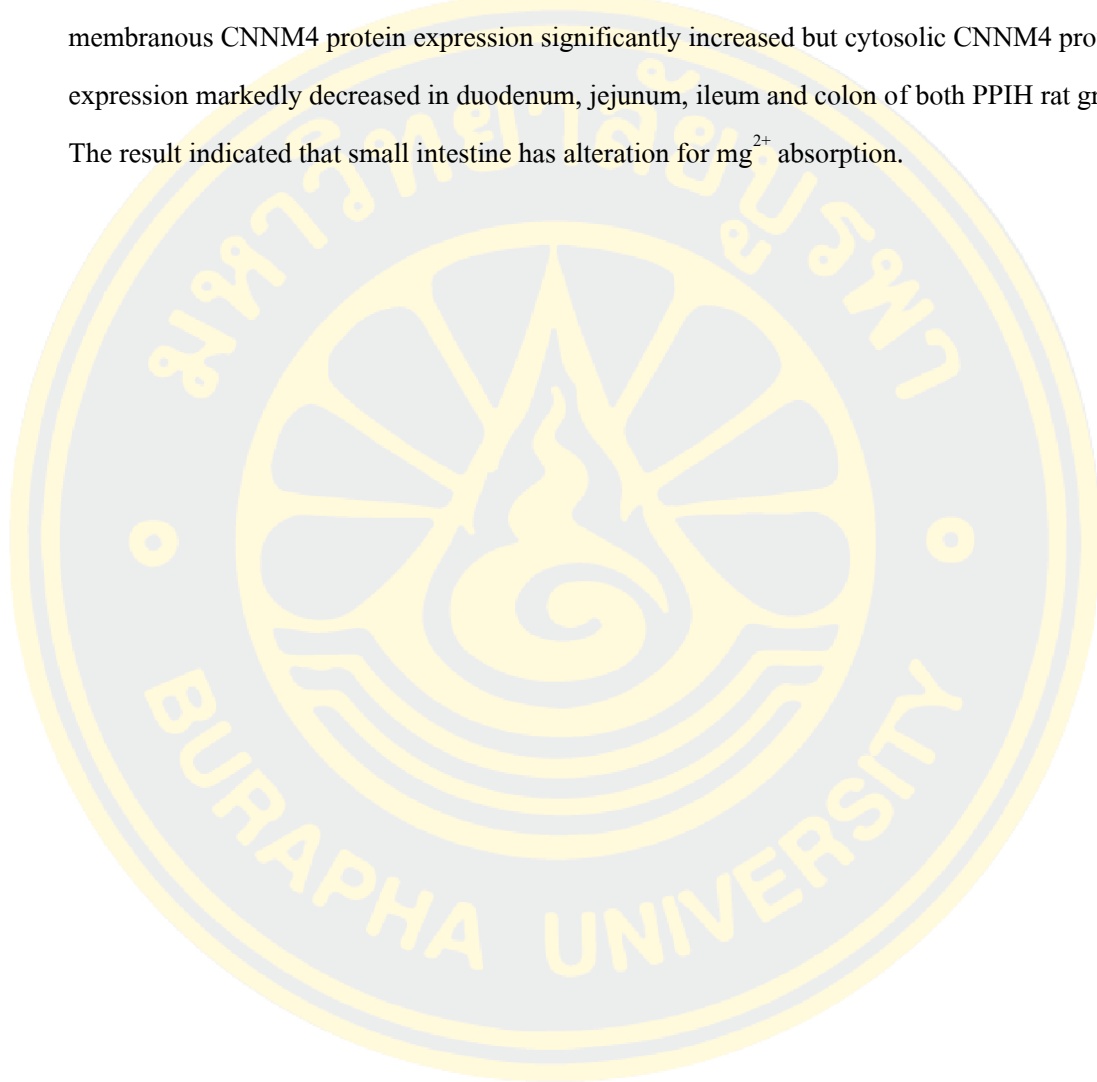
61910121: MAJOR: MEDICAL SCIENCE; M.Sc. (MEDICAL SCIENCE)

KEYWORDS: Magnesiotropic protein, PPIs, Omeprazole, TRPM6, TRPM7, CNNM4, TRPM6/7 dimerization, mass spectrometry, Immunoprecipitation, PPIH rat models

NATTIDA KAMPUANG : THE STUDY OF MAGNESIOTROPIC PROTEIN ON INTESTINAL EPITHELIUM IN OMEPRAZOLE - INDUCED HYPOMAGNESEMIA RATS. ADVISORY COMMITTEE: NARONGRIT THONGON, Ph.D. 2022.

Proton pump inhibitors (PPIs) are the common therapeutic medicine for acid peptic disorders. Prolong PPIs used induced hypomagnesemia (PPIH) is a serious side effect of PPIs. Our previous studies reported that prolonged Omeprazole 12- and 24-weeks injection suppressed small intestinal Mg^{2+} absorption especially duodenum and induced hypomagnesemia, although TRPM6 and CNNM4 proteins which transport Mg^{2+} through villous epithelial enterocyte significantly increased. Therefore, the present study aimed to observe the distribution of TRPM6, TRPM7 and CNNM4 in duodenum, jejunum, ileum, and colon of PPIH rats from our previous study. Proteins from duodenal, jejunal, ileal and colon tissues were subjected to perform western blot analysis to observe the expression of TRPM6, TRPM7, and CNNM4 expression. The results demonstrated that proteins significantly increased in whole small intestinal parts of both 12- and 24-weeks Omeprazole injected rats compared with vehicle-injected rats. Separated membranous and cytosolic protein were subjected to perform western blot analysis to identify located protein expression. The result demonstrated that membranous TRPM6 significantly increased while cytosolic TRPM6 significantly decreased in duodenum, jejunum, ileum and colon of Omeprazole injected rats compared with vehicle-injected rats. Whereas membranous TRPM7 expression markedly decreased but cytosolic TRPM7 significantly increased in duodenum, jejunum of both PPIH rat groups (12 and 24 wks) compared with vehicle-injected rats. Moreover, immunoprecipitated TRPM6 (TRPM6-IP) protein expression in membrane were observed, then identify TRPM7 protein expression in TRPM6-IP, the results revealed that TRPM7 protein expression significantly decreased in duodenum and jejunum of both PPIH rat groups. This result indicated that TRPM6/TRPM7 heterodimer markedly decreased. Then liquid chromatography coupled with electrospray ionization-quadrupole-time of flight-mass spectrometry (LC-ESI-

QTOF-MS/MS) analysis were performed to observe phosphorylation site of TRPM6 membranous protein, the results shown that peptide base W1814 to C1838 were disappeared in α -kinase domain of 24-weeks Omeprazole injected rats. these results explained why Mg^{2+} absorption still decreased, although proteins were up-regulated in small intestine of PPIH rats. Furthermore, membranous CNNM4 protein expression significantly increased but cytosolic CNNM4 protein expression markedly decreased in duodenum, jejunum, ileum and colon of both PPIH rat groups. The result indicated that small intestine has alteration for mg^{2+} absorption.



กิตติกรรมประกาศ

รายงานฉบับนี้ ได้รับทุนอุดหนุนการทำกิจกรรมส่งเสริมและสนับสนุนการวิจัยและนวัตกรรมจากสำนักงานการวิจัยแห่งชาติ และ ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2563 คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. ณรงค์ฤทธิ์ ทองอ่อน อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่สละเวลาให้คำแนะนำ ช่วยเหลือและแก้ปัญหาตลอดการดำเนินกระบวนการวิจัยและทำให้งานวิจัยฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ และขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริพร จำเนียรสวัสดิ์ และ ดร.ชนพรรณ เสียงแจ่ม คณะกรรมการสอบเค้าโครงร่างวิทยานิพนธ์ และขอขอบคุณคณะสหเวชศาสตร์ที่ช่วยเหลือและส่งเสริมสถานที่และเครื่องมือที่ใช้ในกระบวนการวิจัย รวมถึงอำนวยความสะดวกในขณะที่อยู่ในระหว่างกระบวนการวิจัย รวมถึงขอขอบคุณ คุณสุพิชฌาย์ ปั้นเหน่งเพชร จากหน่วยบริการ โปรตีนโอมิคส์ ศูนย์วิจัยพัฒนานวัตกรรม คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ได้ให้บริการ การเตรียมสารเคมี และบริการเครื่องมือ Mass spectrometer สำหรับงานวิจัยนี้

สุดท้ายนี้ ขอขอบคุณเพื่อนนิสิตปริญญาโท และปริญญาเอก รวมถึงอาจารย์คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพาทุกท่านที่ได้ให้คำแนะนำในการใช้เครื่องมือต่าง ๆ รวมถึงในส่วนขั้นตอนกระบวนการทำงานวิจัย และส่งเสริมให้กำลังใจตลอดมา นอกจากนี้ยังมีผู้ที่ให้ความร่วมมือ และให้การช่วยเหลืออีกหลายท่าน ซึ่งผู้วิจัยไม่สามารถกล่าวนามได้หมดในที่นี้ จึงขอขอบพระคุณทุกท่านเหล่านั้น ไว้ ณ โอกาสนี้ด้วย

ณัฐธิดา คำพวง

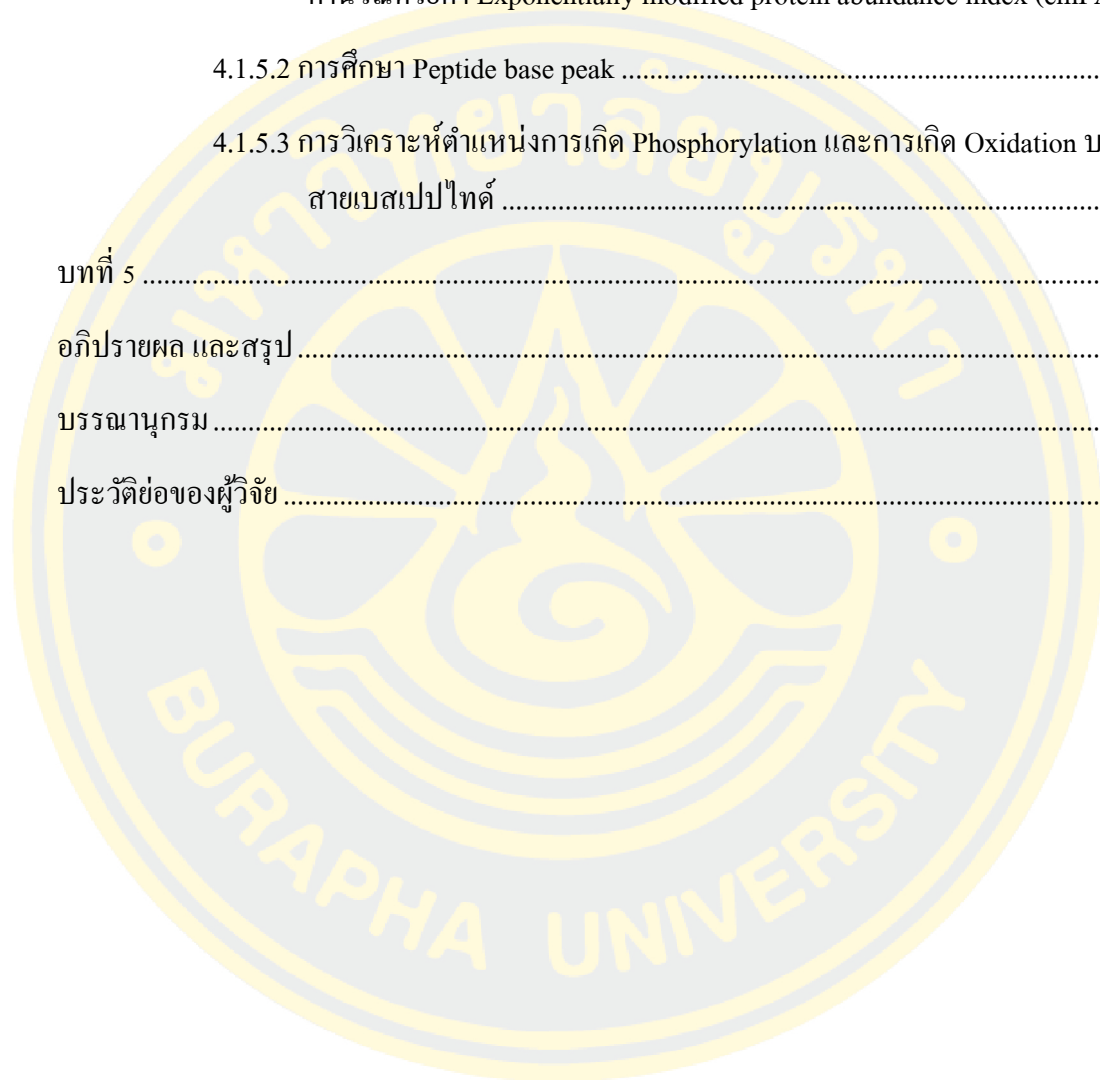
สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ฉ
กิตติกรรมประกาศ	ช
สารบัญ	ฅ
สารบัญตาราง	ฉุ
สารบัญรูปภาพ	๓
บทที่ 1	1
บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	6
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	6
1.4 ขอบเขตของการวิจัย	6
บทที่ 2	7
วรรณกรรมและผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	7
Proton pump inhibitor (PPI) และ hypomagnesemia	7
แมกนีเซียม (magnesium ; Mg ²⁺)	9
ความสำคัญของแมกนีเซียม	10
ความสำคัญของแมกนีเซียมต่อกลไกการทำงานภายในเซลล์	12
การรักษาสมดุลแมกนีเซียมในร่างกายมนุษย์.....	14
การดูดซึมแมกนีเซียมในลำไส้เล็ก.....	17
Passive paracellular transport.....	17

Active transcellular transport	20
TRPM6/22	
TRPM7/23	
CNNM4	24
การรักษาสมดุลแมกนีเซียมในกระดูก	26
การรักษาสมดุลแมกนีเซียมในไต	27
ยากดกลุ่ม Proton Pump Inhibitor ต่อการดูดการดูดซึมแมกนีเซียมในลำไส้ (PPIs suppressed Intestinal Mg ²⁺ absorption).....	30
การย้ายถิ่นฐานของโปรตีนจากในเซลล์สู่เยื่อหุ้มเซลล์.....	34
บทที่ 3	38
วิธีดำเนินการวิจัย.....	38
3.1 ประชากร	38
3.2 กลุ่มตัวอย่างและสุ่มตัวอย่าง	38
3.3 การเก็บรวบรวมข้อมูล	38
โปรตีน.....	38
การสกัดโปรตีน (Protein Extraction)	39
การศึกษาการแสดงออกของโปรตีน (Protein Expression).....	39
การแยกเก็บโปรตีนด้วยเทคนิค Immunoprecipitation (Protein Separation by Immunoprecipitation)	40
การเพิ่มความเข้มข้นของตัวอย่าง โดยใช้ Concentration tube	41
การแสดงออก Phosphorylation site ของโปรตีน ด้วยเทคนิค ESI-QTOF- Mass Spectrometry (MS/MS).....	42
3.4 การวิเคราะห์ข้อมูล.....	44
บทที่ 4	45

ผลการวิจัยและอภิปรายผล	45
4.1 ผลการวิจัย.....	45
4.1.1 ผลการศึกษาโปรตีน Transient receptor potential melastatin (TRPM) 6	45
4.1.1.1 การแสดงออกของโปรตีน TRPM6 ในลำไส้ของหนู เมื่อได้รับยา Omeprazole นาน 12 และ 24 สัปดาห์.....	45
4.1.1.2 การแสดงออกของโปรตีน TRPM6 เมื่อได้รับยา Omeprazole นาน 12 สัปดาห์.....	46
4.1.1.3 การแสดงออกของโปรตีน TRPM6 เมื่อได้รับยา Omeprazole นาน 24 สัปดาห์.....	47
4.1.2 ผลการศึกษาโปรตีน Transient receptor potential melastatin (TRPM) 7	51
4.1.2.1 การแสดงออกของโปรตีน TRPM7 ในลำไส้ของหนู เมื่อได้รับยา Omeprazole นาน 12 และ 24 สัปดาห์.....	51
4.1.2.2 ผลการศึกษาการแสดงออกของโปรตีน TRPM7 เมื่อได้รับยา Omeprazole นาน 12 สัปดาห์	52
4.1.2.3 ผลการศึกษาการแสดงออกของโปรตีน TRPM7 เมื่อได้รับยา Omeprazole นาน 24 สัปดาห์	53
4.1.3 การแสดงออกของโปรตีน TRPM6 และการศึกษาการแสดงออกของการทำงานร่วมกันของโปรตีน TRPM6 และ TRPM7 ด้วยเทคนิค Immunoprecipitation	57
4.1.4 ผลการศึกษาโปรตีน Ancient conserved domain protein 4 (CNNM4).....	59
4.1.4.1 การแสดงออกของโปรตีน CNNM4 ในลำไส้ของหนู เมื่อได้รับยา Omeprazole นาน 12 และ 24 สัปดาห์	59
4.1.4.2 การแสดงออกของโปรตีน CNNM4 เมื่อได้รับยา Omeprazole นาน 12 สัปดาห์.....	60
4.1.4.3 ผลการศึกษาการแสดงออกของโปรตีน CNNM4 เมื่อได้รับยา Omeprazole นาน 24 สัปดาห์	61

4.1.5 การแสดงออกของ Phosphorylation site ของโปรตีน TRPM6 ด้วยเทคนิค Mass spectrometry.....	65
4.1.5.1 การศึกษาจำนวนของ Peptide หรือปริมาณโปรตีนที่ตรวจจับได้โดยการคำนวณด้วยค่า Exponentially modified protein abundance index (emPAI)	70
4.1.5.2 การศึกษา Peptide base peak	76
4.1.5.3 การวิเคราะห์ตำแหน่งการเกิด Phosphorylation และการเกิด Oxidation บนสายเบสเปปไทด์	90
บทที่ 5	97
อภิปรายผล และสรุป	97
บรรณานุกรม	108
ประวัติย่อของผู้วิจัย	124



สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 แสดงขนาดของโปรตีนและเปอร์เซ็นต์ของเจล SDS-PAGE ที่เหมาะสม	39
ตารางที่ 2 ตารางแสดงร้อยละการเหมือนกันของ Sequence protein ของโปรตีน TRPM6 ในกลุ่มตัวอย่าง ทั้ง 3 กลุ่ม ของลำไส้ส่วน duodenum กับฐานข้อมูล	66
ตารางที่ 3 ตารางแสดงร้อยละการเหมือนกันของ Sequence protein ของโปรตีน TRPM6 ในกลุ่มตัวอย่าง ทั้ง 3 กลุ่ม ของลำไส้ส่วน jejunum กับฐานข้อมูล	67
ตารางที่ 4 ตารางแสดงร้อยละการเหมือนกันของ Sequence protein ของโปรตีน TRPM7 ในกลุ่มตัวอย่าง ทั้ง 3 กลุ่ม ของลำไส้ส่วน duodenum กับฐานข้อมูล	68
ตารางที่ 5 ตารางแสดงร้อยละการเหมือนกันของ Sequence protein ของโปรตีน TRPM7 ในกลุ่มตัวอย่าง ทั้ง 3 กลุ่ม ของลำไส้ส่วน jejunum กับฐานข้อมูล	69
ตารางที่ 6 แสดงค่า emPAI ของ Peptide ในลำไส้ส่วน duodenum ที่ได้จากการศึกษาโดยใช้เทคนิค ESI-QTOF MS/MS ที่คำนวณได้จากโปรแกรม Mascot search result (Matrix Science)	71
ตารางที่ 7 แสดงค่า emPAI ของ Peptide ในลำไส้ส่วน jejunum ที่ได้จากการศึกษาโดยใช้เทคนิค ESI-QTOF MS/MS ที่คำนวณได้จากโปรแกรม Mascot search result (Matrix Science)	72
ตารางที่ 8 ตารางแสดง Phosphorylated protein ในตำแหน่งต่าง ๆ ของ TRPM6 sequence protein ในลำไส้ส่วน duodenum.....	92
ตารางที่ 9 ตารางแสดง Oxidation ในตำแหน่งต่าง ๆ ของ TRPM6 sequence protein ในลำไส้ส่วน duodenum.....	94
ตารางที่ 10 ตารางแสดง Phosphorylated protein ในตำแหน่งต่าง ๆ ของ TRPM6 sequence protein ในลำไส้ส่วน jejunum	94
ตารางที่ 11 ตารางแสดง Oxidation ในตำแหน่งต่าง ๆ ของ TRPM6 sequence protein ในลำไส้ส่วน jejunum.....	96

สารบัญรูปภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1 แสดงการรักษาสมดุลแมกนีเซียมในร่างกายมนุษย์	15
ภาพที่ 2 แสดงกลไกการดูดซึมและปัจจัยที่มีผลต่อการดูดซึมแมกนีเซียมในลำไส้	15
ภาพที่ 3 แสดงการรักษาสมดุลของแมกนีเซียมภายในเซลล์ ของ Transporters protein.....	17
ภาพที่ 4 แสดงโครงสร้างของ TRPM6 และ 7	21
ภาพที่ 5 แสดงกลไกการทำงานของ TRPM7.....	24
ภาพที่ 6 แสดงการจับกันระหว่าง CNNM4 และ PRL ซึ่งมีผลต่อการขนส่งแมกนีเซียม	25
ภาพที่ 7 แสดงกลไกการรักษาสมดุลแมกนีเซียมภายในกระดูก	26
ภาพที่ 8 แสดงการรักษาสมดุลของแมกนีเซียมในไตที่บริเวณส่วนต่างๆ	29
ภาพที่ 9 ภาพแสดงการเกิด Protein insertion รูปแบบต่างๆ.....	37
ภาพที่ 10 แสดงขั้นตอนการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS)	44
ภาพที่ 11 แสดงการแสดงออกของโปรตีน total TRPM6 protein.....	45
ภาพที่ 12 แสดงการแสดงออกของโปรตีน cytosolic และ membranous TRPM6 protein.....	48
ภาพที่ 13 แสดงการแสดงออกของโปรตีน total TRPM7 protein.....	51
ภาพที่ 14 แสดงการแสดงออกของ cytosolic และ membranous TRPM6 protein	54
ภาพที่ 15 แสดงการแสดงออกของ Immunoprecipitation protein	58
ภาพที่ 16 แสดงการแสดงออกของโปรตีน total CNNM4 protein.....	59
ภาพที่ 17 แสดงการแสดงออกของ cytosolic และ membranous CNNM4 protein.....	62
ภาพที่ 18 แสดง Protein sequencing ของโปรตีน TRPM6 ของหนูกลุ่มควบคุม	73
ภาพที่ 19 แสดง Protein sequencing ของโปรตีน TRPM6 ของหนูกลุ่มที่ได้รับยา Omeprazole นาน 12 สัปดาห์.....	74

ภาพที่ 20 แสดง Protein sequencing ของโปรตีน TRPM6 ของหนูกลุ่มที่ได้รับยา Omeprazole นาน 24 สัปดาห์.....	75
ภาพที่ 21 แสดง peptide base peak ของโปรตีน TRPM6 ตำแหน่งที่มีการขาดหายไป ในลำไส้ส่วน duodenum ของกลุ่มควบคุม	78
ภาพที่ 22 แสดง peptide base peak ของโปรตีน TRPM6 ตำแหน่งที่มีการขาดหายไป ในลำไส้ส่วน duodenum ของกลุ่มหนูที่ได้รับยา Omeprazole นาน 12 สัปดาห์	78
ภาพที่ 23 แสดง peptide base peak ของโปรตีน TRPM6 ตำแหน่งที่มีการขาดหายไป ในลำไส้ส่วน duodenum ของกลุ่มหนูที่ได้รับยา Omeprazole นาน 24 สัปดาห์	79
ภาพที่ 24 แสดง peptide base peak ของโปรตีน TRPM6 ตำแหน่งที่มีการขาดหายไป ในลำไส้ส่วน jejunum ของกลุ่มควบคุม	80
ภาพที่ 25 แสดง peptide base peak ของโปรตีน TRPM6 ตำแหน่งที่มีการขาดหายไป ในลำไส้ส่วน jejunum ของกลุ่มหนูที่ได้รับยา Omeprazole นาน 12 สัปดาห์.....	80
ภาพที่ 26 แสดง peptide base peak ของโปรตีน TRPM6 ตำแหน่งที่มีการขาดหายไป ในลำไส้ส่วน jejunum ของกลุ่มหนูที่ได้รับยา Omeprazole นาน 24 สัปดาห์.....	81
ภาพที่ 27 แสดง peptide base peak ของโปรตีน TRPM6 ตำแหน่งที่ T1851I (autophosphorylation) ในลำไส้ส่วน duodenum ของหนูกลุ่มควบคุม.....	82
ภาพที่ 28 แสดง peptide base peak ของโปรตีน TRPM6 ตำแหน่งที่ T1851I (autophosphorylation) ในลำไส้ส่วน duodenum ของหนูกลุ่มที่ได้รับยา Omeprazole นาน 12 สัปดาห์.....	82
ภาพที่ 29 แสดง peptide base peak ของโปรตีน TRPM6 ตำแหน่งที่ T1851I (autophosphorylation) ในลำไส้ส่วน duodenum ของหนูกลุ่มที่ได้รับยา Omeprazole นาน 24 สัปดาห์.....	83
ภาพที่ 30 แสดง peptide base peak ของโปรตีน TRPM6 ตำแหน่งที่ T1851I (autophosphorylation) ในลำไส้ส่วน jejunum ของหนูกลุ่มควบคุม	84
ภาพที่ 31 แสดง peptide base peak ของโปรตีน TRPM6 ตำแหน่งที่ T1851I (autophosphorylation) ในลำไส้ส่วน jejunum ของหนูกลุ่มที่ได้รับยา Omeprazole นาน 12 สัปดาห์.....	84
ภาพที่ 32 แสดง peptide base peak ของโปรตีน TRPM6 ตำแหน่งที่ T1851I (autophosphorylation) ในลำไส้ส่วน jejunum ของหนูกลุ่มที่ได้รับยา Omeprazole นาน 24 สัปดาห์.....	85

ภาพที่ 33 แสดง peptide base peak ของโปรตีน TRPM6 ตำแหน่ง Dimerization motif ในลำไส้ ส่วน duodenum ของหนูกลุ่มควบคุม	86
ภาพที่ 34 แสดง peptide base peak ของโปรตีน TRPM6 ตำแหน่ง Dimerization motif ในลำไส้ ส่วน duodenum ของหนูกลุ่มที่ได้รับยา Omeprazole นาน 12 สัปดาห์	86
ภาพที่ 35 แสดง peptide base peak ของโปรตีน TRPM6 ตำแหน่ง Dimerization motif ในลำไส้ ส่วน duodenum ของหนูกลุ่มที่ได้รับยา Omeprazole นาน 24 สัปดาห์	87
ภาพที่ 36 แสดง peptide base peak ของโปรตีน TRPM6 ตำแหน่ง Dimerization motif ในลำไส้ ส่วน jejunum ของหนูกลุ่มควบคุม	88
ภาพที่ 37 แสดง peptide base peak ของโปรตีน TRPM6 ตำแหน่ง Dimerization motif ในลำไส้ ส่วน jejunum ของหนูกลุ่มที่ได้รับยา Omeprazole นาน 12 สัปดาห์	88
ภาพที่ 38 แสดง peptide base peak ของโปรตีน TRPM6 ตำแหน่ง Dimerization motif ในลำไส้ ส่วน jejunum ของหนูกลุ่มที่ได้รับยา Omeprazole นาน 24 สัปดาห์	89
ภาพที่ 39 แสดงกลไกการทำงานของโปรตีนที่เกี่ยวข้องต่อการควบคุม Mg^{2+} ในภาวะปกติ และ ภาวะที่ได้รับยา Omeprazole เป็นเวลานาน	107

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ยาในกลุ่ม proton pump inhibitors (PPIs) เป็นยาที่ยับยั้งการหลั่งกรดในกระเพาะอาหาร โดยออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ H⁺/K⁺ ATPase (proton pump) ที่ cytoplasmic membrane ของ parietal cell ในกระเพาะอาหาร ซึ่งจัดว่าเป็นยาที่มีประสิทธิภาพในการป้องกันและรักษาโรคทางระบบทางเดินอาหาร มักถูกใช้อย่างแพร่หลายในการรักษาโรคที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการหลั่งกรด อย่างเช่น โรคกรดไหลย้อน (gastroesophageal reflux disease: GERD) นอกจากนี้ยังถูกใช้เป็นการป้องกันและการเกิดแผลในกระเพาะอาหารจากการใช้ยาในกลุ่ม Aspirin และ NSAID (Yoshikazu Kinoshita, Norihisa Ishimura, & Shunji Ishihara, 2018) เนื่องจากเป็นยาที่ได้รับการรับรองด้านประสิทธิภาพและความปลอดภัย จึงเป็นยาที่มักจะถูกนำมาพิจารณาใช้เป็นอันดับแรก โดยปัจจุบันพบว่าผู้ป่วยที่ต้องใช้ยาในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่เป็นการใช้ยาเป็นระยะเวลานาน ซึ่งการใช้ยาในกลุ่มนี้เป็นระยะเวลานานก็จะทำให้เกิดผลข้างเคียงต่อระบบทางเดินอาหารที่หลากหลาย เช่น เกิดการหลั่งกรดในกระเพาะอาหารมากกว่าปกติเมื่อหยุดใช้ยา และมียังมีผลต่อการดูดซึมสารอาหารหลายตัว โดยเฉพาะแมกนีเซียม (Joel J. Heidelbaugh, 2013)

แมกนีเซียม (magnesium ; Mg²⁺) เป็นไอออนบวกภายในเซลล์ที่มีมากเป็นอันดับสองรองจากโพแทสเซียม และมีมากเป็นอันดับที่สี่ในร่างกาย โดยในเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ความเข้มข้นของแมกนีเซียมในเซลล์จะมีประมาณ 10 ถึง 30 mmol/l ซึ่งส่วนใหญ่จะจับกับโปรตีนหรือนิวคลีโอไทด์ (de Baaij et al., 2015) และยังมีแมกนีเซียมที่อยู่อย่างอิสระใน cytosol อีกประมาณ 0.5-1.2 mmol/l เทียบได้กับความเข้มข้นที่พบใน extracellular fluid (Ebel & Gunther, 1980) ส่วนแมกนีเซียมในเลือดนั้นปกติอยู่ที่ประมาณ 0.6-1.15 mmol/l (Svagzdiene, Sirvinskas, Baranauskiene, & Adukauskiene, 2015) แมกนีเซียมมีบทบาทอย่างมากในกระบวนการทางชีวเคมีในร่างกายมนุษย์ โดยมีส่วนเกี่ยวข้องในปฏิกิริยาของเอนไซม์มากกว่า 600 ชนิดรวมถึงการเผาผลาญพลังงานและการสังเคราะห์โปรตีน นอกจากนี้ยังมีบทบาททางสรีรวิทยาที่สำคัญ โดยเฉพาะในสมองหัวใจและกล้ามเนื้อโครงร่าง (de Baaij et al., 2015) ดังนั้นร่างกายจึงต้องมีการรักษาสมดุล

แมกนีเซียมอย่างเข้มงวด แต่สมมูลนี้อาจถูกรบกวนได้จากหลายสาเหตุอย่างเช่น การได้รับแมกนีเซียมไม่เพียงพอ หรืออาจจะเกิดจากการดูดซึมแมกนีเซียมได้น้อยลง เนื่องจากได้รับผลข้างเคียงจากการใช้ยา อย่างเช่น การใช้ยากลุ่ม proton pump inhibitors (PPIs) ที่เหนี่ยวนำให้เกิดภาวะการขาดแมกนีเซียมร่างกาย (Proton-pump inhibitor-induced hypomagnesemia; PPIH) โดยภาวะนี้บ่งชี้ได้จากระดับของแมกนีเซียมในเลือดที่น้อยกว่า 0.6 mmol/L แต่ในระดับนี้แมกนีเซียมอาจยังไม่แสดงอาการ จนกระทั่ง ระดับแมกนีเซียมเริ่มลดลงเหลือน้อยกว่า 0.5 mmol/L จะเริ่มมีอาการแสดงกระตุ้นทางประสาทกล้ามเนื้อมากเกินไป เช่น มีการสั่น กระตุก ชักเกร็ง หรือมีอาการทางประสาทจิตเวช เช่น อาจทำให้เกิดภาวะไร้อารมณ์ เพื่อ สับสน มึนงง และเกิดการโคม่าได้ นอกจากนี้ยังอาจทำให้เกิดภาวะแทรกซ้อนที่ถึงแก่ชีวิตที่เกิดจากภาวะขาดแคลเซียม และ/หรือโพแทสเซียม ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยการขาดแมกนีเซียมในร่างกาย ซึ่งจะส่งผลให้เกิดภาวะหัวใจเต้นผิดปกติ ซึ่งอาจรุนแรง จนเกิดอาการที่เรียกว่า torsades de pointe ที่มีอาการหัวใจเต้นเร็วมากกว่าปกติอย่างรุนแรงจนอาจนำไปสู่ภาวะหัวใจล้มเหลวได้ (Pham et al., 2014; Saris, Mervaala, Karppanen, Khawaja, & Lewenstam, 2000) เนื่องจากแมกนีเซียมอาจเป็นสาเหตุให้เกิดอาการและภาวะที่กล่าวไปข้างต้น ดังนั้นการรักษาสมมูลแมกนีเซียม หรือการรักษาระดับแมกนีเซียมในเลือดจึงมีความสำคัญ ซึ่งกลไกการรักษาสมมูลแมกนีเซียมนั้นจะเริ่มจากร่างกายจะได้รับแมกนีเซียมจากการกินประมาณ 300 mg ต่อวัน แต่จะมีเพียง 40-70 % เท่านั้นที่ถูกดูดซึมที่ลำไส้ จัดเก็บที่กระดูกและเนื้อเยื่อ และถูกขับออกทางไต (Jahnen-Dechent & Ketteler, 2012) เนื่องจากแมกนีเซียมที่ร่างกายได้รับมาจากการบริโภคเท่านั้น ดังนั้นการดูดซึมที่ลำไส้จึงเป็นกระบวนการที่สำคัญที่สุดแต่อย่างไรก็ตามกลไกการดูดซึมแมกนีเซียมในลำไส้นั้นก็ยังไม่ทราบอย่างแน่ชัด

การดูดซึมแมกนีเซียมอาศัย 2 กลไก หลักคือ กลไกการแพร่แบบผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์ (passive paracellular transport) และ กลไกแบบผ่านเซลล์โดยใช้พลังงาน (active transcellular transport) passive paracellular transport จะเป็นกลไกหลักในการดูดซึมแมกนีเซียม ซึ่งกลไกนี้เป็นการแพร่แบบไม่อาศัยพลังงาน แต่อาศัยการแพร่ของสารจากความเข้มข้นของแมกนีเซียมจากมากไปน้อย โดยอาศัยโปรตีนใน tight junction คือ Claudins (Cldn) ซึ่งในปัจจุบันพบว่ามีทั้งหมด 27 ชนิดคือ Cldn 1 Cldn 27 ในแต่ละชนิดนั้นมีการแสดงออกแบบจำเพาะในอวัยวะต่างๆที่แตกต่างกัน ซึ่ง Cldn จะมีผลต่อความสามารถในการเลือกผ่านของ tight junction (Gunzel & Yu, 2013) โดยในการดูดซึมแมกนีเซียมนั้นจะใช้ Cldn 16 และ Cldn 19 เป็นตัวควบคุมในท่อขดส่วนปลายของหน่วยไตแต่ไม่พบในลำไส้เล็ก (de Baaij et al., 2015; Fujita et al., 2006) แต่จากการศึกษาก่อนหน้า

นี้ของ Thongon and Krishnamra (2012) ที่ได้ศึกษาคุณสมบัติของ transepithelial electrical resistance (TER) หรือคุณสมบัติการคัดเลือกประจุผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์ (paracellular charge selectivity) ในเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 monolayers พบว่า Cldn 7 และ Cldn 12 มีส่วนช่วยในการดูดซึมแมกนีเซียม หมายความว่าอีกอย่างหนึ่งว่า Cldn 7 และ Cldn 12 มีความสามารถเป็น magnesium channel โดยในการทำงานของ Tight junction นั้นต้องอาศัยการควบคุมด้วย signaling molecule นอกจากนี้จากการศึกษาการควบคุมการแสดงออกของ Cldn ในลำไส้ พบว่า Cldn 2, 3, 7 และ 15 มารวมกลุ่มกันที่ Tight junction ของเยื่อผนังลำไส้ในหนู เมื่อถูกกระตุ้นด้วย Epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) (Lei et al., 2012; Sakaguchi et al., 2002) แต่ในลำไส้เล็กของหนู นั้นพบได้ทั้ง Cldn 2,7,12 และ 15 จึงยังไม่สามารถระบุได้ว่า Cldn ชนิดใดเกี่ยวข้องหรือมีบทบาทอย่างไรกับการขนส่งแมกนีเซียมในลำไส้ ส่วนกลไกแบบผ่านเซลล์โดยใช้พลังงาน (active transcellular transport) เป็นการขนส่ง ion ที่ต้าน concentration gradient จึงต้องใช้พลังงาน จะถูกกระตุ้นก็ต่อเมื่อมีปริมาณแมกนีเซียมลดน้อยลง (Penner & Fleig, 2007) โดยกลไกนี้ต้องอาศัยการทำงานของโปรตีน transient receptor potential: ซึ่งเป็น channel เฉพาะของสารประจุบวกสอง (divalent cations channel) เช่น Mg^{2+} , โซเดียม (Na^{+}) และ แคลเซียม (Ca^{2+}) ในการดูดซึมแมกนีเซียมนั้น จะต้องอาศัยโปรตีน transient receptor potential melastatin (TRPM) 6 และ 7 ที่อยู่ทางด้าน apical ของลำไส้เพื่อให้แมกนีเซียม จากด้าน luminal เข้าสู่ enterocyte จากนั้นจะต้องอาศัย secondary active transport เพื่อขนส่งแมกนีเซียม จาก enterocyte เข้าสู่กระแสเลือด โดยใช้โปรตีนที่เป็น Na /Mg exchanger คือ ancient conserved domain protein 4 (CNNM4) ยืนยันได้จากการศึกษาของ Yamazaki et al. (2013) ที่พบว่าเมื่อทำการ point mutation โปรตีน CNNM4 ในหนู จะทำให้การขนส่งแมกนีเซียมออกเซลล์นั้นลดลงด้วย โดย CNNM4 จะอาศัยการทำงานของ phosphatase of regenerating liver (PRL) PRL (Funato et al., 2014; Hardy et al., 2015) TRPM6 และ TRPM7 มีบทบาทสำคัญอย่างยิ่งต่อการขนส่ง Mg^{2+} ผ่านเซลล์ เนื่องจากต้องทำงานร่วมกัน โดย TRPM6 และ TRPM7 ประกอบไปด้วย α -kinase domain และมีคุณสมบัติพิเศษ ของ Protein channels ที่สามารถทำหน้าที่เป็น Enzymes ได้ เรียกคุณสมบัติพิเศษนี้ว่า “Chanzymes” (Runnels, 2011; Takezawa et al., 2004) ในการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Brandao (2014) พบว่า กิจกรรมของ TRPM6 kinase มีผลต่อ TRPM7 serine phosphorylation นอกจากนี้การศึกษาในปัจจุบันพบว่า TRPM7 ชดเชยความไวของ TRPM6 ต่อ cytosolic Mg^{2+} ในขณะที่ TRPM6 ก็ช่วย TRPM7 จากการยับยั้งโดย Mg-ATP และ TRPM6 สามารถเกิดกระตุ้นให้ TRPM7 เกิดการย้ายถิ่นฐานและมาทำงาน

ร่วมกันในรูปแบบ Heterodimer ได้ โดย TRPM6 และ 7 เป็น Integral membrane proteins (IMPs) ที่ จะถูกสร้างขึ้นใน endoplasmic reticulum (ER) จากนั้นจึงจะสามารถขึ้นไปอยู่บน membrane ทำ หน้าที่ในรูปแบบ Transmembrane domain (TMDs) โดยอยู่ในรูปแบบ tertiary และ quaternary structures ดังนั้นกลไกในการกระตุ้นของ TRPM6 ต่อการย้ายถิ่นฐานของ TRPM7 ขึ้นมาอยู่บน เยื่อหุ้มเซลล์เพื่อทำงานร่วมกันนั้น อาจเกิดผ่านกลไกการ Insertion จากการ folding จากไรโบโซม โดยอาศัย Translocon ที่ชื่อว่า Sec61 จาก Endoplasmic reticulum (ER) ในการดึงปลายสาย N-terminus ของ TRPM6 และ TRPM7 ให้สามารถแทรกขึ้นไปอยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์ เพื่อทำงานร่วมกัน ในรูปแบบ heterodimer (Cymer, von Heijne, & White, 2015) ซึ่งการทำงานร่วมกันของ TRPM6/7 heterodimer นี้ มีคุณสมบัติพิเศษที่เหมาะสมสำหรับการดูดซึมแมกนีเซียมอย่างมาก คือ TRPM6/7 heterodimer สามารถทำหน้าที่ดูดซึมแมกนีเซียมได้อย่างต่อเนื่อง แม้ว่าระดับแมกนีเซียม ในเซลล์จะมีมากกว่าระดับปกติแล้วก็ตาม ในขณะที่การทำงานของ TRPM6 และ TRPM7 ที่เป็น homodimer นั้น จะถูกยับยั้งให้หยุดทำงานเมื่อระดับแมกนีเซียมในเซลล์อยู่ในระดับปกติ (Chubanov, Mittermeier, & Gudermann, 2018)

ในการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Thongon, Penguy, Kulwong, Khongmueang, and Thongma (2016) ที่ทำการศึกษาผลของยากด PPIs ต่อการลดการดูดซึมแมกนีเซียมในลำไส้เล็กของหนูขาว สายพันธุ์ Sprague-Dawley เพศผู้ อายุ 9 สัปดาห์ โดยการฉีด Omeprazole ขนาด 20 mg/kg เป็น เวลานาน 4 และ 24 สัปดาห์ (PPIH rats model) โดยศึกษาการระดับแมกนีเซียมในเลือด การขับ แมกนีเซียมออกทั้งในปัสสาวะและอุจจาระ ศึกษาการสะสมแมกนีเซียมในกระดูกและกล้ามเนื้อ ศึกษาการหลัง HCO_3^- ค่า pH ในกระเพาะอาหารและลำไส้ส่วน duodenum และดูการแสดงออกของ โปรตีนที่เกี่ยวข้องต่อการศึกษาแมกนีเซียม ได้แก่ TRPM6, CNNM4 และ Clcn 2, 7, 12, 15 ในหนู PPIH rats model จากการศึกษาพบว่า ในกลุ่มหนูขาวที่ได้รับยา Omeprazole มีค่า pH เพิ่มขึ้น โดยเฉพาะในกลุ่มที่ได้รับยา Omeprazole และเมื่อทำการศึกษาความเข้มข้นของแมกนีเซียมใน กระแสเลือดพบว่าแมกนีเซียมมีการลดลงในกลุ่มที่ได้รับยา Omeprazole ส่งผลให้การขับ แมกนีเซียมทางปัสสาวะมีการลดลงด้วย เช่นเดียวกับการสะสมที่กระดูกและกล้ามเนื้อที่ลดลง นอกจากนี้เมื่อทำการศึกษาการดูดซึมแมกนีเซียม โดยศึกษาทั้งกลไกการดูดซึมแบบ active transport และ paracellular transport พบว่ามีการดูดซึมแมกนีเซียมลดลง ของทั้ง 2 กลไก ในกลุ่ม หนูขาวที่ได้รับยา Omeprazole นาน 12 และ 24 สัปดาห์ เมื่อเทียบกับกลุ่ม ควบคุม ในขณะที่ในการศึกษาการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องต่อการดูดซึมแมกนีเซียมทั้งในกลไกการดูดซึมแบบ

Active transport และ paracellular transport ซึ่งได้แก่ TRPM6, CNNM4, Cldn2, 7, 12, 15 ในลำไส้ส่วน duodenum กลับพบว่า มีการแสดงออกของโปรตีนเพิ่มมากขึ้นในกลุ่มของหนูที่ได้รับยา Omeprazole (PPIH rats) นอกจากนี้ในการศึกษาต่อมาของ Suksridechacin, Kulwong, Chamniansawat, and Thongon (2020) ที่ทำการศึกษาผลของยา Omeprazole ต่อการกดการดูดซึมแมกนีเซียมในลำไส้เล็กของหนูขาวสายพันธุ์ Sprague-Dawley เพศผู้ อายุ 9 สัปดาห์ ด้วยการฉีด Omeprazole ขนาด 20 mg/kg เป็นเวลานาน 12 และ 24 สัปดาห์ (PPIH rats model) โดยทำการศึกษาค้นคว้ากับการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Thongon et al. (2016) โดยทำการศึกษาการดูดซึมแมกนีเซียมในลำไส้เล็กทั้ง 4 ส่วน พบว่า ยา Omeprazole กดการดูดซึมในลำไส้ duodenum, jejunum, ileum และ colon โดยคำนวณเป็นร้อยละได้ดังนี้ คือ 81.86%, 70.59%, 69.45% และ 39.25% ตามลำดับ และเมื่อทำการศึกษาระดับแมกนีเซียมในเลือดพบว่าการลดลง เช่นเดียวกันกับการขนส่งแมกนีเซียมที่ลดลง ในลำไส้ทั้ง 4 ส่วนของหนูขาวที่ได้รับยา Omeprazole ทั้ง 2 กลุ่ม ทั้งในกลไกแบบ active Transcellular transport และแบบ paracellular transport ในขณะเดียวกันเมื่อทำการศึกษาการแสดงออกของโปรตีน TRPM6 และ CNNM4 โดยผลการศึกษานี้ให้ผลคล้ายกับการศึกษาของงานวิจัยก่อนหน้าของ Thongon et al. (2016) ที่พบการแสดงออกของโปรตีนเพิ่มมากขึ้นในขณะที่การดูดซึมนลดลง จึงเกิดเป็นคำถามสำคัญคือ เหตุใดการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของโปรตีนข้างต้น จึงไม่สามารถเพิ่มการดูดซึม Mg^{2+} ในลำไส้ และช่วยลดภาวะ PPIH ได้

ดังนั้นในการศึกษาในครั้งนี้จึงมุ่งเน้นไปที่การศึกษากการแสดงออกและกลไกการทำงานของโปรตีนที่เกี่ยวข้องต่อการดูดซึมแมกนีเซียม โดยใช้เซลล์เยื่อลำไส้จากลำไส้ของหนูที่ได้รับการเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะขาดแมกนีเซียม (hypomagnesemia) จากการได้รับ Omeprazole ซึ่งเป็นยา กลุ่ม Proton pump inhibitor เป็นเวลานาน (PPIs-induced hypomagnesemia (PPIH) rats model) ที่ได้มาจากการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Suksridechacin et al. (2020) โดยทำการศึกษากการแสดงออกของโปรตีน TRPM6, TRPM7 และ CNNM4 ทั้งใน cytosol และบน membrane เพื่อบ่งชี้ถึงความพร้อมในการทำงานของโปรตีน รวมไปถึงศึกษาการทำงานร่วมกันของ TRPM6 และ TRPM7 ด้วยเทคนิค Immunoprecipitation และ Western blot นอกจากนั้นเพื่อเป็นการตรวจสอบการทำงานและความผิดปกติของโปรตีน TRPM6 จึงได้ทำการศึกษา Phosphorylation site ด้วยเทคนิค ESI-QTOF MS/MS เพื่อนำความรู้ที่ได้ไปใช้ประกอบในการศึกษาความเกี่ยวข้องของการใช้ยากกลุ่ม PPIs อย่าง Omeprazole และอธิบายกลไกการเกิดภาวะ PPIH ในผู้ป่วยที่ได้รับยา PPIs ติดต่อกันเป็นเวลานาน และเพื่อใช้ในการศึกษา กลไกและความเกี่ยวข้องของโปรตีนต่อการดูดซึมแมกนีเซียมที่เป็นแร่ธาตุ

ที่มีความสำคัญในกระบวนการต่างๆของร่างกายมนุษย์ เพื่อนำสู่การศึกษาต่อยอดเพื่อหากลไกการรักษาหรือป้องกันภาวะ PPIH ต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาการแสดงออก และตำแหน่งการแสดงออก TRPM6 และ TRPM7 และ CNNM4 ในลำไส้ส่วน duodenum, jejunum, ileum และ colon ของหนูขาวกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ได้รับการฉีด Omeprazole เป็นเวลา 12 และ 24 สัปดาห์
2. เพื่อศึกษาการทำงานร่วมกันของ โปรตีน TRPM6 และ TRPM7 ในลำไส้ของหนูขาวกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ได้รับการฉีด Omeprazole เป็นเวลา 12 และ 24 สัปดาห์
3. เพื่อวิเคราะห์กรดอะมิโนในสายโปรตีน TRPM6 ของหนูขาวกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ได้รับการฉีด Omeprazole เป็นเวลา 12 และ 24 สัปดาห์

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

เพิ่มพูนความเข้าใจและองค์ความรู้ด้านกลไกการดูดซึม Mg^{2+} ในลำไส้ และอธิบายกลไกการเกิดภาวะ PPIH ในผู้ป่วยที่ได้รับยา PPIs ติดต่อกันเป็นเวลานาน เพื่อนำสู่การศึกษาต่อยอดเพื่อหากลไกการรักษาหรือป้องกันภาวะ PPIH ต่อไป

1.4 ขอบเขตของการวิจัย

การศึกษาทั้งหมดโครงการวิจัยนี้ครอบคลุมการศึกษาตำแหน่งการแสดงออก และความผิดปกติของ โปรตีนที่เกี่ยวข้องต่อการดูดซึมแมกนีเซียมในลำไส้ส่วน of หนูขาวกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ได้รับการฉีด Omeprazole เป็นเวลา 12 และ 24 สัปดาห์

บทที่ 2

วรรณกรรมและผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Proton pump inhibitor (PPI) และ hypomagnesemia

Proton pump inhibitor (PPI)

ยากลุ่ม proton pump inhibitors (PPIs) เป็นยาที่ยับยั้งการหลั่งกรดในกระเพาะอาหาร ยาในกลุ่มนี้ได้แก่ Omeprazole, Esomeprazole, Lansoprazole และ Rabeprazole จะมี benzimidazole เป็นส่วนประกอบ โดยยากลุ่มนี้จะออกฤทธิ์โดยการจับ SH residues ของ cysteine ใน alpha-subunit ของ H^+/K^+ ATPase (proton pump) บน secretory canalicular membranes ของ parietal cells ของกระเพาะอาหาร และยับยั้งการหลั่งกรดของ proton pump จึงส่งผลให้ยับยั้งการหลั่งกรดในกระเพาะอาหารได้ และถึงแม้เนื่องจากค่าครึ่งชีวิตของยากลุ่มนี้จะอยู่ได้เพียง 2-3 ชั่วโมง แต่ตัวยามีผลของการออกฤทธิ์ลดกรดได้มากกว่า 24 ชั่วโมง ในขณะที่เดียวกันร่างกายของมนุษย์ ต้องใช้เวลาในการสร้างเอนไซม์ H^+/K^+ ATPase ขึ้นใหม่โดยเฉลี่ยประมาณ 18 ชั่วโมง ผลการออกฤทธิ์ที่ยาวนานนี้จึงเป็นผลให้ยากลุ่ม PPIs จัดว่าเป็นยาที่มีประสิทธิภาพในการป้องกันและรักษาโรคทางระบบทางเดินอาหารจากการหลั่งกรด (Reimer, Sondergaard, Hilsted, & Bytzer, 2009; Waldum et al., 1996) และมักถูกใช้อย่างแพร่หลายในการรักษาโรคที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการหลั่งกรด อย่างเช่น โรคกรดไหลย้อน (gastroesophageal reflux disease: GERD) นอกจากนี้ยังถูกใช้เป็นการป้องกันการเกิดแผลในกระเพาะอาหารในผู้ป่วยที่เป็นโรคหัวใจและหลอดเลือดที่จำเป็นต้องใช้ยากลุ่ม Aspirin และ NSAID (Y. Kinoshita, N. Ishimura, & S. Ishihara, 2018) และเนื่องจากเป็นยาที่ได้รับการรับรองด้านประสิทธิภาพและความปลอดภัย จึงมักจะถูกนำมาพิจารณาใช้เป็นอันดับแรก โดยปัจจุบันพบว่าผู้ป่วยที่ต้องใช้ยากลุ่มนี้ส่วนใหญ่เป็นการใช้ยาเป็นระยะเวลานาน ซึ่งการใช้ยากลุ่มนี้เป็นระยะเวลานานก็จะทำให้เกิดผลข้างเคียงต่อระบบทางเดินอาหารที่หลากหลาย เช่น เกิดการหลั่งกรดในกระเพาะอาหารมากกว่าปกติเมื่อหยุดใช้ยา หรือเกิดการติดเชื้อในทางเดินอาหาร โดยเฉพาะอย่างยิ่ง Salmonella spp., Campylobacter spp. และ Clostridium difficile ซึ่งเป็นเชื้อที่ไม่ทนต่อกรดในกระเพาะอาหาร เมื่อมีกรดในกระเพาะอาหารน้อย เชื้อเหล่านี้จึงเติบโตอย่างรวดเร็ว (Lo & Chan, 2013) นอกจากนี้การใช้ยา PPIs เป็นระยะเวลานาน อาจส่งผลต่อการทำงานของไต คือให้เกิดโรค

ไตเรื้อรังและอาจพัฒนาไปเป็น end stage renal disease (ESRD) (Lazarus et al., 2016; Y. Xie et al., 2016) ดังนั้นในผู้ป่วยที่มีความจำเป็นต้องใช้ PPIs เป็นเวลานานจึงควรมีการตรวจสอบค่าการทำงานของไตหรือค่าความสามารถในการกรองของไตด้วย (GFR:glomerular filtration rate) (Y. Xie et al., 2017) ในการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Sun et al. (2017) ที่ทำการศึกษาในผู้ป่วยโรค GERD ที่จำเป็นต้องใช้ ยากลุ่ม PPIs เป็นเวลานาน พบว่า ยากลุ่ม PPIs สามารถเพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดโรคกล้ามเนื้อหัวใจตาย (myocardial infarction) ได้ นอกจากนี้กรดในกระเพาะอาหารช่วยในการดูดซึมสารอาหารและแร่ธาตุหลายชนิดเช่น วิตามิน B12, แคลเซียม, แมกนีเซียม และเหล็ก การที่ใช้ยากลุ่ม PPIs เป็นเวลานาน จะทำให้กรดในกระเพาะน้อยเป็นเวลานานไปด้วย จึงทำให้เสี่ยงต่อการขาดสารอาหารเหล่านี้ โดยเฉพาะแมกนีเซียม จึงทำให้เกิดโรคหรือภาวะที่เรียกว่าภาวะขาดแมกนีเซียมที่ถูกเหนี่ยวนำโดยการได้รับยากลุ่ม PPIs เป็นเวลานาน (Proton-pump inhibitor-induced hypomagnesemia ; PPIH) (J. J. Heidelbaugh, 2013) ซึ่งในปี 2011 องค์การอาหารและยาแห่งสหรัฐอเมริกา (Food and Drug Administration; FDA) ได้ระบุว่า PPIs อาจทำให้เกิดภาวะ hypomagnesemia หากกินนานกว่าหนึ่งปี (Reimer et al., 2009) จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าผู้ป่วยที่เป็น hypomagnesemia 61% ได้รับการรักษาด้วยยา PPIs เป็นเวลามากกว่า 5 ปีขึ้นไป และ 29% เป็นเวลาอย่างน้อย 10 ปี (Sheen & Triadafilopoulos, 2011) ผู้ป่วยส่วนใหญ่จะมีภาวะ hypokalemia และ hypocalcemia ร่วมด้วย รวมถึงอาการเซซ, Paresthesia, ชัก, สับสนและอาการทางเดินอาหารที่รุนแรง โดยที่ผู้ป่วยเหล่านี้ไม่มีเคยมีประวัติ เป็น magnesium malabsorption หรือสูญเสียการทำงานของไต หรือมีความผิดปกติในลำไส้หรือลำไส้ใหญ่มาก่อน (Cundy & Mackay, 2011)

hypomagnesemia

hypomagnesemia เป็นภาวะที่ร่างกายมีความเข้มข้นของแมกนีเซียมในเลือดต่ำกว่า 0.66 mmol / L (1.6 mg / dL) โดยอาจมีหรือไม่มีการสูญเสียแมกนีเซียมของร่างกายทั้งหมด ซึ่งในระดับนี้อาจจะยังไม่มีอาการ แต่ถ้าร่างกายมีความเข้มข้นของแมกนีเซียมในเลือดต่ำกว่า 0.5 mmol / L ร่างกายจะเริ่มแสดงอาการทางคลินิก โดยจะเริ่มมีอาการแสดงกระตุ้นทางประสาทกล้ามเนื้อมากขึ้น เช่น มีการสั่น กระตุก ชักเกร็ง หรือมีอาการทางประสาทจิตเวช เช่น อาจทำให้เกิดภาวะไร้อารมณ์ เพื่อ สับสน มึนงง และเกิดการโคม่าได้ นอกจากนี้ยังอาจทำให้เกิดภาวะแทรกซ้อนที่ถึงแก่ชีวิตที่เกิดจากภาวะขาดแคลเซียม และ/หรือ โพแทสเซียม ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยการขาดแมกนีเซียมในร่างกาย ซึ่งจะส่งผลให้เกิดภาวะหัวใจเต้นผิดปกติ ซึ่งอาจรุนแรง จนเกิดอาการที่เรียกว่า torsades

de pointe ที่มีอาการหัวใจเต้นเร็วมากกว่าปกติอย่างรุนแรงจนอาจนำไปสู่ภาวะหัวใจล้มเหลวได้ (Pham et al., 2014; Saris et al., 2000) อย่างไรก็ตามเนื่องจากแมกนีเซียมมีส่วนเกี่ยวข้องกับการทำงานของโครงสร้างและสรีรวิทยาผลข้างเคียงที่เกี่ยวข้องกับภาวะ hypomagnesemia อาจเกิดขึ้นได้ในเกือบทุกระบบของอวัยวะไม่ว่าจะเป็นอาการแบบเฉียบพลันหรือเรื้อรัง อย่างเช่น โรคทางระบบประสาท ภาวะการขาดแมกนีเซียมนั้นมีความสัมพันธ์กับหลายโรค เช่น

ไมเกรน ซึมเศร้า และโรคลมชัก ความเข้มข้นของแมกนีเซียมในเซลล์ประสาทมีความสำคัญอย่างมากในการควบคุมการกระตุ้น N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor ซึ่งมีความจำเป็นสำหรับการส่งผ่านกระแสประสาท synaptic excitatory, plasticity neuronal และ excitotoxicity โดย NMDA receptor จะถูกเปิดใช้งานเมื่อจับกับกลูตาเมตและทำให้แคลเซียมและโซเดียมเข้าเซลล์ แลกเปลี่ยนกับการนำโพแทสเซียมออกเซลล์ แต่เมื่ออยู่ในภาวะ hypomagnesemia NMDA receptor จะกระตุ้นมากเกินไป เนื่องจากถูกยับยั้งด้วย extracellular Magnesium (Mayer, Westbrook, & Guthrie, 1984) และเนื่องจากแมกนีเซียมมีบทบาทในการสร้างกระดูกโดยทำให้เกิดการแพร่กระจายของ osteoblast ดังนั้นในภาวะที่ขาดแมกนีเซียมประสิทธิภาพของการสร้างกระดูกก็จะลดลง (He, Zhang, Liu, Tian, & Ma, 2016) นอกจากนี้ในภาวะที่แมกนีเซียมมีจะมีการหลั่งของ proinflammatory cytokines อย่างเช่น tumor necrosis factor (TNF), interleukin (IL)-1, and substance P เพิ่มขึ้น ทำให้มีการสลายกระดูก โดยใช้ osteoclast ที่เพิ่มขึ้นด้วย (de Baaij et al., 2015) hypomagnesemia สามารถลด กิจกรรมของ $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ เนื่องจาก Magnesium เป็น cofactor ของ $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ และแมกนีเซียมยังสามารถควบคุม K channels ให้เปิดในภาวะที่ไม่มีแมกนีเซียม (White & Hartzell, 1989) ทั้งสองปัจจัยนี้จะทำให้เกิดการลดลงของโพแทสเซียมภายในเซลล์ ซึ่งทำให้เกิด depolarizes ของ myocyte membrane potential ของหัวใจลดลง และทำให้ threshold ของ action potential ลดลงด้วย การลดลงของโพแทสเซียมภายในเซลล์ ทำให้ลดความเร็วในการขนส่งโพแทสเซียมออกเซลล์ด้วย จึงส่งผลทำให้เกิด repolarize ของ cell membrane เป็นเวลานาน จึงทำให้หัวใจเต้นผิดปกติ (Andrasi, Igaz, Molnar, & Mako, 2000)

แมกนีเซียม (magnesium ; Mg^{2+})

แมกนีเซียมมีเลขอะตอมคือ 12 และถูกจัดประเภทเป็นธาตุอัลคาไลน์ ซึ่งมีสามไอโซโทปเสถียรคือ ^{24}Mg , ^{25}Mg และ ^{26}Mg โดย ^{24}Mg เป็นไอโซโทปที่เจอบ่อยที่สุด ถึง 78 ถึง 99% และมีมวลอะตอมสัมพัทธ์คือ 24.30 Da จุดหลอมเหลว 648.8°C และจุดเดือด $1,090^\circ\text{C}$ (Weast, 1986) แมกนีเซียมเป็นองค์ประกอบที่พบบ่อยที่สุดแปดอย่างในเปลือกโลกและส่วนใหญ่จะถูกผูกไว้ใน

แหล่งแร่ตัวอย่างเช่น magnesite (แมกนีเซียมคาร์บอเนต) และ โดโลไมต์ Dolomite $\text{CaMg}(\text{SO}_3)_2$ แต่แมกนีเซียมตามแหล่งทางชีวภาพนั้นมีมากที่สุดใน Hydrosphere (Bodaker et al., 2010) นอกจากนั้นแมกนีเซียมยังเป็นไอออนบวกที่จำเป็นต่อสิ่งมีชีวิต โดยพบว่ามีแมกนีเซียมมากเป็นอันดับที่สองภายในเซลล์และมากเป็นอันดับที่สี่ในร่างกายมนุษย์ ซึ่งแมกนีเซียมนี้เป็นสิ่งจำเป็นสำหรับการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิกและ โปรตีนสำหรับระบบเมแทบอลิซึมและสำหรับปฏิกิริยาในอวัยวะต่างๆ เช่นระบบประสาท, กล้ามเนื้อ, หัวใจและหลอดเลือด และเอนไซม์มากกว่า 600 ชนิดในร่างกาย (de Baaij et al., 2015) ประมาณ 99% ของแมกนีเซียมในร่างกายอยู่ในกระดูก กล้ามเนื้อ และเนื้อเยื่ออ่อน (Classen & Nowitzki, 1990) โดยแมกนีเซียม 60% ของแมกนีเซียมทั้งหมดในร่างกาย จะอยู่ในส่วนประกอบไฮดรอกซีอะพาไทต์ของกระดูก และที่เหลือจะอยู่ในกล้ามเนื้อโครงร่างและเนื้อเยื่ออ่อน ปริมาณแมกนีเซียมทั้งหมดในร่างกายมนุษย์จะมีปริมาณประมาณ 20 mmol/kg ของเนื้อเยื่อไขมัน (fat-free tissue) (Jahnen-Dechent & Ketteler, 2012; Kisters, 1998) โดยความเข้มข้นของแมกนีเซียมในเซลล์อยู่ในช่วง 5-20 mmol/l ซึ่ง 1% -5% ถูกแตกตัวเป็นไอออน, ส่วนที่เหลือนั้นจะจับกับ โปรตีน, โมเลกุลที่มีประจุลบและอะดีโนซีนไตรฟอสเฟต (ATP) (Grober, Schmidt, & Kisters, 2015) ส่วนแมกนีเซียมนอกเซลล์มีสัดส่วนประมาณ 1% -3% ของแมกนีเซียมในร่างกายทั้งหมด (Jahnen-Dechent & Ketteler, 2012) ซึ่งพบได้ในซีรัมและเซลล์เม็ดเลือดแดง ความเข้มข้นแมกนีเซียมในเลือดปกติอยู่ที่ประมาณ 0.76-1.15 mmol/l (Svagzdiene et al., 2015) โดยแบ่งออกเป็นสามส่วน คือแตกตัวเป็นไอออน (55% -70%), จับกับโปรตีน (20% -30%) และรวมกับกลุ่มไอออนลบ (5% -15%) เช่น ฟอสเฟตไบคาร์บอเนตและซิเตรตหรือซัลเฟต โดยที่อัตราส่วนระหว่างเซลล์เม็ดเลือดแดง และแมกนีเซียมในเลือดเท่ากับ 2:8 (Seelig, 1982) อย่างไรก็ตามระดับของแมกนีเซียมในเลือดมีค่าเพียง 1% ของแมกนีเซียมทั้งหมดในร่างกายเนื่องจากแมกนีเซียมส่วนใหญ่ของร่างกายจะถูกเก็บไว้ในกระดูกกล้ามเนื้อและเนื้อเยื่ออ่อน ดังนั้นแม้ว่าค่าแมกนีเซียมในเลือดจะอยู่ในช่วงปกติแต่ร่างกายก็สามารถอยู่ในสถานะขาดแมกนีเซียมอย่างรุนแรงได้

ความสำคัญของแมกนีเซียม

แมกนีเซียมเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของโครงสร้าง RNA และ DNA ในโครงสร้างแบบตติยภูมิโดยจะจับกับโมเลกุล O^- และ N^- ใน polynucleotide chain :ซึ่งการจับจะขึ้นอยู่กับระดับของ magnesium dehydration และศักย์ไฟฟ้าบนตำแหน่งที่จะจับ (Misra & Draper, 1998) โดยบทบาทของแมกนีเซียมต่อ RNA คือทำให้โครงสร้าง RNA มีความเสถียร และสามารถแก้ไข tRNA ที่ถูก

ทำลายได้ (Lindahl, Adams, & Fresco, 1966) นอกจากนั้นยังมีความสำคัญต่อ โครงสร้าง RNA ระดับตติยภูมิที่มีอยู่ใน mRNA, ribosomal RNA, transfer-messenger RNA, catalytic self-splicing RNA และ viral genomic RNA อีกด้วย ส่วนใน DNA แมกนีเซียมจับธาตุประจุลบ (O, N) ด้วยพันธะไฮโดรเจน (Chiu & Dickerson, 2000) และมีบทบาทในการสร้างความเสถียรให้โครงสร้างทุติยภูมิและตติยภูมิของ DNA โดยแมกนีเซียมจะจับกับ minor groove บนโครงสร้างของ DNA แต่อย่างไรก็ตาม หากอยู่ในสภาวะขาดแมกนีเซียม จะทำให้ DNA ถูกทำลายด้วยอนุมูลอิสระของออกซิเจนได้ง่ายขึ้นและมีแนวโน้มที่จะเกิดความเครียดจากอนุมูลอิสระ (oxidative stress) แต่ถ้าหากความเข้มข้นแมกนีเซียมสูงเกินไป แมกนีเซียมอาจจับ DNA ด้วยพันธะโควาเลนต์และทำให้โครงสร้าง double helix ของ DNA บิดเบี้ยวได้ (Anastassopoulou & Theophanides, 2002) ดังนั้นการรักษาความเข้มข้นของแมกนีเซียมจึงเป็นสิ่งจำเป็นสำหรับความเสถียรของ RNA และ DNA

นอกจากนี้แมกนีเซียมมีอิทธิพลต่อการทำงานของเอนไซม์ มากกว่า 600 ชนิด โดยที่แมกนีเซียมทำหน้าที่เป็น Cofactor และ activator (de Baaij et al., 2015) หรือ coactivator โดยจับกับลิแกนด์ เช่น ATP ในเอนไซม์ที่ต้องกาใช้ ATP หรือจับกับ binding site ของเอนไซม์ เช่น enolase, pyruvate kinase, pyrophosphatase เป็นต้น และยังมีบทบาทในการทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างในระหว่างกระบวนการเร่งปฏิกิริยา เช่น Na^+ , K^+ -ATPase หรือส่งเสริมการรวมตัวของสารประกอบเชิงซ้อนของเอนไซม์หลายชนิดเช่น Aldehyde dehydrogenate (Ryan, 1991; Swaminathan, 2003) และเนื่องจากแมกนีเซียมมีคุณสมบัติที่คล้ายคลึงกับแคลเซียมมาก แต่ก็มีคุณสมบัติในการต่อต้านแคลเซียมด้วยเช่นกัน โดยแมกนีเซียมมีบทบาทสำคัญในการเคลื่อนย้ายของแคลเซียม โดยแมกนีเซียมจะแย่งจับที่ membrane binding site และการกระตุ้นการสะสมแคลเซียม โดย sarcoplasmic reticulum ในกระบวนการหดตัวของกล้ามเนื้อเพื่อทำให้กล้ามเนื้อคลายตัว และยังสามารถ N-methyl-D-aspartate (NMDA) channel ที่ใช้ขนส่งแคลเซียมในกระบวนการนำกระแสประสาทไม่ให้กระแสประสาทถูกกระตุ้นมากเกินไป นอกจากนี้แมกนีเซียมยังช่วยในการรักษาความเข้มข้นของแคลเซียมในเซลล์ซึ่งมีความสำคัญในการทำงานของเซลล์ ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยของแมกนีเซียม ภายในเซลล์อาจก่อให้เกิดผลกระทบต่อการส่งสัญญาณของแคลเซียมได้ (Iseri & French, 1984) ซึ่งแคลเซียมมีส่วนในกระบวนการของร่างกายอย่างมาก โดยเป็นส่วนประกอบของกระดูก ช่วยในการหลั่งฮอร์โมน, การกระตุ้นสัญญาณประสาท, และการทำงานของหลอดเลือด และเป็นตัวการสำคัญของกิจกรรมภายในเซลล์ โดยเฉพาะการส่งสัญญาณภายในเซลล์ (cell signaling) การกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ การ

กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน เป็นต้น โดยในภาวะปกติแมกนีเซียมจะมีส่วนช่วยในการรักษาสมดุลของ แคลเซียม โดยเป็นตัวช่วยในการเป็น Cofactor ของเอนไซม์ Adenylyl cyclase เพื่อกระตุ้น cAMP ซึ่งเป็นกลไกที่ใช้ในการกระตุ้นการหลั่งฮอร์โมนพาราไทรอยด์ เพื่อรักษาสมดุลแคลเซียมใน กระแสเลือด โดยการเปลี่ยนวิตามินดีให้อยู่ในรูปแบบ Active form เพื่อช่วยในการดูดซึมแคลเซียม ในกรณีที่แคลเซียมในกระแสเลือดลดลง แต่ในขณะที่เดียวกันเมื่ออยู่ในภาวะการขาดแมกนีเซียมก็ ทำให้กระบวนการนี้เสียสมดุลเนื่องจากฮอร์โมนพาราไทรอยด์ลดลงแล้วส่งผลต่อปริมาณและการทำงาน ของแคลเซียมได้ โดยพบว่าในคนที่ เป็น hypomagnesemia สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะ ขาดแคลเซียมหรือแคลเซียมในกระแสเลือดต่ำ (hypocalcemia) ได้ (Clark, 1968) ซึ่งการขาด แคลเซียมนี้อาจเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะกระดูกพรุน หรือโรคอื่น ๆ ตามได้ นอกจากนี้การขาด แมกนีเซียมยังมีผลต่อโพแทสเซียม เนื่องจากแมกนีเซียมมีบทบาทในการขนส่งโพแทสเซียม ให้ออกผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ซึ่งเป็นกระบวนการที่สำคัญสำหรับการนำกระแสประสาทสำหรับการหด ตัวของกล้ามเนื้อหัวใจ (Iseri & French, 1984; Volpe, 2013) เมื่อขาดแมกนีเซียมอาจจะเหนี่ยวนำให้ เกิดภาวะการขาดโพแทสเซียม (hypokalemia) ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้เกิดภาวะหัวใจเต้นผิดปกติตามมา ได้ ดังนั้นด้วยกระบวนการดังกล่าวทำให้แมกนีเซียมมีบทบาทสำคัญหลายประการในร่างกาย มนุษย์โดยมีบทบาทสำคัญในการป้องกันและรักษาโรคต่างๆ ดังนั้นการขาดแมกนีเซียมอาจจะ ส่งผลให้เกิดโรคเรื้อรังและโรคทางเดินหายใจ เช่น โรคอัลไซเมอร์, โรคหอบหืด, โรคสมาธิสั้น, ความต้านทานต่ออินซูลิน, เบาหวานชนิดที่ 2, ความดันโลหิตสูง, โรคหัวใจและหลอดเลือด ปวด หัวไมเกรนและโรคกระดูกพรุนได้ (Magpie Trial Follow-Up Study Collaborative, 2007)

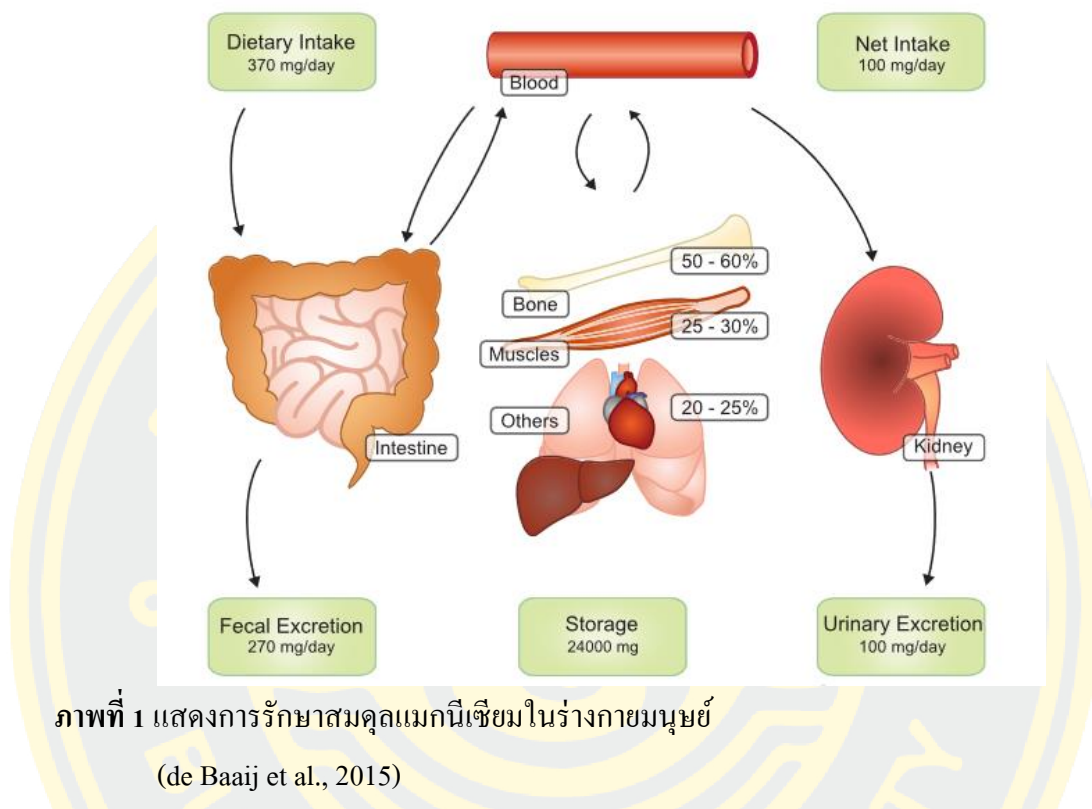
ความสำคัญของแมกนีเซียมต่อกลไกการทำงานภายในเซลล์

อย่างที่กล่าวที่กล่าวไปข้างต้นว่า แมกนีเซียมให้ออกในเซลล์นั้นมีมากเป็น อันดับ 2 ในเซลล์ โดยมีความเข้มข้นประมาณ 10–30 mM ซึ่งส่วนมากจะจับกับ Ribosome, polynucleotides และ ATP และ อยู่ในรูปแบบ free form ที่ความเข้มข้นประมาณ 0.5–1.2 mM โดยที่แมกนีเซียมมีความสำคัญและ เป็นส่วนหนึ่งของกระบวนการเผาผลาญพลังงาน และกระบวนการต่าง ๆ ภายในเซลล์ อย่างเช่นที่ กล่าวในบทนำข้างต้นที่ว่า แมกนีเซียมมีส่วนเกี่ยวข้องในการรักษาโครงสร้างของ RNA และ DNA โดยจับกับประจุลบของโมเลกุล O และ N ใน polynucleotide chains โดยกระบวนการจับกัน ของสาย polynucleotide chains นี้ จะต้องอาศัย กระบวนการ Mg^{2+} dehydration และประสิทธิภาพ ของ binding site (Misra & Draper, 1998) และยังพบว่า แมกนีเซียมสามารถช่วยรักษา tRNA ที่เกิด

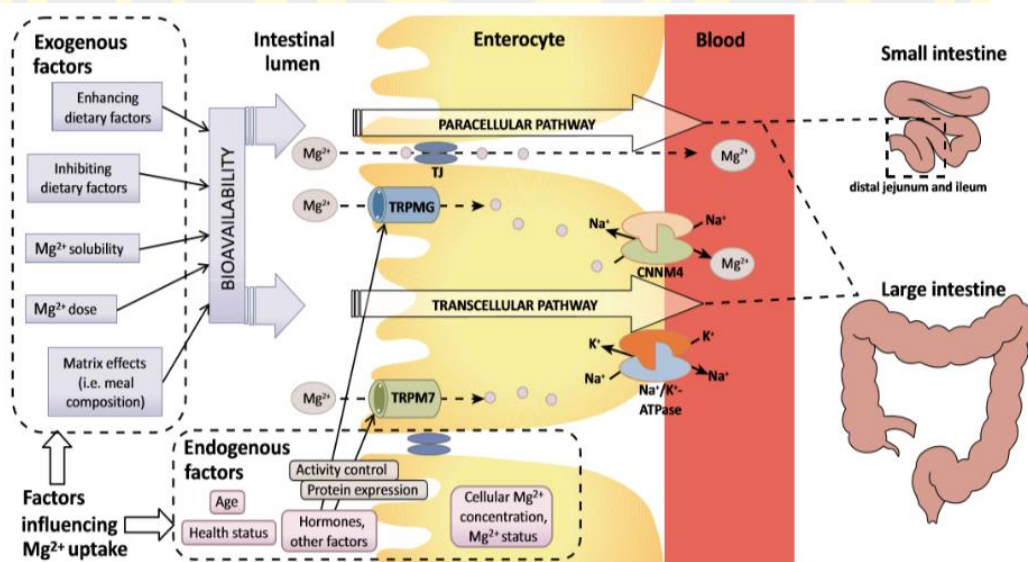
การ denatured ได้ (Lindahl et al., 1966) Mg^{2+} ใน RNA structure มีส่วนเกี่ยวข้องทั้งใน mRNA, ribosomal RNA, transfer-messenger RNA, catalytic self-splicing RNA, และ viral genomic RNA (Green, Kim, Bustamante, & Tinoco, 2008) ส่วนใน DNA นั้น แมกนีเซียมก็มีบทบาทคล้ายๆกันคือสามารถจับกับ โมเลกุล O และ N เพื่อช่วยในการรักษาโครงสร้างให้มีความเสถียรมากขึ้น โดยมีบทบาทสำคัญในโครงสร้างทุติยภูมิและตติยภูมิ ของ DNA โดยเมื่อความเข้มข้นของแมกนีเซียมมีมาก แมกนีเซียมจะจับกับสาย DNA ด้วยพันธะโคเวเลนต์ แล้วเกิดการบิดสายของ DNA เป็นโครงสร้างแบบ Double helix (Anastassopoulou & Theophanides, 2002) (Price & Tullius, 1992) นอกจากนี้แมกนีเซียมยังมีส่วนเกี่ยวข้องกับการทำงานของเอนไซม์มากกว่า 600 ชนิดตามที่กล่าวไปในบทนำข้างต้น โดยส่วนมากจะทำหน้าที่เป็น Cofactor และอีกประมาณ 200 กระบวนการ แมกนีเซียมจะทำหน้าที่เป็นตัว Activator (Bairoch, 2000; Caspi et al., 2016) โดยเฉพาะอย่างยิ่งในการควบคุมเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการ Glycolysis เนื่องจากแมกนีเซียมเป็น Cofactor ของ Nucleotides และ Mg-ATP นั้นมีความจำเป็น สำหรับ กิจกรรมของ hexokinase, phosphofructokinase, aldolase, phosphoglycerate kinase และ pyruvate kinase (Garfinkel & Garfinkel, 1985) ซึ่งอาจนำไปสู่บทบาทสำคัญที่เกี่ยวข้องกับโรคเบาหวานได้ นอกจากนี้แล้วตัวแมกนีเซียมนั้นยังมีบทบาทสำคัญในกระบวนการส่งสัญญาณภายในเซลล์ โดยทำหน้าที่เป็นเหมือน Ca^{2+} antagonist ซึ่งอัตราส่วนระหว่าง Mg^{2+} ต่อ Ca^{2+} นั้นมีความจำเป็นต่อ กิจกรรมของ Ca^{2+} -ATPase (Chaigne-Delalande et al., 2013; Li et al., 2011) การทำงานของโปรตีนที่ทำหน้าที่ขนส่งแคลเซียม โดยการเปลี่ยนแปลงของแมกนีเซียมภายในเซลล์จะสามารถทำให้เกิดการรบกวนสัญญาณของ Ca^{2+} และเกิด Ca^{2+} toxicity ได้อีกด้วย (Iseri & French, 1984) หน้าที่ของแมกนีเซียมอีกหน้าที่หนึ่งที่สำคัญไม่แพ้หน้าที่อื่นก็คือ แมกนีเซียมนั้นมีบทบาทสำคัญต่อ กระบวนการ Cell Proliferation โดยมีบทบาทในการควบคุมวัฏจักรเซลล์และ และกระบวนการสร้างโปรตีน และการตอบสนองต่อ Growth factor (H. Rubin, 1975) โดยการสร้างโปรตีนนั้น จะต้องใช้แมกนีเซียมในความเข้มข้นที่ค่อนข้างสูง และใช้เวลานานในการเกิดปฏิกิริยา มากกว่าการสร้าง DNA (A. H. Rubin, Terasaki, & Sanui, 1979; Terasaki & Rubin, 1985) และในกระบวนการกระตุ้น Cell Proliferation จะต้องอาศัยการทำงานของ Growth factor เพิ่มปริมาณ Glucose ภายในเซลล์ ซึ่งกระบวนการทั้งหมดนี้จะต้องอาศัยแมกนีเซียมในการกระตุ้นหรือมีส่วนร่วมทั้งหมด (Hershko, Mamont, Shields, & Tomkins, 1971)

การรักษาสมดุลแมกนีเซียมในร่างกายมนุษย์

เนื่องจากแมกนีเซียมมีความสำคัญอย่างมากในกระบวนการต่าง ๆ ภายในเซลล์ และกระบวนการต่างๆภายในร่างกายดังนั้นกระบวนการรักษาสมดุลแมกนีเซียมจึงมีความจำเป็นอย่างมาก โดยพบว่าในคนปกตินั้นมีระดับแมกนีเซียมจะอยู่ที่ประมาณ 0.7 -1.1 mM (Lowenstein & Stanton, 1986) โดยปกติมนุษย์จะได้รับแมกนีเซียมผ่านทางรับประทานอาหาร ปริมาณที่แนะนำต่อวันจะอยู่ที่ 420 mg สำหรับผู้ชาย และ 320 mg สำหรับผู้หญิง (1997) หรือโดยเฉลี่ย 300 มิลลิกรัมต่อวัน จากนั้นลำไส้จะดูดซึมแมกนีเซียมได้ประมาณ 24 – 76 % สำหรับอาหารที่มีแมกนีเซียมหมด(Graham, Caesar, & Burgen, 1960) โดยจะดูดซึมแมกนีเซียม 120 มิลลิกรัม และขับทิ้ง 20 มิลลิกรัม ดังนั้นการบริโภคสุทธิต่อวันคือ 100 มิลลิกรัมต่อวัน ต่อมาไตจะเข้ามามีบทบาทในการรักษาสมดุลแมกนีเซียมโดยขับแมกนีเซียม โดยแมกนีเซียมที่แตกตัวเป็นไอออนและที่เป็น complex นั้นจะกรองผ่าน glomerulus ด้วยความเข้มข้นของแมกนีเซียม 2 mg/dL และมีความสามารถในการกรองอยู่ที่ 120 mL/min ดังนั้นไตจะกรองแมกนีเซียม 2,420 มิลลิกรัมต่อวัน และเพื่อรักษาภาวะสมดุลของไต ฉะนั้นไตจะต้องดูดซับสิ่งเหล่านี้ทั้งหมดยกเว้นแมกนีเซียม 100 มิลลิกรัมที่ลำไส้ดูดซึมได้ ที่ proximal tubule จะดูดซับแมกนีเซียมได้น้อยกว่าของโซเดียมและแคลเซียม proximal tubule สามารถดูดซับ แคลเซียม, โพแทสเซียม, โซเดียมและน้ำได้ถึง 60% แต่ดูดซับแมกนีเซียมได้เพียง 20 ถึง 30% (Quamme, 1989) การกรองออกของแมกนีเซียมส่วนใหญ่ (60-70%) เกิดขึ้นที่ thick ascending limb (TAL) ของของ Henle loop โดยอาศัย Na-K-2Cl transporter และ potassium channel การขับทิ้งแมกนีเซียม ที่ thick ascending limb ขึ้นอยู่กับการไหล ดังนั้นเมื่ออัตราการไหลของ tubular flow เพิ่มขึ้น เช่น เมื่อกินน้ำเยอะหรือได้รับน้ำเกลือก็จะทำให้การขับทิ้งแมกนีเซียมลดน้อยลงด้วย แต่ที่ Distal tubule จะกรองแมกนีเซียมได้เพียง 10% แต่จะมีบทบาทสำคัญในการควบคุมสมดุลของแมกนีเซียมในกระบวนการที่ต้องอาศัยแคลเซียม นอกจากนี้ยังมีผลจากปัจจัยอื่นๆเช่น ฮอร์โมน parathyroid (PTH), glucagon, และ antidiuretic ทั้งหมดเพิ่มการขับแมกนีเซียมใน Henle loop และ distal convoluted tubule ในภาวะ hypomagnesemia การขับทิ้งที่ไตแทบจะเป็น 0 สอดคล้องกับค่า GFR หรือความสามารถในการกรองที่ลดลง เพื่อลดความสามารถในการขับทิ้งแมกนีเซียม เพื่อตอบสนองต่อปริมาณแมกนีเซียมที่ลดลง (Quamme, 1997) ดังที่แสดงในภาพที่ 1 และ ภาพที่ 2



ภาพที่ 1 แสดงการรักษาสมดุลแมกนีเซียมในร่างกายมนุษย์ (de Baaij et al., 2015)

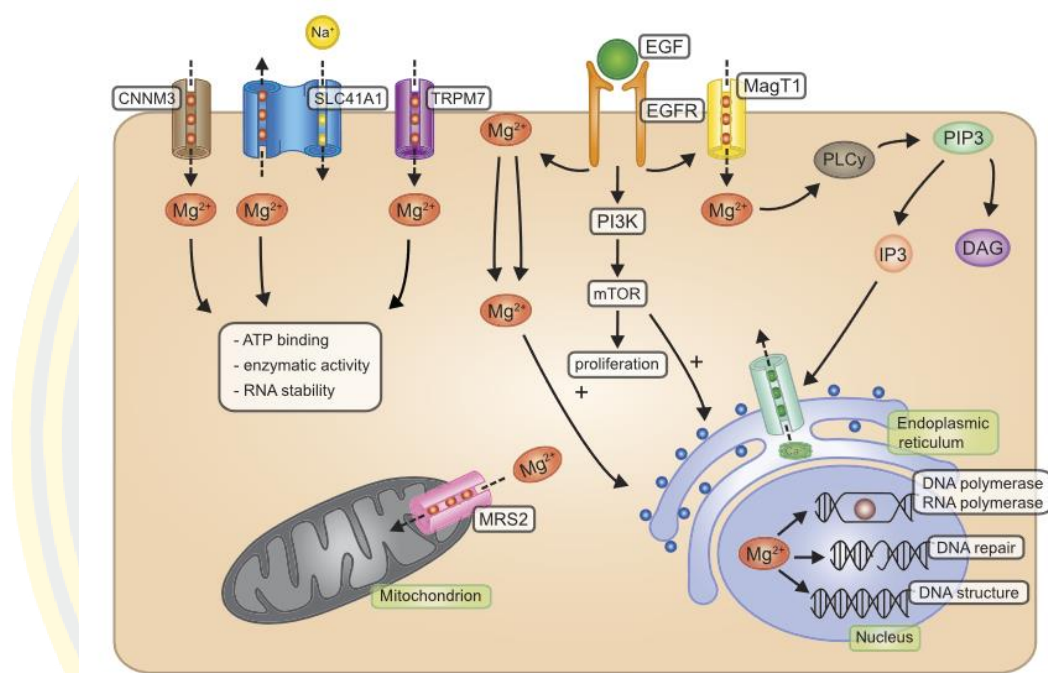


ภาพที่ 2 แสดงกลไกการดูดซึมและปัจจัยที่มีผลต่อการดูดซึมแมกนีเซียมในลำไส้ (Schuchardt & Hahn, 2017)

นอกจากนี้การรักษาสมดุลแมกนีเซียมอาจจะต้องอาศัย Transporters อื่นๆ ในเซลล์ในการขนส่งแมกนีเซียมเข้าออกเซลล์ หรือรักษาสมดุลภายในเซลล์ อย่างเช่น

1. **MagT1** ซึ่งเป็น Transporter ที่พบได้ใน MDCT cell มีชื่อเต็มว่า Mg^{2+} transporter 1 (MagT1) ซึ่งเป็น transporter ที่มีความสามารถในการขนส่งแมกนีเซียมเข้าเซลล์ได้อย่างรวดเร็ว โดยมีความสามารถและหน้าที่ในการขนส่งใกล้เคียงกับ TRPM7 (Chaigne-Delalande et al., 2013; Graham et al., 1960; Jin et al., 2008) ที่มีความสำคัญในกระบวนการดูดซึมแมกนีเซียมในลำไส้ที่จะกล่าวถึงในภายหลัง
2. **Extrusion** หรือการอัดฉีดแมกนีเซียม คือการควบคุมให้แมกนีเซียมถูกขับออกนอกเซลล์ โดยอาศัยความแตกต่างทางความเข้มข้นของ Na^{2+} (Romani, 2007) โดยกลไกนี้จะมีความแตกต่างกันไปในแต่ละเซลล์ และสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกัน
3. **SLC41A1** หรือชื่อเต็มคือ Solute carrier family 41 member 1 (SLC41A1) ทำหน้าที่เป็นตัวแลกเปลี่ยน หรือ Transporter ระหว่าง Na^{2+} และ Mg^{2+} ด้วยอัตราการแลกเปลี่ยนแบบ 2:1 (Kolisek, Nestler, Vormann, & Schweigel-Rontgen, 2012) โดยที่ SLC41A1 มีโดเมนที่เป็นส่วนของ Transmembrane protein ทั้งหมด 11 domain (Goytain & Quamme, 2005b) โดยพบว่า การศึกษาการไหลออกของ Mg^{2+} โดยใช้ mag-fura 2 แสดงการขับอัด Mg^{2+} ออกนอกเซลล์ แบบอาศัยปริมาณความเข้มข้นของ Na^{2+} โดยพบว่าการเกิด mutation ใน SLC41A1 จะทำให้เกิดไตวายได้ (Hurd et al., 2013) SLC41A1 นอกจากนี้ ยังมีเพิ่มเติมอีกตัวที่เป็น Sub family เดียวกันคือ SLC41A2 และ SLC41A3 โดย SLC41A2 เป็น Plasma protein โดยมีลักษณะทางกายภาพตรงข้ามกับ SLC41A1 ทำให้ SLC41A2 ที่แสดงออกบนเยื่อหุ้มของออร์แกเนลล์อาจเกี่ยวข้องกับการขนส่ง Mg^{2+} ภายใน Subcellular หรือภายในเซลล์ (Sahni, Nelson, & Scharenberg, 2007)
4. **CNNM3** อยู่ใน family ของ Cyclin M (CNNM) :ซึ่งเป็น โปรตีนที่ใช้ในการขนส่งแมกนีเซียม (Goytain & Quamme, 2005a; Wang et al., 2003) CNNM1 ส่วนใหญ่จะพบการแสดงออกในสมอง CNNM2พบการแสดงออกในไต และ CNNM4 จะถูกพบส่วนใหญ่ในลำไส้ (de Baaij et al., 2012) ซึ่งจะกล่าวถึงต่อไปในคราวหลัง ส่วน CNNM3 มีรูปแบบการแสดงออกที่แพร่หลายและอาจมีบทบาทในการบำรุงรักษาภาวะสมดุลของ Mg^{2+} ในเซลล์ โดยในการศึกษาของ Hardy และคณะ (Hardy et al., 2015) พบว่า CNNM3 ขนส่ง Mg^{2+} โดยทำงานร่วมกับ PRL2 เพื่อขนส่ง Mg^{2+} แล้วสามารถกระตุ้นการเติบโตเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อได้

5. **MRS2** หรือ mitochondrial RNA splicing 2 เป็น Mg^{2+} channel บนเยื่อหุ้มไมโทคอนเดรีย โดย MRS2 ควบคุมความเข้มข้นของ Mg^{2+} ภายในเซลล์ (Zsurka, Gregan, & Schweyen, 2001) โดยการศึกษาของ พบว่า ไมโทคอนเดรียอาจเก็บ Mg^{2+} ภายในเซลล์ เนื่องจาก Mg^{2+} มีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการจับ ATP และความเข้มข้นของ Mg^{2+} ภายในไมโทคอนเดรีย อาจส่งผลกระทบต่อ Citric cycle (Kuramoto et al., 2011)



ภาพที่ 3 แสดงการรักษาสมดุลของแมกนีเซียมภายในเซลล์ ของ Transporters protein (de Baaij et al., 2015)

การดูดซึมแมกนีเซียมในลำไส้เล็ก

การดูดซึมในลำไส้ประมาณ 370 mg 30-50 % เกิดในลำไส้ (Graham et al., 1960) การดูดซึมแมกนีเซียมในลำไส้ เกิดผ่าน 2 กลไก หลักคือ กลไกการแพร่แบบผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์ (passive paracellular transport) และ กลไกแบบผ่านเซลล์โดยใช้พลังงาน (active transcellular transport) ดังที่แสดงในภาพที่ 2 โดยการเกิดการดูดซึมนี้อาจเกิดขึ้นที่บริเวณส่วนของลำไส้เล็ก และ บางส่วนของ Cecum และ Colon ผ่าน Transcellular transport

Passive paracellular transport

จะเป็นกลไกหลักในการดูดซึมแมกนีเซียม โดยกลไกนี้จะใช้การแพร่แบบไม่อาศัยพลังงาน แต่อาศัยการแพร่ของสารจากความเข้มข้นของแมกนีเซียมจากมากไปน้อย แรงที่ใช้ในการขนส่ง

แมกนีเซียมในกลไกนี้มาจากความเข้มข้นของแมกนีเซียมที่ด้าน luminal ซึ่งมีความเข้มข้นมากถึง 5 mM แต่ในขณะที่เดียวกันด้าน Basolateral มีความเข้มข้นเพียง 1 mM ส่งผลให้เกิดความแตกต่างทางความเข้มข้นจึงสามารถเกิดการแพร่แบบไม่ต้องใช้พลังงานได้ นอกจากนี้ยังต้องอาศัยแรงความแตกต่างทางศักย์ไฟฟ้า ซึ่งที่ด้าน luminal จะมีค่าศักย์ไฟฟ้าเป็นบวก แต่ในขณะที่เดียวกันด้าน Basolateral มีศักย์ไฟฟ้าเป็นลบ ดังนั้นจึงทำให้แมกนีเซียมที่มีประจุเป็นบวกในรูปอิสระ (Mg^{2+}) สามารถขนส่งผ่านได้ตาม electrical gradient (Grober et al., 2015; Quamme, 2008) โดยอาศัยโปรตีนใน tight junction คือ Claudins (Cldn)

Tight junction เป็น protein complexes ที่วางตัวแบบ semi-permeable connections บน cell membrane โดยจะแบ่งด้าน apical ออกจากด้าน basolateral ทำให้เซลล์มีคุณสมบัติแบบ Polarization โดย Tight junction จะแบ่งเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนที่เป็น cytoplasmic plaque และ ส่วนที่เป็น transmembrane protein ที่แบ่งเป็น claudin family, occludin family และ junctional adhesion molecules (JAMs) โดยที่ occludin จะจับกับ Zonula occludens (ZO) 1, 2, และ 3 (หรือเรียกว่า tight junction protein 1, 2 และ 3) ที่เป็นส่วน cytoplasmic plaque และทำหน้าที่เป็นตัวรับส่งสัญญาณที่สำคัญให้กับ Tight junction อย่างเช่น ZO-1 จะมีการแสดงออกใน epithelial และ endothelial cells มีหน้าที่ในการช่วยส่งสัญญาณของเซลล์ เนื่องจาก ZO-1 มีการจับกันกับโปรตีน คือ PDZ domains ที่สามารถจับกับ claudins และ JAMs Guk domain ที่จับกับ occludin และ SH3 domain ที่จับกับ transcription factor ZONAB, และ c-terminus ที่จับกับ cytoskeletal F-actin (Simon et al., 1999) การจับกันนี้ทำให้เกิดการส่งสัญญาณทั้ง extra- และ intracellular signaling ที่มีผลต่อการทำงานของ Tight junction (Vermette et al., 2018) นอกจากนี้ยังมีโปรตีนที่สำคัญที่ทำหน้าที่รักษาเสถียรภาพ (integrity) คงความแข็งแรง ของ Tight junction ทำให้เกิดคุณสมบัติการคัดเลือกรูปขนาดของโมเลกุล (size-selectivity) หรือ เกิดคุณสมบัติการคัดเลือประจุ (charge-selectivity) โปรตีนกลุ่มนั้นๆ คือ Claudins

โปรตีน Cldn ในปัจจุบันพบว่าทั้งหมด 27 ชนิดคือ Cldn 1 Cldn 27 ซึ่งในแต่ละชนิดนั้น มีการแสดงออกแบบจำเพาะในอวัยวะที่แตกต่างกัน การแสดงออกของโปรตีน Claudin นั้นขึ้นอยู่กับยีนและโปรตีนที่เกี่ยวข้องยกตัวอย่างเช่น Cldn 2 ควบคุมด้วย Cdx1 และ Cdx2 ซึ่งเป็น transcription factor (TF) ที่จะไปกระตุ้น Cldn 2 promoter ที่สำคัญต่อกระบวนการ differentiation ของเยื่อผนังลำไส้ (Sakaguchi et al., 2002) Cldn เป็นตัวการสำคัญสำหรับในการทำให้ tight

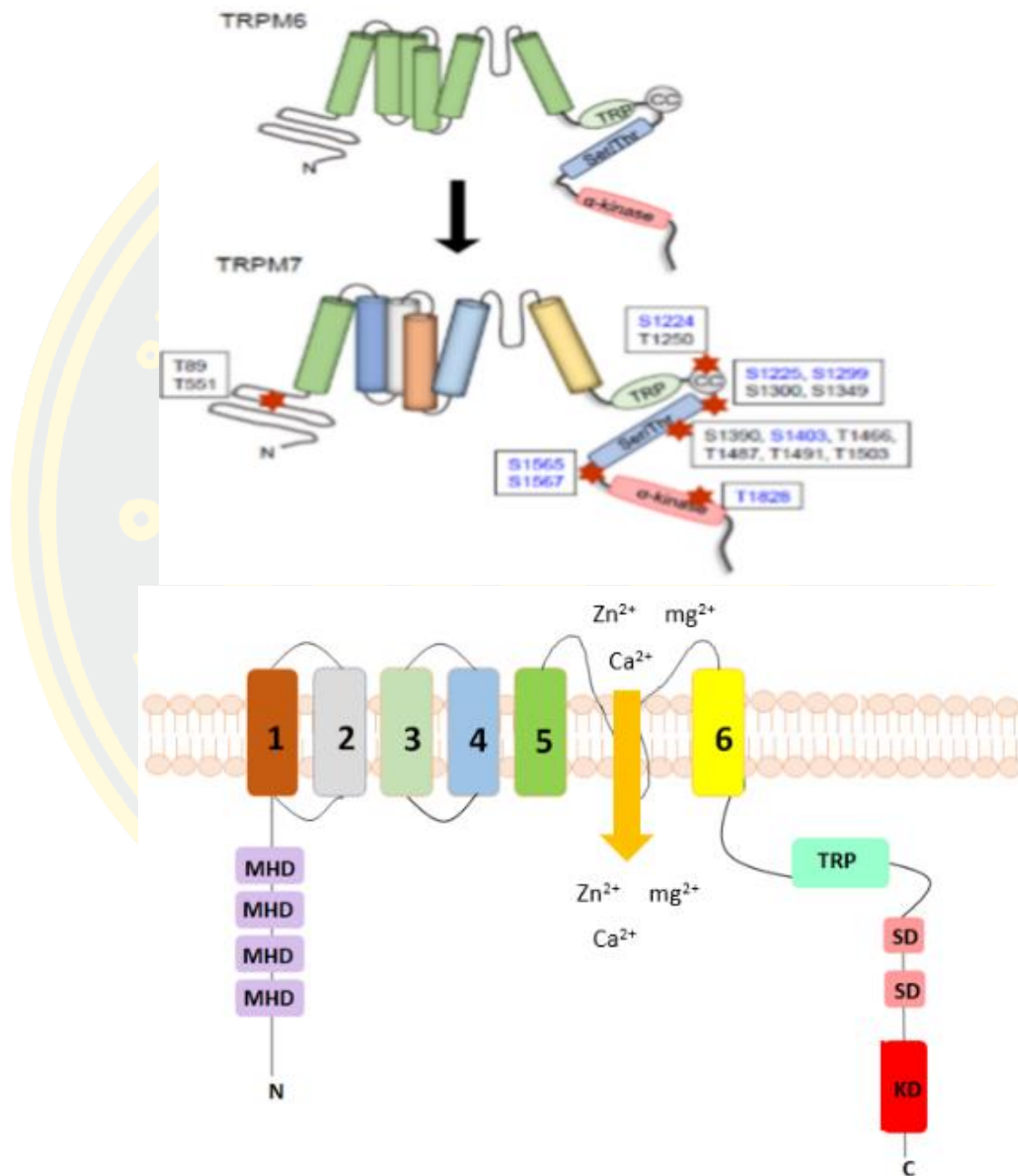
junction สามารถคัดเลือกประจุ (charge-selectivity) ซึ่งจำเป็นต่อการขนส่งสาร โดยการศึกษาท่อนหน้านี้แสดงให้เห็นว่า Cldn 2 และ 12 เป็น paracellular channels สำหรับแคลเซียม (Beggs et al., 2017) หรือ Cldn 7 ที่มีผลต่อการขนส่ง โซเดียมและคลอไรด์ไอออน (Fan, Tatum, Hoggard, & Chen, 2019) โครงสร้างส่วนใหญ่ของ claudins จะประกอบด้วย 2 extracellular domain และ 1 intracellular domain ซึ่งมี N- และ C-terminal อยู่ฝั่ง cytoplasm (Vermette et al., 2018) และจะมี serine/threonine ที่สามารถเกิด phosphorylation ได้ในส่วนของ C-terminal โดย phosphorylation นั้นจะสัมพันธ์กับฟังก์ชันของ tight junction ที่ลดลงหรือเพิ่มขึ้น (Van Itallie et al., 2012) การศึกษาท่อนี้ของ Van Itallie and Anderson (2006) ได้ทำการศึกษารายละเอียดการควบคุมของ Cldn ชนิดต่างๆ ในเซลล์เยื่อหุ้มหลายชนิดพบว่า Cldn ชนิดต่างๆถูกควบคุมและตอบสนองต่อ signaling molecule ซึ่งอาจทำให้เกิดกระบวนการ Phosphorylation และเพิ่มการแสดงออกหรือกระตุ้นการทำงานของ Cldn ได้หลายชนิดอย่างเช่น cAMP, mitogen activated protein kinase (MAPK), protein kinase C, phospholipase C, G protein เป็นต้น นอกจากนี้ในการรักษาเซลล์บุผนังหลอดเลือดที่ได้รับการเพาะเลี้ยงด้วย cAMP จะช่วยเพิ่มการทำงานของ tight junction โดยใช้กลไกการเกิด phosphorylation ผ่าน protein kinase A (Duan, Zhang, Wu, Li, & Liu, 2017; Gonzalez-Mariscal, Raya-Sandino, Gonzalez-Gonzalez, & Hernandez-Guzman, 2018) นอกจากนี้จากการศึกษาของ Ikari et al. (2010) ได้ทำการศึกษาผลของ extracellular Mg^{2+} ต่อการควบคุม tight junction localization และความสามารถในการเลือกผ่านของ Claudin 16 ในเซลล์ MDCK cell พบว่า tight junction localization ของ claudin 16 ต้องอาศัยความเข้มข้นของ Mg^{2+} (Pan et al., 2012) หากปริมาณแมกนีเซียมไม่เพียงพอจะทำให้เกิดการลด localization และความสามารถในการให้ผ่านของ Tight junction โดยแมกนีเซียม จะควบคุมกระบวนการ phosphorylation ของ threonine ผ่าน MEK/ERK pathway จึงกล่าวได้ว่า Cldn มีผลต่อความสามารถในการเลือกผ่านของ tight junction (Gunzel & Yu, 2013) ในการดูซึมแมกนีเซียมนั้นจะใช้ Cldn 16 และ Cldn 19 เป็นตัวควบคุมในท่อขดส่วนปลายของหน่วยไตแต่ไม่พบในลำไส้เล็ก (de Baaij et al., 2015; Fujita et al., 2006) แต่จากการศึกษาท่อนี้ของ Thongon and Krishnamra (2012) ที่ได้ศึกษาคุณสมบัติของ transepithelial electrical resistance (TER) หรือคุณสมบัติการคัดเลือกประจุผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์ (paracellular charge selectivity) ในเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 monolayers พบว่า Cldn 7 และ Cldn 12 มีส่วนช่วยในการดูซึมแมกนีเซียม หมายความว่าได้อีกอย่างหนึ่งว่า Cldn 7 และ Cldn 12 มีความสามารถเป็น magnesium channel โดยในการทำงานของ Tight

junction นั้นต้องอาศัยการควบคุมด้วย signaling molecule นอกจากนี้จากการศึกษาการควบคุมการแสดงออกของ claudins ในลำไส้ พบว่า cldn 2, 3, 7 และ 15 มารวมกลุ่มกันที่ Tight junction ของเยื่อผนังลำไส้ในหนู เมื่อถูกกระตุ้นด้วย Epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) (Lei et al., 2012; Sakaguchi et al., 2002) นอกจากนี้ยังพบว่าหาก knockout Sodium proton exchangers (NHEs) ในหนู ทำให้การแสดงออกของ Cldn 2 และ Cldn 15 ลดลง (Pan et al., 2012)

Active transcellular transport

เป็นกลไกแบบผ่านเซลล์โดยใช้พลังงาน เป็นการขนส่ง ion ที่ต้าน concentration gradient จึงต้องใช้พลังงาน จะถูกกระตุ้นก็ต่อเมื่อมีปริมาณแมกนีเซียมลดน้อยลง (Penner & Fleig, 2007) โดยกลไกนี้ต้องอาศัยการทำงานของโปรตีน transient receptor potential ซึ่งเป็น channel เฉพาะของสารประจุบวกสอง (divalent cations channel) เช่น Mg^{2+} , Na^{2+} และ Ca^{2+} ในการดูดซึมแมกนีเซียม นั้น จะต้องอาศัยโปรตีน transient receptor potential melastatin (TRPM) 6 และ 7 ที่อยู่ทางด้าน apical ของลำไส้เพื่อให้แมกนีเซียม จากด้าน luminal เข้าสู่ enterocyte จากนั้นจะต้องอาศัย secondary active transport เพื่อขนส่งแมกนีเซียม จาก enterocyte เข้าสู่กระแสเลือด โดยใช้โปรตีนที่เป็น Na/Mg exchanger คือ ancient conserved domain protein 4 (CNNM4) ยืนยันได้จากการศึกษาของ Yamazaki et al. (2013) ที่พบว่าเมื่อทำการ point mutation โปรตีน CNNM4 ในหนู จะทำให้การขนส่งแมกนีเซียมออกเซลล์นั้นลดลงด้วย นอกจากนี้ TRPM6 และ TRPM7 ที่สามารถถูกยับยั้งโดย Free Mg^{2+} และ แมกนีเซียมที่จับอยู่กับ ATP (Mg-ATP) ใน cytoplasm ที่เพิ่มขึ้นได้ ส่วน TRPM6 และ TRPM 7 นั้นมีบทบาทสำคัญอย่างยิ่งต่อการขนส่ง Mg ผ่านเซลล์ เนื่องจากต้องทำงานร่วมกัน

Transient receptor potential (TRP) family เป็น channel ของไอออนบวก มีคุณสมบัติในการให้ไอออนบวกผ่านได้ ซึ่งมีทั้งหมด 8 ชนิด แต่ชนิดที่เด่นที่สุดคือ TRPM6 (ChaK2) และ TRPM7 (ChaK1, TRP-PLIK, LTRPC7) มีโครงสร้างแบบ tetrameric และแต่ละ subunit ประกอบด้วยส่วนที่อยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์ 6 ส่วน (S1-6) และโดยส่วนที่สามารถดูดซึม Mg^{2+} , Ca^{2+} และ Zn^{2+} จะอยู่ระหว่างส่วนที่ 5 และ 6 นอกจากนี้ TRPM6 และ 7 มีส่วนประกอบของ α -kinases domain เป็นลักษณะเด่นที่เพิ่มมาจากส่วนที่เป็น Ion channel ซึ่งสามารถเกิดกระบวนการ Phosphorylation บริเวณนี้ได้ เรียกคุณสมบัตินี้ว่า “Chanzymes” (Simon et al., 1999; Zou, Rios, Montezano, & Touyz, 2019)



ภาพที่ 4 แสดงโครงสร้างของ TRPM6 และ 7

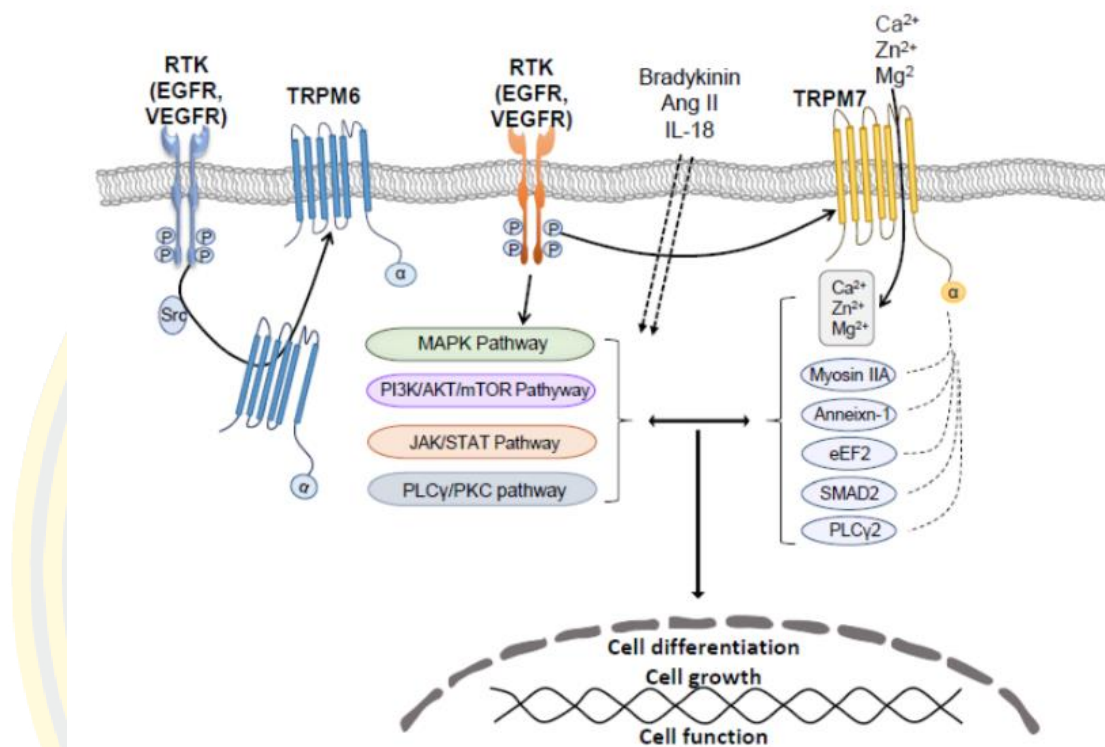
(Thebault et al., 2008; Zou et al., 2019)

TRPM6 กระจายอยู่ในลำไส้เล็ก, colon และ distal convoluted tubule (DCT) (Simon et al., 1999) ในการศึกษา functional expression พบว่าการ แสดงออกของ TRPM6 ที่ cell membrane จำเป็นต้องมีการแสดงออกของ TRPM7 ร่วมด้วย (co-expression) จะได้โครงสร้างแบบ heteromeric ion channels (Chubanov et al., 2018; Schmitz et al., 2005) ในการศึกษาโรคทางพันธุกรรมชื่อ isolated autosomal recessive hypomagnesemia (IRH) ซึ่งทำให้เกิดการสูญเสีย Mg อย่างรุนแรง พบว่าผู้ป่วยมีการ mutation ของยีนที่สร้าง epithelial growth factor (EGF) และ TRPM6 โดยการ mutation เกิดที่ c-terminal domain หากให้ EGF กับเซลล์ที่มีการแสดงออกของ TRPM6 จะช่วยเพิ่ม activity ของ TRPM6 แต่หากเกิดการ mutation ของ EGF TRPM6 จะไม่ถูกกระตุ้น และมีการแสดงออกของโปรตีนที่ colon, cecum, DCT มากขึ้นในหนูที่ไม่ได้รับแมกนีเซียม (Groenestege, Hoenderop, van den Heuvel, Knoers, & Bindels, 2006) นอกจากนี้ยีน TRPM6 ของมนุษย์ ต้องเข้ารหัสไอโซฟอร์ม mRNA หลายตัว ทำให้ TRPM6 ถูกเก็บไว้ในเซลล์และยังไม่สามารถทำงานได้ จึงต้องอาศัย TRPM7 ในการทำงาน โดยจากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า TRPM7 นั้นสามารถกระตุ้นการ Translocation ของ TRPM6 ให้ออกมาจาก cytosol ไปอยู่บนผิวเซลล์แล้วทำงานร่วมกับ TRPM7 ในรูปแบบ Heteromeric ion channel ได้ (Chubanov et al., 2018; Chubanov et al., 2004; Schmitz et al., 2005) ซึ่งอาจกระตุ้นผ่าน cAMP-PKA pathway นอกจากนี้ยังมีการศึกษาที่แสดงว่า kinase activity ของ TRPM6 มีผลต่อการกระจายตัวของ subcellular TRPM7 และมีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ภายใต้สภาวะการเติบโตแบบ hypomagnesemia และยังมี การศึกษาจากในปี 2016 ที่ทำใน human embryonic kidney 293 (HEK293) cells ก็ให้ผล เช่นเดียวกัน (Blanchard et al., 2016) ซึ่งหมายความว่า kinase ของทั้งสอง channels เป็น องค์ประกอบที่สำคัญของการรักษา ion homeostasis และปรับเปลี่ยนการส่งสัญญาณ โดยมีอิทธิพล ต่อกิจกรรมทางชีวภาพของกันและกัน เช่นเดียวกับเหตุการณ์การส่งสัญญาณภายในเซลล์ การ ค้นพบเหล่านี้ยืนยันว่าถึงแม้ว่า TRPM6 และ TRPM7 จะเป็นทั้งเซ็นเซอร์ของ extracellular mg และ และควบคุมสมดุลแมกนีเซียม แต่ channel ทั้งสองทำงานแบบไม่ซ้อนทับหน้าที่กัน (Ferioli et al., 2017) เนื่องจากในการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Brandao (2014) พบว่า กิจกรรมของ TRPM6 kinase มี ผลต่อ TRPM7 serine phosphorylation และ ช่วย TRPM7 จากการยับยั้งโดย Mg-ATP (Chubanov et al., 2018) ส่วน TRPM7 ก็ชดเชยความไวของ TRPM6 ต่อ cytosolic Mg^{2+} ที่สัมพันธ์ กับความ เข้มข้นทางสรีรวิทยา ซึ่งเป็นเช่นเดียวกับในการศึกษาของ Thongon and Chamniansawat (2019) ที่ พบว่ามีการเพิ่มขึ้นของโปรตีนทั้ง TRPM6 และ CNNM4 แต่การดูดซึมแมกนีเซียมไม่ดีขึ้น ซึ่งอาจ

เป็นไปได้ว่า การทำงานของ TRPM6 นั้นอาจต้องอาศัยการกระตุ้นจากโปรตีนหรือ signaling molecule ตัวอื่นๆ แต่ในขณะเดียวกัน ในการศึกษาของ Langeslag, Clark, Moolenaar, van Leeuwen, and Jalink (2007) กลับแสดงให้เห็นว่า TRPM6 อาจทำงานได้ด้วยตัวเอง ซึ่งแตกต่างจากงานวิจัยอื่นๆ ที่สรุปว่าต้องทำงานควบคู่กับ TRPM7 นอกจากนี้ในการศึกษาของ Jia Xia และคณะ ในปี 2011 (J. Xie et al., 2011) ที่ทำการศึกษากิจกรรมของ TRPM6 ในเซลล์ HEK 293T cell ที่พบว่า โปรตีน TRPM6 นั้นมีความต้องการ PIP₂ หรือ Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate เพื่อช่วยในกิจกรรมการทำงานของตัวโปรตีน โดยพบว่า เมื่อทำการ Mutation PIP₂ จะทำให้สามารถลดหรือยับยั้งกิจกรรมการทำงานของ TRPM6 และเมื่อ TRPM6 มีการ Interaction กับ PIP₂ ที่บริเวณประจุบวก แล้วจะสามารถกระตุ้นให้ TRPM6 นั้นเกิดการกระตุ้นเพื่อให้ขึ้นไปอยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์ได้ดียิ่งขึ้น และกระตุ้นการทำงานของ TRPM6 ในทางกลับกันถ้าหากที่เกิด Hydrolyzation ของ PIP₂ ก็จะทำให้กิจกรรมการทำงานของ TRPM6 นั้นลดลง และโปรตีนก็จะอยู่ในเซลล์ โดยกระบวนการเกิด Hydrolyzation ของ PIP₂ นี้ อาจเกิดขึ้นได้จากการกระตุ้นโดย GRP receptor ผ่าน Gq subunit ที่ไปกระตุ้น PLCβ ที่สามารถจับกับ TRPM6 แล้วยังสามารถ กระตุ้น การเกิด Hydrolyzation เปลี่ยน PIP₂ เป็น IP₃ และ DAG ได้

TRPM7 นั้นสามารถแสดงออกได้ตามหลาย ๆ อวัยวะ และมีความสามารถในการยอมให้แมกนีเซียมผ่านมากกว่าแคลเซียมเล็กน้อย โดยทั่วไปแล้วกิจกรรมของ TRPM7 ถือเป็นสิ่งที่จำเป็นต้องมีก่อนสำหรับความมีชีวิตของเซลล์ ในการศึกษาที่มีการยับยั้งของ TRPM7 ในเซลล์ทำให้เกิดการขาดแมกนีเซียมในเซลล์และทำให้เซลล์หยุดการเจริญเติบโต แสดงให้เห็นว่า TRPM7 มีความสำคัญอย่างยิ่งต่อสถานะสมดุลของแมกนีเซียมในระดับเซลล์ (Jin et al., 2008) TRPM7 มีกระบวนการ auto-phosphorylation เป็นกลไกควบคุม channel activity (Schmitz et al., 2005; Thebault et al., 2008) ที่ C-terminal มี α-kinase domain ที่ควบคุมการเกิด autophosphorylation ด้วยตัวเองได้ (Zou et al., 2019) โดยอาจจะอาศัย Receptor Tyrosine Kinases (RTK) และขึ้นอยู่กับ การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นภายในเซลล์ของ Mg²⁺ เนื่องจากเมื่อความเข้มข้นของแมกนีเซียมภายในเซลล์ อยู่ในระดับต่ำการกระตุ้นด้วย PLC จะยับยั้ง TRPM7 แต่ในขณะที่ในสภาวะปกติ PLC จะได้รับการกระตุ้น และเพิ่มการแสดงออกของ TRPM7 หรืออีกทางหนึ่ง การแสดงออกของ TRPM7 นั้นอาจเกิดขึ้นได้จากการกระตุ้นของ Ca²⁺ ของ ERK เนื่องจากเมื่อทำการยับยั้ง ERK จะทำให้การแสดงออกของ TRPM7 นั้นลดลง นอกจากนี้ TRPM7 นั้นสามารถกระตุ้นการ Translocation ของ TRPM6 ให้ออกมาจาก cytosol ไปอยู่บนผิวเซลล์แล้วทำงานร่วมกับ TRPM7

ในรูปแบบ Heteromeric ion channel ได้ โดยอาจกระตุ้นผ่าน cAMP-PKA pathway (Chubanov et al., 2018; Chubanov et al., 2004; Schmitz et al., 2005)

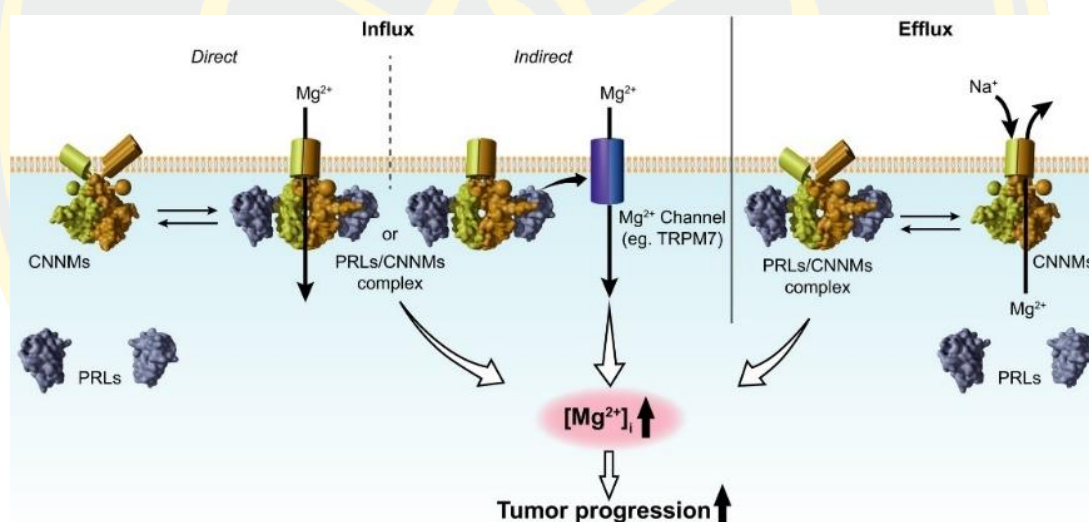


ภาพที่ 5 แสดงกลไกการทำงานของ TRPM7

(Zou et al., 2019)

CNNM4 cyclin M (CNNM) ซึ่งนี้มาจากการมี motif box cyclin (Wang et al., 2003) มี 4 ชนิดคือ CNNM1 – CNNM4 โปรตีนเหล่านี้ประกอบด้วย domain of unknown function 21 (DUF2) และ cystathionine β-synthase (CBS) domains in the cytoplasmic region (de Baaij et al., 2012; Stuiiver et al., 2011) สามารถพบได้ในยูคาริโอตจากยีสต์ไปจนถึงสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม การศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าการกลายพันธุ์ของ CNNM2 เกิดขึ้นในผู้ป่วยที่มีภาวะ hypomagnesemia (Stuiver et al., 2011) ซึ่งชี้ให้เห็นอย่างชัดเจนถึงบทบาทของ CNNM ในการขนส่ง Mg²⁺ แต่ในการศึกษาของ Yamazaki et al. (2013) ในการวัดปริมาณขององค์ประกอบโลหะสำคัญในเซลล์ HEK293 พบว่าระดับโซเดียมเพิ่มขึ้นในขณะที่ระดับแมกนีเซียมลดลงในเซลล์ที่มีการแสดงออกของ CNNM4 ในทางกลับกันเมื่อยับยั้ง CNNM4 โดยใช้ RNA (RNAi) ในเซลล์ HEK293 ส่งผลให้แมกนีเซียมใน

เซลล์เพิ่มขึ้น (Funato et al., 2014) จึงสรุปได้ว่าจึงสรุปได้ว่า CNNM4 มีความสำคัญกับการดูดซึมแมกนีเซียมโดยการแลกเปลี่ยน intracellular Mg^{2+} และ extracellular Na^+ (Na^+ / Mg^{2+} exchanger) และเป็น Mg^{2+} transporters ที่ขับ Mg^{2+} ออกจากเซลล์ CNNM จะอาศัยการทำงานของ phosphatase of regenerating liver (PRL) PRL ที่ประกอบด้วย tyrosine phosphatase domain ซึ่งโปรตีน PRL (PRL1-3) และ CNNM (CNNM1-4) สามารถจับกันและการทำงานร่วมกันได้เนื่องจาก CNNM มี CBS (Funato et al., 2014; Hardy et al., 2015) ที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาของ PRL ได้ ในการศึกษาของ Funato et al. (2014) พบว่าการแสดงออกของ PRL ระวัง Mg^{2+} efflux อย่างสมบูรณ์ นอกจากนี้หากมีการแสดงออกของ PRL มากเกินไปหรือน้อยเกินไป ก็จะส่งผลกระทบต่อระดับ Mg^{2+} ภายในเซลล์ด้วย ผลลัพธ์เหล่านี้เกี่ยวข้องกับ PRL ในการควบคุมระดับ Mg^{2+} โดยยับยั้งกิจกรรม Mg^{2+} efflux ของ CNNM4 (Yamazaki et al., 2013)

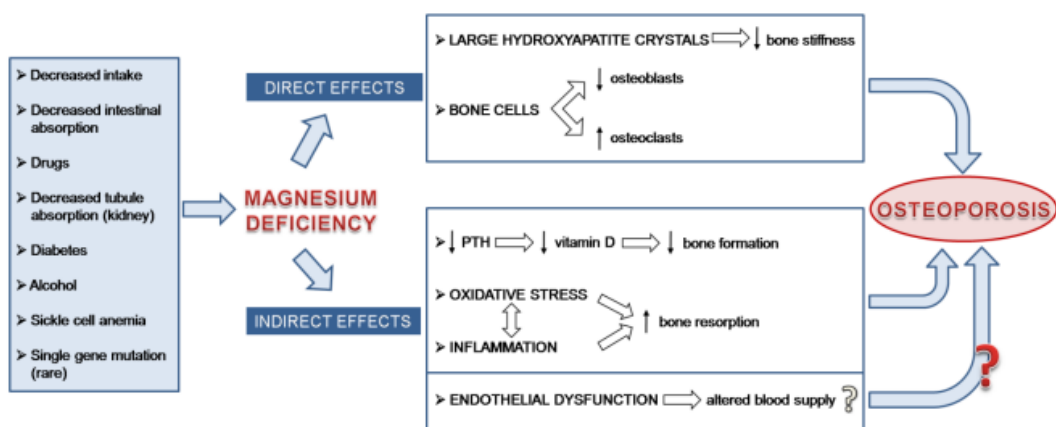


ภาพที่ 6 แสดงการจับกันระหว่าง CNNM4 และ PRL ซึ่งมีผลต่อการขนส่งแมกนีเซียม

(Funato et al., 2014)

การรักษาสมดุลแมกนีเซียมในกระดูก

เนื่องจากแมกนีเซียม 50 - 60% ถูกเก็บที่กระดูก โดยการสะสมนี้เป็นกระบวนการที่มีความเกี่ยวข้องกับความสัมพันธ์ของแมกนีเซียมในกระแสเลือด ซึ่งถ้าหากแมกนีเซียมในเลือดนั้นเกิดลดน้อยลงจะเกิดกระบวนการการสลายกระดูกเกิดขึ้น ซึ่งผิวกระดูกจะมีการแลกเปลี่ยนแมกนีเซียมอย่างต่อเนื่องให้กับเลือด (Alfrey, Miller, & Trow, 1974) เพื่อให้แมกนีเซียมในเลือดกลับมาที่มีปริมาณความเข้มข้นให้ใกล้เคียงปกติมากที่สุด โดยในกระดูก Mg^{2+} จะจับกับพื้นผิวของผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์ และเพิ่มความสามารถในการละลายของ P_i และ Ca^{2+} ไฮดรอกซีอะพาไทต์และด้วยเหตุนี้จึงส่งผลต่อขนาดและการก่อตัวของผลึก(Boistelle, Lopez-Valero, & Abbona, 1993) นอกจากนี้ Mg^{2+} ยังสามารถกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์สร้างกระดูกในกรณีที่มีแมกนีเซียมมากพอให้เก็บสะสม นอกจากนี้ ในการศึกษาของ Rude และคณะ พบว่าการขาด Mg^{2+} จะเพิ่มการหลั่งของ proinflammatory cytokines เช่น tumor necrosis factor (TNF)- , interleukin (IL)-1 และ Substance (Rude et al., 2004) ซึ่งทั้งหมดนี้มีความเกี่ยวข้องในกระบวนการสลายของกระดูก osteoclastic โดยทำให้เกิดการสลายกระดูกที่เพิ่มมากขึ้น โดยมีความเกี่ยวข้องกับระดับฮอร์โมนพาราไทรอยด์ (PTH) และ 1,25 (OH)2D3 ซึ่งอาจเป็นสาเหตุที่ทำให้มีการเพิ่มหรือลดแมกนีเซียมในกระแสเลือดและในกระดูก (Rude, Oldham, Sharp, & Singer, 1978)



ภาพที่ 7 แสดงกลไกการรักษาสมดุลแมกนีเซียมภายในกระดูก

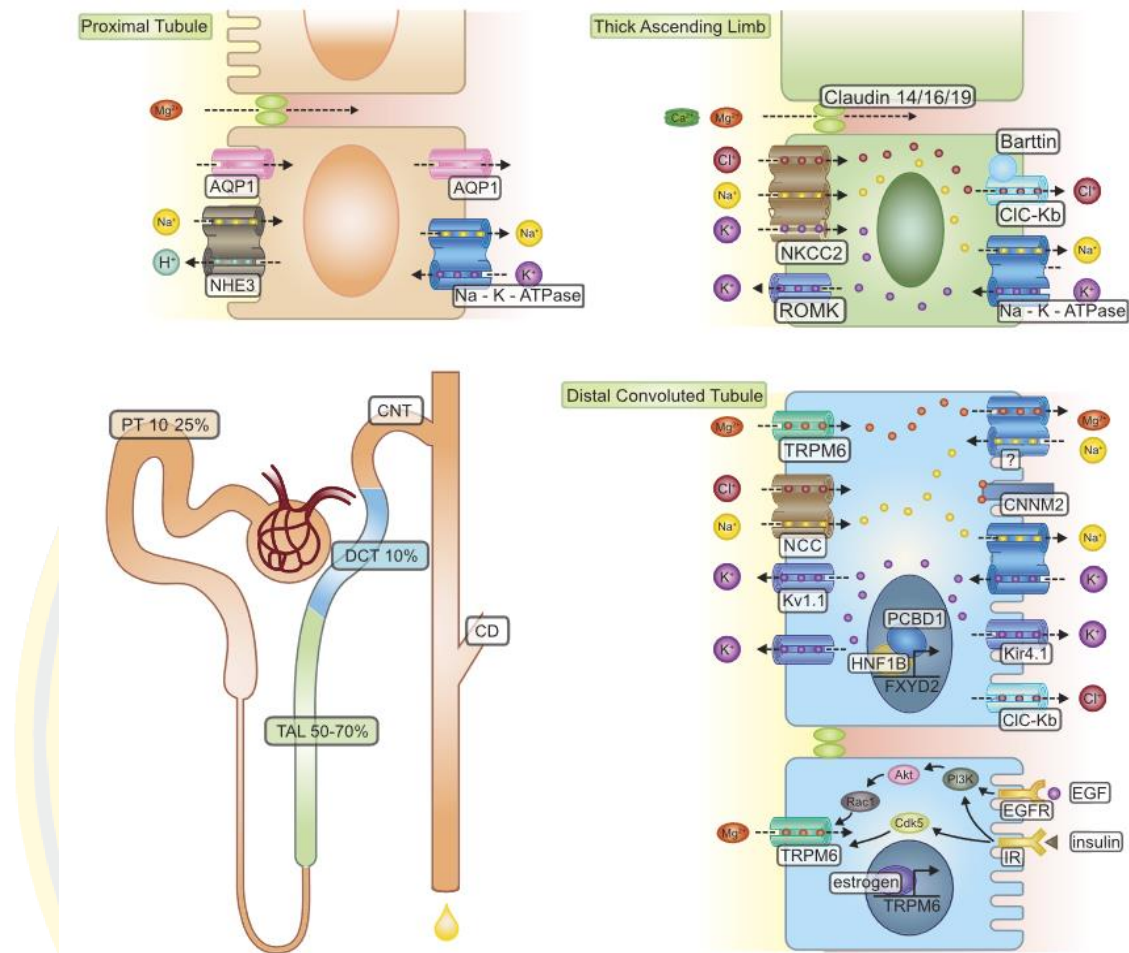
(Castiglioni, Cazzaniga, Albisetti, & Maier, 2013)

การรักษาสมดุลแมกนีเซียมในไต

ในไตนั้นเป็นกระบวนการสำคัญอย่างมากในการรักษาระดับแมกนีเซียมภายในร่างกายของมนุษย์ เนื่องจากจะทำหน้าที่ขับแมกนีเซียมส่วนเกินทิ้งและดูดกลับแมกนีเซียมในยามจำเป็น โดยที่แมกนีเซียม ประมาณ 2400 mg จะถูกกรองที่ Glomerulus และจะดูดกลับที่ Nephron ประมาณ 90-99% โดยส่วนที่เหลืออีก 100 mg จะถูกขับทิ้ง ในกระบวนการรักษาสมดุลของแมกนีเซียมในไตนั้น เกิดขึ้นได้ในหลายส่วน คือ

1. **proximal tubule (PT)** กลไกของการดูดซึมแมกนีเซียมของ proximal tubule (PT) นั้นแสดงให้เห็นว่า 10–25% ของ Mg^{2+} ถูกดูดกลับโดย nephron และ 70% ของ Mg^{2+} serum สามารถกรองได้อย่างอิสระใน Glomerulus (Quamme et al., 1978) โดยส่วนใหญ่เป็นการดูดกลับของ Mg^{2+} จะเกิดขึ้นที่ส่วนปลายของ proximal tubule โดยใช้กระบวนการ passive paracellular transport โดยจำเป็นจ้องพึ่งพาอาศัยการขนส่งของ Na^{2+} ร่วมด้วย (Ikari, Kano, & Suketa, 2002; Le Grimellec, 1975)
2. **Thick ascending limb of Henle's loop (TAL)** ส่วนนี้จะเป็นส่วนหลักสำหรับการดูดกลับของ Mg^{2+} (Feraille & Dizin, 2016; Hoenderop, Nilius, & Bindels, 2002) เนื่องจากคุณสมบัติเฉพาะของส่วนนี้ ทำให้แมกนีเซียมที่ถูกกรองแล้ว ประมาณ 50–70% สามารถถูกดูดกลับมาได้อีกครั้ง การขนส่ง Mg^{2+} แบบ paracellular transport นั้นขึ้นอยู่กับแรงดันความต่างศักย์ Transepithelial ที่เป็นบวกของลูเมน (+10 mV) ซึ่งถูกกำหนดโดยกิจกรรมของ $Na^+ -K^+ -2Cl^-$ cotransporter (NKCC2) และการหลั่งของ K^+ ที่ Apical membrane ปัจจัยที่เพิ่มแรงดันความต่างศักย์ให้ Transepithelial membrane คือการหลั่ง K^+ ผ่านทาง renal outer medullary potassium channel (ROMK) และการไหลย้อนกลับของ Na^{2+} แบบ paracellular ซึ่งเป็นผลมาจากการลดความเข้มข้นของ Na^{2+} ที่อยู่ใน luminal (Greger & Velazquez, 1987) การขนส่งแมกนีเซียมในส่วนนี้จะต้องขนส่งแบบ paracellular transport โดยอาศัยการเลือกผ่านของ Tight junction ที่วางตัวอยู่ระหว่าง Epithelium cell โดยอาศัยโปรตีนกลุ่ม Clon โดยการแสดงออกของโปรตีนชนิดนี้จะแตกต่างกันออกไปในแต่ละส่วนซึ่งในส่วนนี้จะมีการแสดงออกของโปรตีน Clon 3, 10, 11, 14, 16, และ 19 โดยตัวที่ทำหน้าที่ในการเลือกผ่านแมกนีเซียมได้แก่ Clon 16 และ 19 (Gunzel & Yu, 2013; Konrad et al., 2006)
3. **distal convoluted tubule (DCT)** เป็นตัวกำหนดความเข้มข้นของ Mg^{2+} แมกนีเซียม ประมาณ 10% จะถูกดูดกลับโดยกลไกการขนส่งแบบ Transcellular transport ที่มีการควบคุมอย่างเข้มงวด (Brunette, Vigneault, & Carriere, 1974) โดยที่ส่วนของ เซลล์ DCT ก่อตัวเป็นเยื่อหุ้มที่มีความต้านทานสูงโดยมีความต่างศักย์ของลูเมนเป็นลบอยู่ที่ประมาณ -5 mV (Greger & Velazquez,

1987; Wright, 1971) ใน DCT จึงจำเป็นต้องใช้การขนส่งแบบ Transcellular transport ที่ต้องอาศัยโปรตีน TRPM6 ในการ เป็นตัวกลางในการขนส่ง Mg^{2+} ให้เพิ่มขึ้นใน Luminal โดยการ ทำงานของ TRPM6 นั้นจะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของแมกนีเซียมภายในเซลล์ (Hoenderop & Bindels, 2008; Voets et al., 2004) โดยที่ความแตกต่างความเข้มข้นของแมกนีเซียม ที่เข้าสู่ เซลล์ DCT ส่วนที่เป็น Luminal จะอยู่ที่ประมาณ 0.2-0.7 mM และส่วนที่อยู่ในเซลล์จะประมาณ 0.5-1 mM ดังนั้นแมกนีเซียมที่เข้าสู่ด้านลูเมน จะใช้ความต่างศักย์ที่เป็นลบของเยื่อหุ้มเซลล์ใน การขนส่งแมกนีเซียมเข้ามาภายใน DCT cell นอกจากนี้ K^+ channel ยกตัวอย่างเช่น voltage-gated K^+ channel ยังมีความจำเป็นอย่างมากในการขับเคลื่อนกระบวนการ Mg^{2+} uptake (de Baaij et al., 2013; Glaudemans et al., 2009; Xu et al., 1997) นอกจากนี้ยังพบว่า ROMK ที่เคย กล่าวถึงไปข้างต้นนั้นก็พบการแสดงออกได้ใน DCT cell และยังมีผลต่อกระบวนการต่างๆใน การดูดซึมและดูดกลับแมกนีเซียมอีกด้วย (Xu et al., 1997; Yang, Frindt, & Palmer, 2010) อย่างเช่นในการศึกษาก่อนหน้านี้ได้ทำการศึกษาโดยการยับยั้ง ROMK แล้วพบว่ามีการ ควบคุมสมดุลของแมกนีเซียม และเมื่อทำการยับยั้งโดยใช้ Aldosterone หรือ epithelial Na^+ channel (Caspi et al.) ทำให้ลดการสูญเสียหรือการขับแมกนีเซียมทิ้งได้ (Ellison, 2009) นอกจากนี้แล้ว ใน DCT ยังพบว่ามี การแสดงออกของ CNNM2 (de Baaij et al., 2012) ซึ่งทำหน้าที่เป็น Mg^{2+} transporter ที่ส่วนของ basolateral membrane โดยกระบวนการทำงานนั้นต้อง อาศัยการทำงานร่วมกับ PRL ซึ่งสามารถจับกับส่วนของ CBS domain บน CNNM2 ได้อีกด้วย (Goytain & Quamme, 2005a; Stuver et al., 2011) แต่อย่างไรก็ตามกระบวนการรักษาสมดุลของ แมกนีเซียมก็ยังคงต้องทำการศึกษาค้นคว้าต่อไปในอนาคตเนื่องจากยังไม่ทราบกลไกที่แน่นอน ทั้งหมด



ภาพที่ 8 แสดงการรักษาสมดุลของแมกนีเซียมในไตที่บริเวณส่วนต่างๆ (de Baaij et al., 2015)

ยากลุ่ม Proton Pump Inhibitor ต่อการดูดซึมแมกนีเซียมในลำไส้ (PPIs suppressed Intestinal Mg²⁺ absorption)

ยากลุ่ม Proton Pump Inhibitors (PPIs) ตามที่กล่าวไปข้างต้น เป็นยาที่มักใช้อย่างแพร่หลาย ในการรักษาอาการที่เกี่ยวข้องต่อการหลังกรดเกินในกระเพาะอาหาร โดยผู้ป่วยที่จำเป็นต้องรับยาชนิดนี้ มีความจำเป็นที่จะต้องใช้ติดต่อกันเป็นระยะเวลานาน ในขณะที่เดียวกันเมื่อใช้เป็นระยะเวลานาน จะทำให้เกิดผลข้างเคียงหลายอย่างตามมา โดยเฉพาะทำให้เกิดภาวะแมกนีเซียมในเลือดต่ำ (hypomagnesemia) เนื่องจากการดูดซึมแมกนีเซียมในลำไส้ โดยผลข้างเคียงนี้ได้ถูกค้นพบครั้งแรกปี 2006 (Epstein, McGrath, & Law, 2006) ในผู้ป่วยที่มีภาวะพร่องพาราไทรอยด์และแมกนีเซียมต่ำจากการใช้ยา PPIs จากผลการศึกษาบ่งชี้ว่า เมื่อหยุดใช้ยากลุ่ม PPIs สามารถทำให้ระดับแมกนีเซียมในเลือด และ แมกนีเซียมในปัสสาวะกลับสู่ภาวะปกติได้ ในขณะที่เมื่อผู้ป่วยกลับมาได้รับยา PPIs เป็นระยะเวลานานอีกครั้ง จะทำให้ระดับแมกนีเซียมในเลือดและแมกนีเซียมในปัสสาวะลดลงต่ำกว่าระดับปกติ จากนั้นจึงมีการศึกษาหลายการศึกษาที่บ่งชี้ว่า ยา PPIs มีผลข้างเคียงในการทำให้เกิดภาวะ hypomagnesemia หากใช้ติดต่อกันเป็นระยะเวลานาน (Cundy & Mackay, 2011) โดยการเกิดภาวะ hypomagnesemia จากการได้รับยากลุ่ม PPIs เป็นระยะเวลานานนั้น สามารถเกิดได้จากการดูดซึมแมกนีเซียมในลำไส้ หรือลดการดูดกลับทางไต แต่ทั้งนี้เนื่องจากแมกนีเซียมโดยปกติจะได้รับผ่านทางรับประทานอาหารเท่านั้น จึงทำให้กระบวนการดูดซึมแมกนีเซียมในลำไส้จึงมีความจำเป็น หากการดูดซึมแมกนีเซียมในลำไส้ถูกรบกวน จะส่งผลให้ระดับแมกนีเซียมในเลือดลดลง นำไปสู่ภาวะ hypomagnesemia (Perazella, 2013) ยืนยันได้จากการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Rondon, Groenesteghe, Rayssiguier, and Mazur (2008) ที่ได้ทำการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างระดับแมกนีเซียมที่ลดลงและการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องต่อการดูดซึมแมกนีเซียม คือ TRPM6 ในไตและลำไส้ใหญ่ของหนู C57BL/6J mice พบว่าในภาวะแมกนีเซียมต่ำหรือพร่องแมกนีเซียม มีการแสดงออกของโปรตีน TRPM6 และ TRPM6/7 เพิ่มขึ้นทั้งในไตและในลำไส้ใหญ่ นอกจากนี้ในการศึกษาของ Bai, Hausman, Lionberger, and Zhang (2012) บ่งชี้ว่า การดูดซึมแมกนีเซียมในลำไส้ ผ่านกลไก paracellular transport นั้น ไม่มีการเปลี่ยนแปลง ในขณะที่ในการดูดซึมแมกนีเซียมในลำไส้ผ่านกลไก active transcellular transport โดยใช้ TRPM6/7 Channels นั้นลดลง เมื่ออ้างอิงการศึกษาดูดซึมแมกนีเซียมในผู้ป่วยที่มีภาวะ hypomagnesemia จากการได้รับยากลุ่ม PPIs เทียบกับผู้ป่วยที่มีสุขภาพดีและไม่ได้รับยา โดยไม่มีความเกี่ยวข้องกับการขับออกทางไต บ่งชี้ว่า ยากลุ่ม PPIs

เหนี่ยวนำให้เกิดภาวะ hypomagnesemia โดยการลดการดูดซึมแมกนีเซียมในลำไส้ ในขณะที่การตอบสนองในการเพิ่มการดูดกลับแมกนีเซียมในไตนั้นเป็นการรักษาแมกนีเซียมในร่างกายไว้ ยืนยันได้ว่า การดูดซึมแมกนีเซียมแบบ active transcellular transport จะต้องอาศัยโปรตีน TRPM6 ในการดูดซึมแมกนีเซียมในลำไส้ โดยทำงานร่วมกันแบบ TRPM6/7 Heterodimer โดยการทำงานร่วมกันนี้จะทำให้ TRPM6 เกิดการดูดซึมแมกนีเซียมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ของลำไส้ได้ (Chubanov et al., 2004; Nadler et al., 2001; Runnels, Yue, & Clapham, 2001; Schlingmann, Waldegger, Konrad, Chubanov, & Gudermann, 2007; Schmitz et al., 2005) โดยพบว่าหาก TRPM6 เกิดความผิดปกติ จะสามารถเปลี่ยนแปลงระดับแมกนีเซียมได้ (Schlingmann et al., 2002) นอกจากนี้ จากการศึกษาของ Serfaty-Lacrosniere et al. (1995) ที่ทำการศึกษาค้นคว้าผลของการใช้ยาในกลุ่ม PPIs ต่อการดูดซึมแมกนีเซียมและแร่ธาตุอื่นๆ ในภาวะที่กรดในกระเพาะอาหารต่ำกว่าปกติ (hypochlorhydria) โดยทำการศึกษาในอาสาสมัครสุขภาพดี ซึ่งจะได้รับยา Omeprazole 40 mg /วัน ติดต่อกันเป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์ พร้อมกับกำหนดยาอาหารของอาสาสมัครไปด้วย พบว่า มีการลดลงของการดูดซึมแมกนีเซียมในอาสาสมัครที่ได้รับยา Omeprazole เทียบกับกลุ่มควบคุม ในการศึกษาของ Behar (1974) และ Bai et al. (2012) ที่ทำการศึกษาค้นคว้าการดูดซึมแมกนีเซียมในลำไส้ในส่วนต่างๆ บ่งชี้ไปในทางทิศทางเดียวกัน คือ การดูดซึมแมกนีเซียมนั้นเกิดขึ้นในลำไส้ส่วนปลาย โดยพบว่า การให้ยา PPIs สามารถลดการทำงานของโปรตีน TRPM6/7 ในลำไส้ส่วน jejunum และ ileum ได้ ตรงกันข้ามกับการศึกษาของ Thongon et al. (2016) ที่ทำการศึกษาค้นคว้าผลของยาในกลุ่ม PPIs ต่อการลดการดูดซึมแมกนีเซียมในลำไส้เล็กของหนูขาวสายพันธุ์ Sprague-Dawley เพศผู้ อายุ 9 สัปดาห์ โดยการฉีด Omeprazole ขนาด 20 mg/kg เป็นเวลานาน 4 และ 24 สัปดาห์ (PPIH rats model) โดยศึกษาการระดับแมกนีเซียมในเลือด การขับแมกนีเซียมออกทั้งในปัสสาวะและอุจจาระ ศึกษาการสะสมแมกนีเซียมในกระดูกและกล้ามเนื้อ ศึกษาการหลัง HCO_3^- ค่า pH ในกระเพาะอาหารและลำไส้ส่วน duodenum และดูการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องต่อการศึกษาแมกนีเซียม ได้แก่ TRPM6, cyclin M4 (CNNM4), Clcn 2, 7, 12, และ 15 ในหนู PPIH rats model จากการศึกษาพบว่า ในกลุ่มหนูขาวที่ได้รับยา Omeprazole มีค่า pH เพิ่มขึ้น โดยเฉพาะในกลุ่มที่ได้รับยา Omeprazole และเมื่อทำการศึกษาค้นคว้าความเข้มข้นของแมกนีเซียมในกระแสเลือดพบว่า แมกนีเซียมมีการลดลงในกลุ่มที่ได้รับยา Omeprazole ส่งผลให้การขับแมกนีเซียมทางปัสสาวะมีการลดลง เช่นเดียวกับการสะสมที่กระดูกและกล้ามเนื้อที่ลดลง นอกจากนี้เมื่อทำการศึกษาค้นคว้าการดูดซึมแมกนีเซียม โดยศึกษาทั้งกลไกการดูดซึมแบบ Active transport และ paracellular transport

พบว่ามีการดูดซึมแมกนีเซียมลดลง ของทั้ง 2 กลไก ในกลุ่มหนูขาวที่ได้รับยา Omeprazole นาน 12 และ 24 สัปดาห์ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ในขณะที่ในการศึกษาการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องต่อการดูดซึมแมกนีเซียมทั้งในกลไกการดูดซึมแบบ Active transport และ paracellular transport ซึ่งได้แก่ TRPM6, cyclin M4 (CNNM4) , Cldn 2, 7, 12, และ 15 ในลำไส้ส่วน duodenum กลับพบว่า มีการแสดงออกของโปรตีนเพิ่มมากขึ้นในกลุ่มของหนูที่ได้รับยา Omeprazole (PPIH rats) และเมื่อทำการศึกษาระดับ HCO_3^- พบว่าในกลุ่มของหนูขาวที่ได้รับยา Omeprazole มีการหลั่ง HCO_3^- เพิ่มขึ้นในลำไส้ ซึ่งการหลั่ง HCO_3^- นี้เป็นผลมาจากการได้รับยา Omeprazole (Mertz-Nielsen, Hillingso, Bukhave, & Rask-Madsen, 1996) และส่งผลให้การขนส่งแมกนีเซียมลดลง ยืนยันได้จากการศึกษาของ Thongon, Ketkeaw, and Nuekchob (2014) ที่ได้ศึกษาการแสดงออกของ HCO_3^- ต่อการดูดซึมแมกนีเซียมใน เซลล์ Caco-2 monolayer แล้วพบว่ามีการหลั่งของ HCO_3^- เพิ่มมากขึ้น ส่งผลให้การดูดซึมแมกนีเซียมลดลงด้วย ซึ่งเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับการศึกษาของ Suksridechacin et al. (2020) ที่ทำการศึกษผลของยา Omeprazole ต่อการดูดซึมแมกนีเซียมในลำไส้เล็กของหนูขาวสายพันธุ์ Sprague-Dawley เพศผู้ อายุ 9 สัปดาห์ ด้วยการฉีด Omeprazole ขนาด 20 mg/kg เป็นเวลานาน 12 และ 24 สัปดาห์ (PPIH rats model) โดยมีการศึกษาค้นคว้าเกี่ยวกับการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Thongon et al. (2016) คือศึกษาการดูดซึมแมกนีเซียมในลำไส้เล็กทั้ง 4 ส่วน พบว่า ยา Omeprazole กดการดูดซึมในลำไส้ duodenum, jejunum, ileum และ colon โดยคำนวณเป็นร้อยละได้ดังนี้ คือ 81.86%, 70.59%, 69.45% และ 39.25% ตามลำดับ และเมื่อทำการศึกษาระดับแมกนีเซียมในเลือดพบว่าการลดลง เช่นเดียวกันกับการขนส่งแมกนีเซียมที่ลดลง ในลำไส้ทั้ง 4 ส่วนของหนูขาวที่ได้รับยา Omeprazole ทั้ง 2 กลุ่ม ทั้งในกลไกแบบ Active Transcellular transport และแบบ Paracellular transport ในขณะเดียวกันเมื่อทำการศึกษาการแสดงออกของโปรตีน TRPM6 และ CNNM4 โดยผลการศึกษานี้ให้ผลคล้ายกับการศึกษาของงานวิจัยก่อนหน้าของ Thongon et al. (2016) ที่พบการแสดงออกของโปรตีนเพิ่มมากขึ้นในขณะที่การดูดซึมแมกนีเซียมในลำไส้ลดลง ส่งผลให้ระดับแมกนีเซียมในเลือดลดลงไปด้วย นอกจากการได้รับยา PPIs จะเหนี่ยวนำให้เกิด hypomagnesemia จากการกีดการดูดซึมแมกนีเซียมในลำไส้ จากการศึกษาของ Gommers et al. (2019) ที่ได้ทำการศึกษาความเกี่ยวข้องของจุลินทรีย์ในลำไส้ต่อการส่งเสริมภาวะแมกนีเซียมในเลือดต่ำจากการเหนี่ยวนำโดยยากลุ่ม PPIs โดยทำการศึกษาในหนู C57BL/6J mice ในภาวะที่ได้รับแมกนีเซียมปกติ และภาวะพร่องแมกนีเซียมร่วมกับการได้รับยา Omeprazole 20 mg/kg นาน 4 สัปดาห์ พบว่ากลุ่มหนูที่ได้รับยา Omeprazole มี

ระดับแมกนีเซียมในเลือดลดลง และ จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกยีนส์ของ TRPM6 ในลำไส้ส่วน Colon และ ไต กลับพบว่า ไม่มีการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนส์ TRPM6 ในลำไส้ส่วน Colon และไต เช่นเดียวกับการศึกษาผลของ PPIs ต่อการทำลายเนื้อเยื่อส่วน Colon ที่พบว่า PPIs ไม่ส่งผลในการทำลายเนื้อเยื่อของลำไส้ส่วน Colon แต่กลับมีผลลดความหลากหลายของจุลินทรีย์ในลำไส้ ซึ่งส่งผลต่อ Mucus formation และความสามารถในการเลือกผ่านของ Tight junction ซึ่งส่งผลต่อการดูดซึมแมกนีเซียม ตรงกันข้ามกับ Thongon et al. (2016) ที่พบว่า การได้รับยา Omeprazole เป็นระยะเวลานาน สามารถเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเนื้อเยื่อโดยเกิด Villi หรือ Crypt hyperplasia ของลำไส้ส่วน duodenum ซึ่งนำไปสู่การดูดซึมแมกนีเซียมที่ลดลงได้

การย้ายถิ่นฐานของโปรตีนจากในเซลล์สู่เยื่อหุ้มเซลล์

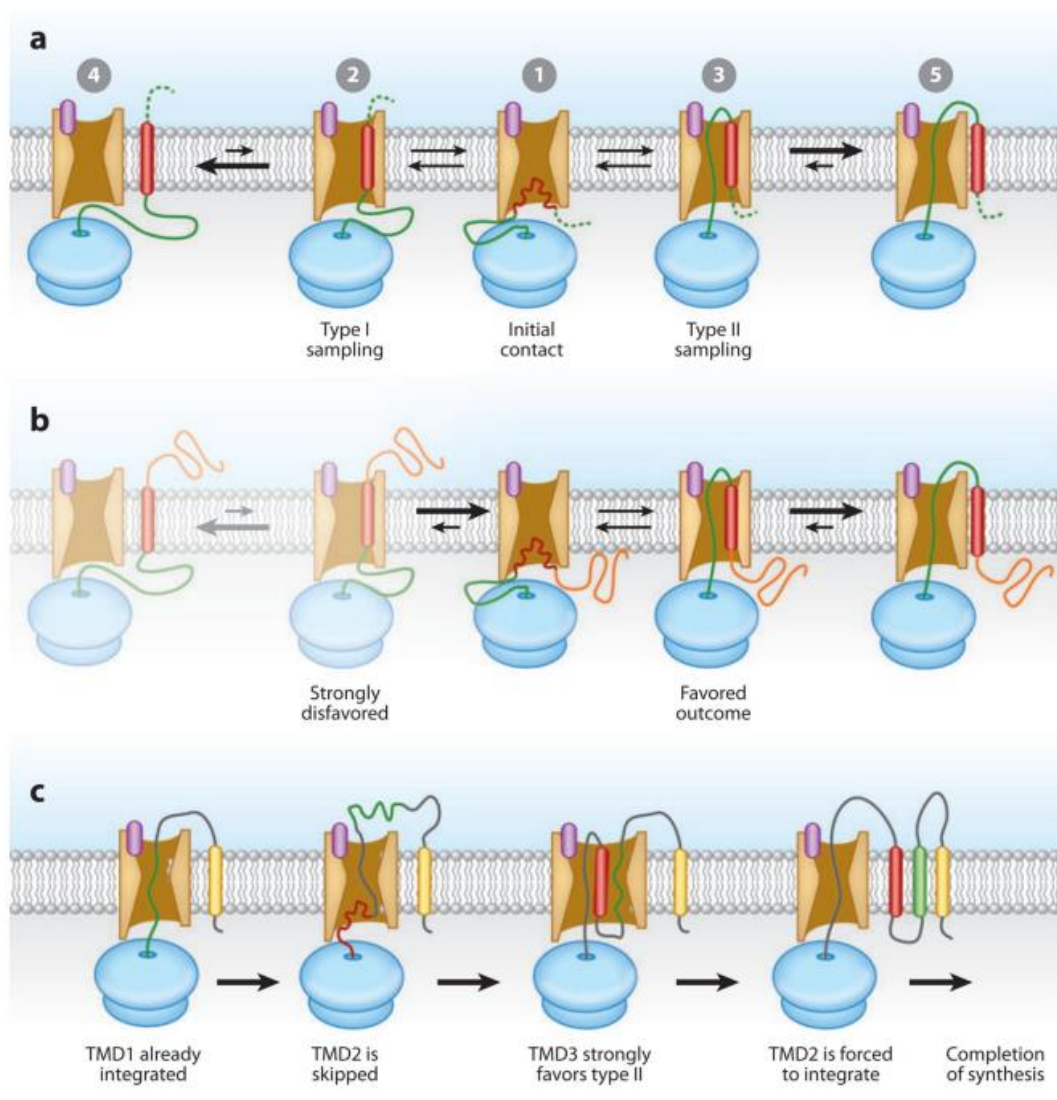
Integral membrane proteins (IMPs) เป็นโปรตีนสำคัญ ที่มีผลต่อการทำงานของเซลล์ในกระบวนการต่าง ๆ เช่น signaling receptors, intracellular trafficking, การแพร่ของ organelle และขนส่งโมเลกุลต่าง ๆ ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ โดยเป็นโปรตีนที่มีในเซลล์ มากถึง 30% โดยส่วนมากจะเป็น plasma membrane และส่วนประกอบของ intracellular ซึ่ง IMPs จะเริ่มสร้างขึ้นใน endoplasmic reticulum (ER) จากนั้นจึงจะสามารถขึ้นไปอยู่บน membrane ทำหน้าที่ในรูปแบบ Transmembrane domain (TMDs) โดยอยู่ในรูปแบบ tertiary และ quaternary structures ได้ (Alder & Johnson, 2004) โดย TRPM6 TRPM7 และ CNNM4 ก็จัดเป็นหนึ่งใน Integral membrane proteins (IMPs) ที่เป็น Transmembrane protein ซึ่งการแทรกตัวขึ้นไปอยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์ของ IMPs นั้น จะต้องอาศัยการทำงานร่วมกันของ translocon ในที่นี้จะกล่าวถึงในเซลล์ eukaryote ได้แก่ Sec61 ที่สามารถพบได้ใน ER ของเซลล์ eukaryote โดยการศึกษาการย้ายถิ่นฐานของโปรตีนส่วนใหญ่จะทำการศึกษาใน ER

การจดจำและกำหนดเป้าหมาย (Recognition และ Targeting)

IMP targeting อันดับแรก ๆ จะเป็นองค์ประกอบที่เป็น hydrophobic domain แม้ว่าจะเป็นสาย N-terminal sequence หรือ TMD ก็จะถูกแปลด้วย ribosome ก่อนเสมอ เพราะ hydrophobic domain จะถูก recognized โดย signal recognition particle (Grudnik, Bange, & Sinning) บน ribosome ก่อนจะเข้าสู่ ER ผ่าน interaction กับ SRP receptor (SR) จากนั้นเปลี่ยนถ่ายสู่ Sec61 translocon ใน GTPase-dependent step ในการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า SRP 54-kDa (SRP54) อยู่บริเวณ ribosome tunnel และจับกับ hydrophobic substrate ผ่าน Membrane domain ในขณะที่ Alu-domain ของ SRP จับอยู่กับ factor binding site บน ribosome เพื่อให้เกิดการ translocation อย่างช้า ๆ และเมื่อมีการจับกันของ SRP กับ SR จะทำให้เกิด SRP-ribosome complex จากนั้นจะออกมาอยู่ในด้าน ribosome tunnel เพื่อจับกับ Sec61 เมื่อ Sec61 จับกับ Ribosome บนด้าน tunnels แล้ว nascent chain จะถูก Translocation จาก SRP ไปยัง Sec61 จากนั้น SRP-SR complex จะเกิดการ disassemble และหยุดการแปลรหัสชั่วคราว โดยการเกิดกลไกทั้งหมดนี้จะต้องอาศัยการกระตุ้นการทำงาน GTPase ของ SRP54 ร่วมกับ α และ β subunits ของ SR ต่อมา TMD จะออกไปสู่ ribosomal tunnel เข้าสู่ cytosolic vestibule ของ Sec61 และจับกันอย่างเสถียร (Goder, Junne, & Spiess, 2004) โดยการจับกันนี้จะมี 2 กลไก คือ type I configuration คือ สาย polypeptide จะไปอยู่ข้าง ๆ cytosolic vestibule และ/หรือ ม้วนออก ระหว่าง ribosome และ translocon ส่วน type II

configuration downstream polypeptide จะอยู่ข้าง ๆ Sec61 channel โดยที่ secondary structure ของ TMD ระหว่างการเกิด sampling ประกอบไปด้วย amino acid และส่วนที่ไม่ชอบน้ำ นอกจากนี้ TMD เป็น α -helix และอยู่บริเวณ lateral gate ซึ่งมีไขมันล้อมรอบและอยู่นอก channel (Hessa et al., 2007) และ TMD ยังสร้างการจับกันระหว่างโปรตีน (protein-protein interactions) กับ Sec61 channel โดยการศึกษาก่อนหน้านี้ พบว่า TMDs สามารถเกิดการ cross-link กับ Sec61 α กับ TRAM และ/หรือ lipids ได้ (Sadlish, Pitonzo, Johnson, & Skach, 2005) และยังสามารถสร้าง membrane-bound ribosome ทำให้สามารถจับกับ ribosome, Sec61 complex และ accessory factors ดังแสดงในภาพที่ 9a ในรูปแบบการแทรกเข้าสู่เยื่อหุ้มเซลล์แบบปกติรูปแบบหนึ่งคือ Single-Spanning Membrane Proteins ซึ่งเหมาะสำหรับ IMPs ที่ประกอบด้วย N terminus ของ TMD แค่ ~40 residues (Higy, Junne, & Spiess, 2004) หรือกล่าวได้ว่า มี N-terminal domain สั้นมาก และไม่สามารถเกิดการ sampling โดย TMD ได้ ดังนั้น type II จึงต้องมีการปรับตัว N-terminal domain คือ cytosolic ในขณะที่การ sampling ของ type I ในการแทรกตัวของ N-terminal domain เพื่อ translocate ผ่าน หรืออยู่ข้าง ๆ Sec61 channel โดยที่การ Integration ของ TMD เกิดขึ้นที่ membrane จับ ribosome แต่เนื่องจากความยาวของสาย N-terminus การ sampling ของ type I ในการดึงสาย N-terminus เข้าสู่ Sec61 channel ที่แคบนั้นเป็นไปได้ยาก ดังนั้นการ sampling ของ type II จึงเกิดขึ้นได้มากกว่า แต่อย่างไรก็ตามความยาว ของ N-terminal domain ที่ยาว 50–60 residues ที่สามารถเกิด type I topology สามารถพบเจอได้ในโปรตีนบางชนิด เพื่อให้สามารถเกิดการ sampling ของ type I ได้ N-terminal domain ที่เป็นสายยาว จะถูกตัด N-terminal signal sequence ก่อนเริ่มกระบวนการ translocation เพื่อกลายเป็น Transmembrane protein จากนั้น N terminus ของ TMD จะอยู่ใน lumen และต่อมา TMD จะ ออกจาก ribosome และเกิดตามกระบวนการดังที่กล่าวไว้ข้างต้น แต่การเกิด type II topology นั้นยุ่งยากกว่ามาก เนื่องจาก N terminus ที่ผ่านการ translocation แล้ว จะต้องกลับไปผ่าน Sec61 channel อีกครั้ง ในขณะที่ type I topology ไม่ต้องการขั้นตอนนี้ ดังแสดงในภาพที่ 9b ดังนั้นจะสังเกตได้ว่า การสอดแทรกขึ้นสู่เยื่อหุ้มเซลล์จะมีปัจจัยต่างๆที่เข้ามามีส่วนในการกำหนดกลไกการเกิดกระบวนการ ได้แก่ ความไม่ชอบน้ำ hydrophobicity ประจุ และความยาวของ N-terminal domain ตัวอย่างเช่น type II IMP ที่มี N-terminal domain เป็นสายยาว นั้นเป็นไปได้ยากอย่างมาก ดังนั้นการเกิด TMD ก็ต้องอาศัยส่วนประกอบสำคัญเหล่านี้ด้วยเช่นกัน จึงอาจทำให้เกิดรูปแบบการแทรกแบบ Polytopic Membrane Proteins ของ IMP insertion โดยการแทรกในรูปแบบนี้มีความชัดเจนและต้องอาศัยองค์ประกอบของ TMD ที่มีความเพียงพอที่จะ

ขับเคลื่อนทั้งการ translocon recognition และ membrane insertion เนื่องจาก TMDs ใน Polytopic IMP อาจมีการเปลี่ยนทิศทางการแทรกบนเยื่อหุ้มเซลล์เนื่องจากประจุที่ไม่สมมาตรกัน นอกจากนี้จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า ความหลากหลายในการเกิดการแทรกของโปรตีนบนเยื่อหุ้มเซลล์ใน eukaryote นั้นมีความหลากหลายน้อยกว่า prokaryote แต่กลับมี IMP ที่มีความหลากหลายและซับซ้อนมากกว่า (Enquist et al., 2009) ซึ่งเป็นผลมาจากการเอาชนะข้อจำกัดทางกายภาพของการเกิด TMD โดยสามารถเกิดกระบวนการแทรกได้ดังตัวอย่างในกระบวนการดังต่อไปนี้ คือ TMD2 ของ polytopic IMP มีส่วน hydrophobic น้อย และไม่สามารถเกิดการ TMD recognition ได้ ดังนั้นแทนที่จะใส่และแทรกส่วนนี้เข้าสู่เยื่อหุ้มเซลล์ ก็นำส่วน polypeptide นี้ย้ายไปยัง ER lumen แทนตามมาด้วย TMD3 ซึ่งประกอบด้วย hydrophobic ที่มีมากพอสำหรับการเกิด membrane insertion โดยที่ TMD3 จะเข้าสู่ translocon โดยนำส่วนประกอบต่าง ๆ แทรกไว้ในบริเวณข้างๆของเยื่อหุ้มเซลล์ เมื่อ TMD3 แทรกเข้าไปได้สำเร็จแล้ว TMD1 ก็จะพร้อมสำหรับกระบวนการแทรกเป็นลำดับถัดมา โดยเยื่อหุ้มเซลล์จะถูกขยายออก ซึ่งกระบวนการเหล่านี้จะใช้เวลานานมากกว่า การเกิดการแทรกของ TMD2 ดังนั้น กระบวนการเกิด TMDs insertion สามารถเกิดแบบไม่เรียงลำดับได้ โดยขั้นตอนบางขั้นตอน และส่วนประกอบบางส่วนจะถูกพักใน ER lumen หรือ cytosol ชั่วคราว (Junne, Schwede, Goder, & Spiess, 2006) ดังแสดงในภาพที่ 9c แต่ในขณะเดียวกันขั้นตอนต่างๆ ก็อาจเปลี่ยนไปตามความเหมาะสม เช่น แทนที่จะข้ามขั้นตอนแบบไม่เรียงลำดับ TMD อาจถูกเก็บไว้ชั่วคราวที่ใกล้กับบริเวณที่เกิด integration ทำให้ส่วนประกอบของ TMD ไม่จำเป็นต้องเข้าสู่เยื่อหุ้มเซลล์ทั้งหมด โดยอาจจะถูกกักไว้โดยโปรตีนเสริมหรือ Sec61 และเกิดการแทรกเข้าสู่เยื่อหุ้มเซลล์ตามกระบวนการปกติ หรืออาจจะปรับกลไกและขั้นตอนกระบวนการดังกล่าวตามความเหมาะสม (Kauko et al., 2010)



ภาพที่ 9 ภาพแสดงการเกิด Protein insertion รูปแบบต่างๆ

(Shao & Hegde, 2011)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 ประชากร

เยื่อบุลำไส้ของหนูเพศผู้อายุ 9 สัปดาห์ สายพันธุ์ Sprague Dawley

3.2 กลุ่มตัวอย่างและสุ่มตัวอย่าง

กลุ่มการทดลองแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่

1. กลุ่มควบคุม คือ กลุ่มหนูที่ไม่ได้รับ Omeprazole
2. กลุ่มทดสอบที่ 1 คือ กลุ่มหนูที่ได้รับ Omeprazole ขนาด 20 mg/kg เป็นระยะเวลานาน 12 สัปดาห์
3. กลุ่มทดสอบที่ 2 คือ กลุ่มหนูที่ได้รับ Omeprazole ขนาด 20 mg/kg เป็นระยะเวลานาน 24 สัปดาห์

3.3 การเก็บรวบรวมข้อมูล

โปรตีน

โปรตีนที่ใช้ในการศึกษาในครั้งนี้มาจากการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Suksridechacin et al. (2020) ซึ่งได้ทำการศึกษาฤทธิ์ของยา Omeprazole ต่อการลดระดับแมกนีเซียมในเลือดและการดูดซึมของแมกนีเซียมในลำไส้เล็กส่วน duodenum ของหนูสายพันธุ์ Sprague-Dawley เพศผู้ อายุ 9 สัปดาห์ น้ำหนัก 250-350 กรัม โดยแบ่งเป็น กลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ได้รับยา Omeprazole เป็นระยะเวลานานคือ 12 สัปดาห์ และ 24 สัปดาห์ จากนั้นจะถูกรักษาเพื่อทำการศึกษาระดับแมกนีเซียมในเลือดและการดูดซึมแมกนีเซียมในลำไส้เล็กส่วน duodenum ซึ่งนอกจากทำการศึกษาข้างต้นแล้ว ได้มีการศึกษาการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการดูดซึมแมกนีเซียม โดยทำการเก็บโปรตีนจากลำไส้ของหนู 4 ส่วน คือ duodenum, jejunum, ileum และ colon ด้วยการใช้การเก็บเนื้อเยื่อบุผนังลำไส้ โดยเริ่มจากการนำลำไส้ส่วนต่างๆ ล้างด้วยน้ำเกลือ จากนั้นทำการผ่าตัดลำไส้ให้แผ่ออก ล้างด้วยน้ำเกลืออีกครั้ง จากนั้นวางลงบนถาดทดลองโดยด้าน apical อยู่ด้านบน หยดด้วย RIPA buffer แล้วใช้ Slide ทำการดูดเนื้อเยื่อบุผนังลำไส้ จากนั้นทำการดูดเก็บเนื้อเยื่อที่ได้ใส่หลอดทดลอง Eppendorf แล้วนำไปเก็บที่ -20 °C โดยกระบวนการทั้งหมดได้ผ่านการพิจารณาทางจริยธรรมในการใช้สัตว์ทดลองในงานวิจัย มหาวิทยาลัยบูรพา

การสกัดโปรตีน (Protein Extraction)

โปรตีนที่ได้จากการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Suksridechacin et al. (2020) ถูกละลาย จากนั้นเติม protease inhibitor (10 mg/ml) กับ RIPA buffer (10%) นำไปผ่านกระบวนการ Sonication ด้วยเครื่อง sonicator ที่ความแรง 100% amplitude เป็นเวลา 1 นาที นำมาปั่นตกด้วยเครื่อง centrifuge ที่ 12,000 g เป็นเวลา 15 นาที แล้วดูดเก็บ supernatant ในหลอดทดลอง Eppendorf ซึ่ง supernatant ในส่วนแรกนี้คือโปรตีนในส่วนของ cytosol protein จากนั้น pellet จะถูกนำมา sonicated และปั่นตกอีกครั้งที่ 12,000 g เป็นเวลา 15 นาที เมื่อทำการดูดเก็บ supernatant ในส่วนนี้ จะเป็น membranous และ transmembrane protein โดยวิธีการที่กล่าวมาข้างต้นได้ปรับวิธีการมาจาก Xi, Shen, and Clemmons (2008) และ Walker (2009) จากนั้นนำไปเก็บที่ -20°C เพื่อนำไปใช้สำหรับขั้นตอนต่อไป

การศึกษากการแสดงออกของโปรตีน (Protein Expression)

โปรตีนที่ได้จากขั้นตอนการสกัดโปรตีน ถูกวัดความเข้มข้นโดยใช้วิธีการ Bradford assay และการวัดค่าดูดกลืนแสง (OD measurement) จากนั้นนำมาคำนวณความเข้มข้นโปรตีนโดยใช้กราฟเทียบความเข้มข้นแบบมาตรฐานที่สร้างโดยการใช้โปรตีน BSA เพื่อนำไปใช้ในกระบวนการเตรียมตัวอย่างโปรตีนสำหรับกระบวนการ Gel Electrophoresis โดยเริ่มจากเตรียมโปรตีนสำหรับ Loading ที่ 40 ไมโครกรัม จากนั้นนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 5 นาที โดยเจล SDS-PAGE จะถูกเตรียมโดยใช้เปอร์เซ็นต์ของเจลตามตารางที่ 1 เพื่อแยกโปรตีนตามขนาด

ตารางที่ 1 แสดงขนาดของโปรตีนและเปอร์เซ็นต์ของเจล SDS-PAGE ที่เหมาะสม

โปรตีน (น้ำหนักโมเลกุล)	% Gel SDS-PAGE
TRPM 6 (234 KDa)	10 %
TRPM 7 (210 KDa)	10 %
CNNM4 (86 KDa)	12%

เมื่อโปรตีนถูกแยกตามขนาดโดย SDS-PAGE ต่อมาจะถูกนำมาใช้ในกระบวนการ Western Blot โดยเริ่มจากการ Transfer โปรตีนไปยังแผ่น membrane ซึ่งโปรตีน TRPM6 TRPM7 และ CNNM4 นั้นจะใช้ Nitrocellulose membrane จากนั้น Membrane จะถูกยับยั้ง non-specific protein ด้วย skim milk เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง ทำการล้างด้วย TBS-T 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที จากนั้น

membrane จะถูกป้อมด้วย primary antibody ต่อโปรตีน TRPM6, TRPM7 และ CNNM4 ด้วยอัตราส่วน 1:1000 ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปป้อมกับ HRP-conjugated secondary antibody ในอัตราส่วนที่ 1:10,000 ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทำการล้างด้วย TBS-T 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที ก่อนนำไปแสดงผลด้วยการตรวจจับสัญญาณ (Detection) โดยใช้ Enhance Chemiluminescent detection substrate (ECL) จับภาพด้วย GelDoc (BioRad) จากนั้นนำไปวิเคราะห์ความเข้มข้นของแถบโปรตีน(densitometric analysis) ด้วยโปรแกรม Image J

นอกจากนี้เทคนิคการ Strip membrane จะถูกใช้ในการตรวจสอบความน่าเชื่อถือของการแสดงออกของโปรตีน TRPM6, TRPM7 และโปรตีน CNNM4 โดยการ Re-probe membrane ด้วย Strip buffer ล้างด้วย TBS-T 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที จากนั้นยับยั้ง non-specific protein ด้วย skim milk เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง ทำการล้างด้วย TBS-T 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที ยับยั้ง non-specific protein ด้วย skim milk เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง ทำการล้างด้วย TBS-T 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที จากนั้นป้อมด้วย primary antibody ที่แตกต่างกันบน membrane อีกครั้ง

การแยกเก็บโปรตีนด้วยเทคนิค Immunoprecipitation (Protein Separation by Immunoprecipitation)

กระบวนการนี้สามารถแยกโปรตีนเพื่อให้มีความบริสุทธิ์ และมีความจำเพาะมากยิ่งขึ้น โดยใช้ชุด Immunoprecipitation kit (Abcam) โดยมีขั้นตอนดังนี้

1. Antibody binding เป็นขั้นตอนที่นำ Antibody จับกับโปรตีนในหลอดตัวอย่างการทดลอง โดยทำการเตรียมตัวอย่างตามปริมาตรที่ต้องการ ใช้อัตราส่วน Antibody ต่อปริมาตรของตัวอย่าง 1: 500 นำไปป้อมบน Rotator นาน 3-4 ชั่วโมงหรือข้ามคืน ที่ 4 °C เรียกหลอดทดลองนี้ว่า Antibody-antigen tag

2. preparing A/G Sepharose bead นำ Bead ใส่ในแต่ละหลอดทดลอง 25 ไมโครลิตร (ปริมาตรนี้สามารถจับกับโปรตีนมากถึง 500 ไมโครกรัม) จากนั้นถูกล้างด้วย 1X wash buffer 1 มิลลิลิตร ปั่นที่ 2000 x g นาน 2 นาที ที่ 4 °C ดูด Supernatant ทิ้ง ทำซ้ำ 2 ครั้ง ล้างด้วย 1X wash buffer ประมาณ 50% ของ Bead หรือประมาณ 12.5 ไมโครลิตร

3. Bead capture นำ bead มาทำการผสม หรือ Capture กับหลอดทดลองที่เป็น Antibody-antigen tag เรียกหลอดทดลองนี้ว่า Complex เพื่อให้ง่ายต่อการ capture และผสม สารที่เป็น Antibody-antigen tag จะถูกดูดใส่ในหลอดทดลองที่เป็น Bead เพื่อลดความเสียหายระหว่างการดูด Bead ด้วยการ pipett จากนั้นจะทำการผสมด้วยการใช้ micropipette ดูดขึ้นลง โดยที่ปลาย tips ที่ใช้

จะต้องทำการตัดปลายออกเล็กน้อย เพื่อลดการทำลาย Bead ระหว่างผสม และยังช่วยให้ Bead ไม่ติดข้างหลอดทดลอง จากนั้น นำหลอดทดลองที่ทำการผสมแล้ว บ่มที่ 4 °C นาน 1 ชั่วโมง นำไปปั่นที่ 2000 x g ที่ 4 °C นาน 2 นาที คูด Supernatant ที่ล้าง Bead ด้วย 1X wash buffer 1 มิลลิลิตร ปั่นที่ 2000 x g นาน 2 นาที ที่ 4 °C คูด Supernatant ที่ล้าง ทำซ้ำ 3 ครั้ง โดยที่การล้างในรอบสุดท้าย ต้องคูด Supernatant ออกให้ได้มากที่สุด แต่ต้องระวังไม่ให้ Bead แห้ง

4. Elution นำหลอดทดลองที่ได้จากขั้นตอนก่อนหน้า มาทำการชะล้าง เพื่อให้โปรตีนที่จับกับ Antibody และ Bead หลุดออกมา โดยใช้สารชะล้างที่ต้องการ โดยงานวิจัยนี้ใช้ Glycine-Tris elution buffer เนื่องจากสามารถนำโปรตีนที่อยู่ใน buffer ชนิดนี้ ผ่าน Mass spectrometry ได้ โดยไม่รบกวนกระบวนการแยกสาย fragment ของ peptide โดยเริ่มจากนำหลอดทดลองที่เป็น Complex เติม 0.1M Glycine buffer pH 2.3 (0.1M Glycine, 0.02M HCl, DW H₂O) 50 ไมโครลิตร ผสมเบาๆ ด้วย pipette จากนั้นนำบ่มบน Rotator นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง นำไปปั่นที่ 2000 x g นาน 2 นาที ที่ 4 °C เก็บ Supernatant หรือที่เรียกอีกชื่อว่า Eluent จากนั้นเติม 1M Tris buffer pH 8.5 (1M Tris, 1M NaOH, DW H₂O) 1 ส่วน 10 ของปริมาตร Eluent เพื่อ Neutralized Eluent เพื่อให้ค่า pH กลับมาเป็นกลาง จากนั้นทำซ้ำจนกว่าจะได้ปริมาตรที่ต้องการ นำไปเก็บที่ -40 ถึง -80 °C เพื่อนำไปใช้ในการศึกษาต่อไป

การเพิ่มความเข้มข้นของตัวอย่าง โดยใช้ Concentration tube

โปรตีนที่ทำการแยกให้บริสุทธิ์จากขั้นตอน Immunoprecipitation ในการศึกษาครั้งนี้ มีความเข้มข้นต่ำ ไม่เพียงพอต่อการนำไปใช้ในการศึกษาด้วยเทคนิค ESI-QTOF- Mass Spectrometry ดังนั้น Concentration tube (VIVASPIN20, 10 KDa MWCO) ถูกนำมาใช้เพื่อเพิ่มความเข้มข้นให้สารตัวอย่าง โดยกระบวนการนี้จะทำการปั่นตกสารละลายส่วนเกินออกจากสารละลายตัวอย่าง ทำให้ความเข้มข้นสารละลายตัวอย่างเพิ่มมากขึ้น แต่ในขณะเดียวกันปริมาตรของสารละลายตัวอย่างก็ลดลง ซึ่ง Concentration tube จะถูกปั่นล้าง ด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ที่ 5000 rpm 5 นาที ทั้งสารละลายที่อยู่ในหลอด Waste จากนั้นเติม Glycine-Tris elution buffer ปั่นที่ 5000 rpm 5 นาที ทั้งสารละลายที่อยู่ในหลอด Waste เติมสารตัวอย่างที่ต้องการเพิ่มความเข้มข้นใน Concentration tube จากนั้น ทำการ ปั่นที่ 2000-5000 rpm 5-10 นาที หรือจนกว่าจะได้ปริมาตรตามที่ต้องการ คูดเก็บสารละลายตัวอย่างที่อยู่ในหลอดบน Membrane ใส่ หลอดทดลอง Eppendorf ทั้งสารละลายส่วนเกินในหลอด waste จากนั้น เติม Glycine-Tris elution buffer 200-500 ไมโครลิตร ปั่นที่ 2000-5000 rpm 5-10 นาที อีกครั้งเพื่อทำการชะล้าง Membrane คูดเก็บสารละลายตัวอย่างที่อยู่ในหลอดบน Membrane ใส่รวมในหลอดทดลองตัวอย่างที่ได้ก่อนหน้านี้ เก็บที่ -20 °C

เพื่อนำไปใช้ในการทดลองต่อไป นอกจากนี้ เมื่อทำการเก็บสารละลายตัวอย่างเรียบร้อยแล้ว Concentration tube จะถูกปั่นล้างอีกครั้ง ด้วยน้ำกลั่น ที่ 5000 rpm 5 นาที 3 ครั้ง เติม 20 % Ethanol และนำไปเก็บที่ 10 °C เพื่อรักษาประสิทธิภาพของ Membrane

การแสดงออก Phosphorylation site ของโปรตีน ด้วยเทคนิค ESI-QTOF- Mass Spectrometry (MS/MS)

กระบวนการ Mass Spectrometry โปรตีนที่จากขั้นตอน Protein extraction จะต้องถูกทำให้มีความบริสุทธิ์มากยิ่งขึ้น โดยผ่านกระบวนการ Immunoprecipitation จากนั้นนำไปตรวจสอบด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดของสารละลาย โดยเทียบกับกราฟเทียบความเข้มข้นแบบมาตรฐานที่สร้างโดยการใช้โปรตีน BSA จากนั้นละลายสารตัวอย่าง ทุกหลอดการทดลองให้มีความเข้มข้นที่ 20 ug/volume โดยงานวิจัยนี้ใช้ปริมาตรเท่ากับ 200 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปตรวจสอบและวิเคราะห์ผลด้วย mass spectrometer (Baez, Reisz, & Furdui, 2015; Chong & Leong, 2012) (Cai, 2017) โดยใช้การวิเคราะห์แบบ ESI-QTOF- Mass Spectrometry เทคนิคนี้เป็นหนึ่งในประเภทย่อยของเทคนิค Tandem Mass Spectrometry (MS/MS) โดยการให้บริการเครื่องมือและการเตรียมตัวอย่าง โดยคณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล โดยมีการเตรียมตัวอย่างดังต่อไปนี้

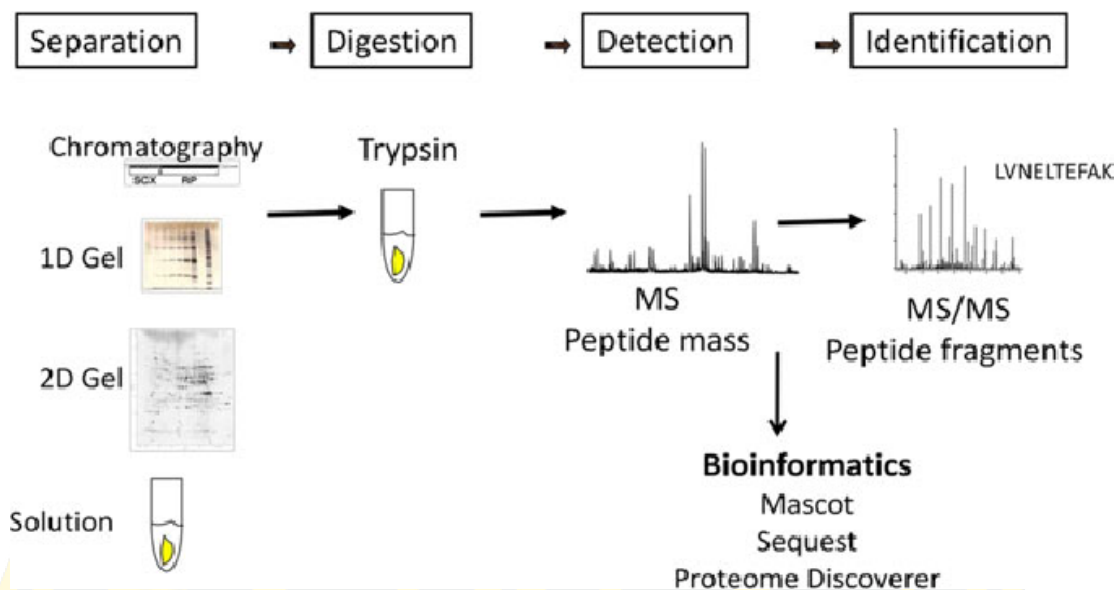
1. In-solution digestion โปรตีนตัวอย่างจะถูกทำความสะอาดด้วย Clean-up kit (GE Healthcare, USA). จากนั้น pellets จะถูกละลายใน 8 M urea และวัดความเข้มข้นของ โปรตีนอีกครั้ง ด้วยเทคนิค Bradford assay (Bio-Rad protein assay, Bio-Rad Laboratory, CA). จากนั้นโปรตีนขนาด 20 µg จะถูกบ่มที่ อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที กับ reduction buffer (100 mM dithiothreitol , 100 mM TEAB). จากนั้นเติม alkylating buffer (100 mM iodoacetamide ,100 mM TEAB) และบ่มในที่ที่บ่มแสง ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา for 30 นาที และบ่มด้วย reduction buffer อีกครั้ง ที่อุณหภูมิห้อง 15 min ต่อมาตัวอย่างจะถูกย่อยด้วย Trypsin, Gold (mass spectrometry grade; Promega, USA) นาน 16 ชั่วโมง ที่ 37 °C จากนั้นตัวอย่างจะถูกทำให้แห้งใน CentriVap DNA Concentrator (Labconco Co., Kansas City, Missouri, USA) และผสมใน 0.1 % formic acid (FA), แล้วล้างด้วย C18 Zip tip ทำให้แห้งอีกครั้งด้วย CentriVap จากนั้นเก็บที่ -80 °C เพื่อนำไปศึกษาในกระบวนการต่อไป ซึ่งหากจะทำการศึกษาต้องนำโปรตีนตัวอย่างที่ถูกย่อยเป็น Peptide เรียบร้อยแล้วมาทำการผสม กับ 0.1 % formic acid และวัดความเข้มข้นด้วย Nano drop 1000 (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) เพื่อเตรียมความพร้อมสำหรับ Mass spectrometry

2. Nano-LC-MS/MS analysis

Peptides จะถูกนำไปวิเคราะห์ด้วยระบบ LC-MS/MS system โดยใช้ Nano-liquid chromatograph (Dionex Ultimate 3000, RSLCnano System, Thermo Scientific) ในการทำงานร่วมกันกับ CaptiveSpray source/Quadrupole ion trap mass spectrometer (Model Q-ToF Compact II, Bruker, Germany) โดยที่ peptide 1 μg จะถูกทำให้บริสุทธิ์อีกครั้งด้วยคอลัมน์ Nano trap 100 μm i.d. \times 2 cm, Acclaim PepMap100 C18 5 μm , ขนาด pore กว้าง 100 \AA และ ทำการแยก Peptide โดยใช้คอลัมน์ PepMap100 C18 3 μm 75 μm \times คอลัมน์ 500 mm LC จากนั้น Peptide จะถูกชะด้วย linear gradient ของ 2-95 % Solvent B นาน 90 min ที่ flow rate 300 nL/min อุณหภูมิ ในคอลัมน์ที่ 60 $^{\circ}\text{C}$. โดยใช้ mobile phases 2 ชนิด ได้แก่ A) 0.1 % FA ในน้ำ และ B) 0.08 % FA ใน 80 % acetonitrile โดยที่ loading pump solvent จะประกอบไปด้วย 0.05 % TFA ใน 2 % acetonitrile จากนั้น gradient ของ mobile phase B จะถูกใช้ดังต่อไปนี้ คือ 2 % นาน 5 นาที, จากนั้นจะปรับเป็น 30 % นาน 60 นาที ต่อมาปรับเป็น 50 % นาน 10 นาที , 70 % นาน 5 นาที, 95 % นาน 5 นาที จากนั้นปรับลงเป็น to 2 % นาน 1 วินาที และทำการปรับสมดุล ประมาณ 5 นาที จากนั้น Drying gas flow ที่ 5 ลิตร/นาที ที่อุณหภูมิ 150 $^{\circ}\text{C}$ ตามลำดับ และ ปรับเครื่องพ่น nebulizer gas pressure เป็น 0.2 bars โดยที่ให้ MS acquisition rate อยู่ที่ประมาณ 6 Hz และ mass range of m/z 150-2200 จะถูกตรวจสอบด้วย positive ionization mode โดยที่ให้เครื่องทำการตรวจสอบ AutoMSn CID fragmentation experiments ที่ mass spectral rates ต่ำสุดคือ 4 Hz และสูงสุดคือ 16 Hz

3. การวิเคราะห์ผล Mass spectrometry ด้วย MASCOT MS/MS Ions search

peptide sequence จะถูกตรวจสอบและเทียบกับฐานข้อมูล Uniport - Q9BX84 (TRPM6_HUMAN) database โดยใช้ MASCOT (version 2.3) สำหรับการค้นหาและวิเคราะห์ โดย parameters ใน MASCOT MS/MS Ions search จะถูกตรวจสอบตามข้อมูลดังต่อไปนี้ carbamidomethyl ที่ cysteine residues จะถูกกำหนดให้คงที่ ในขณะที่ acetylation ใน N-terminus, oxidation ใน methionine, phosphorylation ใน serine, threonine และ tyrosine จะสามารถค้นหาได้ตามความเหมาะสม โดยที่กำหนดค่า peptide tolerance ± 1.2 Da, MS/MS fragment tolerance ± 0.6 Da และผลการวิเคราะห์ mascot score ของ โปรตีน ที่ดีที่สุดจะถูกกำหนดด้วย p-value < 0.05



ภาพที่ 10 แสดงขั้นตอนการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS)

(Guerrera & Kleiner, 2005)

3.4 การวิเคราะห์ข้อมูล

แสดงความแตกต่างของข้อมูลในการศึกษาโปรตีนที่เกี่ยวข้องต่อการศึกษาแมกนีเซียม ในลำไส้ของหนูที่มีภาวะ hypomagnesemia จากการได้รับ Omeprazole เป็นระยะเวลานาน โดยใช้โปรแกรม GraphPad Prism 9 แสดงผลเป็นค่า mean \pm standard error of man (S.E.M.) เปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติระหว่างกลุ่มด้วย Analysis of Variance (one-way ANOVA) โดยใช้ค่านัยสำคัญ $P < 0.05$ และเปรียบเทียบผลต่างข้อมูลของกลุ่มทดสอบและกลุ่มควบคุมแบบเป็นคู่ด้วย Tukey's multiple comparison test โดยใช้ค่านัยสำคัญ $P < 0.05$

บทที่ 4

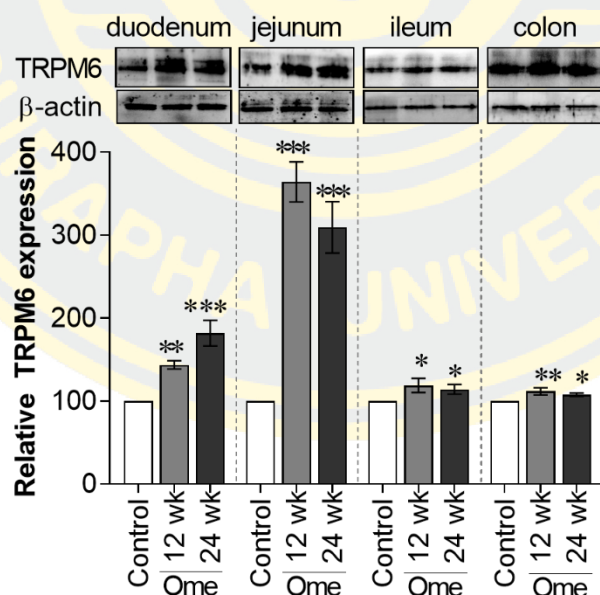
ผลการวิจัยและอภิปรายผล

4.1 ผลการวิจัย

4.1.1 ผลการศึกษาโปรตีน Transient receptor potential melastatin (TRPM) 6

4.1.1.1 การแสดงออกของโปรตีน TRPM6 ในลำไส้ของหนู เมื่อได้รับยา Omeprazole นาน 12 และ 24 สัปดาห์

เมื่อทำการศึกษาการแสดงออกของโปรตีน TRPM6 โดยศึกษาโปรตีนที่ยังไม่ได้ถูกทำให้บริสุทธิ์ (total protein) ของหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะแมกนีเซียมในเลือดต่ำ (PPIH model rats) โดยเทียบกันทั้ง 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มควบคุม กลุ่มที่ได้รับ Omeprazole 20 mg/Kg เป็นเวลานาน 12 สัปดาห์ และกลุ่มที่ได้รับ Omeprazole เป็นเวลานาน 24 สัปดาห์ พบว่า Total protein มีการแสดงออกของโปรตีนเพิ่มมากขึ้นในกลุ่มของหนูที่ได้รับยา Omeprazole เป็นระยะเวลา 12 และ 24 สัปดาห์อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ในลำไส้ทุกส่วน ได้แก่ duodenum; jejunum, ileum และ colon โดยเฉพาะ duodenum และ jejunum ดังที่แสดงให้เห็นในภาพที่ 11



ภาพที่ 11 แสดงการแสดงออกของโปรตีน total TRPM6 protein

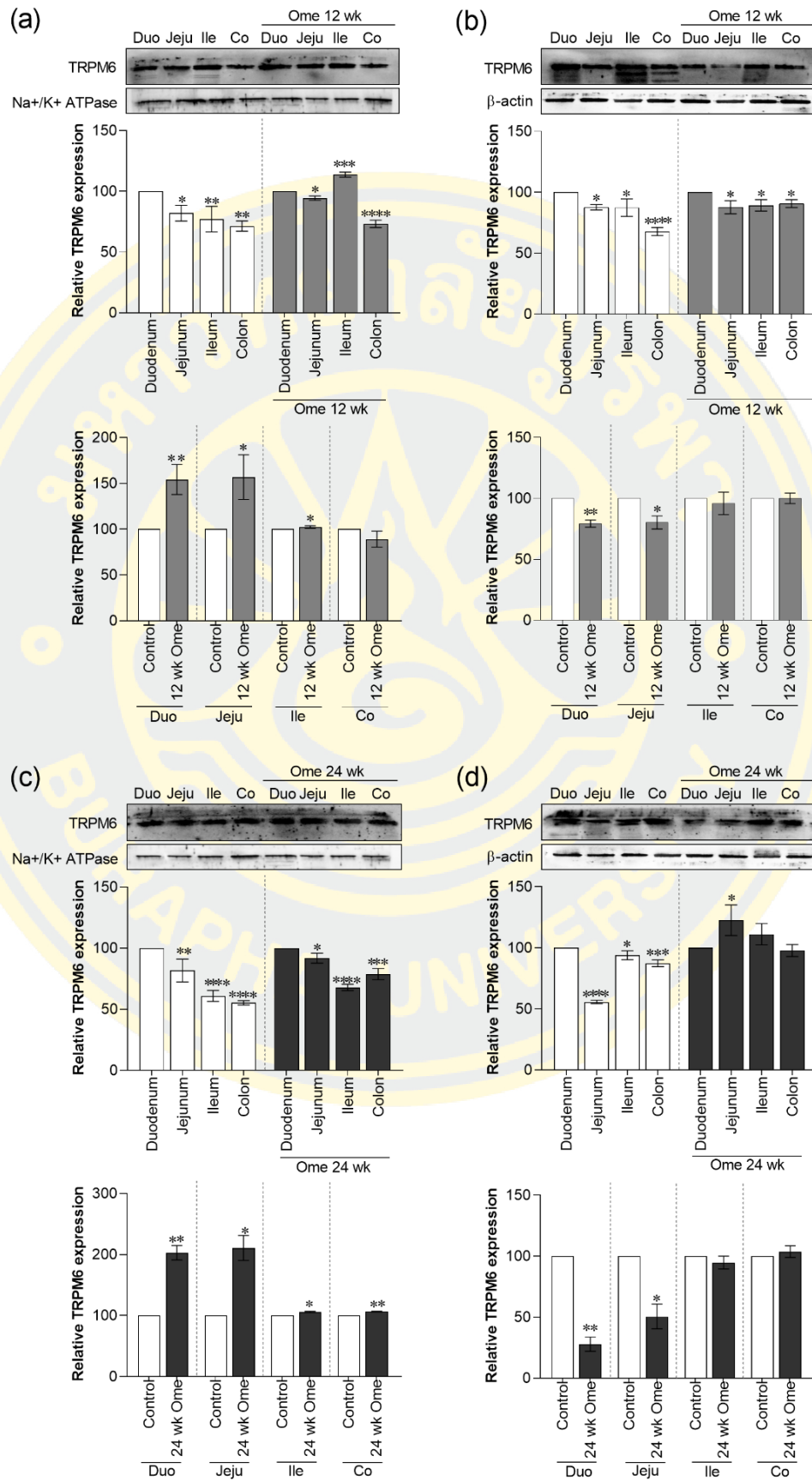
การแสดงออกของโปรตีน TRPM6 ที่เป็น total protein ในกลุ่มของหนูที่ได้รับ Omeprazole นาน 12 สัปดาห์ และ 24 สัปดาห์ เทียบกับกลุ่มควบคุม (Ome : Omeprazole) Means \pm SEM นัยสำคัญทางสถิติได้รับการประเมินโดย one-way ANOVA . *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001

4.1.1.2 การแสดงออกของโปรตีน TRPM6 เมื่อได้รับยา Omeprazole นาน 12 สัปดาห์

เพื่อระบุตำแหน่งการแสดงออกที่เพิ่มมากขึ้นของโปรตีน TRPM6 จึงได้ทำการศึกษาการแสดงออกของโปรตีน TRPM6 โดยศึกษาทั้งโปรตีนที่อยู่ในตำแหน่ง cytosolic protein และ membranous protein ของหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะแมกนีเซียมในเลือดต่ำ (PPIH model rats) ในหนูกลุ่มที่ได้รับ Omeprazole 20 mg/Kg เป็นเวลานาน 12 สัปดาห์ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม พบว่า ในกลุ่มของ membranous protein มีการแสดงออกเพิ่มมากขึ้นในลำไส้ส่วน duodenum, jejunum และ ileum โดยเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญที่ duodenum และ jejunum ในขณะที่ลำไส้ส่วน colon กลับมีการแสดงออกของโปรตีนลดลงอย่างรุนแรง เมื่อเทียบกับ หนูที่อยู่ในกลุ่มควบคุม แต่ในขณะเดียวกัน การแสดงออกของโปรตีน TRPM6 ในกลุ่มของ cytosolic protein ก็ลดลงอย่างมีนัยสำคัญในลำไส้ส่วน duodenum และ jejunum และเปลี่ยนไปเพียงเล็กน้อยที่ส่วนของ ileum และ colon นอกจากนี้เมื่อทำการเปรียบเทียบการแสดงออกของโปรตีนในกลุ่มด้วยตัวเอง ในส่วนของ membrane protein พบว่าการแสดงออกของโปรตีนในกลุ่มควบคุม มีการแสดงออกลดลงตามลำดับ ดังนี้ คือ duodenum jejunum ileum และ colon เช่นเดียวกันกับในกลุ่มที่ได้รับยา Omeprazole จะเห็นว่าการแสดงออกของโปรตีนจะลดลงในลำไส้ส่วนอื่นๆเมื่อเทียบกับ duodenum ในขณะที่การแสดงออกของโปรตีนที่เป็น cytosol พบว่า มีการแสดงออกของโปรตีนลดลงในกลุ่มควบคุมตามลำดับ แต่ในกลุ่มที่ได้รับยา Omeprazole กลับพบการแสดงออกที่ไม่เป็นระเบียบใน ileum และ colon ส่วนในลำไส้ duodenum ยังคงมีการแสดงออกในอัตราส่วนที่คล้ายกับกลุ่มควบคุม ดังที่แสดงให้เห็นในภาพที่ 10 12a และ 12b

4.1.1.3 การแสดงออกของโปรตีน TRPM6 เมื่อได้รับยา Omeprazole นาน 24 สัปดาห์

เมื่อทำการศึกษาการแสดงออกของโปรตีน TRPM6 โดยศึกษาทั้งโปรตีนที่อยู่ในตำแหน่ง cytosolic protein และ membranous protein ของหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะแมกนีเซียมในเลือดต่ำ (PPIH model rats) ในหนูกลุ่มที่ได้รับ Omeprazole 20 mg/Kg เป็นเวลานาน 24 สัปดาห์ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม พบว่า ผลมีความใกล้เคียง หรือมีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกันกับการศึกษาการแสดงออกของโปรตีน TRPM6 ในกลุ่มของหนูที่ได้รับ Omeprazole นาน 12 สัปดาห์ กล่าวคือ มีการแสดงออกของโปรตีน TRPM6 ในส่วนของที่เป็น membranous protein ที่บริเวณลำไส้ส่วน duodenum, jejunum และ ileum เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ แต่อาจมีการแสดงออกเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในส่วนของ colon เมื่อเทียบกับกับหนูในกลุ่มควบคุม ในขณะที่เดียวกัน การแสดงออกของโปรตีน TRPM6 ในส่วนของ cytosolic protein ของหนูในกลุ่มนี้ มีการแสดงออกลดลงอย่างรุนแรงและมีนัยสำคัญที่บริเวณส่วนของลำไส้ duodenum และ jejunum แต่กลับมีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยในส่วนของ ileum และ colon นอกจากนี้เมื่อทำการเปรียบเทียบการแสดงออกของโปรตีนในกลุ่มด้วยตัวเอง จะให้ผลที่คล้ายคลึงกับ TRPM6 ที่ได้รับยา Omeprazole 12 สัปดาห์ คือ ในส่วนของ membrane protein พบว่าการแสดงออกของโปรตีนในกลุ่มควบคุม มีการแสดงออกลดลงตามลำดับ แตกต่างกันตรงที่การแสดงออกในกลุ่มที่ได้รับยา Omeprazole มีการแสดงออกของโปรตีนจะลดลงในลำไส้ส่วนอื่นๆเมื่อเทียบกับ duodenum ยกเว้น ileum ที่มีการแสดงออกของโปรตีนเพิ่มมากกว่า duodenum ในขณะที่การแสดงออกของโปรตีนที่เป็น cytosol พบว่า มีการแสดงออกของโปรตีนลดลงในกลุ่มควบคุมตามลำดับ แต่ในกลุ่มที่ได้รับยา Omeprazole กลับพบการแสดงออกใน ส่วนในลำไส้ duodenum น้อยกว่า ลำไส้ทั้ง 3 ส่วนคือ jejunum ileum และ colon ดังที่แสดงให้เห็นในภาพที่ 12c และ 12d



ภาพที่ 12 แสดงการแสดงออกของโปรตีน cytosolic และ membranous TRPM6 protein

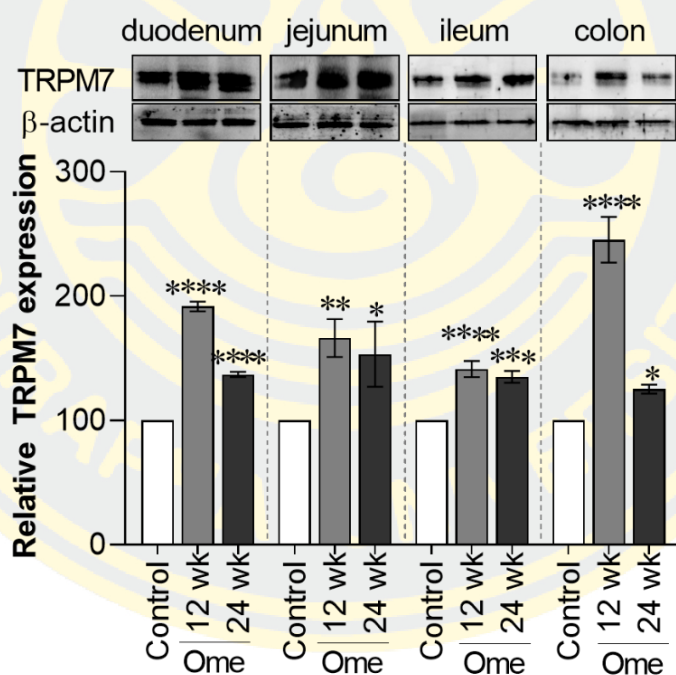
การแสดงออกของโปรตีน cytosolic และ membranous TRPM6 protein ในกลุ่มของหนูที่ได้รับ Omeprazole นาน 12 สัปดาห์ และ 24 สัปดาห์ เทียบกับกลุ่มควบคุม โดย ภาพ 10A แสดงการ แสดงออกของโปรตีน TRPM6 Membranous protein ในกลุ่มหนูที่ได้รับ Omeprazole 12 สัปดาห์ เทียบกับกลุ่มควบคุม, ภาพ 10B แสดงการ แสดงออกของโปรตีน TRPM6 cytosolic protein ใน กลุ่มหนูที่ได้รับ Omeprazole 12 สัปดาห์ เทียบกับกลุ่มควบคุม, 10C แสดงการ แสดงออกของ โปรตีน TRPM6 membranous protein ในกลุ่มหนูที่ได้รับ Omeprazole 24 สัปดาห์ เทียบกับกลุ่ม ควบคุม, ภาพ 10D แสดงการ แสดงออกของโปรตีน TRPM6 cytosolic protein ในกลุ่มหนูที่ได้รับ Omeprazole 24 สัปดาห์ เทียบกับกลุ่มควบคุม (Duo : duodenum; Jeju : jejunum; Ile : ileum; Co : colon, Ome : Omeprazole) Means \pm SEM นัยสำคัญทางสถิติได้รับการประเมินโดย one- way ANOVA และ t-test. *P < 0.05, **P<0.01, ***P<0.001

จากผลของการศึกษาการแสดงออกของโปรตีน TRPM6 โดยศึกษาทั้งโปรตีนที่เป็น total protein และโปรตีนที่อยู่ในตำแหน่ง cytosolic protein และ membranous protein ของหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะแมกนีเซียมในเลือดต่ำ จากการได้รับยา Omeprazole 20 mg/Kg (PPIH model rats) ทั้ง 3 กลุ่ม คือกลุ่มควบคุม กลุ่มทดสอบที่ 1 คือหนูที่ได้รับยา Omeprazole เป็นระยะเวลานาน 12 สัปดาห์ และกลุ่มทดสอบที่ 2 คือหนูที่ได้รับยา Omeprazole เป็นระยะเวลานาน 24 สัปดาห์ โดยทำการเปรียบเทียบการแสดงออกทั้งแบบเทียบในกลุ่มแต่ละกลุ่ม cytosolic protein, membranous protein เทียบกับกลุ่มควบคุมในลำไส้ทั้ง 4 ส่วน ได้แก่ duodenum, jejunum ileum และ colon แล้ว พบว่า การแสดงออกที่มีนัยสำคัญส่วนมาก เกิดขึ้นที่บริเวณส่วนของลำไส้ duodenum และ jejunum ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้เลือกทำการทดสอบการแสดงออกของโปรตีน TRPM6 ทั้ง 3 ส่วน คือ ส่วนที่เป็นโปรตีนรวม หรือ total protein, โปรตีนที่อยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์ หรือ membranous protein และ โปรตีนที่อยู่ในเซลล์ หรือ cytosolic protein เพื่อทำการเปรียบเทียบการแสดงออกของโปรตีน TRPM6 ในทั้ง 3 กลุ่มว่าต่างกันอย่างไรมาก่อน เมื่อได้ทำการทดสอบการแสดงผลข้างต้น สรุปผลการทดสอบการแสดงออกของ โปรตีน TRPM6 ได้ดังนี้คือ โปรตีน TRPM6 มีการแสดงออกเพิ่มมากขึ้นที่บริเวณส่วนของ membrane protein เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ในหนูที่อยู่ในกลุ่มการทดสอบที่ได้รับยา Omeprazole ทั้ง 2 กลุ่มการทดสอบ และในทางตรงกันข้ามก็มีการแสดงออกที่ลดลงที่บริเวณส่วนของ cytosolic protein เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ในหนูที่อยู่ในกลุ่มการทดสอบที่ได้รับยา Omeprazole ทั้ง 2 กลุ่มการทดสอบอย่างมีนัยสำคัญ โดยในกลุ่มของหนูที่ได้รับการรักษา Omeprazole เป็น เวลา 24 สัปดาห์ มีอัตราส่วนการเพิ่มขึ้นที่ membrane มากกว่า กลุ่มที่ได้รับการรักษา Omeprazole เป็นเวลา 12 สัปดาห์ แต่ในขณะเดียวกันการลดลงของการแสดงออกโปรตีนที่บริเวณ cytosolic protein ของหนูที่ได้รับการรักษา Omeprazole เป็น เวลา 24 สัปดาห์ กลับลดลงน้อยกว่า กล่าวคือมีการแสดงออกของโปรตีนน้อยกว่ากลุ่มที่ได้รับการรักษา Omeprazole เป็นเวลา 12 สัปดาห์ แต่มากกว่ากลุ่มควบคุม ในขณะเดียวกันผลจากการศึกษาการแสดงออกของโปรตีน TRPM6 โดยเทียบกันภายในกลุ่ม พบว่า การแสดงออกใน duodenum ในทั้งกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ได้รับการรักษา Omeprazole ทั้งในส่วน membranous protein และ cytosolic protein มีรูปแบบการแสดงออกคล้ายกันคือ เป็นส่วนลำไส้ที่มีการแสดงออกของโปรตีน TRPM6 มากกว่า jejunum หรืออาจจะมากกว่าการแสดงออกของโปรตีนในลำไส้ส่วนอื่นด้วย ส่วนในลำไส้ส่วนอื่นจะพบว่าการแสดงออกของโปรตีนแบบไม่เป็นระเบียบ คือ อย่างเช่น jejunum สามารถพบการแสดงออกของโปรตีนมากกว่า หรือน้อยกว่า duodenum ก็ได้ในกลุ่มเดียวกัน

4.1.2 ผลการศึกษาโปรตีน Transient receptor potential melastatin (TRPM) 7

4.1.2.1 การแสดงออกของโปรตีน TRPM7 ในลำไส้ของหนู เมื่อได้รับยา Omeprazole นาน 12 และ 24 สัปดาห์

เมื่อทำการศึกษาการแสดงออกของโปรตีน TRPM7 โดยศึกษาโปรตีนที่ยังไม่ได้ถูกทำให้บริสุทธิ์ (total protein) ของหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะแมกนีเซียมในเลือดต่ำ (PPIH model rats) โดยเทียบกันทั้ง 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มควบคุม กลุ่มที่ได้รับ Omeprazole 20 mg/Kg เป็นเวลานาน 12 สัปดาห์ และกลุ่มที่ได้รับ Omeprazole เป็นเวลานาน 24 สัปดาห์ มีการแสดงออกของโปรตีนเพิ่มมากขึ้นในกลุ่มของหนูที่ได้รับยา Omeprazole เป็นระยะเวลา 12 และ 24 สัปดาห์อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ในลำไส้ทุกส่วน ได้แก่ duodenum, jejunum, ileum และ colon ดังที่แสดงให้เห็นในภาพที่ 13



ภาพที่ 13 แสดงการแสดงออกของโปรตีน total TRPM7 protein

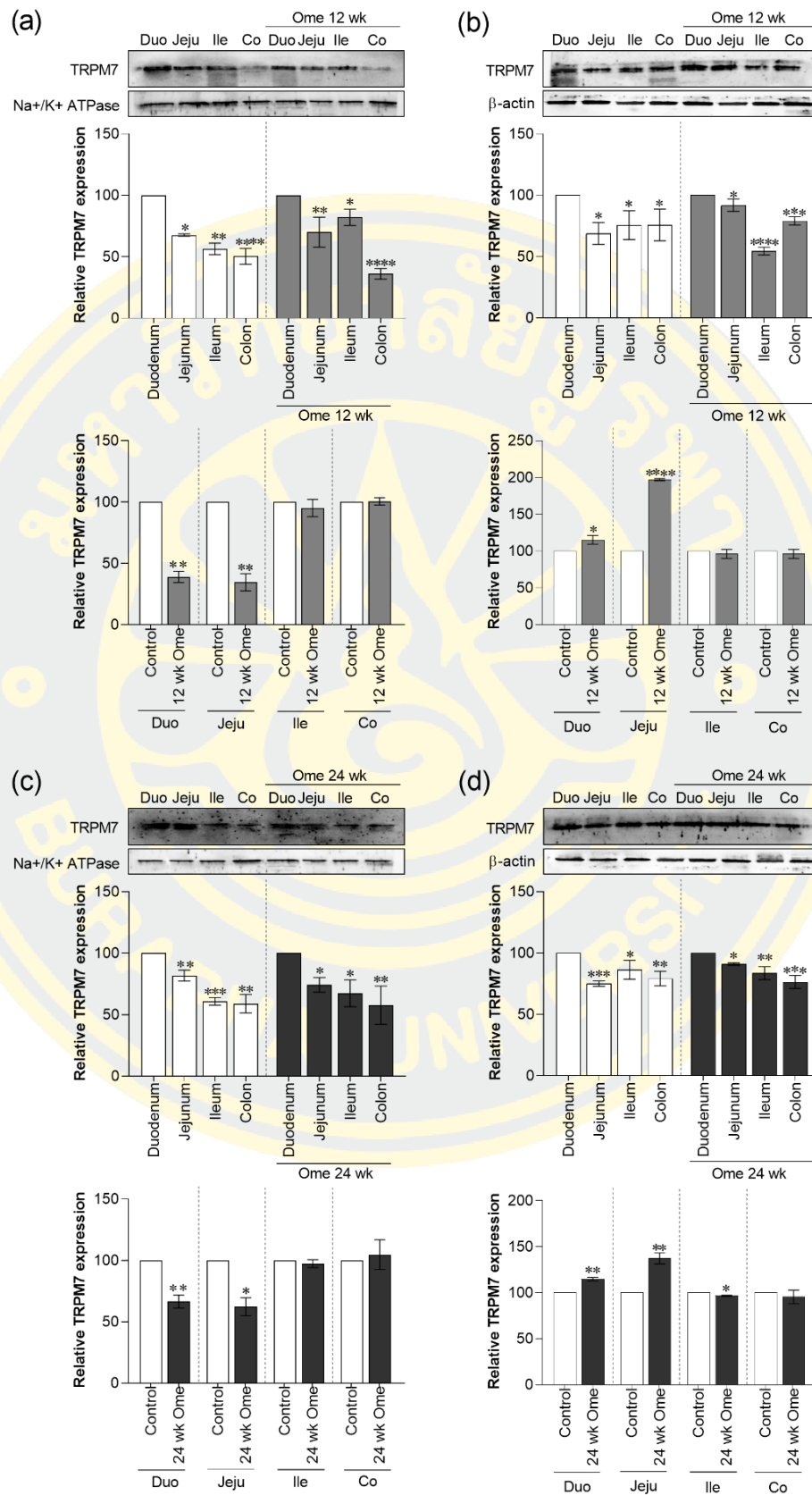
การแสดงออกของโปรตีน total TRPM7 protein ในกลุ่มของหนูที่ได้รับ Omeprazole นาน 12 สัปดาห์ และ 24 สัปดาห์ เทียบกับกลุ่มควบคุม (Ome : Omeprazole) Means \pm SEM นัยสำคัญทางสถิติได้รับการประเมินโดย one-way ANOVA. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

4.1.2.2 ผลการศึกษาการแสดงออกของโปรตีน TRPM7 เมื่อได้รับยา Omeprazole นาน 12 สัปดาห์

เมื่อทำการศึกษาการแสดงออกของโปรตีน TRPM7 โดยศึกษาทั้งโปรตีนที่อยู่ในตำแหน่ง cytosolic protein และ membranous protein ของหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะแมกนีเซียมในเลือดต่ำ (PPIH model rats) ในหนูกลุ่มที่ได้รับ Omeprazole 20 mg/Kg เป็นเวลานาน 12 สัปดาห์ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม พบว่า มีการแสดงออกของโปรตีน TRPM7 ลดลงอย่างรุนแรงและมีนัยสำคัญในโปรตีนที่เป็น membranous protein ในลำไส้ 2 ส่วน ได้แก่ ลำไส้ส่วน duodenum, jejunum ส่วน ileum และ colon กลับไม่มีการเปลี่ยนแปลง ในขณะที่เดียวกันมีการแสดงออกเพิ่มมากขึ้นของโปรตีนส่วนที่เป็น cytosolic protein ในลำไส้ส่วน duodenum และ jejunum ในขณะที่ ileum และ colon ไม่มีการเปลี่ยนแปลงการแสดงออก เช่นเดียวกันกับการศึกษาการแสดงออกของโปรตีน TRPM6 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม เช่นเดียวกัน ในการศึกษาครั้งนี้ ได้ทำการศึกษาการแสดงออกของโปรตีนโดยทำการเปรียบเทียบการแสดงออกของโปรตีน TRPM7 ในกลุ่มการทดลองเดียวกัน พบว่า การแสดงออกของโปรตีน TRPM7 มีการแสดงออกของโปรตีน ลดลงเรียงตามลำดับคือ duodenum ileum และ colon ในกลุ่มของ membranous protein ในขณะที่กลุ่มควบคุมใน cytosol protein มีการแสดงออกของโปรตีน TRPM7 ในลำไส้ส่วน duodenum มากกว่าในลำไส้ส่วนอื่นๆ โดยที่มีการแสดงออกในลำไส้ jejunum ลดน้อยลงสุด ในขณะที่กลุ่มที่ได้รับยา Omeprazole ในส่วนของ membranous protein มีการแสดงออกของโปรตีนลดลงตามลำดับเช่นเดียวกัน ในขณะที่การแสดงออกโปรตีนในส่วนของ cytosolic protein ในกลุ่มที่ได้รับยา Omeprazole นาน 12 สัปดาห์ พบว่า มีการแสดงออกของโปรตีน TRPM7 มากที่สุด ในขณะที่การแสดงออกในลำไส้ส่วนอื่นๆ มีการแสดงออกน้อยกว่า โดยเฉพาะใน ileum ของดังที่แสดงให้เห็นในภาพที่ 14a และ 14b

4.1.2.3 ผลการศึกษาการแสดงออกของโปรตีน TRPM7 เมื่อได้รับยา Omeprazole นาน 24 สัปดาห์

เมื่อทำการศึกษาการแสดงออกของโปรตีน TRPM7 โดยศึกษาทั้งโปรตีนที่อยู่ในตำแหน่ง cytosolic protein และ membranous protein ของหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะแมกนีเซียมในเลือดต่ำ (PPIH model rats) ในหนูกลุ่มที่ได้รับ Omeprazole 20 mg/Kg เป็นเวลานาน 24 สัปดาห์ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม พบว่า มีการแสดงออกของโปรตีน TRPM7 ใกล้เคียงกับการแสดงออกของโปรตีน TRPM7 ในกลุ่มของหนูที่ได้รับยา Omeprazole 12 สัปดาห์ คือ พบการแสดงออกของโปรตีนลดลงของโปรตีนที่เป็น membranous protein อย่างมีนัยสำคัญ ในลำไส้ 3 ส่วน ได้แก่ ลำไส้ส่วน duodenum และ jejunum แต่ในขณะเดียวกัน ก็มีการแสดงออกของโปรตีนส่วนที่เป็น cytosolic protein เพิ่มมากขึ้นในลำไส้ส่วน duodenum jejunum โดยเฉพาะ duodenum และ jejunum ที่มีการแสดงออกเพิ่มมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ยกเว้นในลำไส้ส่วน ileum และ colon ที่มีการแสดงออกเปลี่ยนไปเพียงเล็กน้อย เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ในการศึกษาครั้งนี้ ได้ทำการศึกษาการแสดงออกของโปรตีนโดยทำการเปรียบเทียบการแสดงออกของโปรตีน TRPM7 ในกลุ่มการทดลองเดียวกัน พบว่า การแสดงออกของโปรตีน TRPM7 ในกลุ่มควบคุมจะมีการแสดงออกของโปรตีน ลดลงเรียงตามลำดับเช่นเดียวกันกับในกลุ่มที่ได้รับยา Omeprazole นาน 12 สัปดาห์ คือ duodenum ileum และ colon ในกลุ่มของ membranous protein ในขณะที่กลุ่มควบคุมใน cytosol protein มีการแสดงออกของโปรตีน TRPM7 ในลำไส้ส่วน duodenum มากกว่าในลำไส้ส่วนอื่นๆ โดยที่มีการแสดงออกในลำไส้ jejunum ลดน้อยลงสุด ในขณะที่กลุ่มที่ได้รับยา Omeprazole ในส่วนของ membranous protein มีการแสดงออกของโปรตีนลดลงตามลำดับเช่นเดียวกัน ในขณะที่การแสดงออกโปรตีนในส่วนของ cytosolic protein ในกลุ่มของหนูกลุ่ม ที่ได้รับยา Omeprazole นาน 24 สัปดาห์ พบว่ามีการแสดงออกของโปรตีน TRPM7 ลดลงตามลำดับคือ duodenum jejunum ileum และ colon ดังที่แสดงให้เห็นในภาพที่ 14c และ 14d



ภาพที่ 14 แสดงการแสดงออกของ cytosolic และ membranous TRPM6 protein

การแสดงออกของ cytosolic และ membranous TRPM6 protein ในกลุ่มของหนูที่ได้รับ Omeprazole นาน 12 สัปดาห์ และ 24 สัปดาห์ เทียบกับกลุ่มควบคุม โดย ภาพ 12A แสดงการแสดงออกของโปรตีน TRPM7 Membranous protein ในกลุ่มหนูที่ได้รับ Omeprazole 12 สัปดาห์ เทียบกับกลุ่มควบคุม, ภาพ 12B แสดงการแสดงออกของโปรตีน TRPM7 cytosolic protein ในกลุ่มหนูที่ได้รับ Omeprazole 12 สัปดาห์ เทียบกับกลุ่มควบคุม, 12C แสดงการแสดงออกของโปรตีน TRPM7 membranous protein ในกลุ่มหนูที่ได้รับ Omeprazole 24 สัปดาห์ เทียบกับกลุ่มควบคุม, ภาพ 12D แสดงการแสดงออกของโปรตีน TRPM7 cytosolic protein ในกลุ่มหนูที่ได้รับ Omeprazole 24 สัปดาห์ เทียบกับกลุ่มควบคุม (Duo : duodenum; jeju : jejunum; Ile : ileum; Co : colon, Ome : Omeprazole) Means \pm SEM นัยสำคัญทางสถิติได้รับการประเมินโดย one-way ANOVA และ t-test. *P < 0.05, **P<0.01, ***P<0.001

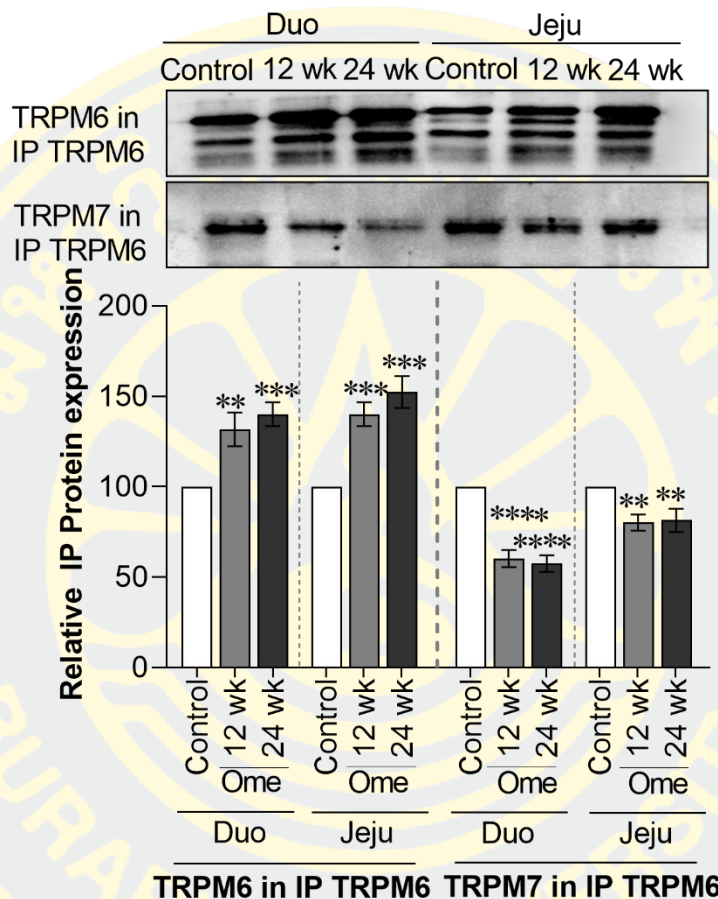
จากผลของการศึกษาการแสดงออกของโปรตีน TRPM7 โดยศึกษาทั้งโปรตีนที่อยู่ในตำแหน่ง cytosolic protein และ membranous protein ของหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะแมกนีเซียมในเลือดต่ำ จากการได้รับยา Omeprazole 20 mg/Kg (PPIH model rats) ทั้ง 3 กลุ่ม คือ กลุ่มควบคุม กลุ่มทดสอบที่ 1 คือหนูที่ได้รับยา Omeprazole เป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์ และกลุ่มทดสอบที่ 2 คือหนูที่ได้รับยา Omeprazole เป็นระยะเวลา 24 สัปดาห์ โดยทำการเปรียบเทียบการแสดงออกทั้งแบบเทียบในกลุ่มแต่ละกลุ่ม cytosolic protein, membranous protein เทียบกับกลุ่มควบคุมในลำไส้ทั้ง 4 ส่วน ได้แก่ duodenum, jejunum ileum และ colon แล้ว พบว่าการแสดงออกที่มีนัยสำคัญส่วนมาก เกิดขึ้นที่บริเวณส่วนของลำไส้ duodenum และ jejunum เช่นเดียวกันกับการแสดงออกของโปรตีน TRPM6 และ CNNM4 ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้เลือกทำการทดสอบการแสดงออกของโปรตีน CNNM4 ทั้ง 3 ส่วนคือ ส่วนที่เป็นโปรตีนรวม หรือ total protein, โปรตีนที่อยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์ หรือ membranous protein และ โปรตีนที่อยู่ในเซลล์ หรือ cytosolic protein เพื่อทำการเปรียบเทียบการแสดงออกของโปรตีน CNNM4 ในทั้ง 3 กลุ่มว่าแตกต่างกันหรือไม่อย่างไร เมื่อได้ทำการทดสอบการแสดงออกทั้งหมดตามผลข้างต้น สรุปผลการทดสอบการแสดงออกของ โปรตีน TRPM7 ได้ว่า มีการแสดงออกของโปรตีนที่บริเวณส่วนของ membrane protein ลดน้อยลง ในหนูที่อยู่ในกลุ่มการทดสอบที่ได้รับยา Omeprazole ทั้ง 2 กลุ่มการทดสอบ ซึ่งแตกต่างกับการแสดงออกของโปรตีน TRPM6 และโปรตีน CNNM4 นอกจากนี้ยังพบว่าส่วนที่เป็นโปรตีน cytosolic protein กลับมีการแสดงออกเพิ่มมากขึ้นในหนูที่อยู่ในกลุ่มการทดสอบที่ได้รับยา Omeprazole ทั้ง 2 กลุ่มการทดสอบอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ทั้งในลำไส้ส่วน duodenum และ jejunum และเป็นที่น่าสังเกตว่า อัตราการการแสดงออกที่ลดลงหรือเพิ่มขึ้นของโปรตีน TRPM7 ในกลุ่มของหนูที่ได้รับยา Omeprazole นาน 12 และ 24 สัปดาห์ ทั้งในส่วน of membranous protein และ cytosolic protein มีอัตราส่วนการเพิ่มขึ้นหรือลดลงเท่ากัน เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม นอกจากนี้เมื่อเทียบการแสดงออกอัตราส่วนของการแสดงออกโปรตีนในส่วนลำไส้ jejunum พบว่า อัตราส่วนการเพิ่มขึ้นของการแสดงออกของโปรตีนใกล้เคียงกันในกลุ่ม duodenum jejunum นั้น พบการแสดงออกของโปรตีนในกลุ่มการทดสอบที่ได้รับยา Omeprazole นาน 24 สัปดาห์เพิ่มขึ้นมากกว่าในส่วน of cytosolic protein และเมื่อทำการศึกษาการแสดงออกของโปรตีนโดยทำการเปรียบเทียบการแสดงออกของโปรตีน TRPM7 ในกลุ่มการทดลองเดียวกัน แสดงให้เห็นว่าการแสดงออกของโปรตีน TRPM7 ในกลุ่มควบคุมมีผลใกล้เคียงกับการศึกษาการแสดงออกของโปรตีน TRPM6 คือ มีการแสดงออกของโปรตีน ลดลงเรียงตามลำดับคือ duodenum ileum และ colon ในกลุ่มของ membranous protein ในขณะที่กลุ่มควบคุมใน cytosol protein มีการแสดงออกของโปรตีน TRPM7 ในลำไส้ส่วน duodenum มากกว่าในลำไส้ส่วนอื่นๆ โดยที่มีการ

แสดงออกในลำไส้ jejunum ลดน้อยลงสุด ในขณะที่กลุ่มที่ได้รับยา Omeprazole ในส่วนของ membranous protein มีการแสดงออกของโปรตีนลดลงตามลำดับเช่นกัน ทั้งในกลุ่มที่ได้รับยา Omeprazole นาน 12 และ 24 สัปดาห์ ในขณะที่การแสดงออกโปรตีนในส่วนของ cytosolic protein ในกลุ่มของหนูกลุ่ม ที่ได้รับยา Omeprazole นาน 24 สัปดาห์ พบว่ามีการแสดงออกของโปรตีน TRPM7 ลดลงตามลำดับคือ duodenum jejunum ileum และ colon แต่ในกลุ่มที่ได้รับยา Omeprazole นาน 12 สัปดาห์ พบว่า มีการแสดงออกของโปรตีน TRPM7 มากที่สุดใน duodenum ในขณะที่การแสดงออกในลำไส้ส่วนอื่นๆ มีการแสดงออกน้อยกว่า โดยเฉพาะใน ileum

4.1.3 การแสดงออกของโปรตีน TRPM6 และการศึกษาการแสดงออกของการทำงานร่วมกันของโปรตีน TRPM6 และ TRPM7 ด้วยเทคนิค Immunoprecipitation

จากการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Nassisor et.al 2020 พบว่า จากการทดลองก่อนหน้าที่ได้ ทำการศึกษาการแสดงออกของโปรตีน TRPM6 และ TRPM7 ซึ่งพบว่า มีการเพิ่มขึ้นของโปรตีน TRPM6 ในส่วนที่เป็น membranous protein ในส่วนลำไส้ duodenum และ jejunum แต่ในทางตรงกันข้ามกับพบว่า การแสดงออกของโปรตีน TRPM7 ของโปรตีนที่เป็น membranous protein ในลำไส้ในส่วนนี้ มีการแสดงออกที่ลดน้อยลงอย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นการศึกษารังนี้จึงได้ ทำการศึกษาการทำงานร่วมกันหรือการจับเข้าคู่กัน (Dimerization) ของ TRPM6 และ TRPM7 โดยใช้เทคนิค Immunoprecipitation (IP) และ Western blot โดยทำการศึกษาโปรตีนที่เป็น membranous protein ในลำไส้ทั้ง 2 ส่วนคือ duodenum และ jejunum ในกลุ่มการทดลองทั้ง 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มควบคุม กลุ่มทดสอบที่ 1 คือหนูที่ได้รับยา Omeprazole เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ และกลุ่มทดสอบที่ 2 คือหนูที่ได้รับยา Omeprazole เป็นระยะเวลา 24 สัปดาห์ จากการศึกษาพบว่า โปรตีน TRPM6 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค IP นั้นมีการแสดงออกเพิ่มมากขึ้นในกลุ่มการทดลองที่ได้รับยา Omeprazole ทั้ง 2 กลุ่มในลำไส้ทั้ง 2 ส่วน คือ Duodenum และ Jejunum อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งเป็นการยืนยันผลการศึกษารังนี้ในการทดลองก่อนหน้า ที่ได้ทำการศึกษารังนี้ในทั้ง 3 กลุ่ม โดยที่ไม่ได้นำไปผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค IP ต่อมา เมื่อนำแผ่น membrane ที่ได้จากการทำ Western blot ของ Immunoprecipitated TRPM6 protein ไปทำการ Strip โดยการบ่มกับ TRPM7 antibody เพื่อทำการศึกษารังนี้ Dimerization ของโปรตีน TRPM6 และ 7 พบว่า มีการแสดงออกของโปรตีน TRPM6 ที่จับกับ TRPM7 ลดลง อย่างมีนัยสำคัญ ในกลุ่มการทดลองที่ได้รับยา

Omeprazole ทั้ง 2 กลุ่มในลำไส้ทั้ง 2 ส่วน คือ duodenum และ jejunum อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ดังที่แสดงในภาพที่ 15

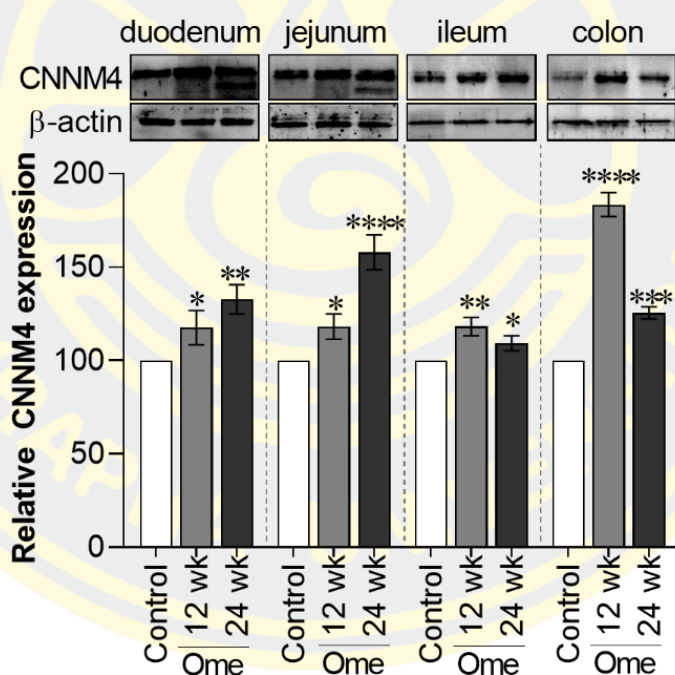


ภาพที่ 15 แสดงการแสดงออกของ Immunoprecipitation protein โดยแสดงทั้งการแสดงออกของ โปรตีน TRPM6 ใน Immunoprecipitated TRPM6 protein และ โปรตีน TRPM7 ใน Immunoprecipitated TRPM6 protein ในกลุ่มของหนูที่ได้รับ Omeprazole นาน 12 สัปดาห์ และ 24 สัปดาห์ เทียบกับกลุ่มควบคุม ในส่วนของลำไส้ duodenum และ ileum ตามลำดับจากซ้ายไปขวา (Duo : duodenum; Jeju : jejunum, Ome : Omeprazole) Means \pm SEM นัยสำคัญทางสถิติได้รับการประเมินโดย one- way ANOVA และ t-test. *P < 0.05, **P<0.01, ***P<0.001

4.1.4 ผลการศึกษาโปรตีน Ancient conserved domain protein 4 (CNNM4)

4.1.4.1 การแสดงออกของโปรตีน CNNM4 ในลำไส้ของหนู เมื่อได้รับยา Omeprazole นาน 12 และ 24 สัปดาห์

เมื่อทำการศึกษาการแสดงออกของโปรตีน CNNM4 โดยศึกษาโปรตีนที่ยังไม่ได้ถูกทำให้บริสุทธิ์ (total protein) ของหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะแมกนีเซียมในเลือดต่ำ (PPIH model rats) โดยเทียบกันทั้ง 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มควบคุม กลุ่มที่ได้รับ Omeprazole 20 mg/Kg เป็นเวลานาน 12 สัปดาห์ และกลุ่มที่ได้รับ Omeprazole เป็นเวลานาน 24 สัปดาห์ พบว่า total protein มีการแสดงออกของโปรตีนเพิ่มมากขึ้นในกลุ่มของหนูที่ได้รับยา Omeprazole เป็นระยะเวลา 12 และ 24 สัปดาห์อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ในลำไส้ทุกส่วน ได้แก่ duodenum; jejunum, ileum และ colon ดังที่แสดงให้เห็นในภาพที่ 16



ภาพที่ 16 แสดงการแสดงออกของโปรตีน total CNNM4 protein

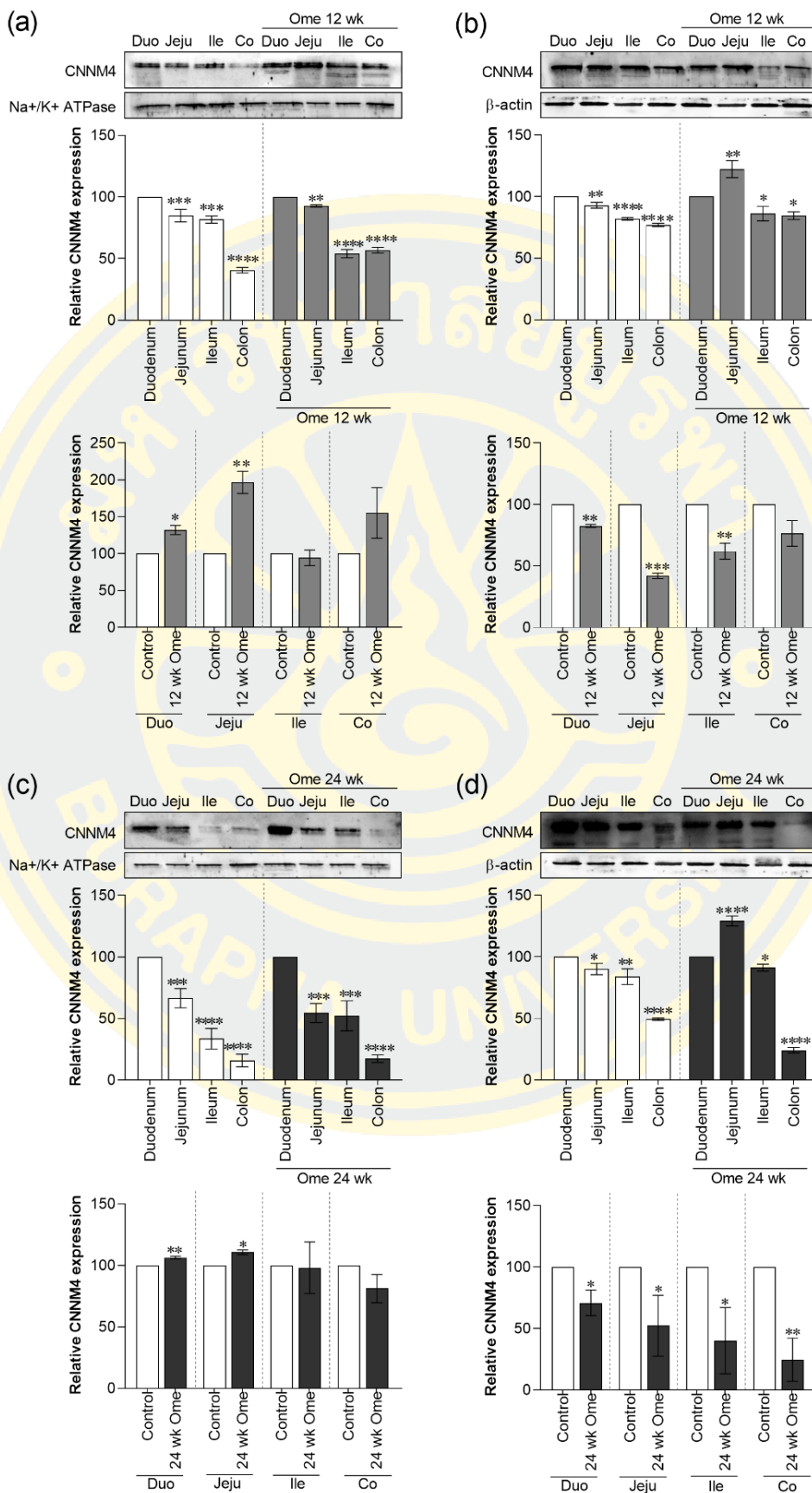
การแสดงออกของโปรตีน total CNNM4 protein ในกลุ่มของหนูที่ได้รับ Omeprazole นาน 12 สัปดาห์ และ 24 สัปดาห์ เทียบกับกลุ่มควบคุม Means \pm SEM นัยสำคัญทางสถิติได้รับการประเมินโดย one-way ANOVA และ t-test. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001

4.1.4.2 การแสดงออกของโปรตีน CNNM4 เมื่อได้รับยา Omeprazole นาน 12 สัปดาห์

เมื่อทำการศึกษาการแสดงออกของโปรตีน CNNM4 โดยศึกษาทั้งโปรตีนที่อยู่ในตำแหน่ง cytosolic protein และ membranous protein ของหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะแมกนีเซียมในเลือดต่ำ (PPIH model rats) ในหนูกลุ่มที่ได้รับ Omeprazole 20 mg/Kg เป็นเวลานาน 12 สัปดาห์ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม พบว่า ในกลุ่มของ membranous protein มีการแสดงออกเพิ่มมากขึ้นในลำไส้ส่วน duodenum, jejunum อย่างมีนัยสำคัญ และลดลงเล็กน้อยในลำไส้ส่วน Ileum แต่เพิ่มขึ้นอย่างรุนแรงในลำไส้ส่วน colon เมื่อเทียบกับหนูที่อยู่ในกลุ่มควบคุม แต่ในขณะเดียวกัน การแสดงออกของโปรตีน TRPM6 ในกลุ่มของ cytosolic protein ก็ลดลงอย่างมีนัยสำคัญในลำไส้ส่วน duodenum และ jejunum ileum และพบการแสดงออกที่ลดลงเช่นกันในลำไส้ส่วน colon เมื่อทำการศึกษาการแสดงออกของโปรตีน CNNM4 โดยทำการเปรียบเทียบกันในกลุ่ม พบว่า การแสดงออกของ CNNM4 ในกลุ่มควบคุม มีการแสดงออกของโปรตีนลดลงตามลำดับของลำไส้ดังต่อไปนี้ คือ duodenum ileum และ colon ในขณะที่ในกลุ่มที่ได้รับยา Omeprazole มีการแสดงออกลดลงอย่างเป็นลำดับเช่นเดียวกันในกลุ่มของ membranous protein แต่ในส่วนของ cytosolic protein พบว่าที่การแสดงออกของโปรตีน CNNM4 ในลำไส้ส่วน jejunum มากที่สุด ดังที่แสดงให้เห็นในภาพที่ 17a และ 17b

4.1.4.3 ผลการศึกษาการแสดงออกของโปรตีน CNNM4 เมื่อได้รับยา Omeprazole นาน 24 สัปดาห์

เมื่อทำการศึกษาการแสดงออกของโปรตีน CNNM4 โดยศึกษาทั้งโปรตีนที่อยู่ในตำแหน่ง cytosolic protein และ membranous protein ของหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะแมกนีเซียมในเลือดต่ำ (PPIH model rats) ในหนูกลุ่มที่ได้รับ Omeprazole 20 mg/Kg เป็นเวลานาน 24 สัปดาห์ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม พบการแสดงออกที่เป็นไปในทิศทางเดียวกับการแสดงออกของโปรตีนที่ทำการศึกษาในหนูกลุ่มที่ได้รับยา Omeprazole นาน 12 สัปดาห์ คือ มีการแสดงออกของโปรตีนเพิ่มมากขึ้นในส่วนของโปรตีนที่เป็น membranous protein ในลำไส้ส่วน duodenum และ jejunum อย่างมีนัยสำคัญ แต่กลับพบการแสดงออกที่ลดลงในลำไส้ส่วน ileum และ colon เช่นเดียวกันกับการแสดงออกของโปรตีน TRPM6 ที่เป็น cytosolic protein ที่มีการแสดงออกลดลง ในลำไส้ทั้ง 4 ส่วน โดยเฉพาะอย่างยิ่งในส่วน of duodenum และ jejunum ที่ลดลงอย่างรุนแรงและมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับกลุ่มทดลองของหนูที่เป็นกลุ่มควบคุม เมื่อทำการศึกษาการแสดงออกโปรตีน CNNM4 โดยทำการเปรียบเทียบความแตกต่างการแสดงออกในกลุ่มทดลองเดียวกัน พบว่าให้ผลการศึกษาใกล้เคียงกับกลุ่มที่ได้รับยา Omeprazole นาน 12 สัปดาห์คือมีการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของโปรตีน CNNM4 ในลำไส้ส่วน jejunum มากที่สุด ในส่วนที่เป็น cytosolic protein ในขณะที่ในส่วนที่เป็น membranous protein มีการลดลงอย่างเป็นลำดับ เรียงจากมากที่สุด ไปน้อยสุด ได้แก่ duodenum jejunum ileum และ colon ดังที่แสดงให้เห็นในภาพที่ 17c และ 17d



ภาพที่ 17 แสดงการแสดงออกของ cytosolic และ membranous CNNM4 protein

ในกลุ่มของหนูที่ได้รับ Omeprazole นาน 12 สัปดาห์ และ 24 สัปดาห์ เทียบกับกลุ่มควบคุม โดยภาพ 15A แสดงการแสดงออกของโปรตีน CNNM4 membranous protein ในกลุ่มหนูที่ได้รับ Omeprazole 12 สัปดาห์ เทียบกับกลุ่มควบคุม, ภาพ 15B แสดงการแสดงออกของโปรตีน TRPM7 cytosolic protein ในกลุ่มหนูที่ได้รับ Omeprazole 12 สัปดาห์ เทียบกับกลุ่มควบคุม, 15C แสดงการแสดงออกของโปรตีน membranous CNNM4 protein ในกลุ่มหนูที่ได้รับ Omeprazole 24 สัปดาห์ เทียบกับกลุ่มควบคุม, ภาพ 15D แสดงการแสดงออกของโปรตีน cytosolic CNNM4 protein ในกลุ่มหนูที่ได้รับ Omeprazole 24 สัปดาห์ เทียบกับกลุ่มควบคุม (Duo : duodenum; Jeju : jejunum; Ile : ileum; Co : colon, Ome : Omeprazole) Means \pm SEM นัยสำคัญทางสถิติได้รับการประเมินโดย one- way ANOVA และ t-test. *P < 0.05, **P<0.01, ***P<0.001

จากผลของการศึกษาการแสดงออกของโปรตีน CNNM4 โดยศึกษาทั้งโปรตีนที่อยู่ในตำแหน่ง cytosolic protein และ membranous protein ของหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะแมกนีเซียมในเลือดต่ำ จากการได้รับยา Omeprazole 20 mg/Kg (PPIH model rats) ทั้ง 3 กลุ่ม คือ กลุ่มควบคุม กลุ่มทดสอบที่ 1 คือหนูที่ได้รับยา Omeprazole เป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์ และกลุ่มทดสอบที่ 2 คือหนูที่ได้รับยา Omeprazole เป็นระยะเวลา 24 สัปดาห์ โดยทำการเปรียบเทียบการแสดงออกทั้งแบบเทียบในกลุ่มแต่ละกลุ่ม cytosolic protein, membranous protein เทียบกับกลุ่มควบคุมในลำไส้ทั้ง 4 ส่วน ได้แก่ duodenum, jejunum ileum และ colon แล้ว พบว่าการแสดงออกที่มีนัยสำคัญส่วนมาก เกิดขึ้นที่บริเวณส่วนของลำไส้ duodenum และ jejunum เช่นเดียวกันกับการแสดงออกของโปรตีน TRPM6 ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้เลือกทำการทดสอบการแสดงออกของโปรตีน CNNM4 ทั้ง 3 ส่วนคือ ส่วนที่เป็นโปรตีนรวม หรือ total protein, โปรตีนที่อยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์ หรือ membranous protein และ โปรตีนที่อยู่ในเซลล์ หรือ cytosolic protein เพื่อทำการเปรียบเทียบการแสดงออกของโปรตีน CNNM4 ในทั้ง 3 กลุ่มว่าแตกต่างกันหรือไม่ อย่างไร เมื่อได้ทำการทดสอบการแสดงออกทั้งหมดตามผลข้างต้น สรุปผลการทดสอบการแสดงออกของโปรตีน CNNM4 ได้ว่า มีการแสดงออกเพิ่มมากขึ้นที่บริเวณส่วนของ membrane protein ในหนูที่อยู่ในกลุ่มการทดสอบที่ได้รับยา Omeprazole ทั้ง 2 กลุ่มการทดสอบ และเช่นเดียวกันกับการแสดงออกของโปรตีน TRPM6 โปรตีน CNNM4 ก็มีการแสดงออกที่ลดลงที่บริเวณส่วนของ cytosolic protein ในหนูที่อยู่ในกลุ่มการทดสอบที่ได้รับยา Omeprazole ทั้ง 2 กลุ่มการทดสอบอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยเฉพาะในกลุ่มของหนูที่ได้รับการยา Omeprazole เป็นเวลา 24 สัปดาห์ มีอัตราส่วนการเพิ่มขึ้นอย่างรุนแรงที่ membrane มากกว่า กลุ่มที่ได้รับยา Omeprazole เป็นเวลา 12 สัปดาห์ ทั้งในลำไส้ส่วน duodenum และ ileum นอกจากนี้ยังพบว่า การแสดงออกของโปรตีนในส่วนที่เป็น cytosolic protein ในลำไส้ส่วน duodenum กลุ่มหนูที่ได้รับยา Omeprazole 24 สัปดาห์ มีอัตราส่วนการแสดงออกที่ลดลงมากกว่า กลุ่มหนูที่ได้รับยา Omeprazole 12 สัปดาห์ แต่ในทางตรงกันข้าม การแสดงออกของโปรตีนที่บริเวณ cytosolic protein ในลำไส้ส่วน jejunum ของหนูที่ได้รับการยา Omeprazole เป็น เวลา 12 สัปดาห์ กลับลดลงได้น้อยกว่า กลุ่มหนูที่ได้รับยา Omeprazole 24 สัปดาห์ กล่าวคือในลำไส้ส่วน duodenum นั้น หนูที่ได้รับ Omeprazole 4 สัปดาห์มีการแสดงออกใน cytosol มากกว่ากลุ่มที่ได้รับ Omeprazole 24 สัปดาห์ และในลำไส้ส่วน jejunum หนูที่ได้รับ Omeprazole 24 สัปดาห์มีการแสดงออกใน cytosol มากกว่ากลุ่มที่ได้รับ Omeprazole 12 สัปดาห์ แต่มีการแสดงออกน้อยกว่ากลุ่มควบคุม นอกจากนี้จากการแสดงออกของโปรตีนที่ถูกเปรียบเทียบกันภายในกลุ่ม แสดงให้เห็นว่า ในกลุ่มควบคุม duodenum เป็นส่วนลำไส้ที่มีการแสดงออกของโปรตีน CNNM4 มากที่สุดในขณะที่ในกลุ่มของหนูที่ได้รับยา

Omeprazole ทั้ง 2 กลุ่มคือ กลุ่มที่ได้รับยา Omeprazole 14 และ 24 สัปดาห์ มีการแสดงออกของโปรตีน CNNM4 มากที่สุดในส่วนของลำไส้ jejunum

4.1.5 การแสดงออกของ Phosphorylation site ของโปรตีน TRPM6 ด้วยเทคนิค Mass spectrometry

จากการศึกษาก่อนหน้านี้ที่ได้ทำการศึกษาการแสดงออกของการทำงานร่วมกันหรือการจับเข้าคู่กัน (Dimerization) ของ TRPM6 และ TRPM7 แล้วพบว่า การเข้าคู่กัน หรือการ Dimerization มีการลดลงอย่างมีนัยสำคัญในกลุ่มที่ได้รับยา Omeprazole ทั้ง 2 กลุ่ม ในลำไส้ทั้ง 2 ส่วนคือ duodenum และ jejunum ดังนั้นในการศึกษานี้จึงได้ทำการศึกษา Phosphorylation site ของโปรตีน TRPM6 และ TRPM7 ในลำไส้ทั้ง 2 ส่วน ในกลุ่มการทดลอง 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มควบคุม กลุ่มทดสอบที่ 1 คือหนูที่ได้รับยา Omeprazole เป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์ และกลุ่มทดสอบที่ 2 คือหนูที่ได้รับยา Omeprazole เป็นระยะเวลา 24 สัปดาห์ ด้วย ESI-QTOF MS/MS

จากการศึกษา TRPM6 sequencing protein พบว่า โปรตีน TRPM6 ในลำไส้ส่วน duodenum ของกลุ่มตัวอย่างทั้ง 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มควบคุม กลุ่มที่ได้รับยา Omeprazole 12 สัปดาห์ และกลุ่มที่ได้รับยา Omeprazole 24 สัปดาห์ สามารถตรวจสอบได้ตรงกับฐานข้อมูลของ TRPM6 ทั้งหมด 3 species ได้แก่ Human (Q9BX84), Non-specific S/T Protein kinase rat (F1M7G0) และ Mouse (Q8CIR4) โดยเทียบเฉลี่ยเป็นร้อยละ ได้ 98-99% ดังที่แสดงในตารางที่ 2 เช่นเดียวกับ โปรตีน TRPM6 ในลำไส้ส่วน jejunum กลุ่มตัวอย่างทั้ง 3 กลุ่ม สามารถตรวจสอบได้ตรงกับฐานข้อมูลของ TRPM6 ทั้งหมด 3 species เช่นเดียวกัน ได้แก่ Human (Q9BX84), Non-specific S/T Protein kinase rat (F1M7G0) และ Mouse (Q8CIR4) โดยเทียบเฉลี่ยเป็นร้อยละ ได้ 99-100% ดังที่แสดงในตารางที่ 3

ในขณะเดียวกัน ในการศึกษา TRPM7 sequencing protein พบว่า โปรตีน TRPM7 ในลำไส้ส่วน duodenum ของกลุ่มตัวอย่างทั้ง 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มควบคุม กลุ่มที่ได้รับยา Omeprazole 12 สัปดาห์ และกลุ่มที่ได้รับยา Omeprazole 24 สัปดาห์ สามารถตรวจสอบได้ตรงกับฐานข้อมูลของ TRPM7 ทั้งหมด 3 species ได้แก่ Human (Q96QT4), Rat (Q925B3) และ Mouse (Q923J1) โดยเทียบเฉลี่ยเป็นร้อยละ ได้ 99-100% ดังที่แสดงในตารางที่ 4 เช่นเดียวกับ โปรตีน TRPM6 ในลำไส้ส่วน jejunum กลุ่มตัวอย่างทั้ง 3 กลุ่ม สามารถตรวจสอบได้ตรงกับฐานข้อมูลของ TRPM6 ทั้งหมด 3 species เช่นเดียวกัน ได้แก่ Human (Q96QT4), Rat (Q925B3) และ Mouse (Q923J1) โดยเทียบเฉลี่ยเป็นร้อยละ ได้ 99-100% ดังที่แสดงในตารางที่ 5

ผลจากการศึกษานี้สามารถยืนยันการแสดงออกของ TRPM6 และ TRPM7 ในลำไส้ส่วน duodenum และ jejunum ได้ และเป็นหลักฐานสำคัญที่บ่งชี้ให้เห็นว่า ในลำไส้ทั้ง 2 ส่วนนี้ มีการดูดซึมแมกนีเซียมผ่านกลไก active transport โดยอาศัยโปรตีนตัวสำคัญ 2 ตัว ได้แก่ TRPM6 และ TRPM7

ตารางที่ 2 ตารางแสดงร้อยละการเหมือนกันของ Sequence protein ของโปรตีน TRPM6 ในกลุ่มตัวอย่าง ทั้ง 3 กลุ่ม ของลำไส้ส่วน duodenum กับฐานข้อมูล

กลุ่มการทดลอง	species	% Matching
Peptide ในลำไส้ส่วน duodenum ของหนูกลุ่มควบคุม	Human (Q9BX84)	98%
	Non-specific S/T Protein kinase rat (F1M7G0)	99%
	Mouse (Q8CIR4)	99%
Peptide ในลำไส้ส่วน duodenum ของหนูกลุ่มที่ได้รับยา Omeprazole 12 สัปดาห์	Human (Q9BX84)	98%
	Non-specific S/T Protein kinase rat (F1M7G0)	99%
	Mouse (Q8CIR4)	99%
Peptide ในลำไส้ส่วน duodenum ของหนูกลุ่มที่ได้รับยา Omeprazole 24 สัปดาห์	Human (Q9BX84)	98%
	Non-specific S/T Protein kinase rat (F1M7G0)	99%
	Mouse (Q8CIR4)	99%

ตารางที่ 3 ตารางแสดงร้อยละการเหมือนกันของ Sequence protein ของโปรตีน TRPM6 ในกลุ่มตัวอย่าง ทั้ง 3 กลุ่ม ของลำไส้ส่วน jejunum กับฐานข้อมูล

กลุ่มการทดลอง	species	% Matching
Peptide ในลำไส้ส่วน jejunum ของหนูกลุ่มควบคุม	Human (Q9BX84)	99%
	Non-specific S/T Protein kinase rat (F1M7G0)	100%
	Mouse (Q8CIR4)	99%
Peptide ในลำไส้ส่วน jejunum ของหนูกลุ่มที่ได้รับยา Omeprazole 12 สัปดาห์	Human (Q9BX84)	99%
	Non-specific S/T Protein kinase rat (F1M7G0)	99%
	Mouse (Q8CIR4)	99%
Peptide ในลำไส้ส่วน jejunum ของหนูกลุ่มที่ได้รับยา Omeprazole 12 สัปดาห์	Human (Q9BX84)	99%
	Non-specific S/T Protein kinase rat (F1M7G0)	99%
	Mouse (Q8CIR4)	99%

ตารางที่ 4 ตารางแสดงร้อยละการเหมือนกันของ Sequence protein ของโปรตีน TRPM7 ในกลุ่มตัวอย่าง ทั้ง 3 กลุ่ม ของลำไส้ส่วน duodenum กับฐานข้อมูล

กลุ่มการทดลอง	species	% Matching
Peptide ใน ลำไส้ส่วน duodenum ของหนูกลุ่มควบคุม	Human (Q96QT4)	99%
	Rat (Q925B3)	100%
	Mouse (Q923J1)	100%
Peptide ใน ลำไส้ส่วน duodenum ของหนูกลุ่มที่ได้รับยา Omeprazole 12 สัปดาห์	Human (Q96QT4)	100%
	Rat (Q925B3)	100%
	Mouse (Q923J1)	100%
Peptide ใน ลำไส้ส่วน duodenum ของหนูกลุ่มที่ได้รับยา Omeprazole 24 สัปดาห์	Human (Q96QT4)	99%
	Rat (Q925B3)	99%
	Mouse (Q923J1)	99%

ตารางที่ 5 ตารางแสดงร้อยละการเหมือนกันของ Sequence protein ของโปรตีน TRPM7 ในกลุ่มตัวอย่าง ทั้ง 3 กลุ่ม ของลำไส้ส่วน jejunum กับฐานข้อมูล

กลุ่มการทดลอง	species	% Matching
Peptide ในลำไส้ส่วน jejunum ของหนูกลุ่มควบคุม	Human (Q96QT4)	100%
	Rat (Q925B3)	100%
	Mouse (Q923J1)	100%
Peptide ในลำไส้ส่วน jejunum ของหนูกลุ่มที่ได้รับยา Omeprazole 12 สัปดาห์	Human (Q96QT4)	99%
	Rat (Q925B3)	99%
	Mouse (Q923J1)	99%
Peptide ในลำไส้ส่วน jejunum ของหนูกลุ่มที่ได้รับยา Omeprazole 12 สัปดาห์	Human (Q96QT4)	100%
	Rat (Q925B3)	100%
	Mouse (Q923J1)	100%

4.1.5.1 การศึกษาจำนวนของ Peptide หรือปริมาณโปรตีนที่ตรวจจับได้โดยการคำนวณด้วยค่า

Exponentially modified protein abundance index (emPAI)

จำนวนของ Peptide หรือปริมาณโปรตีนที่ตรวจจับได้สามารถคำนวณด้วยค่า Exponentially modified protein abundance index (emPAI) ได้ จากสูตร

$$emPAI = 10^{\frac{N_{observed}}{N_{observable}}} - 1$$

จากการศึกษาพบว่า ในกลุ่มการทดลองที่ทดสอบหา Peptide ในลำไส้ส่วน duodenum จะมีค่า emPAI หรือค่าที่แสดงจำนวนของ Peptide ที่ตรวจจับได้ มีความใกล้เคียงกัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่มการทดลองที่ทดสอบหา Peptide ในลำไส้ส่วน duodenum ของหนูกลุ่มหนูที่ได้รับยา Omeprazole นาน 24 สัปดาห์ คือมีค่า emPAI เท่ากับ 0.10 เท่ากันดังที่แสดงในตารางที่ 6 แต่ในขณะเดียวกันกลับพบว่า กลุ่มการทดลองที่ทดสอบหา Peptide ในลำไส้ส่วน jejunum ในกลุ่มของหนูที่ได้รับยา Omeprazole นาน 12 และ 24 สัปดาห์ มีค่า emPAI มากกว่ากลุ่มควบคุม คือ 0.11, 0.14 และ 0.23 ตามลำดับ ดังที่แสดงในตารางที่ 7 แสดงให้เห็นว่า ในกลุ่มการทดลองหาจำนวน Peptide ในลำไส้ส่วน duodenum นั้น มีปริมาณของจำนวน Peptide ใกล้เคียงกัน จากนั้นเมื่อทำการศึกษาการแสดงออกของ Phosphorylation site ของโปรตีน TRPM6 ในลำไส้ส่วน Duodenum พบว่า ในกลุ่มของหนูที่ได้รับยา Omeprazole นาน 12 สัปดาห์นั้นมีการขาดหายไปหรือไม่สามารถตรวจจับได้ของ peptide ในส่วนบริเวณ ของ N-terminus บางตำแหน่ง ซึ่งการขาดหายในตำแหน่งเหล่านี้ไม่ส่งผลต่อการทำงานของโปรตีน แต่ในขณะเดียวกันกลับพบว่า การแสดงออกของ Phosphorylation site ของโปรตีน TRPM6 ในลำไส้ส่วน TRPM6 พบว่า ในกลุ่มของหนูที่ได้รับยา Omeprazole นาน 24 สัปดาห์ นอกจากมีการขาดหายไปหรือไม่สามารถตรวจจับได้ของ peptide บริเวณในส่วนของ N-terminus แล้ว ก็ยังพบการขาดหายไปหรือไม่สามารถตรวจจับได้ของ peptide ในส่วนบริเวณของ α -kinase domain ตั้งแต่ในตำแหน่ง 1814 ถึง 1838 ดังที่แสดงในภาพที่ 20 โดยในตำแหน่งนี้มี Phosphorylation site ที่เป็น serine/threonine คือ S1821T ซึ่งอาจจะเป็นตำแหน่ง Phosphorylation site ที่สำคัญต่อการทำงานของโปรตีน นอกจากนี้ เป็นที่น่าสังเกต หากเทียบกับค่า emPAI ที่เป็นค่าที่สามารถบอกจำนวนของ Peptide ที่ตรวจจับได้นั้น แสดงให้เห็นว่าจำนวน Peptide ในลำไส้ส่วน duodenum มีจำนวนที่ใกล้เคียงกัน หรือเท่ากันของหนูกลุ่มที่ได้รับยา Omeprazole เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม แต่กลับมีการแสดงออกของ Peptide ที่ขาดหายไปหรือตรวจจับไม่ได้ในกลุ่มที่ได้รับยา Omeprazole นาน 24 สัปดาห์ อาจเป็นไปได้ว่า โปรตีน

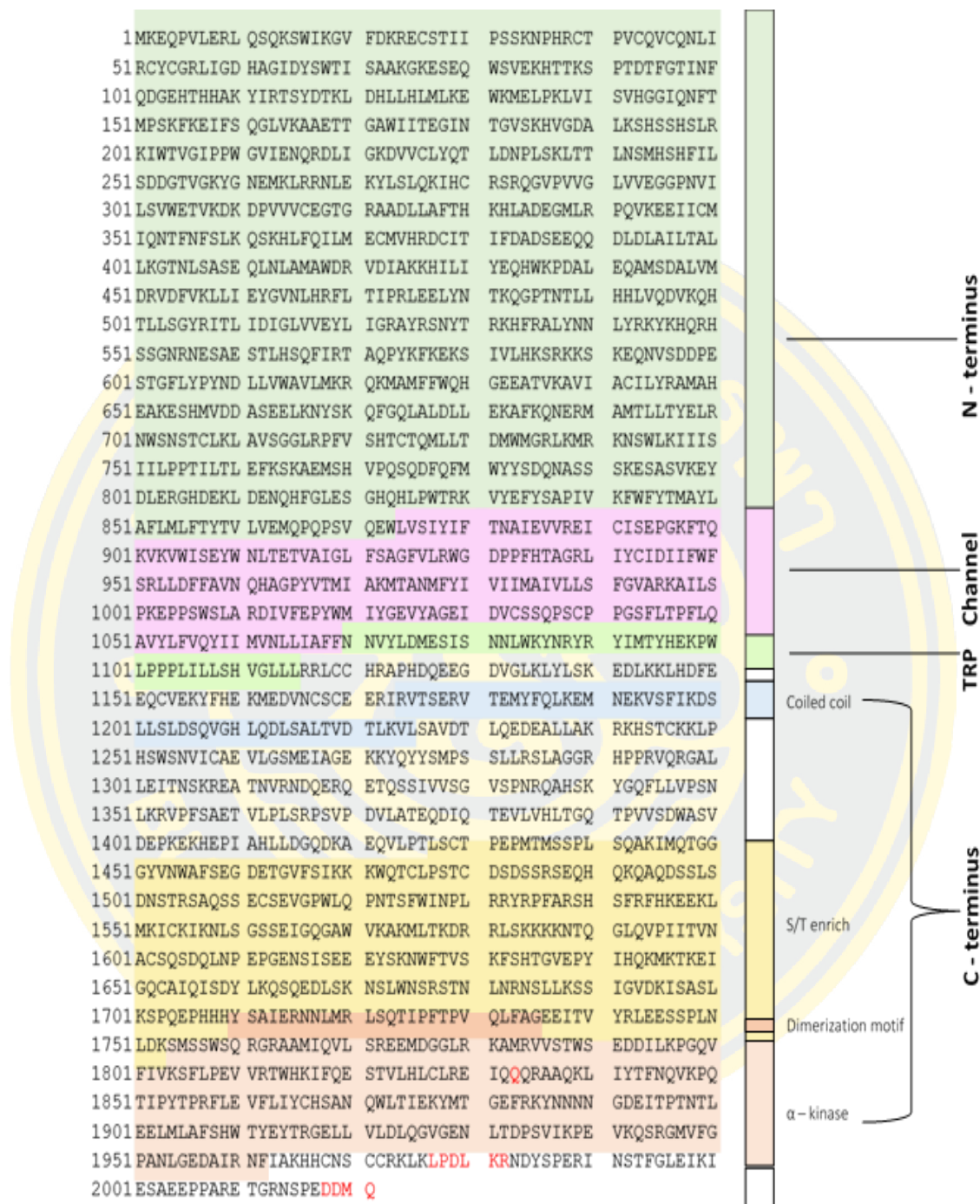
TRPM6 ในลำไส้ duodenum ของหนูในกลุ่มที่ได้รับยา Omeprazole มีโปรตีนบางจำนวนที่มีความผิดปกติของสาย Peptide ซึ่งเมื่อทำการย่อย peptide แล้วพบการขาดหายไป หรือไม่สามารถตรวจจับ Peptide ได้ นั่นอาจอนุมานได้ว่า เกิดความผิดปกติบางอย่าง เช่น การกลายพันธุ์ หรือการเปลี่ยนแปลงไปของกรดอะมิโนในตำแหน่งดังกล่าว ทำให้ส่งผลต่อการทำงานของโปรตีน TRPM6 ต่อการดูดซึมแมกนีเซียมในลำไส้ส่วน duodenum ของหนูกลุ่มที่ได้รับยา Omeprazole นาน 24 สัปดาห์ ในขณะที่เดียวกัน ในลำไส้ส่วน jejunum มีจำนวนของ Peptide ที่สามารถตรวจจับได้มากขึ้นในกลุ่มของหนูที่ได้รับยา Omeprazole ทั้ง 2 กลุ่ม และไม่พบความผิดปกติของ Phosphorylation site ในตำแหน่งที่สำคัญ อาจบ่งชี้ได้ว่าโปรตีน TRPM6 ในลำไส้ jejunum มีความปกติมากกว่า ในลำไส้ส่วน duodenum เนื่องจาก peptide ที่ย่อยได้จากลำไส้ส่วนนี้ สามารถถูกตรวจจับได้ดีกว่ากลุ่ม duodenum หรือเทียบกับกลุ่มควบคุมของลำไส้ส่วน jejunum

ตารางที่ 6 แสดงค่า *emPAI* ของ Peptide ในลำไส้ส่วน duodenum ที่ได้จากการศึกษาโดยใช้เทคนิค ESI-QTOF MS/MS ที่คำนวณได้จากโปรแกรม Mascot search result (Matrix Science)

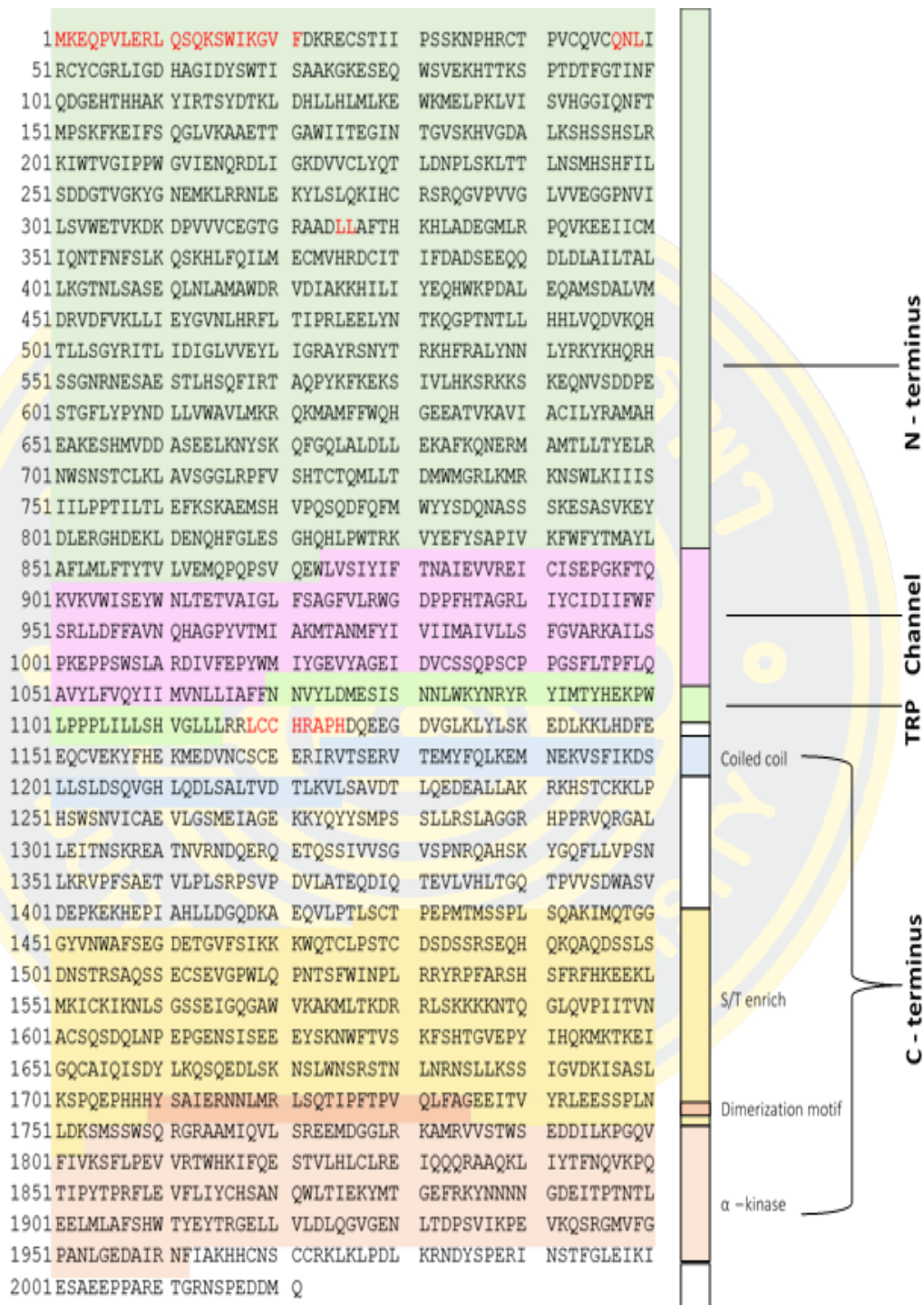
กลุ่มการทดลอง	ค่า <i>emPAI</i>
1. Peptide ในลำไส้ส่วน duodenum ของหนูกลุ่มควบคุม	0.10
2. Peptide ในลำไส้ส่วน duodenum ของหนูกลุ่มที่ได้รับยา Omeprazole นาน 12 สัปดาห์	0.12
3. Peptide ในลำไส้ส่วน duodenum ของหนูกลุ่มที่ได้รับยา Omeprazole นาน 24 สัปดาห์	0.10

ตารางที่ 7 แสดงค่า *emPAI* ของ Peptide ในลำไส้ส่วน jejunum ที่ได้จากการศึกษาโดยใช้เทคนิค ESI-QTOF MS/MS ที่คำนวณได้จากโปรแกรม Mascot search result (Matrix Science)

กลุ่มการทดลอง	ค่า <i>emPAI</i>
1. Peptide ในลำไส้ส่วน jejunum ของหนูกลุ่มควบคุม	0.11
2. Peptide ในลำไส้ส่วน jejunum ของหนูกลุ่มที่ได้รับยา Omeprazole นาน 12 สัปดาห์	0.14
3. Peptide ในลำไส้ส่วน jejunum ของหนูกลุ่มที่ได้รับยา Omeprazole นาน 24 สัปดาห์	0.23

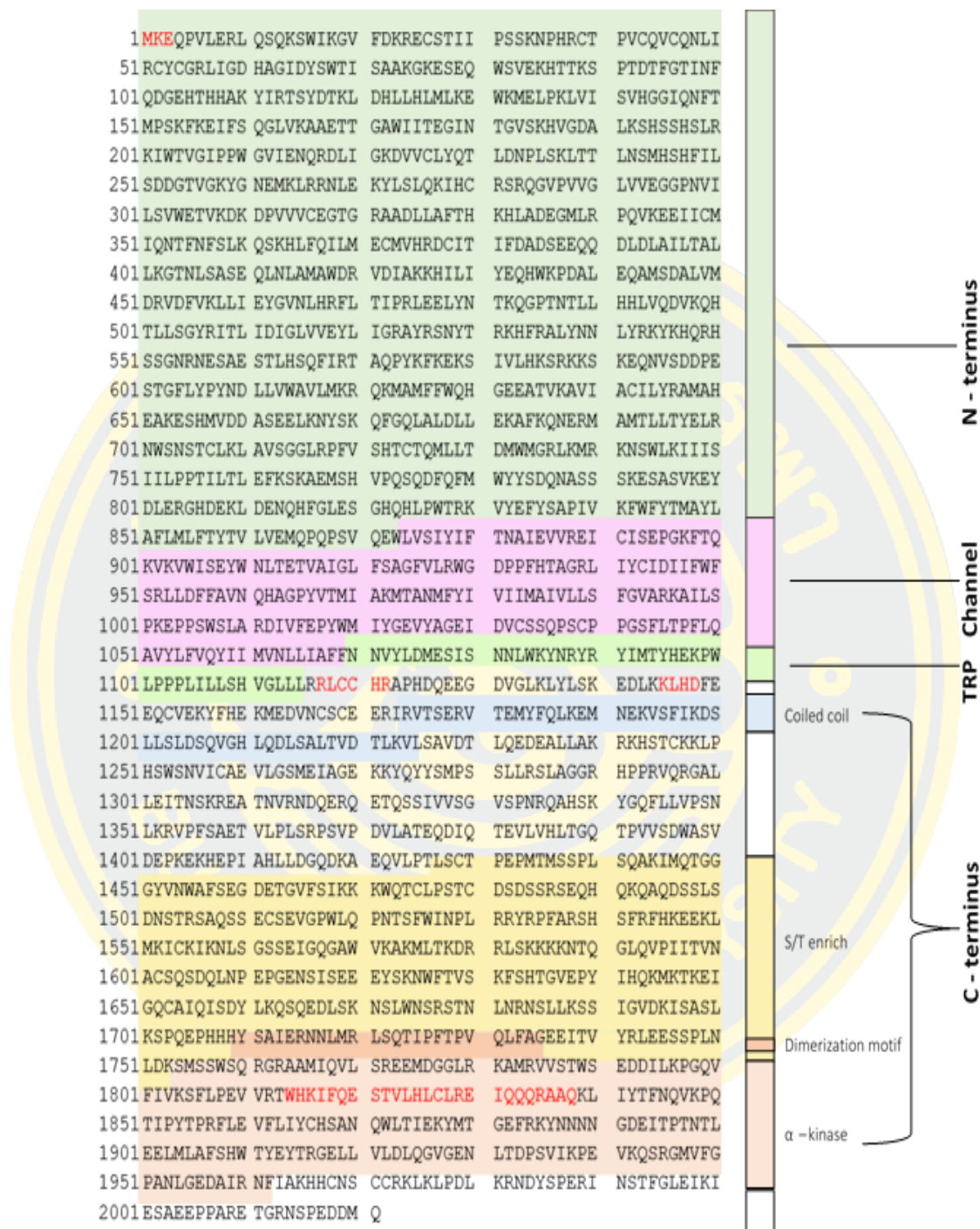


ภาพที่ 18 แสดง Protein sequencing ของโปรตีน TRPM6 ของหนูกลุ่มควบคุม ที่ทำการศึกษาด้วยวิธี LC-ESI-QTOF MS/MS โดยเทียบข้อมูลในฐานข้อมูล SwitProt MassCott Uniprot (Q9BX84/TRPM6_HUMAN)



ภาพที่ 19 แสดง Protein sequencing ของโปรตีน TRPM6 ของหนูกลุ่มที่ได้รับยา Omeprazole นาน 12 สัปดาห์

ที่ทำการศึกษาด้วยวิธี LC-ESI-QTOF MS/MS โดยเทียบข้อมูลในฐานข้อมูล SwitProt MassCott Uniprot (Q9BX84/TRPM6_HUMAN)



ภาพที่ 20 แสดง Protein sequencing ของโปรตีน TRPM6 ของหนูกลุ่มที่ได้รับยา Omeprazole นาน 24 สัปดาห์

ที่ทำการศึกษาด้วยวิธี LC-ESI-QTOF MS/MS โดยเทียบข้อมูลในฐานข้อมูล SwitProt MassCott Uniprot (Q9BX84/TRPM6_HUMAN)

4.1.5.2 การศึกษา Peptide base peak

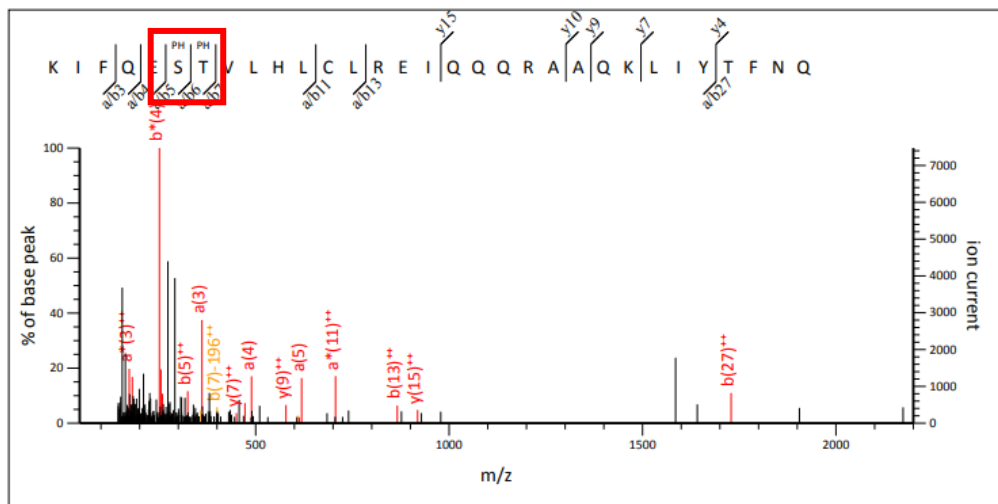
จากผลการศึกษาการแสดงผลของ Phosphorylation site พบว่า มีการขาดหายไปของ peptide บางตำแหน่ง จึงนำมาสู่การศึกษา Peptide base peak เพื่อบ่งชี้การทำงานของ โปรตีน TRPM6 ในลำไส้ ทั้ง 2 ส่วน ได้แก่ duodenum และ jejunum ในกลุ่มการทดลองทั้ง 3 กลุ่ม คือ กลุ่มควบคุม กลุ่มที่ได้รับยา Omeprazole นาน 12 สัปดาห์ และ กลุ่มที่ได้รับยา Omeprazole นาน 24 สัปดาห์ โดยได้ทำการศึกษา Peptide base peak ในตำแหน่งที่หายไป คือ ตำแหน่ง 1814 ถึง 1838 และ ทำการศึกษา Peptide base peak ในตำแหน่งที่ T1851I ที่เป็นตำแหน่งที่สามารถเกิด autophosphorylation ได้ รวมถึงทำการศึกษา Peptide base peak ในตำแหน่ง Dimerization motif

การศึกษาการแสดงผลของ Peptide base peak ในตำแหน่งที่หายไป คือ ตำแหน่ง 1814 ถึง 1838 พบว่า ในลำไส้ ส่วน duodenum ของหนูกลุ่มที่ได้รับยา Omeprazole 12 และ 24 สัปดาห์ พบการขาดหายไปในส่วนบางส่วนของ Base peak peptide ในตำแหน่ง 1821 โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่มที่ได้รับยา Omeprazole นาน 24 สัปดาห์ มีการขาดหายไปถึง 2 ตำแหน่ง ที่อาจเป็น Phosphorylation site ที่สำคัญ ดังที่แสดงในภาพที่ 21 ถึง ภาพที่ 23

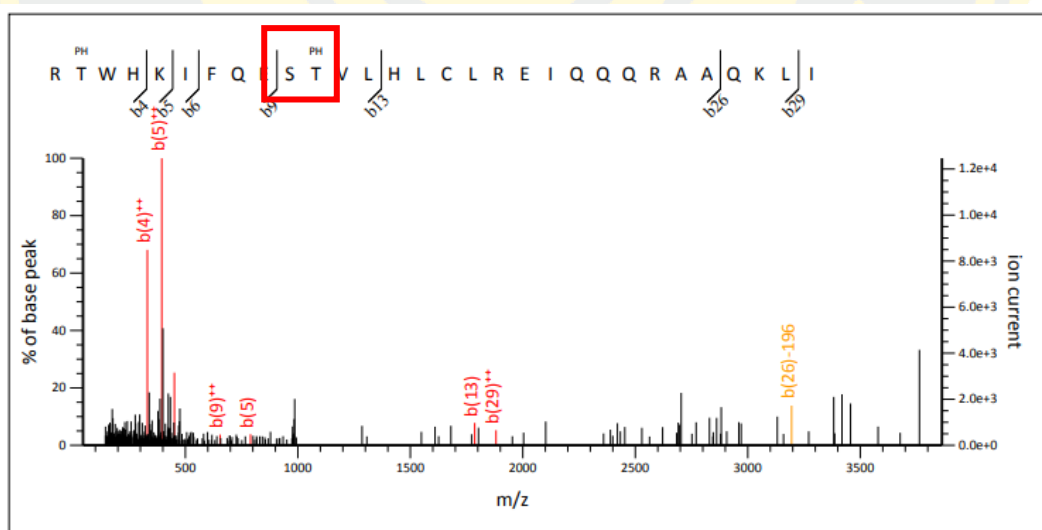
ในขณะที่ลำไส้ jejunum นั้นยังสามารถพบการแสดงผลของ Base peak peptide ตำแหน่งดังกล่าวได้ในหนูกลุ่มที่ได้รับยา Omeprazole ทั้ง 2 กลุ่ม และกลุ่มควบคุม โดยอาจบ่งชี้ได้ว่า protein TRPM6 ในลำไส้ส่วน jejunum มีความปกติมากกว่าในลำไส้ส่วน duodenum จึงสามารถตรวจจับการแสดงผลของ Peptide base peak และ Phosphorylation site ได้ครบทุกตำแหน่ง ดังที่แสดงในภาพที่ 24 ถึง ภาพที่ 26

การศึกษาการแสดงผลของ Peptide base peak ที่ตำแหน่ง 1851 ซึ่งเป็นตำแหน่ง Autophosphorylation ที่สามารถกระตุ้นให้เกิด Phosphorylation และเกิดการ Interact กับ RACK1 ในเซลล์ โดยส่งผลต่อการลดการทำงานของ TRPM6 ในการลดความไวของ TRPM6 ต่อ Mg^{2+} โดยการศึกษาในลำไส้ duodenum พบว่า ในกลุ่มของหนูที่ได้รับยา Omeprazole ทั้ง 12 และ 24 สัปดาห์ มีการแสดงผลของ Phosphorylation ที่ตำแหน่ง 1851 แต่ในขณะเดียวกันในกลุ่มควบคุมกับไม่พบการแสดงผลของ Phosphorylation ที่ตำแหน่งดังกล่าว ดังที่แสดงในภาพที่ 27 ถึง ภาพที่ 29 เช่นเดียวกับการศึกษาในลำไส้ส่วน jejunum ที่พบว่า มีการเกิด phosphorylation ที่ ตำแหน่ง 1851 ในกลุ่มของหนูที่ได้รับยา Omeprazole ทั้ง 12 และ 24 สัปดาห์ แต่ไม่ปรากฏการแสดงผลของ phosphorylation ที่ ตำแหน่ง 1851 ในกลุ่มควบคุม ดังที่แสดงในภาพที่ 30 ถึง 32

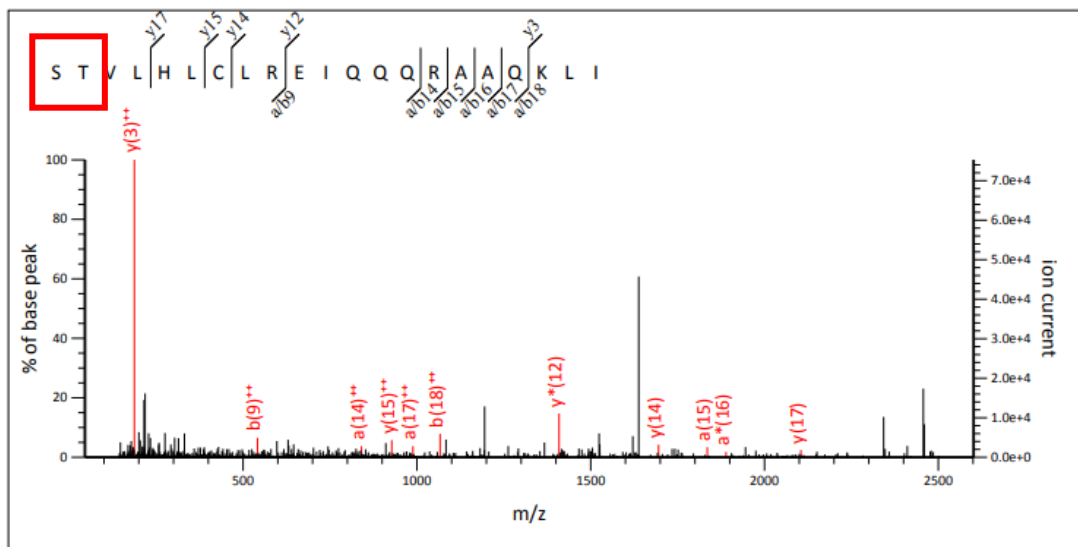
การศึกษาการแสดงออกของ Peptide base peak ที่ตำแหน่ง Dimerization motif พบว่า ในลำไส้ duodenum ของหนูกลุ่มที่ได้รับยา Omeprazole ทั้ง 12 และ 24 สัปดาห์ ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของ Peptide base peak เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม แต่มีการแสดงออกของ Oxidation methionine เพิ่มมากขึ้นในหนูกลุ่มที่ได้รับยา Omeprazole ทั้ง 2 กลุ่ม โดยเฉพาะ กลุ่มที่ได้รับยา Omeprazole นาน 24 สัปดาห์ ในขณะที่ในกลุ่มควบคุมมีการแสดงออกของ Oxidation ของ methionine ในลำไส้ส่วน duodenum น้อยกว่า ดังที่แสดงในภาพที่ 33 ถึง ภาพที่ 35 เช่นเดียวกับในลำไส้ส่วน jejunum พบว่า ในลำไส้ duodenum ของหนูกลุ่มที่ได้รับยา Omeprazole ทั้ง 12 และ 24 สัปดาห์ ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของ Peptide base peak เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม แต่มีการแสดงออกของ Oxidation ของ ตำแหน่งที่เป็น methionine เพิ่มมากขึ้นในหนูกลุ่มที่ได้รับยา Omeprazole ทั้ง 2 กลุ่ม โดยเฉพาะ กลุ่มที่ได้รับยา Omeprazole นาน 24 สัปดาห์ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ดังที่แสดงในภาพที่ 36 ถึง ภาพที่ 38 แต่อย่างไรก็ตาม ผลของการเกิด Oxidation รวมถึงตำแหน่งที่เกิด Phosphorylation บนสาย Peptide ยังต้องได้รับการสังเกตและวิเคราะห์ในลำดับเบสทั้งหมด เพื่อให้ทราบถึงสาเหตุของการทำงานที่ผิดปกติของโปรตีนดังนั้นผู้วิจัยจึงได้ทำการวิเคราะห์ตำแหน่งการเกิด Phosphorylation และการเกิด Oxidation บน สายเบสเปปไทด์ ในการศึกษาในขั้นตอนต่อไป



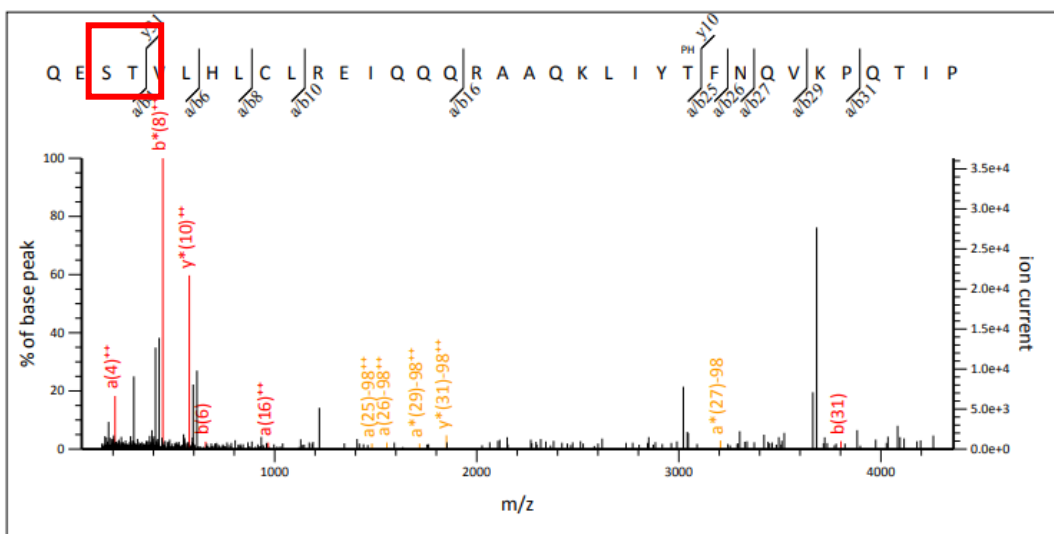
ภาพที่ 21 แสดง peptide base peak ของโปรตีน TRPM6 ตำแหน่งที่มีการขาดหายไป ในลำไส้ส่วน duodenum ของกลุ่มควบคุม
 ทำการศึกษาด้วยวิธี LC-ESI-QTOF MS/MS โดยเทียบข้อมูลในฐานข้อมูล SwitProt MassCott Uniprot (Q9BX84/TRPM6_HUMAN) โดยแสดงตำแหน่งของ TRPM6 peptide base peak ใน fragment ตำแหน่งที่ K1816-1846Q



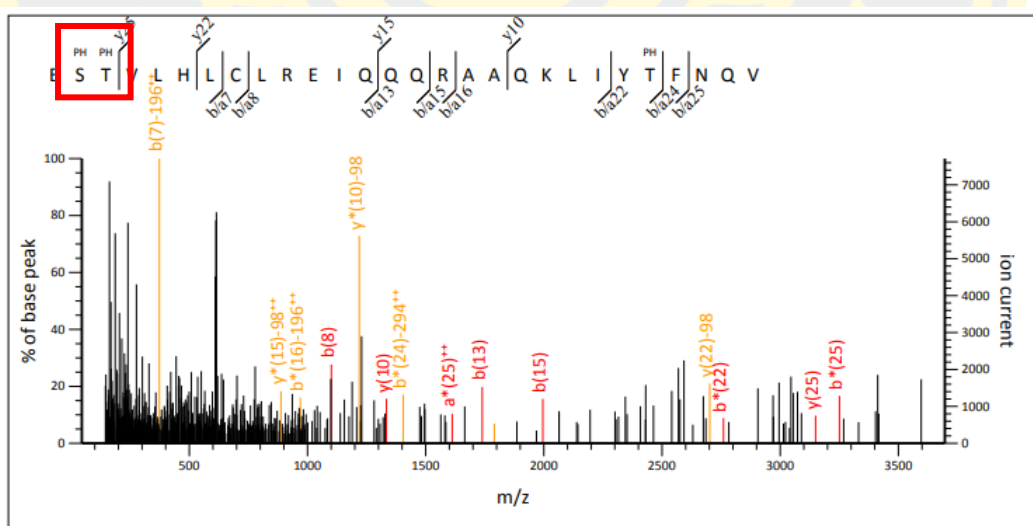
ภาพที่ 22 แสดง peptide base peak ของโปรตีน TRPM6 ตำแหน่งที่มีการขาดหายไป ในลำไส้ส่วน duodenum ของกลุ่มหนูที่ได้รับยา Omeprazole นาน 12 สัปดาห์
 ทำการศึกษาด้วยวิธี LC-ESI-QTOF MS/MS โดยเทียบข้อมูลในฐานข้อมูล SwitProt MassCott Uniprot (Q9BX84/TRPM6_HUMAN) โดยแสดงตำแหน่งของ TRPM6 peptide base peak ใน fragment ตำแหน่งที่ R1812-1841I



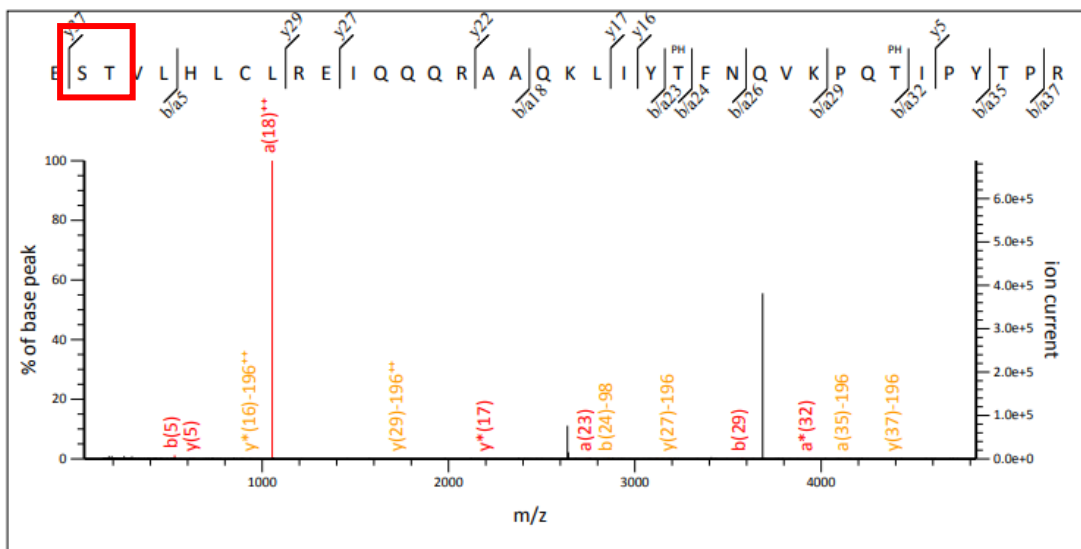
ภาพที่ 23 แสดง peptide base peak ของโปรตีน TRPM6 ตำแหน่งที่มีการขาดหายไป ในลำไส้ส่วน duodenum ของกลุ่มหนูที่ได้รับยา Omeprazole นาน 24 สัปดาห์ ทำการศึกษาด้วยวิธี LC-ESI-QTOF MS/MS โดยเทียบข้อมูลในฐานข้อมูล SwitProt MassCott Uniprot (Q9BX84/TRPM6_HUMAN) โดยแสดงตำแหน่งของ TRPM6 peptide base peak ใน fragment ตำแหน่งที่ S1821-1841I



ภาพที่ 24 แสดง peptide base peak ของโปรตีน TRPM6 ตำแหน่งที่มีการขาดหายไป ในลำไส้ส่วน jejunum ของกลุ่มควบคุม
 ทำการศึกษาด้วยวิธี LC-ESI-QTOF MS/MS โดยเทียบข้อมูลในฐานข้อมูล SwitProt MassCott Uniprot (Q9BX84/TRPM6_HUMAN) โดยแสดงตำแหน่งของ TRPM6 peptide base peak ใน fragment ตำแหน่งที่ Q1819-1853P

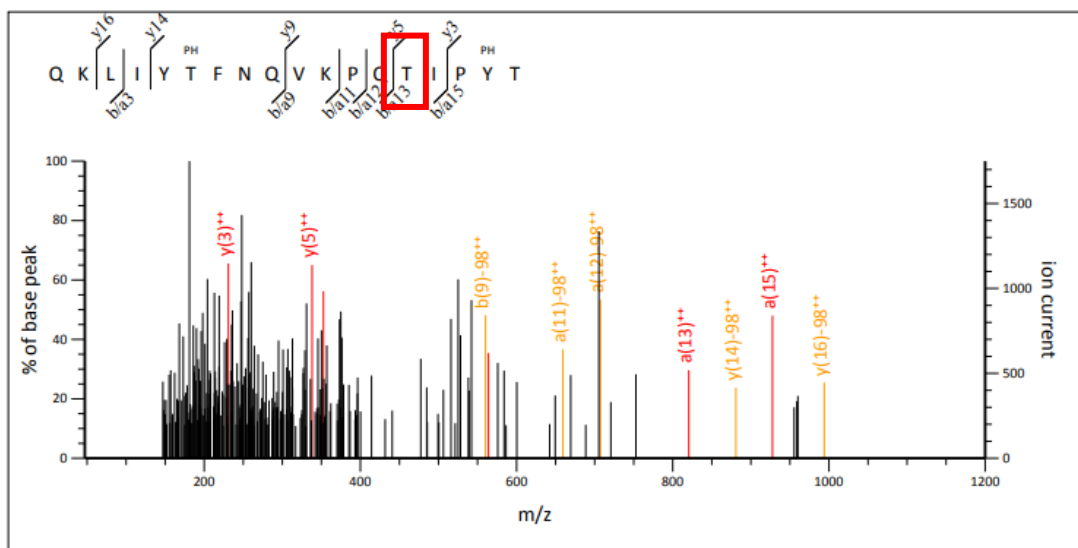


ภาพที่ 25 แสดง peptide base peak ของโปรตีน TRPM6 ตำแหน่งที่มีการขาดหายไป ในลำไส้ส่วน jejunum ของกลุ่มหนูที่ได้รับยา Omeprazole นาน 12 สัปดาห์
 ทำการศึกษาด้วยวิธี LC-ESI-QTOF MS/MS โดยเทียบข้อมูลในฐานข้อมูล SwitProt MassCott Uniprot (Q9BX84/TRPM6_HUMAN) โดยแสดงตำแหน่งของ TRPM6 peptide base peak ใน fragment ตำแหน่งที่ E1820-1847V

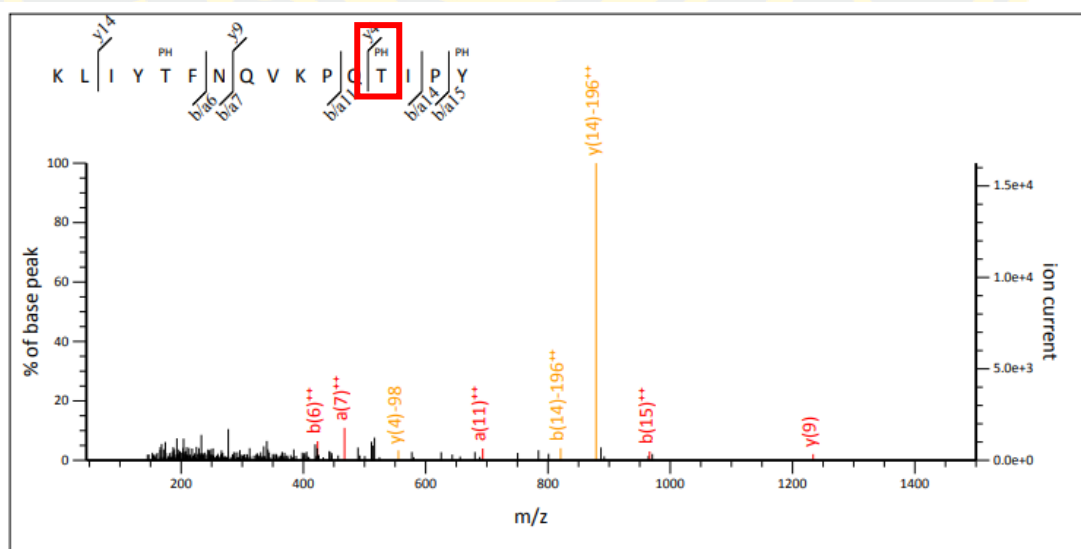


ภาพที่ 26 แสดง peptide base peak ของโปรตีน TRPM6 ตำแหน่งที่มีการขาดหายไป ในลำไส้ส่วน jejunum ของกลุ่มหนูที่ได้รับยา Omeprazole นาน 24 สัปดาห์

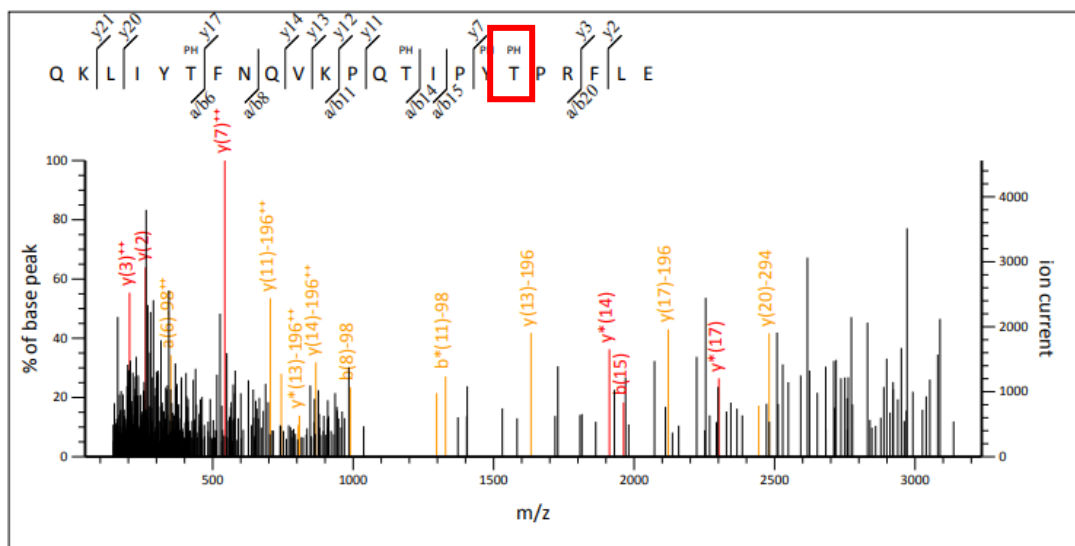
ทำการศึกษาดังวิธี LC-ESI-QTOF MS/MS โดยเทียบข้อมูลในฐานข้อมูล SwitProt MassCott Uniprot (Q9BX84/TRPM6_HUMAN) โดยแสดงตำแหน่งของ TRPM6 peptide base peak ใน fragment ตำแหน่งที่ E1820-1857R



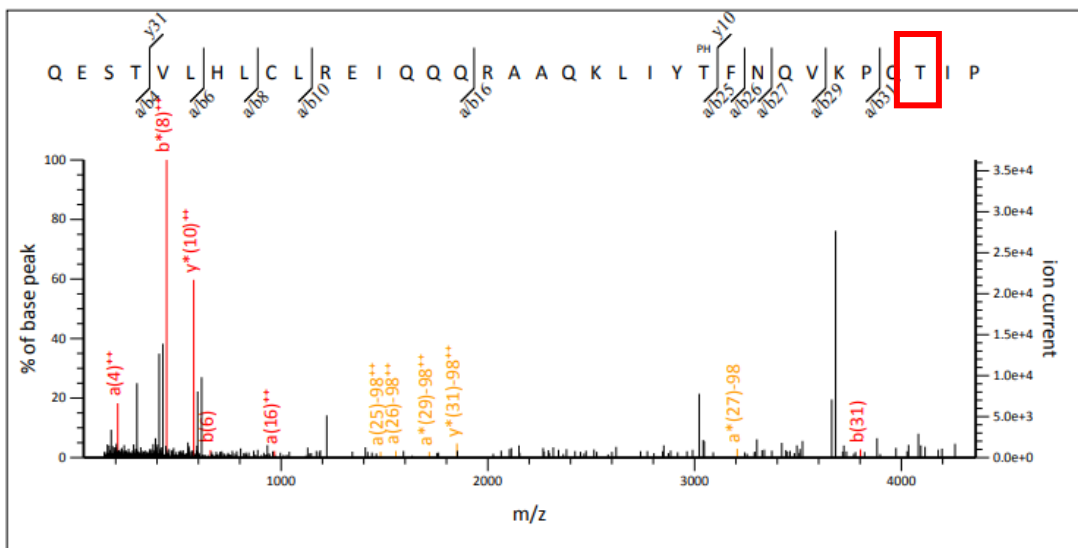
ภาพที่ 27 แสดง peptide base peak ของโปรตีน TRPM6 ตำแหน่งที่ T185I (autophosphorylation) ในลำไส้ส่วน duodenum ของหนูกลุ่มควบคุม ทำการศึกษาด้วยวิธี LC-ESI-QTOF MS/MS โดยเทียบข้อมูลในฐานข้อมูล SwitProt MassCott Uniprot (Q9BX84/TRPM6_HUMAN) โดยแสดงตำแหน่งของ TRPM6 peptide base peak ใน fragment ตำแหน่งที่ Q1838-1855T



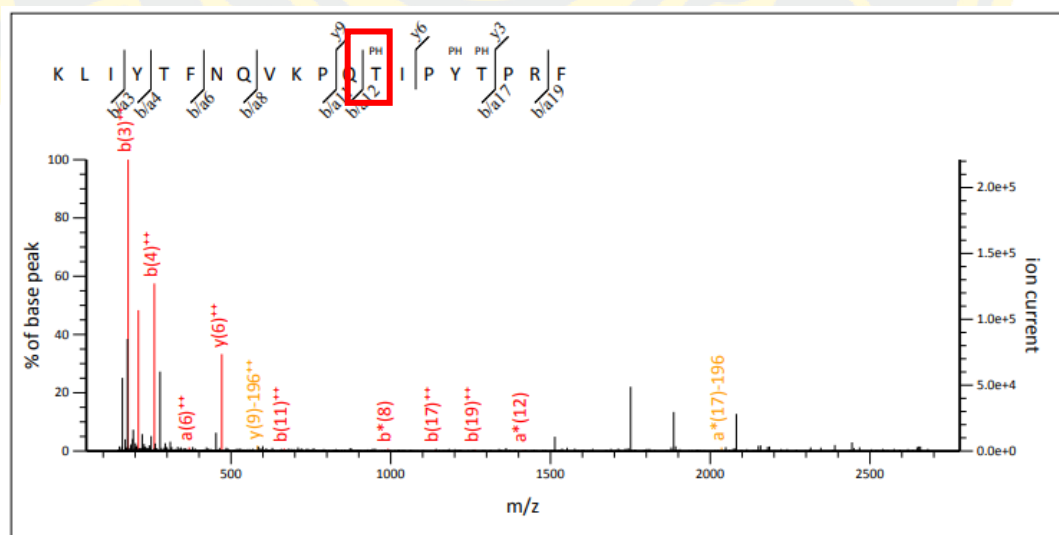
ภาพที่ 28 แสดง peptide base peak ของโปรตีน TRPM6 ตำแหน่งที่ T185I (autophosphorylation) ในลำไส้ส่วน duodenum ของหนูกลุ่มที่ได้รับยา Omeprazole นาน 12 สัปดาห์ ทำการศึกษาด้วยวิธี LC-ESI-QTOF MS/MS โดยเทียบข้อมูลในฐานข้อมูล SwitProt MassCott Uniprot (Q9BX84/TRPM6_HUMAN) โดยแสดงตำแหน่งของ TRPM6 peptide base peak ใน fragment ตำแหน่งที่ K1839-1854Y



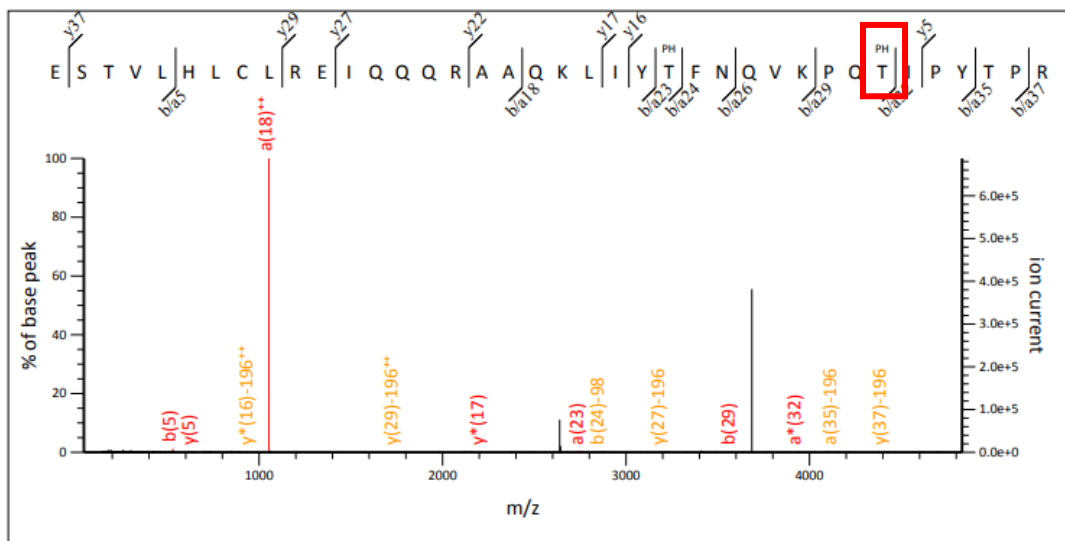
ภาพที่ 29 แสดง peptide base peak ของโปรตีน TRPM6 ตำแหน่งที่ T185I (autophosphorylation) ในลำไส้ส่วน duodenum ของหนูกลุ่มที่ได้รับยา Omeprazole นาน 24 สัปดาห์ ทำการศึกษาด้วยวิธี LC-ESI-QTOF MS/MS โดยเทียบข้อมูลในฐานข้อมูล SwitProt MassCott Uniprot (Q9BX84/TRPM6_HUMAN) โดยแสดงตำแหน่งของ TRPM6 peptide base peak ใน fragment ตำแหน่งที่ Q1838-1860E



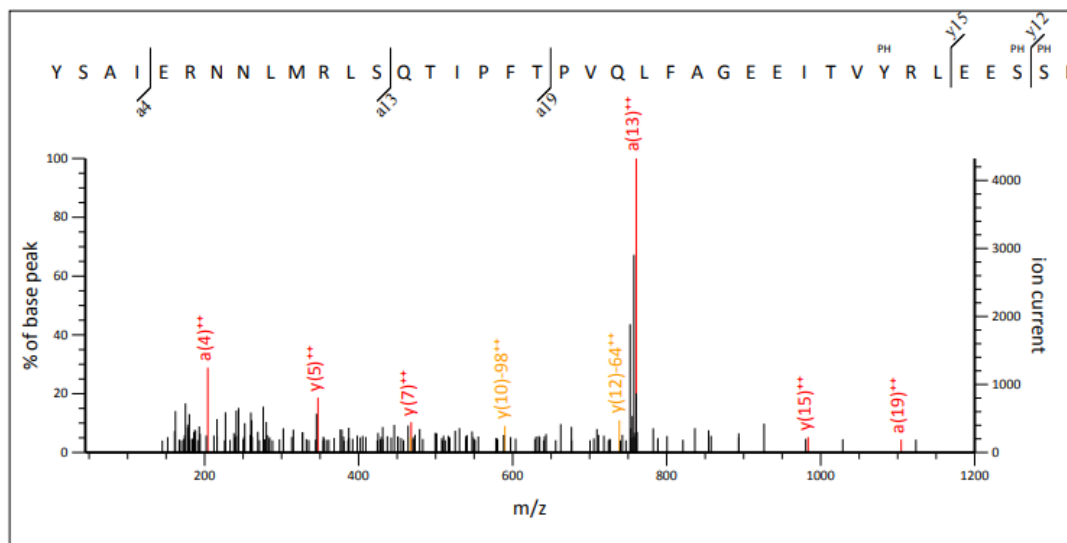
ภาพที่ 30 แสดง peptide base peak ของโปรตีน TRPM6 ตำแหน่งที่ T185II (autophosphorylation) ในลำไส้ส่วน jejunum ของหนูกลุ่มควบคุม ทำการศึกษาด้วยวิธี LC-ESI-QTOF MS/MS โดยเทียบข้อมูลในฐานข้อมูล SwitProt MassCott Uniprot (Q9BX84/TRPM6_HUMAN) โดยแสดงตำแหน่งของ TRPM6 peptide base peak ใน fragment ตำแหน่งที่ Q1819-1853P



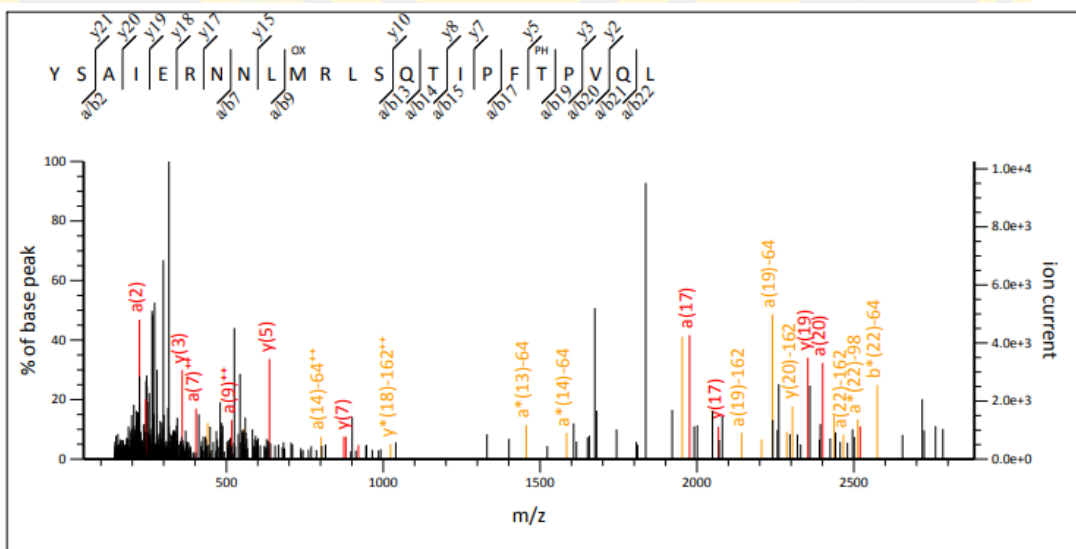
ภาพที่ 31 แสดง peptide base peak ของโปรตีน TRPM6 ตำแหน่งที่ T185II (autophosphorylation) ในลำไส้ส่วน jejunum ของหนูกลุ่มที่ได้รับยา Omeprazole นาน 12 สัปดาห์ ทำการศึกษาด้วยวิธี LC-ESI-QTOF MS/MS โดยเทียบข้อมูลในฐานข้อมูล SwitProt MassCott Uniprot (Q9BX84/TRPM6_HUMAN) โดยแสดงตำแหน่งของ TRPM6 peptide base peak ใน fragment ตำแหน่งที่ K1839-1858F



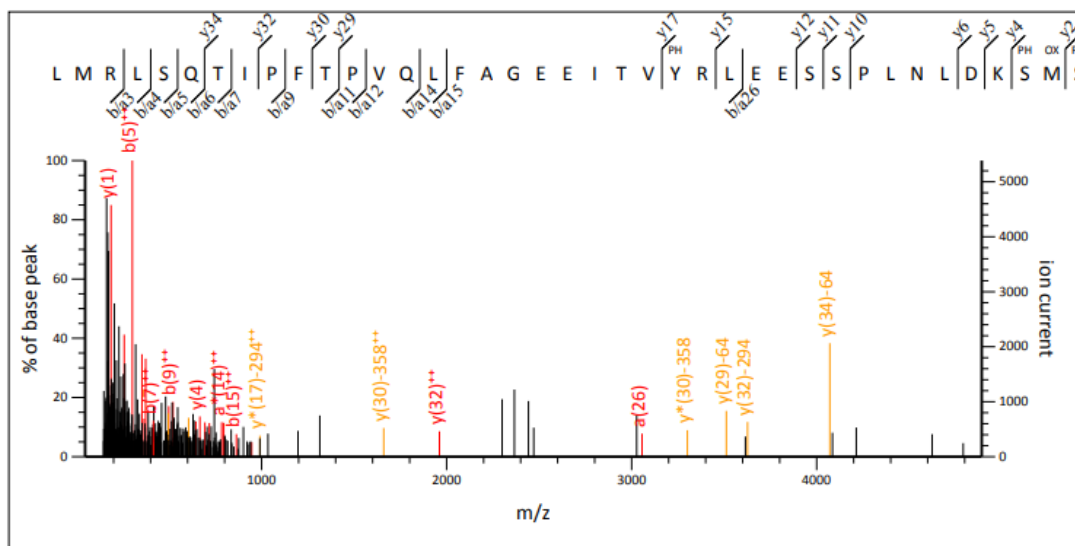
ภาพที่ 32 แสดง peptide base peak ของโปรตีน TRPM6 ตำแหน่งที่ T185I (autophosphorylation) ในลำไส้ส่วน jejunum ของหนูกลุ่มที่ได้รับยา Omeprazole นาน 24 สัปดาห์ ทำการศึกษาด้วยวิธี LC-ESI-QTOF MS/MS โดยเทียบข้อมูลในฐานข้อมูล SwitProt MassCott Uniprot (Q9BX84/TRPM6_HUMAN) โดยแสดงตำแหน่งของ TRPM6 peptide base peak ใน fragment ตำแหน่งที่ E1820-1857R



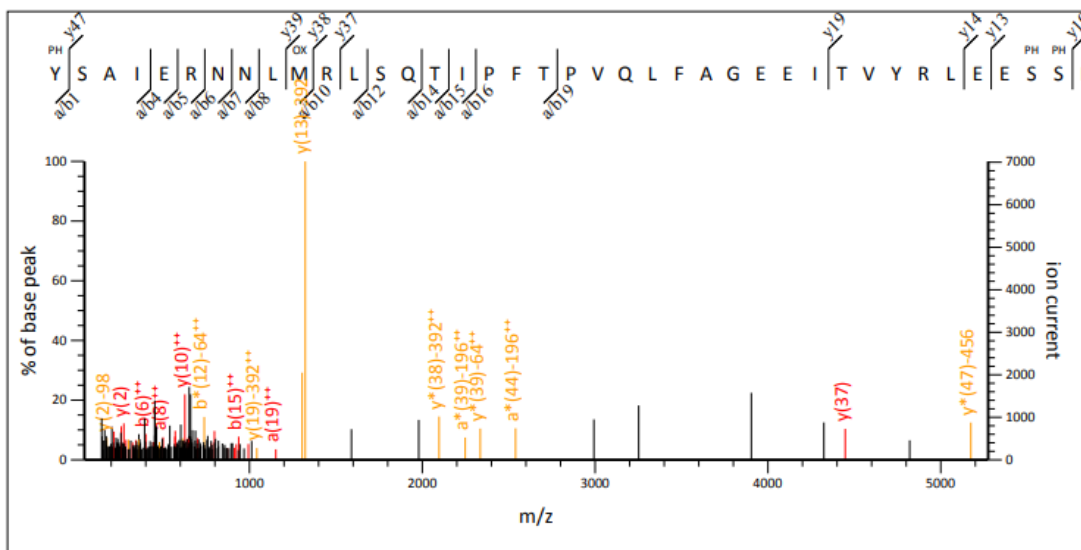
ภาพที่ 33 แสดง peptide base peak ของโปรตีน TRPM6 ตำแหน่ง Dimerization motif ในลำไส้ส่วน duodenum ของหนูกลุ่มควบคุม ทำการศึกษาด้วยวิธี LC-ESI-QTOF MS/MS โดยเทียบข้อมูลในฐานข้อมูล SwitProt MassCott Uniprot (Q9BX84/TRPM6_HUMAN) โดยแสดงตำแหน่งของ TRPM6 peptide base peak ใน fragment ตำแหน่งที่ Y1710-1758P



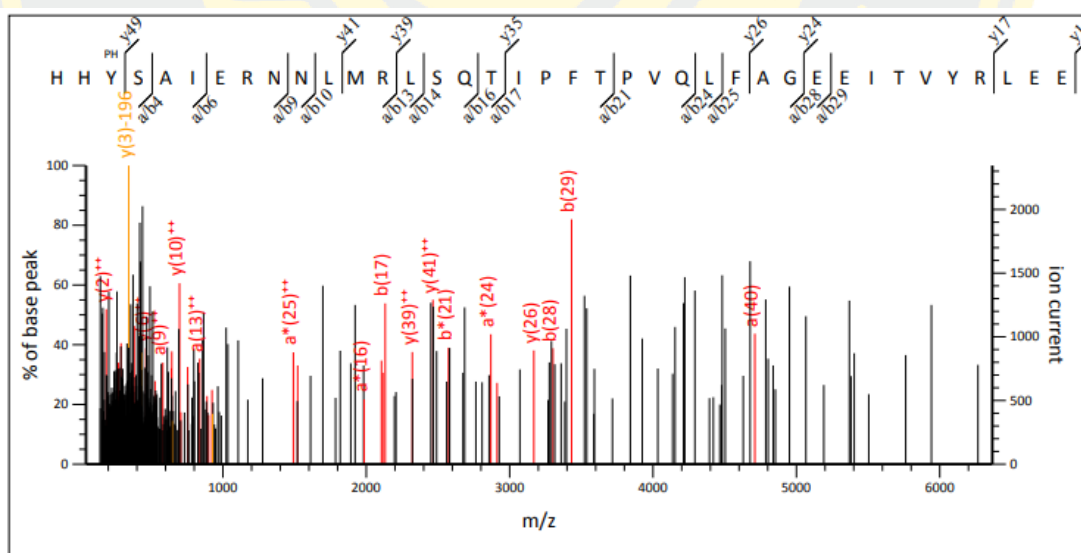
ภาพที่ 34 แสดง peptide base peak ของโปรตีน TRPM6 ตำแหน่ง Dimerization motif ในลำไส้ส่วน duodenum ของหนูกลุ่มที่ได้รับยา Omeprazole นาน 12 สัปดาห์ ทำการศึกษาด้วยวิธี LC-ESI-QTOF MS/MS โดยเทียบข้อมูลในฐานข้อมูล SwitProt MassCott Uniprot (Q9BX84/TRPM6_HUMAN) โดยแสดงตำแหน่งของ TRPM6 peptide base peak ใน fragment ตำแหน่งที่ y1710-1732L



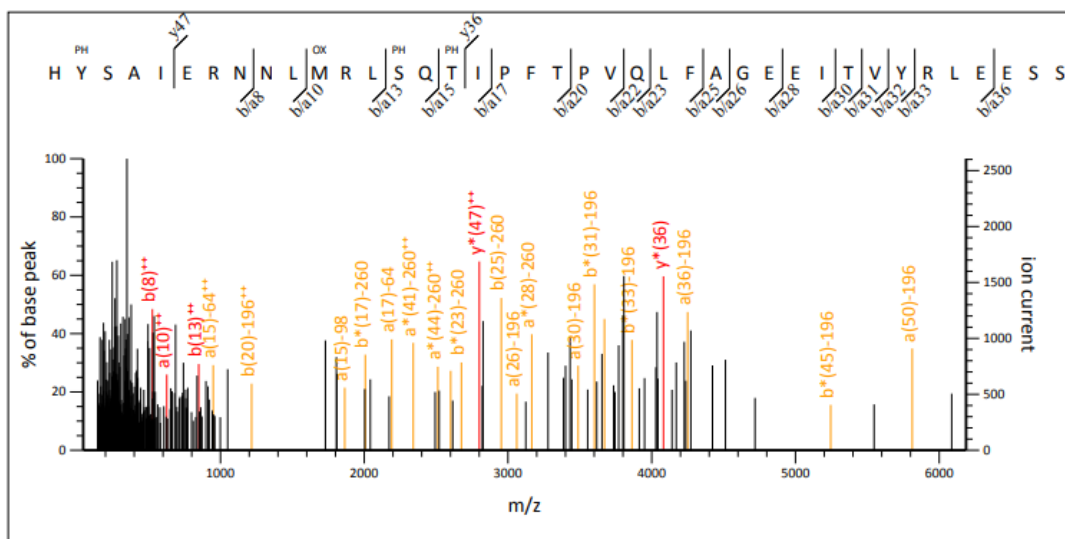
ภาพที่ 35 แสดง peptide base peak ของโปรตีน TRPM6 ตำแหน่ง Dimerization motif ในตำแหน่งส่วน duodenum ของหนูกลุ่มที่ได้รับยา Omeprazole นาน 24 สัปดาห์ ทำการศึกษาด้วยวิธี LC-ESI-QTOF MS/MS โดยเทียบข้อมูลในฐานข้อมูล SwitProt MassCott Uniprot (Q9BX84/TRPM6_HUMAN) โดยแสดงตำแหน่งของ TRPM6 peptide base peak ใน fragment ตำแหน่งที่ L1718-1757S



ภาพที่ 36 แสดง peptide base peak ของโปรตีน TRPM6 ตำแหน่ง Dimerization motif ในลำไส้ส่วน jejunum ของหนูกลุ่มควบคุม ทำการศึกษาด้วยวิธี LC-ESI-QTOF MS/MS โดยเทียบข้อมูลในฐานข้อมูล SwitProt MassCott Uniprot (Q9BX84/TRPM6_HUMAN) โดยแสดงตำแหน่งของ TRPM6 peptide base peak ใน fragment ตำแหน่งที่ Y1710-1757P



ภาพที่ 37 แสดง peptide base peak ของโปรตีน TRPM6 ตำแหน่ง Dimerization motif ในลำไส้ส่วน jejunum ของหนูกลุ่มที่ได้รับยา Omeprazole นาน 12 สัปดาห์ ทำการศึกษาด้วยวิธี LC-ESI-QTOF MS/MS โดยเทียบข้อมูลในฐานข้อมูล SwitProt MassCott Uniprot (Q9BX84/TRPM6_HUMAN) โดยแสดงตำแหน่งของ TRPM6 peptide base peak ใน fragment ตำแหน่งที่ H1708-1759S



ภาพที่ 38 แสดง peptide base peak ของโปรตีน TRPM6 ตำแหน่ง Dimerization motif ในลำไส้ส่วน jejunum ของหนูกลุ่มที่ได้รับยา Omeprazole นาน 24 สัปดาห์ ทำการศึกษาด้วยวิธี LC-ESI-QTOF MS/MS โดยเทียบข้อมูลในฐานข้อมูล SwitProt MassCott Uniprot (Q9BX84/TRPM6_HUMAN) โดยแสดงตำแหน่งของ TRPM6 peptide base peak ใน fragment ตำแหน่งที่ H1709-1760S

4.1.5.3 การวิเคราะห์ตำแหน่งการเกิด Phosphorylation และการเกิด Oxidation บน สายเบสเปปไทด์

จากผลการศึกษาก่อนหน้านี้ ที่ทำการศึกษา Peptide base peak ในตำแหน่งที่ 1814 ถึง 1838 และตำแหน่งที่ T1851I รวมถึงทำการศึกษา Peptide base peak ในตำแหน่ง Dimerization motif พบว่ายังไม่เพียงพอต่อการบ่งชี้การทำงานหรือความผิดปกติของโปรตีน TRPM6 ดังนั้นในการศึกษานี้จึงได้มุ่งเน้นในการวิเคราะห์ตำแหน่งการเกิด Phosphorylation และการเกิด Oxidation บน สายเบสเปปไทด์ทั้งหมด โดยรวบรวมข้อมูลจากการศึกษา Phosphorylated protein ที่เกิดขึ้นบนสายเปปไทด์ทั้งหมด จากผลการศึกษา พบว่า ในลำไส้ duodenum โปรตีนในตำแหน่งที่เป็น Dimerization motif มีการเกิด Phosphorylation ลดลงในกลุ่มของหนูที่ได้รับยา Omeprazole ทั้ง 12 และ 24 สัปดาห์ตามลำดับ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ในขณะที่เดียวกันก็พบว่า ในส่วนของ α -Kinase domain นั้น มีการเกิด Phosphorylation ที่ตำแหน่ง 1851 ในกลุ่มของหนูที่ได้รับยา Omeprazole ทั้ง 2 กลุ่ม ซึ่งการเกิด Phosphorylation ในตำแหน่งนี้จะทำให้ TRPM6 ลดการทำงานลง เนื่องจากมี Rack1 มายับยั้ง นอกจากนี้ยังพบว่า มีการแสดงออกของ Phosphorylation เพิ่มขึ้นใน α -Kinase domain ซึ่งอาจเป็นผลมาจาก การเกิด Phosphorylation ที่ตำแหน่ง 1851 จึงเกิดภาวะ hyperphosphorylation และส่งผลเสียต่อการทำงานของโปรตีนได้ ดังที่แสดงในตารางที่ 8

จากนั้นเมื่อสังเกตการเกิด Oxidation ของโปรตีน TRPM6 ในลำไส้ส่วน duodenum พบว่าในกลุ่มที่ได้รับยา Omeprazole ทั้ง 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ได้รับยา Omeprazole 12 สัปดาห์ และ กลุ่มที่ได้รับยา Omeprazole 24 สัปดาห์ มีการแสดงออกของ methionine Oxidation เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และยังพบการแสดงออกของ methionine Oxidation ที่ตำแหน่งสำคัญ คือ ตำแหน่ง 1755 ซึ่งส่งผลต่อการลดการทำงานของโปรตีน TRPM6 ดังที่แสดงในตารางที่ 9

ในขณะเดียวกัน ในลำไส้ส่วน jejunum พบผลการศึกษาล้ายกันกับ ในลำไส้ส่วน duodenum คือ มีการแสดงออกของ การ Phosphorylation ที่ตำแหน่ง 1851 ที่ส่วน α -Kinase domain ในกลุ่มของหนูที่ได้รับยา Omeprazole ทั้ง 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ได้รับยา Omeprazole 12 สัปดาห์ และ กลุ่มที่ได้รับยา Omeprazole 24 สัปดาห์ ในขณะที่กลุ่มควบคุมไม่พบการแสดงออกของ Phosphorylation ที่ตำแหน่ง 1851 และพบการแสดงออกของ Phosphorylation ที่เพิ่มมากขึ้นในส่วน α -Kinase domain ในหนูกลุ่มที่ได้รับยา Omeprazole เช่นเดียวกับ duodenum เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ดังที่แสดงในตารางที่ 10

ในการศึกษาการแสดงออกของ Oxidation บนเบสเปปไทด์ ในลำไส้ส่วน jejunum มีผลการศึกษาเช่นเดียวกันกับ duodenum คือมีการแสดงออกของ methionine oxidation เพิ่มขึ้น โดยเฉพาะ methionine oxidation ที่ตำแหน่ง 1755 ที่มีการแสดงออกในกลุ่มของหนูที่ได้รับยา Omeprazole ทั้ง 2 กลุ่มคือ กลุ่มที่ได้รับยา Omeprazole 12 สัปดาห์ และ กลุ่มที่ได้รับยา Omeprazole 24 สัปดาห์ แต่ในขณะที่เดียวกันกับไม่พบการแสดงออกของ methionine oxidation ที่ตำแหน่ง 1755 ในหนูกลุ่มควบคุม ดังที่แสดงในตารางที่ 11

จากผลการศึกษาเหล่านี้จึงบ่งชี้ได้ว่า ความบกพร่องของโปรตีน TRPM6 ที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นบนเยื่อหุ้มเซลล์แต่ไม่สามารถทำงานหรือช่วยในการดูดซึมได้นั้นมาจากความผิดปกติของการเกิด methionine oxidation ที่เพิ่มมากขึ้น และมีการเกิด hyperphosphorylation จากการกระตุ้นที่ตำแหน่ง 1851 ใน α -Kinase domain และกระตุ้นการจับกันระหว่างโปรตีน TRPM6 กับ Rack1 ทำให้เกิดการยับยั้งการทำงานของโปรตีน TRPM6 แต่อย่างไรก็ตามกลไกการดูดซึมแมกนีเซียมและกลไกการทำงานของโปรตีน TRPM6 และ TRPM7 รวมไปถึง CNNM4 ยังคงต้องได้รับการศึกษาเพิ่มเติมต่อไปในอนาคต

ตารางที่ 8 ตารางแสดง Phosphorylated protein ในตำแหน่งต่าง ๆ ของ TRPM6 sequence protein ในลำไส้ส่วน duodenum

	กลุ่มควบคุม	กลุ่มที่ได้รับยานาน 12 สัปดาห์	กลุ่มที่ได้รับยานาน 24 สัปดาห์
N-terminus	S12 S141 S703 S705 S869	S12 S141 S153 S705 T706 S713 S869	S12 S28 T150 S705 T859
Channels	Y878	S876 T881 S893 1038 Y1053	Y878 T881 T1046 Y1053
TRP	Y1073 S1078 Y1073 S1078 Y1086 Y1089 T1094 Y1095 S1109	S1078 Y1091 Y1095	Y1073 S1078 S1080 Y1086 Y1089 Y1091 T1094 Y1095
C-terminus	Y1137 S1139	S1139	S1139

Coiled coil			
S/T rich domain	T1739 Y1741	1741	
Dimerization motif	S1711 S1722 T1724 T1728 Y1731 S1736 S1737	Y1710 T1728 T1724 T1728	S1711
α-Kinase domain	S1756 S1757 S1805 T1813 S1821 T1822 T1843 Y1854	S1757 S1759 S1771 T1813 T1822 T1843 T1851 Y1854	Y1741 S1754 S1756 S1757 S1759 S1771 S1805 T1813 T1822 T1843 T1851 Y1854 T1855

ตารางที่ 9 ตารางแสดง Oxidation ในตำแหน่งต่าง ๆ ของ TRPM6 sequence protein ในลำไส้ส่วน duodenum

	กลุ่มควบคุม	กลุ่มที่ได้รับยานาน 12 สัปดาห์	กลุ่มที่ได้รับยานาน 24 สัปดาห์
Oxidation	133	1	1
	1076	133	133
	1092	151	151
	1719	727	727
	1755	1076	732
		1093	864
		1719	1061
		1755	1076
			1093
			1719
		1755	
		1774	

ตารางที่ 10 ตารางแสดง Phosphorylated protein ในตำแหน่งต่าง ๆ ของ TRPM6 sequence protein ในลำไส้ส่วน jejunum

	กลุ่มควบคุม	กลุ่มที่ได้รับยานาน 12 สัปดาห์	กลุ่มที่ได้รับยานาน 24 สัปดาห์
N-terminus	S15	T28	S15
	S703	S32	T28
	S713	S33	T150
	S721	T150	Y697
	T723	T706	Y721
	T725	S869	
Channels	S876	Y878	T881

	Y878 T881 S893 T913 Y1053 Y1058	T881 T899 Y909 Y1053	S893 T899
TRP	Y1073 S1078 S1080 Y1086 Y1089 T1094 Y1095 S1109	Y1073 S1078 T1094 S1109	S1090 Y1073 S1078 S1109 T1094
C-terminus	S1139	Y1137 Y1157	Y1137 Y1157 S1168
Coiled coil			
S/T rich domain	S1746 S1747		
Dimerization motif	Y1710	Y1710	Y1710
α-Kinase domain	S1754 S1756 S1771 S1821 T1843	S1754 S1756 S1757 S1759 S1771	S1722 T1724 S1757 S1759 S1771

	S1821	S1821
	T1822	T1843
	T1843	T1851
	T1851	
	Y1854	
	T1855	

ตารางที่ 11 ตารางแสดง Oxidation ในตำแหน่งต่าง ๆ ของ TRPM6 sequence protein ในลำไส้ส่วน jejunum

	กลุ่มควบคุม	กลุ่มที่ได้รับยานาน 12 สัปดาห์	กลุ่มที่ได้รับยานาน 12 สัปดาห์
Oxidation	1	727	133
	734	732	151
	864	734	727
	1061	1076	734
	1076	1093	864
	1093	1162	1076
	1719	1755	1093
	1755	1766	1162
	1766	1774	1719
			1755
		1766	

บทที่ 5

อภิปรายผล และสรุป

แมกนีเซียม (Mg^{2+}) เป็นแร่ธาตุที่มีความจำเป็นต่อกระบวนการต่างๆในร่างกายมนุษย์ โดยเป็นส่วนหนึ่งในกระบวนการทางกายภาพของหลายๆอวัยวะ เช่น สมอง หัวใจ และ ระบบโครงร่างกล้ามเนื้อ นอกจากนี้ แมกนีเซียม ยังมีความเกี่ยวข้องต่อกระบวนการกระตุ้นการอักเสบ และเป็นองค์ประกอบสำคัญของ RNA และ DNA โดยตัวแมกนีเซียมจะจับกับ phosphate ด้วยพันธะไฮโดรเจนและทำให้สาย DNA และ RNA เสถียร และคงตัวเป็นเกลียว และยังเป็น แคลเซียมแอนทาโกนิส โดยแย่งจับกับ receptor เพื่อกักแคลเซียมไว้ภายในเซลล์ให้นานขึ้น ในกระบวนการการหดตัวของกล้ามเนื้อ และมันยังเป็น Cofactor และ activator ของเอนไซม์ มากกว่า 600 ชนิด และแมกนีเซียมยังสำคัญต่อกลไกภายในเซลล์ผ่าน กลไกการส่งสัญญาณภายในเซลล์ ซึ่งจะไปมีผลต่อ Cell function เช่นการ differentiation, apoptosis contraction หรือ การ migration ของเซลล์อีกด้วย (Anastassopoulou & Theophanides, 2002) มนุษย์จะได้รับแมกนีเซียมจากการบริโภคเพียงอย่างเดียว โดยเฉลี่ย 300 มิลลิกรัมต่อวัน จากนั้นลำไส้จะดูดซึมแมกนีเซียมได้ประมาณ 24-76 % สำหรับอาหารที่มีแมกนีเซียมหมด โดยจะดูดซึมแมกนีเซียม 120 มิลลิกรัม และขับทิ้ง 20 มิลลิกรัม ดังนั้นการบริโภคสุทธิต่อวันคือ 100 มิลลิกรัมต่อวัน ต่อมาไตจะเข้ามามีบทบาทในการรักษาสมดุลแมกนีเซียมโดยกรองและดูดกลับแมกนีเซียม โดยแมกนีเซียมที่แตกตัวเป็นไอออนและที่เป็น complex นั้นจะกรองผ่าน glomerulus ซึ่งมีความสามารถในการกรองอยู่ที่ 120 ml/min ดังนั้นไตจะกรองแมกนีเซียม 2,400 มิลลิกรัมต่อวัน และเพื่อรักษาภาวะสมดุลของไต ไตจะต้องขับทิ้งแมกนีเซียม 100 มิลลิกรัม การกรองออกของแมกนีเซียมส่วนใหญ่ (60-70%) เกิดขึ้นที่ thick ascending limb (TAL) ของ Henle loop และแมกนีเซียมจะเก็บสะสมที่กระดุกในรูปแบบส่วนประกอบของไฮดรอกซีอะพาไทต์ของกระดุก 70% และที่เหลือจะอยู่ในกล้ามเนื้อโครงร่างและเนื้อเยื่ออ่อน 30% ซึ่งโดยปกติแล้ว แมกนีเซียมในเซลล์จะมีอยู่ประมาณ 0.5 to 1 mmol/l โดยแบ่งเป็นแมกนีเซียมไอออน 1-5% อีก 90-95% จะจับกับโปรตีน ATP หรือ anion ส่วนในเลือดความเข้มข้นปกติของแมกนีเซียมจะอยู่ที่ประมาณ 0.76-1.15 mmol/l โดยอยู่ในรูปแบบไอออน 55-70 % จับกับโปรตีน 20-30% และจับกับ Anion 5-15 % ดังนั้น ภาวะ hypomagnesemia คือ ภาวะที่มีแมกนีเซียมในเลือดน้อยกว่า < 0.66 mmol/l แต่การลดลงระดับนี้อาจจะยังไม่มีการแสดงออกของอาการทางคลินิกแต่เมื่อระดับ

แมกนีเซียมลดต่ำกว่า 0.5 mmol/l คนไข้จะเริ่มมีอาการ muscle neuron hyperactivity เช่น กล้ามเนื้อสั่น เกร็ง ชัก กระตุก หรือมีอาการทางจิตประสาท คือ เพื่อสับสน มึน งงและเกิดการโคม่าได้ นอกจากนี้ยังอาจทำให้เกิดภาวะแทรกซ้อนที่ถึงแก่ชีวิตที่เกิดจากภาวะขาดแคลเซียม และ/หรือโพแทสเซียม ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยการขาดแมกนีเซียมในร่างกาย ซึ่งจะส่งผลให้เกิดภาวะหัวใจเต้นผิดปกติ ซึ่งอาจนำไปสู่ภาวะหัวใจล้มเหลวได้ (Iseri & French, 1984; Volpe, 2013) หรืออาจทำให้เกิดภาวะกระดูกพรุนเนื่องจากแมกนีเซียมเหนี่ยวนำให้เกิดการสลายกระดูกก็ได้แต่ในภาวะ hypomagnesemia พบว่า PPIs เหนี่ยวนำให้แมกนีเซียมในกระแสเลือดผิดปกติโดยทำให้การดูดซึมที่ลำไส้ลดน้อยลง และลดการสะสมของแมกนีเซียมในแหล่งสะสม โดยไม่ไปมีผลกับไต โดยการดูดซึมแมกนีเซียมในลำไส้เกิดผ่าน 2 กลไก หลักคือ กลไกการแพร่แบบผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์ (passive paracellular transport) และ กลไกแบบผ่านเซลล์โดยใช้พลังงาน (active transcellular transport) กลไกแบบผ่านเซลล์โดยใช้พลังงาน (active transcellular transport) เป็นการขนส่ง ion ที่ต้าน concentration gradient จึงต้องใช้พลังงาน จะถูกกระตุ้นก็ต่อเมื่อมีปริมาณแมกนีเซียมลดน้อยลง โดยกลไกนี้ต้องอาศัยการทำงานของโปรตีน transient receptor potential ซึ่งเป็น channel เฉพาะของสารประจุบวกสอง (divalent cations channel) ซึ่งก็คือ transient receptor potential melastatin (TRPM) 6 และ 7 ที่อยู่ทางด้าน apical ของลำไส้เพื่อให้แมกนีเซียม จากด้าน luminal เข้าสู่ enterocyte (Penner & Fleig, 2007) จากนั้นจะต้องอาศัย secondary active transport เพื่อขนส่งแมกนีเซียม จาก enterocyte เข้าสู่กระแสเลือด คือ ancient conserved domain protein 4 (CNNM4) งานวิจัยก่อนหน้าของ Thongon et al. 2016 ได้ทำการศึกษาการดูดซึมแมกนีเซียมในหนูขาวเพศผู้ อายุ 9 สัปดาห์ โดยให้ Omeprazole 20 mg/kg เป็นระยะเวลา 4 และ 24 สัปดาห์ ซึ่งพบว่ากลุ่มที่ได้รับ Omeprazole นาน 24 สัปดาห์ เกิดการลดลงของแมกนีเซียมในเลือดอย่างรุนแรง จึงเกิดเป็น Models PPIH rats โดยการทดลองก่อนหน้านี้ Thongon et al. 2016 บ่งชี้ว่าระดับแมกนีเซียมในเลือดลดลง ระดับการดูดซึมในลำไส้ลดลง และลดการสะสมกระดูกและกล้ามเนื้อ โดยไม่มีผลต่อไต นอกจากนี้เมื่อพบว่าระดับแมกนีเซียมลดลงจึงได้ทำการศึกษาโปรตีนเพิ่มเติมแต่กลับพบว่าการแสดงออกของโปรตีน cldn 2,7,12,15 TRPM 6, 7 และ CNNM4 มีการแสดงออกเพิ่มมากขึ้น ซึ่งขัดแย้งกันคือ มีการแสดงออกของโปรตีนเพิ่มขึ้น แต่ระดับแมกนีเซียมยังคงลดต่ำอยู่ จึงเกิดเป็นคำถามของการศึกษาในครั้งนี้คือ ในเมื่อมีการแสดงออกของโปรตีนหรือ การ up-regulated ของโปรตีนเพิ่มขึ้นแต่เพราะเหตุใดการดูดซึมแมกนีเซียมจึงไม่เพิ่มขึ้นตาม จากการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Suksridechacin et al. (2020) ที่ทำการศึกษาผลของการได้รับยา Omeprazole เป็นระยะเวลา

นาน 12 และ 24 สัปดาห์ในลำไส้ส่วนต่างๆ ได้แก่ duodenum jejunum ileum และ colon โดยที่ 12 สัปดาห์จะเท่ากับ 5 ปีในคนและ 24 สัปดาห์เท่ากับ 10 ปีในคน พบว่า Omeprazole มีระดับผลของกวดการดูดซึมแมกนีเซียม ในส่วนลำไส้ duodenum มากสุดถึง 81.86% และ jejunum 70.59% ส่วนในลำไส้ส่วน ileum และ colon นั้น ลดลงตามลำดับ และมีการแสดงออกของโปรตีน TRPM6 และ CNNM4 ลดลง คล้ายกับการศึกษาที่ผ่านมา ในการศึกษาครั้งนี้ก็เช่นเดียวกัน เมื่อทำการตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีน TRPM6 TRPM7 และ CNNM4 ที่เป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องต่อการดูดซึมแมกนีเซียมแบบ active transport โดยทำการเปรียบเทียบภายในกลุ่มการทดลอง และพบว่า ในรูปแบบการแสดงออกของโปรตีนทุกชนิดจะมีการแสดงออกที่เป็นระเบียบแบบแผน และมากที่สุดที่ลำไส้ duodenum และ jejunum แสดงให้เห็นว่าลำไส้ส่วนที่ได้รับผลต่อการกวดการดูดซึมแมกนีเซียมนั้น ได้แก่ duodenum และ jejunum เป็นหลัก นอกจากนี้ยังยืนยันได้ว่า ในลำไส้ส่วน duodenum และ jejunum นั้น มีการดูดซึมแมกนีเซียมแบบ active transport โดยอาศัยโปรตีนสำคัญได้แก่ TRPM6 และ TRPM7 ยืนยันได้จากผลการศึกษากาการเทียบ protein sequencing ด้วยเทคนิค ESI-QTOF MS/MS เมื่อนำไปเทียบกับฐานข้อมูลของทั้ง 2 โปรตีนพบว่า ในโปรตีน TRPM6พบการตรวจจับ protein sequencing ตรงกับ 3 species คือ TRPM6 sequencing protein พบว่า โปรตีน TRPM6 ในลำไส้ส่วน duodenum ของกลุ่มตัวอย่างทั้ง 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มควบคุม กลุ่มที่ได้รับยา Omeprazole 12 สัปดาห์ และกลุ่มที่ได้รับยา Omeprazole 24 สัปดาห์ สามารถตรวจสอบได้ตรงกับฐานข้อมูลของ TRPM6 ทั้งหมด 3 species ได้แก่ Human (Q9BX84), Non-specific S/T Protein kinase rat (F1M7G0) และ Mouse (Q8CIR4) โดยเทียบเฉลี่ยเป็นร้อยละ ได้ 98-100% ในขณะเดียวกัน ในการศึกษา TRPM7 sequencing protein พบว่า โปรตีน TRPM7 ในลำไส้ส่วน ทั้ง 2 ส่วน ในกลุ่มการทดลองทั้ง 3 กลุ่ม สามารถตรวจสอบได้ตรงกับฐานข้อมูลของ TRPM7 ทั้งหมด 3 species ได้แก่ Human (Q96QT4), Rat (Q925B3) และ Mouse (Q923J1) โดยเทียบเฉลี่ยเป็นร้อยละ ได้ 99-100% ดังนั้นหากการทำงานของโปรตีน หรือการดูดซึมแมกนีเซียมในลำไส้ 2 ส่วนนี้ เปลี่ยนแปลงไปสามารถส่งผลกระทบต่อระดับแมกนีเซียมในระบบได้ นอกจากนี้ จากที่กล่าวไปข้างต้นว่า ลำไส้จะต้องดูดซึมแมกนีเซียมมากถึงวันละ 100-150 มิลลิกรัม ด้วยความต้องการแมกนีเซียมที่มีปริมาณจำนวนมากนี้ ระบบการดูดซึมแมกนีเซียมในลำไส้จึงต้องเป็นระบบที่มีความสามารถสูง และอ้างอิงจากความยาวทางสรีรวิทยา คือ ส่วนลำไส้ duodenum จะมีช่วงความยาวอยู่ที่ประมาณ 10 เซนติเมตร ในขณะที่ jejunum จะมีช่วงความยาวอยู่ที่ 90-130 เซนติเมตร ileum 2.5-3.5 เซนติเมตร และ colon 90-110 เซนติเมตร ในอัตราส่วนความยาวของ

ลำไส้หนู จะเห็นได้ว่า ลำไส้ส่วน duodenum เป็นส่วนลำไส้ที่อยู่ต่อจากกระเพาะอาหารโดยตรง ทำให้จะได้รับอาหารที่ถูกย่อยจากกระเพาะอาหารเป็นส่วนแรก ดังนั้นอาหารที่จะมาถึงลำไส้ส่วนนี้ถึง จะมีความเข้มข้นสูง แต่เนื่องจากความยาวของลำไส้ จึงมีความเป็นไปได้ที่การดูดซึมในลำไส้ส่วนนี้ จะใช้การดูดซึมแบบ active transport ด้วย เพื่อให้สารอาหารหรือแร่ธาตุถูกดูดซึมได้อย่างรวดเร็ว ในขณะที่ลำไส้ส่วนอื่น ๆ มีความยาวที่อาหารสามารถพักอยู่ได้เป็นระยะเวลาสั้น จึงอาจจะใช้การดูดซึมแบบ paracellular passive transport เป็นหลัก แต่อย่างไรก็ตามการดูดซึมแมกนีเซียมแบบ active transport ยังมีความจำเป็นต้องทำการศึกษาในลำไส้ส่วน jejunum ileum และ colon ดังนั้น การศึกษาครั้งนี้จึงมุ่งเน้นทำการศึกษาโปรตีนที่เกี่ยวข้องต่อกลไกการดูดซึมแมกนีเซียมแบบ active transport คือ TRPM6,7 และ CNNM4 ใน models หนู PPIH ซึ่งได้จากการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Suksridechacin et al. (2020) โดยในการศึกษาการแสดงออกโปรตีน TRPM6, TRPM7 และ CNNM4 ด้วยเทคนิค Western blot ในลำไส้ ทั้ง 4 ส่วน ของหนู จากกลุ่มทดลองทั้ง 3 กลุ่ม คือ กลุ่มควบคุม กลุ่มที่ได้รับยา Omeprazole นาน 12 สัปดาห์ และกลุ่มที่ได้รับยา Omeprazole นาน 24 สัปดาห์ แสดงให้เห็นว่าโปรตีน total TRPM6 มีการแสดงออกเพิ่มมากขึ้นในลำไส้ทั้งสี่ส่วน จากนั้นจึงทำการศึกษาการแสดงออกของโปรตีน TRPM6 ที่อยู่ในตำแหน่ง membrane และ cytosol พบว่า มีการแสดงออกของโปรตีน TRPM6 ในส่วนของเยื่อหุ้มเซลล์มากขึ้น ในขณะที่ในเซลล์ลดน้อยลง ในลำไส้ duodenum และ jejunum อย่างมีนัยสำคัญ ทั้งในกลุ่มของหนูกลุ่มที่ได้รับยา Omeprazole ทั้ง 12 และ 24 สัปดาห์ แต่ในทางตรงกันข้าม ileum กับ colon มีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับยา Omeprazole ต่อมาเมื่อทำการศึกษาการแสดงออกของโปรตีน total TRPM7 พบว่ามีการแสดงออกเพิ่มมากขึ้นในลำไส้ทั้ง 4 ส่วน แต่เมื่อทำการศึกษาการแสดงออกของ TRPM7 ที่อยู่ในตำแหน่ง membrane และ cytosol กลับพบว่าให้การแสดงผลตรงข้ามกับ การแสดงออกของโปรตีน TRPM6 คือ มีการแสดงออกของโปรตีน TRPM7 บนเยื่อหุ้มเซลล์ลดน้อยลง แต่กลับมีการแสดงออกเพิ่มมากขึ้นใน cytosol ในส่วนลำไส้ duodenum และ jejunum แต่ในส่วน ของ ileum และ colon มีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม จากผลการศึกษาบ่งชี้ว่าโปรตีน TRPM6 มีการย้ายถิ่นฐาน จากในเซลล์ขึ้นไปอยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์เพื่อทำหน้าที่ในการดูดซึมแมกนีเซียม โดยเป็นการยืนยันผลการศึกษาก่อนหน้านี้ของ คณะวิจัยข้าพเจ้าที่แสดงให้เห็นว่า มีการแสดงออกของโปรตีน TRPM6 เพิ่มมากขึ้น โดยการแสดงออกนั้นเกิดขึ้นที่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ในส่วนของลำไส้ duodenum และ jejunum โดยในภาวะปกติ TRPM6 สามารถพบการแสดงออกได้ในอวัยวะที่เป็นเนื้อเยื่อ อย่างเช่น

ลำไส้ และไต ในขณะที่ TRPM7 จะมีการแสดงออกอย่างแพร่หลายในหลายๆอวัยวะ โดยโปรตีน ทั้ง 2 ชนิด ทำหน้าที่ในการเป็น Mg^{2+} -permeable channel โดยที่มีคุณสมบัติที่เรียกว่า “Chanzyme” คือสามารถกระตุ้นการเกิด Phosphorylation ได้ด้วยตัวเอง (Runnels, 2011; Takezawa et al., 2004) นอกจากนี้ TRPM6 สามารถถูกกระตุ้นให้ทำงานได้หลาย pathway และหลายกระบวนการ โดย อาจจะต้องอาศัย signaling molecule หรือโปรตีนตัวอื่นๆมากระตุ้นเพื่อให้ทำงาน อย่างเช่น ใน การศึกษาของ Stephanie Thebault และคณะ ในปี 2009 (Thebault, Alexander, Tiel Groenestege, Hoenderop, & Bindels, 2009) ที่ได้ทำการศึกษาความสำคัญของ EGF ต่อการทำงานของโปรตีน TRPM6 ใน HEK 293T cell แล้วพบว่า EGF นั้นมีส่วนร่วมในการควบคุมการทำงานของ TRPM6 ผ่าน EGFR receptor และ Src ผ่าน MAPK/ERK kinase และ PI3K pathway โดยพบว่า .ในการ ยับยั้ง Src ERK1/2 และ Rac1/Rho แล้วพบว่า กิจกรรมในการทำงานของ TRPM6 ลดลง รวมไปถึง เมื่อทำการเติม EGF ไปในเซลล์ แล้วตรวจสอบการแสดงออกของ Rac1/Rho พบว่ายังช่วยให้ โปรตีน TRPM6 เกิดการ Translocation ขึ้นไปอยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์ได้ดียิ่งขึ้นอีกด้วย โดยจากการศึกษา พบว่า เมื่อกระตุ้น EGFR ผ่าน Src จะกระตุ้นผ่าน MAPK/ERK pathway โดยกระตุ้นผ่าน Ras, Raf-1 และ ERK1/2 ที่จะไปกระตุ้นให้ TRPM6 บนเยื่อหุ้มเซลล์สามารถทำงานได้ หรือในการกระตุ้น ผ่าน PI3K pathway โดยกระตุ้นผ่าน Src ซึ่งจะไปกระตุ้น PI3K, Akt และ Rac1/Rho ที่จะสามารถ กระตุ้น โปรตีน TRPM6 ที่อยู่ในเซลล์ ให้ขึ้นไปทำงานที่บนเยื่อหุ้มเซลล์ได้ และ ในการศึกษาของ Jia Xia และคณะในปี 2011 (J. Xie et al., 2011) ที่ทำการศึกษากิจกรรมของ TRPM6 ในเซลล์ HEK 293T cell ที่พบว่า โปรตีน TRPM6 นั้นมีความต้องการ PIP_2 หรือ Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate เพื่อช่วยในกิจกรรมการทำงานของตัวโปรตีน โดยพบว่า เมื่อทำการ Mutation PIP_2 จะ ทำให้สามารถลดหรือยับยั้งกิจกรรมการทำงานของ TRPM6 และเมื่อ TRPM6 มีการ Interaction กับ PIP_2 ที่บริเวณประจุบวก แล้วจะสามารถกระตุ้นให้ TRPM6 นั้นเกิดการกระตุ้นเพื่อให้ขึ้นไปอยู่ บนเยื่อหุ้มเซลล์ได้ดียิ่งขึ้น และกระตุ้นการทำงานของ TRPM6 นอกจากนี้ในการศึกษาของ Jia Xia และคณะ ก็ยังตรงไปตรงกับการศึกษาของ Langeslag และคณะ (Langeslag et al., 2007) ที่พบว่า PIP_2 นั้นยังมีส่วนร่วมสำคัญกับ TRPM7 โดยการกระตุ้นผ่าน GRP receptor ด้วยเช่นกัน โดยพบว่า TRPM7 นั้น สามารถจับกับ PLC ได้ นอกจากนี้ในงานวิจัยของ Takezawa และคณะ (Takezawa et al., 2004) พบว่า เมื่อกระตุ้น PLC ผ่าน M1 muscarinic receptor จะมีส่วนช่วยให้ TRPM7 แสดงออกมากขึ้นในเซลล์ HEK โดยกล่าวว่ากระบวนการนี้ถูกกระตุ้นผ่าน cAMP-PKA pathway จึงทำให้กิจกรรมการทำงานของ TRPM7 เพิ่มมากขึ้น ในขณะที่เดียวกันการศึกษาก่อนหน้า

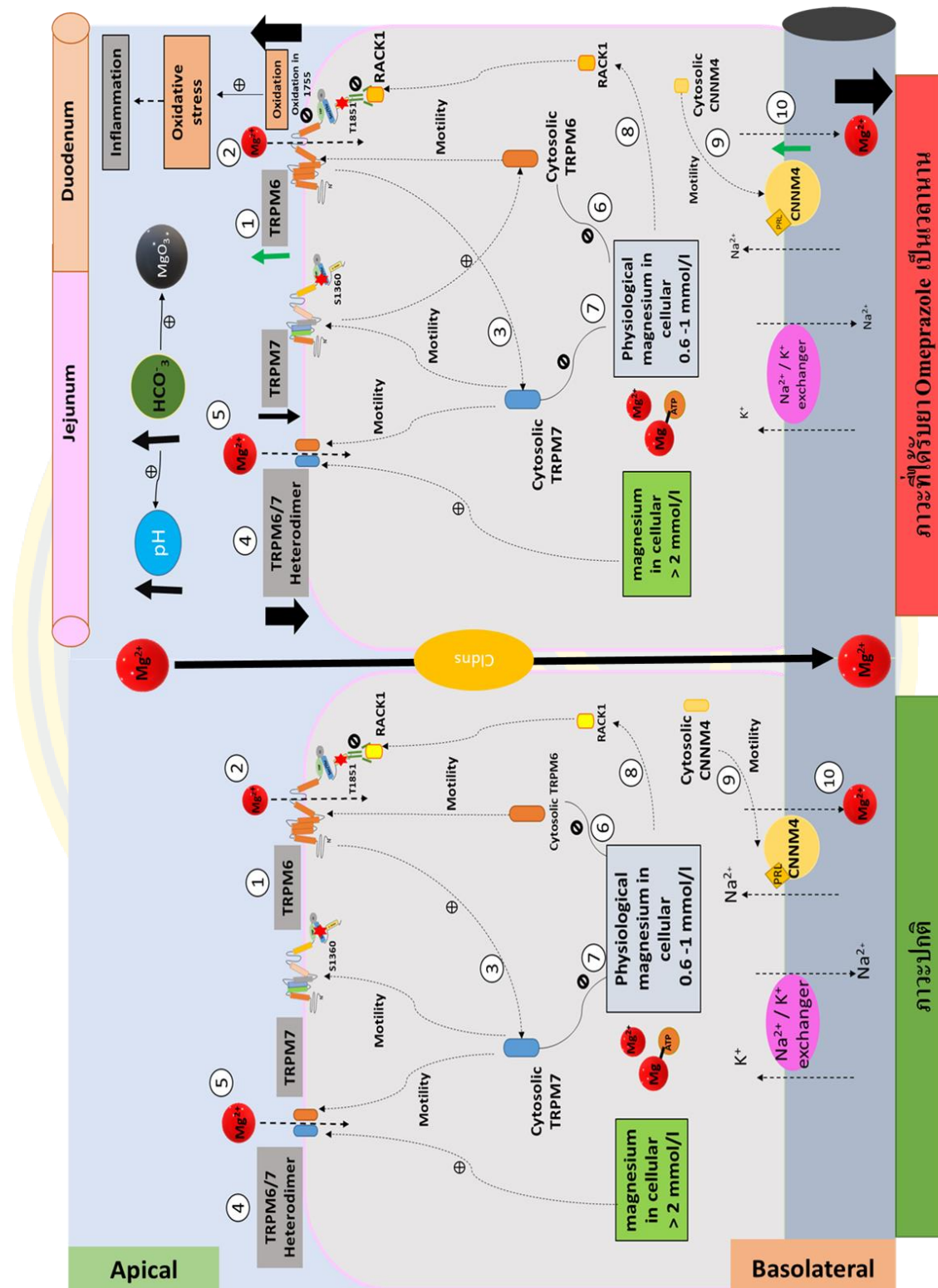
นี้ของ Brandao (2014) พบว่า กิจกรรมของ TRPM6 kinase มีผลต่อ TRPM7 serine phosphorylation และยังสามารถแสดงให้เห็นว่า TRPM6 ไม่สามารถทำงานได้ด้วยตัวเอง แม้จะมี autophosphorylation ก็ตาม โดย TRPM6 ต้องอาศัย TRPM7 ในการทำงานร่วมกัน โดยพบว่า TRPM7 นั้นสามารถกระตุ้นการ Translocation ของ TRPM6 ให้ออกมาจาก cytosol ไปอยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์แล้วทำงานร่วมกับ TRPM7 ในรูปแบบ Heteromeric ion channel โดยอาจกระตุ้นผ่าน cAMP-PKA pathway (Runnels, Yue, & Clapham, 2002) นอกจากนี้การศึกษาในปัจจุบันพบว่าระดับ cellular Mg^{2+} สามารถยับยั้งการทำงานของ TRPM6 และ TRPM7 ได้ กล่าวคือ หากระดับแมกนีเซียมมีมากพอ หรืออยู่ในสภาวะปกติ (0.6-1 mmol/l) TRPM6 และ TRPM7 จะถูกยับยั้งการทำงาน โดยที่ Mg^{2+} สามารถลด TRPM7 autophosphorylation และ ลด TRPM7 Trafficking ทำให้ TRPM7 กลับมาอยู่ใน cytosol แต่ในขณะเดียวกัน TRPM6 และ 7 ที่ถูกกระตุ้นให้มาทำงานร่วมในรูปแบบ TRPM6/7 heterodimer นั้น ยังสามารถทำหน้าที่ในการดูดซึมแมกนีเซียมต่อไปได้แม้ว่าระดับแมกนีเซียมไอออนในเซลล์จะมีมากเกินไปก็ตาม กล่าวคือ TRPM6/7 heterodimer สามารถทำงานได้ แม้จะมีระดับแมกนีเซียมในเซลล์ มากกว่า 2 mmol/l ดังที่แสดงในภาพที่ 39 จึงกล่าวได้ว่า TRPM6/7 heterodimer จึงเหมาะสมและมีประสิทธิภาพมากที่สุด ในการทำหน้าที่ในการดูดซึมแมกนีเซียม ดังนั้นหาก TRPM7 ถูกลดการทำงาน จึงส่งผลกระทบต่อกระตุ้นการทำงานของ TRPM6 ด้วย (Chubanov, Mittermeier, & Gudermann, 2018) ซึ่งในการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่ามีการแสดงออกของโปรตีน TRPM7 เพิ่มมากขึ้นใน cytosol และลดลงในเยื่อหุ้มเซลล์ ประกอบกับการศึกษาการแสดงออกของ Dimerization โดยสังเกตจากการแสดงออกของโปรตีน TRPM7 ที่เข้าคู่แบบ heterodimer กับ TRPM6 ด้วยเทคนิค Immunoprecipitation พบว่า การแสดงออกของ TRPM7 ที่เข้าคู่แบบ heterodimer กับ TRPM6 มีการแสดงออกลดลงทั้งในส่วนลำไส้ duodenum และ jejunum ในหนูทั้ง 2 กลุ่ม คือ กลุ่มของหนูที่ได้รับยา Omeprazole เป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์ และกลุ่มของหนูที่ได้รับยา Omeprazole เป็นระยะเวลา 24 สัปดาห์ ซึ่งการศึกษานี้เป็นครั้งแรกที่ได้ทำการศึกษากการ Dimerization ของ TRPM6 และ TRPM7 ในลำไส้เล็ก ที่เป็น PPIH model จากการสังเกตผลการศึกษาดังกล่าว บ่งชี้ได้ว่า การให้ยา Omeprazole ส่งผลให้ TRPM7 มีการแสดงออกลดลงบนเยื่อหุ้มเซลล์ เป็นผลมาจาก Dimerization ที่ลดลง ยืนยันได้จากการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Brandao (2014) ที่ได้ทำการศึกษากการแสดงออกและการทำงานของ TRPM6 และ TRPM7 รวมถึงศึกษาผลของการ Dimerization ต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ ใน HEK cell และ DT40 B cell พบว่า TRPM6 และ TRPM7 มีการเกิดการแสดงออกร่วมกัน เมื่อทำการยับยั้ง

การแสดงออกของ TRPM6 ทำให้ TRPM7 trafficking ลดลง และมีการแสดงออกที่กระจายอยู่ในเซลล์มากขึ้น ในขณะที่เมื่อทำการแสดงออกร่วมกับ TRPM6 จะส่งผลให้ TRPM7 trafficking เพิ่มขึ้น และเพิ่มการกระจายตัวของ TRPM7 ให้เกิดการรวมกลุ่มกันบนเยื่อหุ้มเซลล์ ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้ เมื่อการแสดงออกของ Dimerization ลดลงจึงเป็นผลให้ TRPM7 มีการแสดงออกลดลงที่บนเยื่อหุ้มเซลล์ด้วย นอกจากนี้อาจเป็นผลมาจาก การทำงานของ TRPM6 โดยจากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า TRPM6 phosphotransferase activity และ TRPM6 kinase domain มีบทบาทสำคัญต่อการควบคุมความไวต่อ Mg-ATP และ Mg^{2+} ของ TRPM6/7 heteromeric ion channels และ TRPM7 ตามลำดับ (Zhang Z et al. 2014) จึงกล่าวได้ว่า กิจกรรมการทำงานของ TRPM6 ส่งผลให้กิจกรรมการทำงานของ TRPM7 เปลี่ยนแปลงได้ ซึ่งการเปลี่ยนแปลงการทำงานของ TRPM7 อาจเกิดจากผลของ kinase activity ของ TRPM6 เนื่องจาก TRPM6 สามารถทำการ Cross phosphorylation กับ TRPM7 ได้ โดยการศึกษาของ Van der และคณะในปี 2014 (van der Wijst et al., 2014) ได้ทำการศึกษาความสัมพันธ์ของการทำงานของ TRPM6/7 dimerization ต่อการทำงานของ TRPM6 kinase domain ใน HEK cell พบว่า phosphorylation ของ TRPM6 kinase domain ส่งผลต่อ TRPM6/7 Dimerization โดยปรับเปลี่ยนความไวต่อ Mg-ATP และส่งผลต่อ Dimerization motif ที่อยู่ใน kinase domain ซึ่งตรงกับการศึกษาในครั้งนี้ ที่ได้ทำการศึกษาการแสดงออกของ Phosphorylation site ด้วยเทคนิค ESI-QTOF MS/MS แล้วพบว่า ในกลุ่มของหนูที่ได้รับยา Omeprazole เป็นระยะเวลา 24 สัปดาห์ จะมีความผิดปกติของ peptide ในบริเวณส่วนของ kinase domain ที่ตำแหน่ง 1814 ถึง 1838 โดยในตำแหน่งที่ผิดปกติ หรือมีการขาดหายไปนั้น มีตำแหน่งของ Serine/Threonine phosphorylation คือ S1821T ที่อาจจะจะเป็นตำแหน่งที่มีผลต่อการทำงานของ TRPM6 และอาจจะส่งผลต่อการ Dimerization ระหว่าง TRPM6 และ TRPM7 ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาสาเหตุสำคัญของความผิดปกตินี้ โดยอ้างอิงจากในการศึกษาก่อนหน้านี้ที่พบว่า TRPM6 นั้นมีส่วนช่วยให้ TRPM7 เกิดการเคลื่อนที่มายู่บนเยื่อหุ้มเซลล์ดังที่กล่าวไปข้างต้น จึงนำไปสู่การวิเคราะห์ Phosphorylation ที่เกิดขึ้นในตำแหน่งต่าง ๆ บนสายเบสเปปไทด์รวมไปถึงการตรวจสอบการเกิด Oxidation บนสายเปปไทด์ที่ตำแหน่งต่าง ๆ เพื่อหาสาเหตุสำคัญที่ส่งผลต่อการทำงานของ TRPM6 จากการศึกษพบว่า ในหนูกลุ่มที่ได้รับยา Omeprazole ทั้ง 2 กลุ่มของลำไส้ทั้ง 2 ส่วน มีการเกิด methionine oxidation ที่เพิ่มมากขึ้นจากภาวะ Oxidative stress ที่เกิดขึ้นในลำไส้ โดยพบการเกิด methionine oxidation ที่ตำแหน่งสำคัญ คือตำแหน่ง 1755 ที่ถูกระบุว่าเป็นตำแหน่งที่เมื่อเกิดการ methionine oxidation แล้วจะส่งผลให้ลดการทำงานของโปรตีน

TRPM6 หรืออีกกลไกหนึ่งที่พบในการศึกษาในครั้งนี้คือ ในหนูกลุ่มที่ได้รับยา Omeprazole ทั้ง 2 กลุ่มของลำไส้ทั้ง 2 ส่วน มีการเกิด Phosphorylation ของโปรตีน TRPM6 ที่ตำแหน่ง 1851 ซึ่งเป็นตำแหน่ง Autophosphorylation ที่สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการ interaction กับ RACK1 ภายในเซลล์แล้วสามารถยับยั้งการทำงานของ TRPM6 โดยการลดความไวของ TRPM6 ต่อแมกนีเซียม นอกจากนี้การเกิด Phosphorylation ในตำแหน่งนี้ ยังสามารถกระตุ้นให้เกิดการ Phosphorylation ในส่วนของ α -kinase domain จนอาจนำไปสู่ภาวะ Hyperphosphorylation ที่ส่งผลเสียต่อการทำงานของโปรตีน ทำให้โปรตีนเกิดการการทำงานที่ผิดปกติ ไม่สามารถไปกระตุ้นการแสดงออกของ TRPM7 ให้มาอยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์ และลดการแสดงออกของ TRPM6/7 dimerization และสุดท้ายจึงส่งผลต่อการดูดซึมแมกนีเซียมที่ลดลงด้วย นอกจากนี้ในการศึกษาครั้งนี้ยังได้ทำการทดสอบการแสดงออกของโปรตีน CNNM4 พบว่า การแสดงออกของ CNNM4 นั้น เพิ่มขึ้น ในส่วนของที่เป็นโปรตีนบนเยื่อหุ้มเซลล์ โดยเฉพาะในลำไส้ส่วน duodenum และ jejunum ซึ่งมีผลใกล้เคียงกันกับการแสดงออกของโปรตีน TRPM6 ดังนั้นจึงวิเคราะห์ได้ว่าโปรตีน CNNM4 นั้น มีการกระตุ้นให้เกิดการทำงาน โดยกระตุ้นให้เกิดการ Translocation ขึ้นไปอยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์ เพื่อพร้อมที่จะทำการขนส่งแมกนีเซียมออกจากเซลล์ไปยังหลอดเลือด โดยโปรตีนจะวางตัวอยู่ด้าน basolateral ติดกับ basement membrane ซึ่งเป็นการยืนยันการศึกษาก่อนหน้านี้ที่แสดงให้เห็นว่ามีการแสดงออกของโปรตีน CNNM4 เพิ่มมากขึ้นแต่การดูดซึมไม่เพิ่มขึ้นตาม สาเหตุอาจเนื่องมาจากการทำงานของ CNNM4 ขึ้นกับความเข้มข้นของ Mg^{2+} ในเซลล์ โดยการศึกษาของ Yamazaki et al., 2013 พบว่า เมื่อปริมาณ Mg^{2+} ในเซลล์เพิ่มมากขึ้น จะส่งผลให้มีการแสดงออกของ CNNM4 บนเยื่อหุ้มเซลล์เพิ่มมากขึ้น โดยในการศึกษาครั้งนี้ที่พบว่าการดูดซึมแมกนีเซียมไม่เพิ่มขึ้นและระดับแมกนีเซียมในเลือดลดลง ทั้งที่มีการ CNNM4 เพิ่มขึ้นบนเยื่อหุ้มเซลล์นั้นอาจเกิดจากการมี Mg^{2+} คลั่งในเซลล์ โดยมีสาเหตุมาจากการที่โปรตีน CNNM4 ไม่สามารถทำการจับแมกนีเซียมออกจากเซลล์ได้ อาจเนื่องมาจากโปรตีน CNNM4 อาจมีความต้องการโปรตีน หรือ Signaling molecule ตัวอื่นเข้ามากระตุ้นหรือเข้าคู่กันเพื่อให้เกิดการกระตุ้นการทำงาน แต่โปรตีนหรือโมเลกุลนั้นเกิดความผิดปกติ จึงส่งผลให้ CNNM4 ไม่สามารถทำงานได้ อย่างเช่น ความผิดปกติของโปรตีน PRL ที่ส่งผลให้การทำงานของ CNNM4 ลดลง Funato et al., 2014 โดยอ้างอิงได้จากการศึกษาของ Yamazaki ที่พบว่า CNNM4 จะอาศัยการทำงานของ phosphatase of regenerating liver (PRL) PRL ที่ประกอบด้วย tyrosine phosphatase domain โดยพบว่า โปรตีน CNNM4 จะสามารถจับกับโปรตีน PRL (PRL1-3) และทำงานร่วมกันได้เนื่องจาก CNNM มี CBS ที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาของ

PRL ได้ (Funato et al., 2014; Hardy et al., 2015) โดยโปรตีน PRL เมื่อถูกกระตุ้น CNNM4 จะเกิดการ Phosphorylation ทำให้ PRL ที่จับ CNNM4 .ในรูปแบบปิดทางเข้าออก ของ channel นั้นหลุดออก ทำให้การกระตุ้น PRL นี้เป็นการเปิด Channel ของ CNNM4 เพื่อให้ทำงานในการขนส่งแมกนีเซียมได้ แต่อย่างไรก็ตามความผิดปกติ ของการทำงานของโปรตีนที่เกี่ยวข้องต่อการศึกษาคูควิมแมกนีเซียมในครั้งนี้ อาจะเกิดจากสภาพแวดล้อมที่ส่งผลต่อการทำงานก็เป็นได้ กล่าวคือ ตัวอย่างที่นำมาทดสอบนั้นเป็นหนูที่ได้รับยา Omeprazole ซึ่งเป็นยากด Proton pump inhibitor และเป็นยาที่ใช้ในการลดกรดในกระเพาะอาหารเพื่อใช้รักษาโรคที่มีความเกี่ยวข้องต่อการหลังกรดในกระเพาะอาหารมากเกินไป โดยไปยับยั้งที่ proton pump ใน Parietal cell โดยพบว่า ผู้ป่วยที่ใช้ยาดังนี้เป็นเวลานาน จะทำให้เกิดการบกพร่องในการดูดซึมวิตามินและแร่ธาตุต่างๆมากมาย โดยเฉพาะแมกนีเซียม เนื่องจากยาดังนี้จะกีดการหลังกรดในกระเพาะ และผลิตต่างออกมาเพิ่มขึ้น ทำให้ค่า pH ในกระเพาะอาหารและลำไส้เพิ่มมากขึ้น (Suksridechacin et al., 2020) ทำให้เกิดสถานะที่ไม่เหมาะสมต่อการแตกตัวหรือย่อยโมเลกุลของสารต่างๆ โดยเฉพาะแมกนีเซียม ที่จำเป็นต้องมีการแตกตัวจาก Complex ที่จับอยู่กับ ion ชนิดอื่นๆ กลายเป็นแมกนีเซียมที่อยู่ในรูป free form (Mg^{2+}) เพื่อที่จะให้เกิดการดูดซึมที่ลำไส้ได้ (Kozak, Matsushita, Nairn, & Cahalan, 2005) จากนอกจากนี้ดังนั้นในการศึกษาก่อนหน้านี้ ที่พบว่ามีการแสดงออกของโปรตีน มากขึ้นแต่การดูดซึมไม่เพิ่มขึ้นตาม อาจเป็นไปได้ว่า นอกจากมีความผิดปกติ ของการทำงานร่วมกันของโปรตีนหรือกระบวนการกระตุ้นต่างๆที่เกี่ยวข้องกับ โปรตีน TRPM6 และ TRPM7 ที่ทำหน้าที่ในการขนส่งแมกนีเซียมไอออน (Mg^{2+}) เข้าเซลล์แล้ว ยังอาจจะเป็นผลมาจากความผิดปกติของการทำงานของโปรตีน CNNM4 หรือความผิดปกติในการทำงานร่วมกันของ CNNM4 กับ PRL จึงส่งผลต่อการดูดซึมแมกนีเซียมในลำไส้ด้วย นอกจากนี้ในการศึกษาก่อนหน้านี้หากสังเกตจะพบว่า ในการแสดงออกของโปรตีน ไม่ว่าจะ TRPM6 TRPM7 หรือ CNNM4 นั้น จะเห็นได้ว่ามีความจำเพาะ เจาะจงหรือมีการแสดงออกที่เพิ่มมากขึ้นแบบมีนัยสำคัญที่บริเวณลำไส้ส่วน duodenum และ jejunum เนื่องจาก การดูดซึมแมกนีเซียมในลำไส้ของมนุษย์นั้น ส่วนมากจะเกิดขึ้นที่บริเวณ ลำไส้ส่วน duodenum jejunum และส่วน distal Ileum ในของหนูก็ใกล้เคียงกัน (Karet, 2011) ดังนั้นในการทำการเปรียบเทียบการแสดงออกของโปรตีน ทั้ง 3 กลุ่มทดสอบจึงได้เลือกทำในส่วน duodenum และ jejunum แล้วพบว่า ในกลุ่มการทดสอบที่เป็น หนูกลุ่มที่ได้รับยา Omeprazole 24 สัปดาห์นั้น มีการแสดงออกของโปรตีนที่ค่อนข้างมากกว่าหนูในกลุ่มการทดสอบที่ได้รับยา Omeprazole 12 สัปดาห์ อาจเนื่องมาจากหนูในกลุ่มที่ได้รับยา Omeprazole 12

สัปดาห์ สภาวะในการดูดซึมอาจจะได้รับความเสียหายจากการได้รับยาน้อยกว่ากลุ่ม 24 สัปดาห์ แต่ในขณะที่เดียวกันหนูในกลุ่มที่ได้รับยา Omeprazole 24 สัปดาห์นั้น การได้รับยาเป็นระยะเวลานาน อาจสร้างความเสียหายให้การดูดซึมมากกว่า ทั้งในด้านการทำลายโปรตีน หรือเนื้อเยื่อในการดูดซึม หรือลดการดูดซึมโดยสร้างสภาวะความเป็นด่างที่มากขึ้น ทำให้แมกนีเซียมไม่สามารถแพร่ตามความเข้มข้นเข้าเซลล์โดยผ่าน passive transport ได้อย่างปกติ ทำให้เซลล์ต้องมาใช้กระบวนการขนส่งแบบใช้พลังงานหรือ active transport อย่างเต็มที่แทน นอกจากนี้ในการศึกษานี้เป็นการศึกษารั้งแรกที่สามารถยืนยันได้ว่า ในลำไส้ส่วน duodenum และ jejunum นั้น มีการดูดซึมแมกนีเซียมแบบ active transport โดยอาศัยโปรตีนสำคัญได้แก่ TRPM6 และ TRPM7 แต่อย่างไรก็ตามกลไกหรือความผิดปกติของการทำงานของโปรตีนที่ใช้ในการดูดซึมแมกนีเซียมนั้น ยังไม่ทราบอย่างแน่ชัด ดังนั้นในการศึกษาการเกิดกลไกการกระตุ้นการดูดซึมแมกนีเซียมของโปรตีน TRPM6 และการตรวจสอบกลไกการทำงานของโปรตีน TRPM7 ยังคงต้องได้รับการตรวจสอบต่อไปในอนาคต โดยหวังว่า จะนำไปสู่การนำองค์ความรู้ไปประกอบในการศึกษาความเสี่ยงของการใช้ยากลุ่ม PPIs อย่าง Omeprazole และเพื่อใช้ในการศึกษา กลไก และความเกี่ยวข้องของโปรตีนต่อการดูดซึมแมกนีเซียม ที่เป็นแร่ธาตุที่มีความสำคัญในกระบวนการต่าง ๆ ของร่างกายมนุษย์เพื่อนำความรู้ไปใช้ในการผลิตยาทดแทนที่ใช้รักษากลุ่มโรคที่มีความจำเป็นต้องใช้ยา กลุ่ม PPIs หรือโรคที่เกี่ยวข้องต่อการดูดซึมแมกนีเซียมในลำไส้ต่อไป



ภาวะที่ได้รับยา Omeprazole เป็นเวลานาน

ภาวะปกติ

ภาพที่ 39 แสดงกลไกการทำงานของโปรตีนที่เกี่ยวข้องต่อการควบคุม Mg^{2+} ในภาวะปกติ และ ภาวะที่ได้รับยา Omeprazole เป็นเวลานาน โดยแสดงหมายเลขลำดับเหตุการณ์ที่เกิดขึ้นตามลำดับ

บรรณานุกรม

- . (1997). In *Dietary Reference Intakes for Calcium, Phosphorus, Magnesium, Vitamin D, and Fluoride*. Washington (DC).
- Alder, N. N., & Johnson, A. E. (2004). Cotranslational membrane protein biogenesis at the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, 279(22), 22787-22790. doi:10.1074/jbc.R400002200
- Alfrey, A. C., Miller, N. L., & Trow, R. (1974). Effect of age and magnesium depletion on bone magnesium pools in rats. *J Clin Invest*, 54(5), 1074-1081. doi:10.1172/JCI107851
- Anastassopoulou, J., & Theophanides, T. (2002). Magnesium-DNA interactions and the possible relation of magnesium to carcinogenesis. Irradiation and free radicals. *Crit Rev Oncol Hematol*, 42(1), 79-91. doi:10.1016/s1040-8428(02)00006-9
- Andrasi, E., Igaz, S., Molnar, Z., & Mako, S. (2000). Disturbances of magnesium concentrations in various brain areas in Alzheimer's disease. *Magnes Res*, 13(3), 189-196. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11008926>
- Baez, N. O., Reisz, J. A., & Furdui, C. M. (2015). Mass spectrometry in studies of protein thiol chemistry and signaling: opportunities and caveats. *Free Radic Biol Med*, 80, 191-211. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2014.09.016
- Bai, J. P., Hausman, E., Lionberger, R., & Zhang, X. (2012). Modeling and simulation of the effect of proton pump inhibitors on magnesium homeostasis. 1. Oral absorption of magnesium. *Mol Pharm*, 9(12), 3495-3505. doi:10.1021/mp300323q
- Bairoch, A. (2000). The ENZYME database in 2000. *Nucleic Acids Res*, 28(1), 304-305. doi:10.1093/nar/28.1.304
- Beggs, M. R., Appel, I., Svenningsen, P., Skjodt, K., Alexander, R. T., & Dimke, H. (2017). Expression of transcellular and paracellular calcium and magnesium transport proteins in renal and intestinal epithelia during lactation. *Am J Physiol Renal Physiol*, 313(3), F629-F640. doi:10.1152/ajprenal.00680.2016
- Behar, J. (1974). Magnesium absorption by the rat ileum and colon. *Am J Physiol*, 227(2), 334-340. doi:10.1152/ajplegacy.1974.227.2.334
- Blanchard, M. G., Kittikulsuth, W., Nair, A. V., de Baaij, J. H., Latta, F., Genzen, J. R., . . . Hoenderop, J. G. (2016). Regulation of Mg²⁺ Reabsorption and Transient Receptor Potential

- Melastatin Type 6 Activity by cAMP Signaling. *J Am Soc Nephrol*, 27(3), 804-813.
doi:10.1681/ASN.2014121228
- Bodaker, I., Sharon, I., Suzuki, M. T., Feingersch, R., Shmoish, M., Andreishcheva, E., . . . Beja, O. (2010). Comparative community genomics in the Dead Sea: an increasingly extreme environment. *ISME J*, 4(3), 399-407. doi:10.1038/ismej.2009.141
- Boistelle, R., Lopez-Valero, I., & Abbona, F. (1993). [Crystallization of calcium phosphate in the presence of magnesium]. *Nephrologie*, 14(6), 265-269. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8145884>
- Brandao, K. (2014). TRPM6 kinase activity regulates TRPM7 trafficking and inhibits cellular growth under hypomagnesian conditions. *Cell Mol Life Sci*, 71(24), 4853-4867. doi:10.1007/s00018-014-1647-7
- Brunette, M. G., Vigneault, N., & Carriere, S. (1974). Micropuncture study of magnesium transport along the nephron in the young rat. *Am J Physiol*, 227(4), 891-896.
doi:10.1152/ajplegacy.1974.227.4.891
- Caspi, R., Billington, R., Ferrer, L., Foerster, H., Fulcher, C. A., Keseler, I. M., . . . Karp, P. D. (2016). The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes and the BioCyc collection of pathway/genome databases. *Nucleic Acids Res*, 44(D1), D471-480.
doi:10.1093/nar/gkv1164
- Castiglioni, S., Cazzaniga, A., Albisetti, W., & Maier, J. A. (2013). Magnesium and osteoporosis: current state of knowledge and future research directions. *Nutrients*, 5(8), 3022-3033.
doi:10.3390/nu5083022
- Chaigne-Delalande, B., Li, F. Y., O'Connor, G. M., Lukacs, M. J., Jiang, P., Zheng, L., . . . Lenardo, M. J. (2013). Mg²⁺ regulates cytotoxic functions of NK and CD8 T cells in chronic EBV infection through NKG2D. *Science*, 341(6142), 186-191. doi:10.1126/science.1240094
- Chiu, T. K., & Dickerson, R. E. (2000). 1 A crystal structures of B-DNA reveal sequence-specific binding and groove-specific bending of DNA by magnesium and calcium. *J Mol Biol*, 301(4), 915-945. doi:10.1006/jmbi.2000.4012
- Chong, K. F., & Leong, H. W. (2012). Tutorial on de novo peptide sequencing using MS/MS mass spectrometry. *J Bioinform Comput Biol*, 10(6), 1231002. doi:10.1142/S0219720012310026
- Chubanov, V., Mittermeier, L., & Gudermann, T. (2018). Role of kinase-coupled TRP channels in

- mineral homeostasis. *Pharmacol Ther*, 184, 159-176. doi:10.1016/j.pharmthera.2017.11.003
- 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. doi:10.1073/pnas.0305252101
- Clark, I. (1968). Effects of magnesium ions on calcium and phosphorus metabolism. *Am J Physiol*, 214(2), 348-356. doi:10.1152/ajplegacy.1968.214.2.348
- Classen, H. G., & Nowitzki, S. (1990). [The clinical importance of magnesium. 2. The indications for supplementation and therapy]. *Fortschr Med*, 108(10), 198-200. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2187780>
- Cundy, T., & Mackay, J. (2011). Proton pump inhibitors and severe hypomagnesaemia. *Curr Opin Gastroenterol*, 27(2), 180-185. doi:10.1097/MOG.0b013e32833ff5d6
- Cymer, F., von Heijne, G., & White, S. H. (2015). Mechanisms of integral membrane protein insertion and folding. *J Mol Biol*, 427(5), 999-1022. doi:10.1016/j.jmb.2014.09.014
- de Baaij, J. H., Groot Koerkamp, M. J., Lavrijsen, M., van Zeeland, F., Meijer, H., Holstege, F. C., . . . Hoenderop, J. G. (2013). Elucidation of the distal convoluted tubule transcriptome identifies new candidate genes involved in renal Mg(2+) handling. *Am J Physiol Renal Physiol*, 305(11), F1563-1573. doi:10.1152/ajprenal.00322.2013
- 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. doi:10.1152/physrev.00012.2014
- de Baaij, J. H., Stuijver, M., Meij, I. C., Lainez, S., Kopplin, K., Venselaar, H., . . . Hoenderop, J. G. (2012). Membrane topology and intracellular processing of cyclin M2 (CNNM2). *J Biol Chem*, 287(17), 13644-13655. doi:10.1074/jbc.M112.342204
- Duan, C. Y., Zhang, J., Wu, H. L., Li, T., & Liu, L. M. (2017). Regulatory mechanisms, prophylaxis and treatment of vascular leakage following severe trauma and shock. *Mil Med Res*, 4, 11. doi:10.1186/s40779-017-0117-6
- Ebel, H., & Gunther, T. (1980). Magnesium metabolism: a review. *J Clin Chem Clin Biochem*, 18(5), 257-270. doi:10.1515/cclm.1980.18.5.257
- Ellison, D. H. (2009). The voltage-gated K⁺ channel subunit Kv1.1 links kidney and brain. *J Clin Invest*, 119(4), 763-766. doi:10.1172/jci38835

- Enquist, K., Fransson, M., Boekel, C., Bengtsson, I., Geiger, K., Lang, L., . . . Nilsson, I. (2009). Membrane-integration characteristics of two ABC transporters, CFTR and P-glycoprotein. *J Mol Biol*, 387(5), 1153-1164. doi:10.1016/j.jmb.2009.02.035
- Epstein, M., McGrath, S., & Law, F. (2006). Proton-pump inhibitors and hypomagnesemic hypoparathyroidism. *N Engl J Med*, 355(17), 1834-1836. doi:10.1056/NEJMc066308
- Fan, J., Tatum, R., Hoggard, J., & Chen, Y. H. (2019). Claudin-7 Modulates Cl⁻ and Na⁺ Homeostasis and WNK4 Expression in Renal Collecting Duct Cells. *Int J Mol Sci*, 20(15). doi:10.3390/ijms20153798
- Feraille, E., & Dizin, E. (2016). Coordinated Control of ENaC and Na⁺,K⁺-ATPase in Renal Collecting Duct. *J Am Soc Nephrol*, 27(9), 2554-2563. doi:10.1681/ASN.2016020124
- Ferioli, S., Zierler, S., Zaisserer, J., Schredelseker, J., Gudermann, T., & Chubanov, V. (2017). TRPM6 and TRPM7 differentially contribute to the relief of heteromeric TRPM6/7 channels from inhibition by cytosolic Mg²⁺ and Mg.ATP. *Sci Rep*, 7(1), 8806. doi:10.1038/s41598-017-08144-1
- 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. doi:10.1369/jhc.6A6944.2006
- Funato, Y., Yamazaki, D., Mizukami, S., Du, L., Kikuchi, K., & Miki, H. (2014). Membrane protein CNNM4-dependent Mg²⁺ efflux suppresses tumor progression. *J Clin Invest*, 124(12), 5398-5410. doi:10.1172/JCI76614
- Garfinkel, L., & Garfinkel, D. (1985). Magnesium regulation of the glycolytic pathway and the enzymes involved. *Magnesium*, 4(2-3), 60-72. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2931560>
- Glaudemans, B., van der Wijst, J., Scola, R. H., Lorenzoni, P. J., Heister, A., van der Kemp, A. W., . . . Bindels, R. J. (2009). A missense mutation in the Kv1.1 voltage-gated potassium channel-encoding gene KCNA1 is linked to human autosomal dominant hypomagnesemia. *J Clin Invest*, 119(4), 936-942. doi:10.1172/JCI36948
- Goder, V., Junne, T., & Spiess, M. (2004). Sec61p contributes to signal sequence orientation according to the positive-inside rule. *Mol Biol Cell*, 15(3), 1470-1478. doi:10.1091/mbc.e03-08-0599

- Gommers, L. M. M., Ederveen, T. H. A., van der Wijst, J., Overmars-Bos, C., Kortman, G. A. M., Boekhorst, J., . . . Hoenderop, J. G. J. (2019). Low gut microbiota diversity and dietary magnesium intake are associated with the development of PPI-induced hypomagnesemia. *FASEB J*, 33(10), 11235-11246. doi:10.1096/fj.201900839R
- Gonzalez-Mariscal, L., Raya-Sandino, A., Gonzalez-Gonzalez, L., & Hernandez-Guzman, C. (2018). Relationship between G proteins coupled receptors and tight junctions. *Tissue Barriers*, 6(1), e1414015. doi:10.1080/21688370.2017.1414015
- Goytain, A., & Quamme, G. A. (2005a). Functional characterization of ACDP2 (ancient conserved domain protein), a divalent metal transporter. *Physiol Genomics*, 22(3), 382-389. doi:10.1152/physiolgenomics.00058.2005
- Goytain, A., & Quamme, G. A. (2005b). Functional characterization of human SLC41A1, a Mg²⁺ transporter with similarity to prokaryotic MgtE Mg²⁺ transporters. *Physiol Genomics*, 21(3), 337-342. doi:10.1152/physiolgenomics.00261.2004
- Graham, L. A., Caesar, J. J., & Burgen, A. S. (1960). Gastrointestinal absorption and excretion of Mg²⁺ in man. *Metabolism*, 9, 646-659. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13848379>
- Green, L., Kim, C. H., Bustamante, C., & Tinoco, I., Jr. (2008). Characterization of the mechanical unfolding of RNA pseudoknots. *J Mol Biol*, 375(2), 511-528. doi:10.1016/j.jmb.2007.05.058
- Greger, R., & Velazquez, H. (1987). The cortical thick ascending limb and early distal convoluted tubule in the urinary concentrating mechanism. *Kidney Int*, 31(2), 590-596. doi:10.1038/ki.1987.39
- Grober, U., Schmidt, J., & Kisters, K. (2015). Magnesium in Prevention and Therapy. *Nutrients*, 7(9), 8199-8226. doi:10.3390/nu7095388
- Groenestege, W. M., Hoenderop, J. G., van den Heuvel, L., Knoers, N., & Bindels, R. J. (2006). The epithelial Mg²⁺ channel transient receptor potential melastatin 6 is regulated by dietary Mg²⁺ content and estrogens. *J Am Soc Nephrol*, 17(4), 1035-1043. doi:10.1681/ASN.2005070700
- Grudnik, P., Bange, G., & Sinning, I. (2009). Protein targeting by the signal recognition particle. *Biol Chem*, 390(8), 775-782. doi:10.1515/BC.2009.102
- Guerrera, I. C., & Kleiner, O. (2005). Application of mass spectrometry in proteomics. *Biosci Rep*,

- 25(1-2), 71-93. doi:10.1007/s10540-005-2849-x
- Gunzel, D., & Yu, A. S. (2013). Claudins and the modulation of tight junction permeability. *Physiol Rev*, 93(2), 525-569. doi:10.1152/physrev.00019.2012
- Hardy, S., Uetani, N., Wong, N., Kostantin, E., Labbe, D. P., Begin, L. R., . . . Tremblay, M. L. (2015). The protein tyrosine phosphatase PRL-2 interacts with the magnesium transporter CNNM3 to promote oncogenesis. *Oncogene*, 34(8), 986-995. doi:10.1038/onc.2014.33
- He, L. Y., Zhang, X. M., Liu, B., Tian, Y., & Ma, W. H. (2016). Effect of magnesium ion on human osteoblast activity. *Braz J Med Biol Res*, 49(7). doi:10.1590/1414-431X20165257
- Heidelbaugh, J. J. (2013). Proton pump inhibitors and risk of vitamin and mineral deficiency: evidence and clinical implications. *Ther Adv Drug Saf*, 4(3), 125-133. doi:10.1177/2042098613482484
- Heidelbaugh, J. J. (2013). Proton pump inhibitors and risk of vitamin and mineral deficiency: evidence and clinical implications. *Therapeutic advances in drug safety*, 4(3), 125-133. doi:10.1177/2042098613482484
- Hershko, A., Mamont, P., Shields, R., & Tomkins, G. M. (1971). "Pleiotypic response". *Nat New Biol*, 232(33), 206-211. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5285753>
- Hessa, T., Meindl-Beinker, N. M., Bernsel, A., Kim, H., Sato, Y., Lerch-Bader, M., . . . von Heijne, G. (2007). Molecular code for transmembrane-helix recognition by the Sec61 translocon. *Nature*, 450(7172), 1026-1030. doi:10.1038/nature06387
- Higy, M., Junne, T., & Spiess, M. (2004). Topogenesis of membrane proteins at the endoplasmic reticulum. *Biochemistry*, 43(40), 12716-12722. doi:10.1021/bi048368m
- Hoenderop, J. G., & Bindels, R. J. (2008). Calcitropic and magnesiotropic TRP channels. *Physiology (Bethesda)*, 23, 32-40. doi:10.1152/physiol.00039.2007
- Hoenderop, J. G., Nilius, B., & Bindels, R. J. (2002). ECaC: the gatekeeper of transepithelial Ca²⁺ transport. *Biochim Biophys Acta*, 1600(1-2), 6-11. doi:10.1016/s1570-9639(02)00438-7
- Hurd, T. W., Otto, E. A., Mishima, E., Gee, H. Y., Inoue, H., Inazu, M., . . . Hildebrandt, F. (2013). Mutation of the Mg²⁺ transporter SLC41A1 results in a nephronophthisis-like phenotype. *J Am Soc Nephrol*, 24(6), 967-977. doi:10.1681/ASN.2012101034
- Ikari, A., Kano, T., & Suketa, Y. (2002). Magnesium influx enhanced by nitric oxide in hypertensive rat proximal tubule cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 294(3), 710-713. doi:10.1016/S0006-

291X(02)00542-9

- Ikari, A., Kinjo, K., Atomi, K., Sasaki, Y., Yamazaki, Y., & Sugatani, J. (2010). Extracellular Mg(2+) regulates the tight junctional localization of claudin-16 mediated by ERK-dependent phosphorylation. *Biochim Biophys Acta*, 1798(3), 415-421. doi:10.1016/j.bbame.2009.11.005
- Iseri, L. T., & French, J. H. (1984). Magnesium: nature's physiologic calcium blocker. *Am Heart J*, 108(1), 188-193. doi:10.1016/0002-8703(84)90572-6
- Jahnen-Dechent, W., & Ketteler, M. (2012). Magnesium basics. *Clin Kidney J*, 5(Suppl 1), i3-i14. doi:10.1093/ndtplus/sfr163
- Jin, J., Desai, B. N., Navarro, B., Donovan, A., Andrews, N. C., & Clapham, D. E. (2008). Deletion of Trpm7 disrupts embryonic development and thymopoiesis without altering Mg²⁺ homeostasis. *Science*, 322(5902), 756-760. doi:10.1126/science.1163493
- Junne, T., Schwede, T., Goder, V., & Spiess, M. (2006). The plug domain of yeast Sec61p is important for efficient protein translocation, but is not essential for cell viability. *Mol Biol Cell*, 17(9), 4063-4068. doi:10.1091/mbc.e06-03-0200
- Karet, F. E. (2011). Disorders of water and acid-base homeostasis. *Nephron Physiol*, 118(1), p28-34. doi:10.1159/000320885
- Kauko, A., Hedin, L. E., Thebaud, E., Cristobal, S., Elofsson, A., & von Heijne, G. (2010). Repositioning of transmembrane alpha-helices during membrane protein folding. *J Mol Biol*, 397(1), 190-201. doi:10.1016/j.jmb.2010.01.042
- Kinoshita, Y., Ishimura, N., & Ishihara, S. (2018). Advantages and Disadvantages of Long-term Proton Pump Inhibitor Use. *Journal of neurogastroenterology and motility*, 24(2), 182-196. doi:10.5056/jnm18001
- Kinoshita, Y., Ishimura, N., & Ishihara, S. (2018). Advantages and Disadvantages of Long-term Proton Pump Inhibitor Use. *J Neurogastroenterol Motil*, 24(2), 182-196. doi:10.5056/jnm18001
- Kisters, K. (1998). [Disorders of magnesium balance]. *Internist (Berl)*, 39(8), 815-819. doi:10.1007/s001080050249
- Kolisek, M., Nestler, A., Vormann, J., & Schweigel-Rontgen, M. (2012). Human gene SLC41A1 encodes for the Na⁺/Mg(2)⁺ exchanger. *Am J Physiol Cell Physiol*, 302(1), C318-326. doi:10.1152/ajpcell.00289.2011
- Konrad, M., Schaller, A., Seelow, D., Pandey, A. V., Waldegger, S., Lesslauer, A., . . . Weber, S.

- (2006). Mutations in the tight-junction gene claudin 19 (CLDN19) are associated with renal magnesium wasting, renal failure, and severe ocular involvement. *Am J Hum Genet*, 79(5), 949-957. doi:10.1086/508617
- Kozak, J. A., Matsushita, M., Nairn, A. C., & Cahalan, M. D. (2005). Charge screening by internal pH and polyvalent cations as a mechanism for activation, inhibition, and rundown of TRPM7/MIC channels. *J Gen Physiol*, 126(5), 499-514. doi:10.1085/jgp.200509324
- Kuramoto, T., Kuwamura, M., Tokuda, S., Izawa, T., Nakane, Y., Kitada, K., . . . Serikawa, T. (2011). A mutation in the gene encoding mitochondrial Mg(2)+ channel MRS2 results in demyelination in the rat. *PLoS Genet*, 7(1), e1001262. doi:10.1371/journal.pgen.1001262
- Langeslag, M., Clark, K., Moolenaar, W. H., van Leeuwen, F. N., & Jalink, K. (2007). Activation of TRPM7 channels by phospholipase C-coupled receptor agonists. *J Biol Chem*, 282(1), 232-239. doi:10.1074/jbc.M605300200
- Lazarus, B., Chen, Y., Wilson, F. P., Sang, Y., Chang, A. R., Coresh, J., & Grams, M. E. (2016). Proton Pump Inhibitor Use and the Risk of Chronic Kidney Disease. *JAMA Intern Med*, 176(2), 238-246. doi:10.1001/jamainternmed.2015.7193
- Le Grimellec, C. (1975). Micropuncture study along the proximal convoluted tubule. Electrolyte reabsorption in first convolutions. *Pflugers Arch*, 354(2), 133-150. doi:10.1007/BF00579944
- 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. doi:10.1016/j.ydbio.2012.07.005
- Li, F. Y., Chaigne-Delalande, B., Kanellopoulou, C., Davis, J. C., Matthews, H. F., Douek, D. C., . . . Lenardo, M. J. (2011). Second messenger role for Mg²⁺ revealed by human T-cell immunodeficiency. *Nature*, 475(7357), 471-476. doi:10.1038/nature10246
- Lindahl, T., Adams, A., & Fresco, J. R. (1966). Renaturation of transfer ribonucleic acids through site binding of magnesium. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 55(4), 941-948. doi:10.1073/pnas.55.4.941
- Lo, W. K., & Chan, W. W. (2013). Proton pump inhibitor use and the risk of small intestinal bacterial overgrowth: a meta-analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 11(5), 483-490. doi:10.1016/j.cgh.2012.12.011
- Lowenstein, F. W., & Stanton, M. F. (1986). Serum magnesium levels in the United States, 1971-

1974. *J Am Coll Nutr*, 5(4), 399-414. doi:10.1080/07315724.1986.10720143
- Magpie Trial Follow-Up Study Collaborative, G. (2007). The Magpie Trial: a randomised trial comparing magnesium sulphate with placebo for pre-eclampsia. Outcome for children at 18 months. *BJOG*, 114(3), 289-299. doi:10.1111/j.1471-0528.2006.01165.x
- Mayer, M. L., Westbrook, G. L., & Guthrie, P. B. (1984). Voltage-dependent block by Mg²⁺ of NMDA responses in spinal cord neurones. *Nature*, 309(5965), 261-263. doi:10.1038/309261a0
- Mertz-Nielsen, A., Hillingsø, J., Bukhave, K., & Rask-Madsen, J. (1996). Omeprazole promotes proximal duodenal mucosal bicarbonate secretion in humans. *Gut*, 38(1), 6-10. doi:10.1136/gut.38.1.6
- Misra, V. K., & Draper, D. E. (1998). On the role of magnesium ions in RNA stability. *Biopolymers*, 48(2-3), 113-135. doi:10.1002/(SICI)1097-0282(1998)48:2<113::AID-BIP3>3.0.CO;2-Y
- 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. doi:10.1038/35079092
- 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. doi:10.1152/ajprenal.00504.2010
- Penner, R., & Fleig, A. (2007). The Mg²⁺ and Mg(2+)-nucleotide-regulated channel-kinase TRPM7. *Handb Exp Pharmacol*(179), 313-328. doi:10.1007/978-3-540-34891-7_19
- Perazella, M. A. (2013). Proton pump inhibitors and hypomagnesemia: a rare but serious complication. *Kidney Int*, 83(4), 553-556. doi:10.1038/ki.2012.462
- Pham, P. C., Pham, P. A., Pham, S. V., Pham, P. T., Pham, P. M., & Pham, P. T. (2014). Hypomagnesemia: a clinical perspective. *Int J Nephrol Renovasc Dis*, 7, 219-230. doi:10.2147/IJNRD.S42054
- Price, M. A., & Tullius, T. D. (1992). Using hydroxyl radical to probe DNA structure. *Methods Enzymol*, 212, 194-219. doi:10.1016/0076-6879(92)12013-g
- Quamme, G. A. (1989). Control of magnesium transport in the thick ascending limb. *Am J Physiol*, 256(2 Pt 2), F197-210. doi:10.1152/ajprenal.1989.256.2.F197
- Quamme, G. A. (1997). Renal magnesium handling: new insights in understanding old problems.

- Kidney Int*, 52(5), 1180-1195. doi:10.1038/ki.1997.443
- Quamme, G. A. (2008). Recent developments in intestinal magnesium absorption. *Curr Opin Gastroenterol*, 24(2), 230-235. doi:10.1097/MOG.0b013e3282f37b59
- Quamme, G. A., Wong, N. L., Dirks, J. H., Roinel, N., De Rouffignac, C., & Morel, F. (1978). Magnesium handling in the dog kidney: a micropuncture study. *Pflugers Arch*, 377(1), 95-99. doi:10.1007/BF00584380
- Reimer, C., Sondergaard, B., Hilsted, L., & Bytzer, P. (2009). Proton-pump inhibitor therapy induces acid-related symptoms in healthy volunteers after withdrawal of therapy. *Gastroenterology*, 137(1), 80-87, 87 e81. doi:10.1053/j.gastro.2009.03.058
- Romani, A. (2007). Regulation of magnesium homeostasis and transport in mammalian cells. *Arch Biochem Biophys*, 458(1), 90-102. doi:10.1016/j.abb.2006.07.012
- Rondon, L. J., Groenestege, W. M., Rayssiguier, Y., & Mazur, A. (2008). Relationship between low magnesium status and TRPM6 expression in the kidney and large intestine. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 294(6), R2001-2007. doi:10.1152/ajpregu.00153.2007
- Rubin, A. H., Terasaki, M., & Sanui, H. (1979). Major intracellular cations and growth control: correspondence among magnesium content, protein synthesis, and the onset of DNA synthesis in BALB/c3T3 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76(8), 3917-3921. doi:10.1073/pnas.76.8.3917
- Rubin, H. (1975). Central role for magnesium in coordinate control of metabolism and growth in animal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 72(9), 3551-3555. doi:10.1073/pnas.72.9.3551
- Rude, R. K., Gruber, H. E., Norton, H. J., Wei, L. Y., Frausto, A., & Mills, B. G. (2004). Bone loss induced by dietary magnesium reduction to 10% of the nutrient requirement in rats is associated with increased release of substance P and tumor necrosis factor-alpha. *J Nutr*, 134(1), 79-85. doi:10.1093/jn/134.1.79
- Rude, R. K., Oldham, S. B., Sharp, C. F., Jr., & Singer, F. R. (1978). Parathyroid hormone secretion in magnesium deficiency. *J Clin Endocrinol Metab*, 47(4), 800-806. doi:10.1210/jcem-47-4-800
- Runnels, L. W. (2011). TRPM6 and TRPM7: A Mul-TRP-PLIK-cation of channel functions. *Curr Pharm Biotechnol*, 12(1), 42-53. doi:10.2174/1389201111793937880
- Runnels, L. W., Yue, L., & Clapham, D. E. (2001). TRP-PLIK, a bifunctional protein with kinase and ion channel activities. *Science*, 291(5506), 1043-1047. doi:10.1126/science.1058519

- Runnels, L. W., Yue, L., & Clapham, D. E. (2002). The TRPM7 channel is inactivated by PIP(2) hydrolysis. *Nat Cell Biol*, 4(5), 329-336. doi:10.1038/ncb781
- Ryan, M. F. (1991). The role of magnesium in clinical biochemistry: an overview. *Ann Clin Biochem*, 28 (Pt 1), 19-26. doi:10.1177/000456329102800103
- Sadlish, H., Pitonzo, D., Johnson, A. E., & Skach, W. R. (2005). Sequential triage of transmembrane segments by Sec61alpha during biogenesis of a native multispanning membrane protein. *Nat Struct Mol Biol*, 12(10), 870-878. doi:10.1038/nsmb994
- Sahni, J., Nelson, B., & Scharenberg, A. M. (2007). SLC41A2 encodes a plasma-membrane Mg²⁺ transporter. *Biochem J*, 401(2), 505-513. doi:10.1042/BJ20060673
- 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. doi:10.1074/jbc.M110261200
- 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. doi:10.1016/s0009-8981(99)00258-2
- 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. doi:10.1016/j.bbadis.2007.03.009
- Schlingmann, K. P., Weber, S., Peters, M., Niemann Nejsun, 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. doi:10.1038/ng889
- 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. doi:10.1074/jbc.M509175200
- Schuchardt, J. P., & Hahn, A. (2017). Intestinal Absorption and Factors Influencing Bioavailability of Magnesium-An Update. *Curr Nutr Food Sci*, 13(4), 260-278. doi:10.2174/1573401313666170427162740
- Seelig, M. S. (1982). Magnesium requirements in human nutrition. *J Med Soc N J*, 79(11), 849-850.

Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6960186>

- Serfaty-Lacrosniere, C., Wood, R. J., Voytko, D., Saltzman, J. R., Pedrosa, M., Sepe, T. E., & Russell, R. R. (1995). Hypochlorhydria from short-term omeprazole treatment does not inhibit intestinal absorption of calcium, phosphorus, magnesium or zinc from food in humans. *J Am Coll Nutr*, 14(4), 364-368. doi:10.1080/07315724.1995.10718522
- Shao, S., & Hegde, R. S. (2011). Membrane protein insertion at the endoplasmic reticulum. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 27, 25-56. doi:10.1146/annurev-cellbio-092910-154125
- Sheen, E., & Triadafilopoulos, G. (2011). Adverse effects of long-term proton pump inhibitor therapy. *Dig Dis Sci*, 56(4), 931-950. doi:10.1007/s10620-010-1560-3
- Simon, D. B., Lu, Y., Choate, K. A., Velazquez, H., Al-Sabban, E., Praga, M., . . . Lifton, R. P. (1999). Paracellin-1, a renal tight junction protein required for paracellular Mg²⁺ resorption. *Science*, 285(5424), 103-106. doi:10.1126/science.285.5424.103
- Stuiver, M., Lainez, S., Will, C., Terryn, S., Gunzel, D., Debaix, H., . . . Muller, D. (2011). CNNM2, encoding a basolateral protein required for renal Mg²⁺ handling, is mutated in dominant hypomagnesemia. *Am J Hum Genet*, 88(3), 333-343. doi:10.1016/j.ajhg.2011.02.005
- 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 J Gastroenterol*, 26(11), 1142-1155. doi:10.3748/wjg.v26.i11.1142
- Sun, S., Cui, Z., Zhou, M., Li, R., Li, H., Zhang, S., . . . Cheng, G. (2017). Proton pump inhibitor monotherapy and the risk of cardiovascular events in patients with gastro-esophageal reflux disease: a meta-analysis. *Neurogastroenterol Motil*, 29(2). doi:10.1111/nmo.12926
- Svagdiene, M., Sirvinskas, E., Baranauskiene, D., & Adukauskiene, D. (2015). Correlation of magnesium deficiency with C-reactive protein in elective cardiac surgery with cardiopulmonary bypass for ischemic heart disease. *Medicina (Kaunas)*, 51(2), 100-106. doi:10.1016/j.medic.2015.03.003
- Swaminathan, R. (2003). Magnesium metabolism and its disorders. *Clin Biochem Rev*, 24(2), 47-66. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18568054>
- Takezawa, R., Schmitz, C., Demeuse, P., Scharenberg, A. M., Penner, R., & Fleig, A. (2004). Receptor-mediated regulation of the TRPM7 channel through its endogenous protein kinase domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(16), 6009-6014. doi:10.1073/pnas.0307565101

- Terasaki, M., & Rubin, H. (1985). Evidence that intracellular magnesium is present in cells at a regulatory concentration for protein synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82(21), 7324-7326. doi:10.1073/pnas.82.21.7324
- Thebault, S., Alexander, R. T., Tiel Groenestege, W. M., Hoenderop, J. G., & Bindels, R. J. (2009). EGF increases TRPM6 activity and surface expression. *J Am Soc Nephrol*, 20(1), 78-85. doi:10.1681/ASN.2008030327
- Thebault, S., Cao, G., Venselaar, H., Xi, Q., Bindels, R. J., & Hoenderop, J. G. (2008). Role of the alpha-kinase domain in transient receptor potential melastatin 6 channel and regulation by intracellular ATP. *J Biol Chem*, 283(29), 19999-20007. doi:10.1074/jbc.M800167200
- Thongon, N., & Chamniansawat, S. (2019). The inhibitory role of purinergic P2Y receptor on Mg(2+) transport across intestinal epithelium-like Caco-2 monolayer. *J Physiol Sci*, 69(1), 129-141. doi:10.1007/s12576-018-0628-2
- Thongon, N., Ketkeaw, P., & Nuekchob, C. (2014). The roles of acid-sensing ion channel 1a and ovarian cancer G protein-coupled receptor 1 on passive Mg²⁺ transport across intestinal epithelium-like Caco-2 monolayers. *J Physiol Sci*, 64(2), 129-139. doi:10.1007/s12576-013-0301-8
- 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. doi:10.3858/emmm.2012.44.11.077
- 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. doi:10.1007/s00424-016-1905-7
- van der Wijst, J., Blanchard, M. G., Woodroof, H. I., Macartney, T. J., Gourlay, R., Hoenderop, J. G., . . . Alessi, D. R. (2014). Kinase and channel activity of TRPM6 are co-ordinated by a dimerization motif and pocket interaction. *Biochem J*, 460(2), 165-175. doi:10.1042/BJ20131639
- Van Itallie, C. M., & Anderson, J. M. (2006). Claudins and epithelial paracellular transport. *Annu Rev Physiol*, 68, 403-429. doi:10.1146/annurev.physiol.68.040104.131404
- Van Itallie, C. M., Tietgens, A. J., LoGrande, K., Aponte, A., Gucek, M., & Anderson, J. M. (2012). Phosphorylation of claudin-2 on serine 208 promotes membrane retention and reduces

- trafficking to lysosomes. *J Cell Sci*, 125(Pt 20), 4902-4912. doi:10.1242/jcs.111237
- Vermette, D., Hu, P., Canarie, M. F., Funaro, M., Glover, J., & Pierce, R. W. (2018). Tight junction structure, function, and assessment in the critically ill: a systematic review. *Intensive Care Med Exp*, 6(1), 37. doi:10.1186/s40635-018-0203-4
- Voets, T., Nilius, B., Hoefs, S., van der Kemp, A. W., Droogmans, G., Bindels, R. J., & Hoenderop, J. G. (2004). TRPM6 forms the Mg²⁺ influx channel involved in intestinal and renal Mg²⁺ absorption. *J Biol Chem*, 279(1), 19-25. doi:10.1074/jbc.M311201200
- Volpe, S. L. (2013). Magnesium in disease prevention and overall health. *Adv Nutr*, 4(3), 378S-383S. doi:10.3945/an.112.003483
- Waldum, H. L., Arnestad, J. S., Brenna, E., Eide, I., Syversen, U., & Sandvik, A. K. (1996). Marked increase in gastric acid secretory capacity after omeprazole treatment. *Gut*, 39(5), 649-653. doi:10.1136/gut.39.5.649
- Wang, C. Y., Shi, J. D., Yang, P., Kumar, P. G., Li, Q. Z., Run, Q. G., . . . She, J. X. (2003). Molecular cloning and characterization of a novel gene family of four ancient conserved domain proteins (ACDP). *Gene*, 306, 37-44. doi:10.1016/s0378-1119(02)01210-6
- Weast, R. C. (1986). *CRC handbook of chemistry and physics Sixty-seventh edition*. United States: CRC Press Inc.
- White, R. E., & Hartzell, H. C. (1989). Magnesium ions in cardiac function. Regulator of ion channels and second messengers. *Biochem Pharmacol*, 38(6), 859-867. doi:10.1016/0006-2952(89)90272-4
- Wright, F. S. (1971). Increasing magnitude of electrical potential along the renal distal tubule. *Am J Physiol*, 220(3), 624-638. doi:10.1152/ajplegacy.1971.220.3.624
- Xie, J., Sun, B., Du, J., Yang, W., Chen, H. C., Overton, J. D., . . . Yue, L. (2011). Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP(2)) controls magnesium gatekeeper TRPM6 activity. *Sci Rep*, 1, 146. doi:10.1038/srep00146
- Xie, Y., Bowe, B., Li, T., Xian, H., Balasubramanian, S., & Al-Aly, Z. (2016). Proton Pump Inhibitors and Risk of Incident CKD and Progression to ESRD. *J Am Soc Nephrol*, 27(10), 3153-3163. doi:10.1681/ASN.2015121377
- Xie, Y., Bowe, B., Li, T., Xian, H., Yan, Y., & Al-Aly, Z. (2017). Long-term kidney outcomes among users of proton pump inhibitors without intervening acute kidney injury. *Kidney Int*,

91(6), 1482-1494. doi:10.1016/j.kint.2016.12.021

Xu, J. Z., Hall, A. E., Peterson, L. N., Bienkowski, M. J., Eessalu, T. E., & Hebert, S. C. (1997).

Localization of the ROMK protein on apical membranes of rat kidney nephron segments.

Am J Physiol, 273(5), F739-748. doi:10.1152/ajprenal.1997.273.5.F739

Yamazaki, D., Funato, Y., Miura, J., Sato, S., Toyosawa, S., Furutani, K., . . . Miki, H. (2013).

Basolateral Mg²⁺ extrusion via CNNM4 mediates transcellular Mg²⁺ transport across

epithelia: a mouse model. *PLoS Genet*, 9(12), e1003983. doi:10.1371/journal.pgen.1003983

Yang, L., Frindt, G., & Palmer, L. G. (2010). Magnesium modulates ROMK channel-mediated

potassium secretion. *J Am Soc Nephrol*, 21(12), 2109-2116. doi:10.1681/ASN.2010060617

Zou, Z. G., Rios, F. J., Montezano, A. C., & Touyz, R. M. (2019). TRPM7, Magnesium, and

Signaling. *Int J Mol Sci*, 20(8). doi:10.3390/ijms20081877

Zsurka, G., Gregan, J., & Schweyen, R. J. (2001). The human mitochondrial Mrs2 protein

functionally substitutes for its yeast homologue, a candidate magnesium transporter.

Genomics, 72(2), 158-168. doi:10.1006/geno.2000.6407

ประวัติย่อของผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล	ณัฐธิดา คำพวง
วัน เดือน ปี เกิด	1 พฤษภาคม 2539
สถานที่เกิด	ต.บ่อทอง อ.ทองแสนขัน จ.อุตรดิตถ์
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	ห้องเลขที่ 1/245 นอร์ทปาร์คคอนโดมิเนียม ถนน ลงหาดบางแสน ซอย 1 ตำบล แสนสุข อำเภอ เมือง จังหวัด ชลบุรี 20130
ประวัติการศึกษา	จบการศึกษามัธยมศึกษาตอนปลายจากโรงเรียนแก่งคอย จ.สระบุรี จบการศึกษาปริญญาตรี วิทยาการแพทย์ สาขาชีวเวชศาสตร์ คณะสหเวช ศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ปัจจุบันกำลังศึกษาในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์ การแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์