

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ ศาสตราจารย์ ดร.นทีทิพย์ กลุณามระ อดีตหัวหน้าหน่วยวิจัยด้านแคลเซียมและกระดูก คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล สำหรับคำแนะนำและการแลกเปลี่ยนประสบการณ์ในการทำวิจัย และขอขอบคุณ นางสาวจิรวรรณ ทองบุญชู และ นางสาวสนา แสงอำนาจ ที่ได้กรุณาช่วยเหลือในด้านเทคนิคงานวิจัย

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ นางสาวฐิติลักษณ์ หลีสกุล และนางสาวโสริยา แยมน้อย ซึ่งเป็นผู้จัดการโครงการวิจัยและบริหารจัดการบัญชี ตลอดจนสมาชิกของหน่วยวิจัยด้านแคลเซียมและกระดูก และภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

โครงการนี้ไม่อาจดำเนินการจนแล้วเสร็จได้ หากปราศจากทุนวิจัยและงบประมาณจากฝ่ายวิชาการ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และมหาวิทยาลัยมหิดล ตลอดจนการสนับสนุนเครื่องมือและสาธารณูปโภคจากคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

นรภัฏพล เจริญพันธุ์

(ศาสตราจารย์ ดร. นพ.นรภัฏพล เจริญพันธุ์)

เมธีวิจัยอาวุโส สกว.

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : RTA6080007

ชื่อโครงการ : งานวิจัยเพื่อการค้นพบการควบคุมควบคุมสมดุลแคลเซียมชนิดใหม่ด้วยกลไกเฉพาะที่และกลไกทั่วร่างกาย :
พื้นฐานเพื่อการพัฒนาผลิตภัณฑ์เสริมแคลเซียมที่มีประสิทธิภาพการดูดซึมสูงและวิธีการรักษาโรคกระดูกพรุน

ชื่อนักวิจัย : ศาสตราจารย์ ดร. นพ.นรรตพล เจริญพันธุ์

อีเมล : narattaphol.cha@mahidol.ac.th

ระยะเวลาโครงการ : 3 ปี (30 มิถุนายน 2560 ถึงวันที่ 29 มิถุนายน 2563)

บทคัดย่อ :

การรักษาสมดุลแคลเซียมและกระดูกมีความสัมพันธ์กันอย่างยิ่ง ความผิดปกติของอย่างใดอย่างหนึ่งย่อมส่งผลเสียต่อคุณภาพกระดูกรวมถึงมวลกระดูกด้วย ในคนและสัตว์กักตุน มีการสะสมแคลเซียมไว้ในกระดูกประมาณ 99% ในรูปของผลึกนาโนไฮดรอกซีอะพาไทต์ ซึ่งใช้เป็นโครงสร้างพื้นฐานของกระดูก ส่วนที่เหลืออีก 1% เก็บอยู่ในเซลล์และสารน้ำนอกเซลล์ เช่น อยู่ในน้ำเลือด เป็นต้น ซึ่งระดับของแคลเซียมในเลือดเป็นสิ่งที่ต้องรักษาให้อยู่ในระดับที่คงที่ โดยอาศัยการทำงานร่วมกันของฮอร์โมนหลายชนิด (เช่น พาราไธรอยด์ฮอร์โมน วิตามินดี ฮอร์โมนเพศ (เช่น เอสโตรเจน) ไพโบรลาสต์โกรทแฟคเตอร์-23 และแคลซิโทนิน) ร่วมกันกับอวัยวะสำคัญคือ ลำไส้ ไต และกระดูก โรค/ความผิดปกติของระบบฮอร์โมนและอวัยวะควบคุมสมดุลแคลเซียมอาจนำไปสู่ความล้มเหลวในการรักษาสมดุลแคลเซียม ซึ่งส่วนหนึ่งแสดงออกในรูปของกระดูกบางและกระดูกพรุน อาการดังกล่าวสามารถพบได้ในหลายภาวะ เช่น การให้นม ความดันโลหิตสูง เบาหวาน โลหิตจางธาลัสซีเมีย เป็นที่ทราบกันว่ากระดูกสะโพกหักเนื่องจากกระดูกพรุนนั้นเป็นสาเหตุสำคัญของการเสียชีวิต โรคกระดูกพรุนนั้นจึงเป็นภัยเงียบที่ผู้ป่วยมักจะไม่มีหวังจนกระทั่งเกิดกระดูกหัก ด้วยอายุที่ยืนยาวขึ้นของคนไทย โรคกระดูกพรุนในวัยหลังหมดประจำเดือน และกระดูกพรุนจากการสูงอายุนับเป็นปัญหาทางสุขภาพที่สำคัญของประเทศไทย ดังนั้น การเข้าใจกลไกและพยาธิกำเนิดจากระดับโมเลกุลไปจนถึงระดับทั้งร่างกาย จึงเป็นกลไกสำคัญที่จะนำไปสู่การพัฒนาวิธีการป้องกันและรักษาการสูญเสียมวลกระดูกตลอดระยะเวลา 3 ปีของการศึกษา ผู้วิจัยได้ผลิตผลงานวิจัยตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ จำนวน 27 เรื่อง สร้างเครือข่ายกับนักวิจัยในประเทศและระดับนานาชาติรวม 12 คน และเผยแพร่ข่าวสารผ่านสื่อสาธารณะเช่น โทรทัศน์ หนังสือพิมพ์ เว็บไซต์ข่าว จำนวน 21 เรื่อง นอกจากนี้ ยังได้สร้างเครือข่ายวิจัยร่วมกับศาสตร์อื่น ๆ เช่น ด้านวัสดุศาสตร์ ซึ่งทำให้เกิดการขยายความร่วมมือและเพิ่มผลกระทบของงานวิจัยในด้านการพัฒนาวัสดุทดแทนกระดูก (ใช้ฝังในร่างกายแทนจุดที่มีกระดูกหัก) และสิ่งสำคัญในการศึกษาในโครงการนี้คือ การส่งเสริมนักวิจัยและขยายเครือข่ายวิจัยทั้งในและต่างประเทศ มีกิจกรรมวิจัยร่วมกันอย่างสม่ำเสมอ ทำให้เกิดการจัดการความรู้และแลกเปลี่ยนความรู้ซึ่งกันและกัน และทำให้เกิดความยั่งยืนของเครือข่ายวิจัยในระยะยาว

คำหลัก : กระดูก; แคลเซียม; ความดันโลหิตสูง; เหล็ก; วัสดุศาสตร์

Abstract

Project Code: RTA6080007

Project Title: Discovery of novel local and systemic control of calcium homeostasis: a foundation for development of highly efficient calcium-fortified products and osteoporosis treatment

Investigator: Professor Narattaphol Charoenphandhu

E-mail Address: narattaphol.cha@mahidol.ac.th

Project Period: 3 years (30 June 2017 to 29 June 2020)

Abstract:

Calcium homeostasis and bone metabolism are closely related, and derangement of each other negatively impact bone mass and bone quality. In humans and rodents, 99% of calcium in the body is stored in bone in the form of hydroxyapatite nanocrystals, which are the most important building block of bone microstructure. The remaining 1% is in the intracellular compartment and the extracellular fluid. Plasma calcium concentrations are kept nearly constant by the concerted actions of calcium-regulating hormones [e.g., parathyroid hormone (PTH), 1,25-dihydroxyvitamin D₃ [1,25(OH)₂D₃], sex hormone (such as estrogen), fibroblast growth factor (FGF)-23 and calcitonin] as well as the three salient organs, namely intestine, kidney and bone. Abnormalities of calciotropic endocrine system and/or calcium-regulating organs may eventually lead to a collapse of the body calcium homeostasis. A derangement of calciotropic endocrine regulation is often observed in individuals with osteopenia or osteoporosis found in several pathophysiological conditions, such as lactation, hypertension, diabetes mellitus, and thalassemia. It is widely known that the osteoporosis-induced hip fracture is one of the important causes of death worldwide. Osteoporosis is indeed a silent killer as individuals with osteoporosis are generally not aware of the disease until they have bone fractures. With an increase in the elderly population in Thailand, postmenopausal and age-related osteoporosis will become the important health-care problems. Therefore, understanding of the underlying mechanisms and pathogenesis in local and systemic control of whole-body can lead to development of novel approach for prevention and treatment of bone loss. Along the entire 3-year research project, we produced 27 international publications and also establish a sustainable research group by fostering career development of 12 skillful Thai and international researchers, and distributing our research for general audience through 21 news articles. In addition, we have expanded a new horizon of calcium and bone research in Thailand by creating a team-spirit with young researchers in other scientific disciplines, such as materials science, thus rendering a new frontier of multidisciplinary research pertaining produce bone-like nanomaterials (e.g., implants for bone fracture). In addition, our team has reached a critical mass for perpetual knowledge sharing, knowledge management, and team spirit, which pertaining to sustainable research network.

Keywords: bone; calcium; hypertension; iron; biomaterials

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	1
บทคัดย่อ และ Abstract	2
บทสรุปผู้บริหาร	5
เนื้อหางานวิจัย	
ชื่อโครงการ และชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน	7
1. ความสำคัญและที่มาของปัญหา	7
รายงานผลการดำเนินงานของโครงการย่อย	
- โครงการย่อยที่ 1	12
- โครงการย่อยที่ 2	23
- โครงการย่อยที่ 3	37
- โครงการย่อยที่ 4	74
- โครงการย่อยที่ 5	90
2. ผลงานที่ได้จากโครงการ	100
3. กิจกรรมอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้อง	102
ภาคผนวก	
ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ	

บทสรุปผู้บริหาร

Executive Summary

รหัสโครงการ RTA6080007

ชื่อโครงการ งานวิจัยเพื่อการค้นพบการควบคุมสมดุลแคลเซียมชนิดใหม่ด้วยกลไกเฉพาะที่และกลไกทั่วร่างกาย :
พื้นฐานเพื่อการพัฒนาผลิตภัณฑ์เสริมแคลเซียมที่มีประสิทธิภาพการดูดซึมสูงและวิธีการรักษาโรคกระดูก
พรุน

ชื่อนักวิจัยหลัก ศาสตราจารย์ ดร. นพ.นรภัฏพล เจริญพันธุ์

การควบคุมสมดุลแคลเซียมและเมแทบอลิซึมของกระดูกเป็นกลไกซับซ้อนและมีความสัมพันธ์กันอย่างใกล้ชิด มีหลายปัจจัยที่ส่งผลต่อเมแทบอลิซึมของแคลเซียมและกระดูก 1) ปัจจัยที่อยู่ในเลือด (systemic factors) เช่น พาราไทรอยด์ฮอร์โมน วิตามินดี แคลซิโทนิน เอสโตรเจน ไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์ 23 (FGF-23) และโปรแลคติน เป็นต้น หรือกลุ่มไซโตไคน์ที่พบได้จากการอักเสบเรื้อรังเช่นที่พบในโรคเบาหวานหรือธาลัสซีเมีย 2) ปัจจัยที่อยู่ด้านโพรงลำไส้ เช่น แบคทีเรียในโพรงลำไส้ หรือสารอาหารบางชนิดรบกวนการดูดซึมแคลเซียม อาทิ ธาตุเหล็ก ไฟเตท (phytate) ออกซาเลต (oxalate) หรือกระตุ้นการดูดซึมแคลเซียม เช่น น้ำตาลกลูโคส กาแล็คโตส กรดอะมิโนบางชนิด 3) local factors ที่สร้างจากเซลล์ลำไส้หรือเซลล์กระดูกเองแล้วออกฤทธิ์ที่บริเวณใกล้เคียงกับแหล่งที่สร้าง และ 4) ผลของระบบประสาทออกฤทธิ์ที่เซลล์เยื่อบุลำไส้หรือเซลล์กระดูกโดยตรง ชุดโครงการวิจัยบูรณาการนี้ได้ศึกษากลไกการเสียสมดุลแคลเซียมและเมแทบอลิซึมของกระดูกในสัตว์ทดลองหลายโมเดล ได้แก่ ภาวะความดันโลหิตสูง โรคอ้วน โรคเลือดจางธาลัสซีเมีย ภาวะกระดูกบางจากการให้นม โมเดลเหล่านี้มีกลไกที่ส่งผลกระทบต่อเมแทบอลิซึมของแคลเซียมต่างกัน แต่ล้วนทำให้เกิดผลกระทบเชิงลบกับโครงสร้างและคุณสมบัติเชิงกลของกระดูก การศึกษาในโครงการนี้ แบ่งเป็น 3 โดเมนหลัก คือ

โดเมน 1 : Local and systemic control of calcium homeostasis

- 1) ผลของฮอร์โมน FGF-23 ต่อเมแทบอลิซึมของแคลเซียมและกระดูก : FGF-23 เป็นฮอร์โมนที่ทำหน้าที่ควบคุมสมดุลฟอสเฟตและแคลเซียม โดยการลดระดับของฮอร์โมนวิตามินดี ซึ่ง FGF-23 สร้างและหลังจากเซลล์กระดูกได้แก่ เซลล์ออสติโอไซต์และออสติโอเบลาสต์ จากผลการศึกษาวิจัยนี้ พบว่า FGF-23 ถูกสร้างขึ้นโดยเซลล์เยื่อบุลำไส้เพื่อตอบสนองต่อ $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ และภาวะที่มีแคลเซียมทางด้านโพรงลำไส้สูง การใช้แอนติบอดีต่อ FGF-23 เพื่อทำลาย FGF-23 ที่ถูกหลั่งออกมาด้านโพรงลำไส้ ส่งผลให้ $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ มีผลในการเพิ่มการดูดซึมแคลเซียมเช่นเดียวกับสภาวะปกติ แสดงให้เห็นว่ามีการสร้างและหลั่ง FGF-23 ออกมาทางด้าน apical จาก Caco-2 ถึงแม้ว่าการทดลองนี้จะแสดงให้เห็นถึงการมีกลไกการควบคุมแบบป้อนกลับเฉพาะแห่งเพื่อควบคุมการดูดซึมแคลเซียม แต่ก็ยังจำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อจะอธิบายรายละเอียดเกี่ยวกับกลไกการควบคุมการแสดงออกของโปรตีน FGF-23 โดย CaSR รวมถึงการส่งสัญญาณจาก FGF-23 เพื่อยับยั้งการดูดซึมแคลเซียมที่ลำไส้
- 2) กรดไขมันชนิดสายสั้น ได้แก่ acetate และ propionate ที่ถูกสร้างขึ้นโดยกระบวนการหมักของกลุ่มจุลินทรีย์ภายในลำไส้ใหญ่ สามารถช่วยเพิ่มอัตราการดูดซึมของแคลเซียม แต่กลไกยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด โดยเฉพาะเส้นทางที่เซลล์เยื่อบุลำไส้ใช้และโปรตีนขนส่งแคลเซียมที่เกี่ยวข้อง
- 3) การได้รับอาหารไขมันสูงเป็นเวลานานทำให้เนื้อกระดูกลดลง ยา vildagliptin ซึ่งเป็นยาที่ใช้รักษาภาวะเบาหวาน สามารถลดระดับโคเลสเตอรอลและเพิ่มความหนาแน่นกระดูกในหนูเพศผู้ได้ เมื่อพิจารณาตัวแปร metabolic หลังจากให้หนูเพศเมียเลี้ยงด้วยอาหารไขมันสูง มีน้ำหนักตัวมากขึ้น พบความบกพร่องของความทนทานต่อระดับน้ำตาลด้วยการทดสอบ oral glucose tolerance test การรับประทานอาหารไขมันสูงอาจทำให้กระดูกมีความแข็งแรงลดลง มีการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างกระดูก แต่ไม่ส่งผลกระทบต่อภาระขนส่งแคลเซียมที่ลำไส้ในหนูเพศเมียที่ไม่ท้อง

โดเมน 2 : Metabolic diseases and osteoporosis: prevention and treatment

- 1) เหล็กทั้งรูปแบบเฟอร์ริก และเฟอร์รัส ทำให้เกิดการตายของเซลล์ออสติโอเบลาสต์ โดยเฟอร์ริกทำให้เกิดการตายของเซลล์ออสติโอเบลาสต์มากกว่าเหล็กเฟอร์รัส โดยทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการตายของเซลล์แบบเอพอโทซิส โดยเฟอร์ริกมีผลให้เกิดการเพิ่มขึ้นของโปรตีนกลุ่มนี้มากกว่าเหล็กเฟอร์รัส
- 2) เหล็กเฟอร์ริกและเฟอร์รัสล้วนทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของเหล็กภายในเซลล์ออสติโอเบลาสต์ แสดงถึงการนำเข้าสู่เซลล์ของออสติโอเบลาสต์ โดยเหล็กเฟอร์ริกก็มีผลต่อออสติโอเบลาสต์มากกว่าเหล็กเฟอร์รัส ทำให้เกิดการนำเข้าสู่เซลล์ของออสติโอเบลาสต์มากกว่า โดยเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการขนส่งเหล็ก โดยมีการลดลงของการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการนำเหล็กเข้าสู่เซลล์ และมีการเพิ่มการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการขนส่งเหล็กออกจากเซลล์ เหล็กทั้งรูปแบบเฟอร์ริก และเฟอร์รัส มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาของออสติโอเบลาสต์และออสติโอคลาสต์ต่างกัน โดยพบการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีน Runx2, คอลลาเจน ชนิดที่ 1, เอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส และโปรตีนออสติโอแคลซิน ที่แตกต่างกันตามระยะเวลาที่ได้รับเหล็ก
- 3) วิตามินดี ทำให้เกิดการนำเข้าสู่เซลล์ออสติโอเบลาสต์มากขึ้น บ่งชี้ได้จากการเพิ่มขึ้นของเหล็กภายในเซลล์ออสติโอเบลาสต์ที่ได้รับวิตามินดี
- 4) ภาวะเหล็กเกินมีผลในการยับยั้งการขนส่งแคลเซียมในเซลล์ลำไส้เล็ก โดยพบว่าการขนส่งแคลเซียม และเหล็กในเซลล์ลำไส้เล็ก มีความสัมพันธ์เชิงผกผันซึ่งกันและกัน
- 5) วิตามินซี มีผลเพิ่มการละลายของแคลเซียมคาร์บอเนต ซึ่งอาจมีผลให้ ionized calcium เพิ่มขึ้นและอาจมีผลให้การดูดซึมแคลเซียมเพิ่มขึ้นในสิ่งมีชีวิตได้
- 6) ภาวะความดันโลหิตสูงที่ถูกชักนำด้วยอาหารที่มีโซเดียมสูงทำให้เสียโครงสร้างระดับจุลภาคของกระดูก โดยพบว่าจำนวนเซลล์สร้างกระดูก (osteoblast number) พื้นผิวของเซลล์สร้างกระดูก (osteoblast surface) ปริมาณ osteoid และพื้นผิวของ osteoid ลดลง ในขณะที่จำนวนเซลล์สลายกระดูก (osteoclast number) และพื้นผิวของออสติโอคลาส (osteoclast surface) เพิ่มขึ้น จากการพบการลดลงของมวลกระดูกร่วมกับการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการรักษามวลของมวลกระดูกแสดงให้เห็นว่าภาวะความดันโลหิตที่สูงขึ้นจากได้รับโซเดียมปริมาณสูงส่งผลให้การทำงานของเซลล์สร้างและสลายกระดูกไม่สมดุลกัน โดยพบการสลายกระดูกที่เพิ่มมากขึ้นในขณะที่การสร้างกระดูกลดลงจึงส่งผลให้เกิดการลดลงของมวลกระดูก

โดเมน 3 : Bone scaffold for fracture treatment

สารชีววัสดุผสมระหว่างสารอนินทรีย์แคลเซียมฟอสเฟต ร่วมกับไบโอพอลิเมอร์ไคโตซานและ poly(lactic acid) มีสภาพความยืดหยุ่นที่ใกล้เคียงกับกระดูกชั้นใน เมื่อขึ้นโครงร่าง 3 มิติ ยังมีคุณสมบัติที่จะกระตุ้นการเหนี่ยวนำเซลล์กระดูกได้ดีพอ ๆ กับแก้วซึ่งเซลล์ชอบที่จะเกาะและเจริญเติบโต มีความเสถียรในสารละลายที่ใช้เพาะเลี้ยงเซลล์กระดูก และมีคุณสมบัติกระตุ้นการเหนี่ยวนำเซลล์สร้างกระดูกให้เจริญเติบโตได้ ดังนั้นส่วนผสมชีววัสดุนี้อาจพัฒนาต่อยอดเพื่อใช้ทดแทนกระดูก (ใช้ฝังในร่างกายแทนจุดที่มีกระดูกหัก)

ตลอดระยะเวลา 3 ปีของโครงการ ผู้วิจัยได้ผลิตผลงานวิจัยโดยตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ 27 เรื่อง สร้างทีมวิจัยที่มีนักวิจัยทั้งในประเทศและต่างประเทศ มีการจัดการความรู้ (knowledge management) แลกเปลี่ยนความรู้กันอย่างต่อเนื่องภายในกลุ่ม รวมถึงเผยแพร่องค์ความรู้ผ่านสื่อสาธารณะ เช่น โทรทัศน์ หนังสือพิมพ์ เว็บไซต์ข่าว จำนวน 21 เรื่อง ตลอดจนมีการจัดประชุมวิชาการรวม 3 ครั้ง เพื่อเผยแพร่องค์ความรู้ผ่านกระบวนการ knowledge translation สู่ประชาชน นักวิจัยและผู้สนใจทั่วไป

เนื้อหางานวิจัย

สัญญาเลขที่ RTA6080007

ชื่อโครงการ : งานวิจัยเพื่อการค้นพบการควบคุมสมดุลแคลเซียมชนิดใหม่ด้วยกลไกเฉพาะที่และกลไกทั่วร่างกาย :
พื้นฐานเพื่อการพัฒนาผลิตภัณฑ์เสริมแคลเซียมที่มีประสิทธิภาพการดูดซึมสูงและวิธีการรักษาโรคกระดูกพรุน
ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน ศาสตราจารย์ ดร. นพ.นรตพล เจริญพันธุ์
รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 30 มิถุนายน 2560 ถึงวันที่ 29 มิถุนายน 2563

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหา

โครงการวิจัยนี้ มีแผนงานวิจัยที่ต่อเนื่องจากโครงการเดิม (โครงการวิจัยบูรณาการด้านเมแทบอลิซึมของแคลเซียมและการศึกษาโครงสร้างของกระดูกในระดับจุลภาค) โดยมีการขยายแผนงานให้ครอบคลุม 2 ด้านใหญ่ ๆ คืองานวิจัยเพื่อสร้างองค์ความรู้ใหม่ และงานวิจัยประยุกต์ที่เน้นการนำไปใช้ประโยชน์อย่างเป็นรูปธรรม ปัจจุบันงานทั้งสองส่วนนี้ดำเนินไปพร้อม ๆ กัน ผ่านการสร้างเครือข่ายวิจัยกับนักวิจัยผู้เชี่ยวชาญจากหลายหน่วยงาน แผนงานวิจัยเพื่อสร้างองค์ความรู้ใหม่มีขอบเขตดังนี้

1.1 งานวิจัยเพื่อการสร้างองค์ความรู้ใหม่

1.1.1 งานวิจัยพื้นฐาน

การวิจัยเพื่อปฏิบัติความรู้ด้านฮอร์โมนที่ควบคุมสมดุลแคลเซียมของร่างกาย ความรู้ในตำรามาตรฐานกล่าวว่า เมแทบอลิซึมของแคลเซียมในมนุษย์และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม อยู่ภายใต้การควบคุมของฮอร์โมน 3 ชนิด ได้แก่ พาราไธรอยด์ฮอร์โมน วิตามินดี และแคลซิโทนิน ซึ่งทั้งหมดสามารถกระตุ้นการดูดซึมแคลเซียมที่ลำไส้ได้ อย่างไรก็ตาม การดูดซึมแคลเซียมอย่างไ้การควบคุมอาจทำให้เกิดอันตรายได้ ร่างกายจึงน่าจะมีระบบหรือฮอร์โมนที่ช่วยลดการดูดซึมแคลเซียมเช่นกัน จากงานวิจัยของ ศ. ดร. นพ.นรตพล และคณะพบว่า fibroblast growth factor-23 (FGF-23) ซึ่งเป็นฮอร์โมนที่ช่วยป้องกันไม่ให้เกิดการดูดซึมแคลเซียมและฟอสฟอรัสสูงมากจนเกิดอันตราย FGF-23 นอกจากจะสร้างจากกระดูกแล้ว ยังสร้างจากลำไส้และออกฤทธิ์ด้านการทำงานของวิตามินดีที่ลำไส้ได้โดยตรงได้ด้วย จึงน่าจะเป็นโปรตีนที่สำคัญที่ควบคุมการดูดซึมแคลเซียมที่ลำไส้ จึงต้องมีการศึกษากลไกการควบคุมการดูดซึมแคลเซียมที่ลำไส้ได้อย่างละเอียดเพื่อนำความรู้ไปประยุกต์ใช้ อาทิ การใช้เป็นตัวบ่งชี้สำหรับการรับประทานแคลเซียมที่เพียงพอ (biomarker of calcium adequacy) และการใช้เป็นสารที่ช่วยป้องกันพิษจากการรับประทานแคลเซียมเกิน เป็นต้น (วิจัยร่วมกับ รศ. ดร.กรรณิการ์ วงศ์ดี คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา)

นอกจาก FGF-23 แล้ว ยังมีปัจจัยอื่นที่จำกัดการดูดซึมแคลเซียมที่ลำไส้ได้ เช่น กรดแอมิโน เปปไทด์ และธาตุเหล็ก ซึ่งพบว่าประสิทธิภาพการดูดซึมธาตุเหล็กแปรผกผันกับการดูดซึมแคลเซียมที่ลำไส้ หมายความว่าหากรับประทานธาตุเหล็กพร้อมกับแคลเซียม เหล็กจะขัดขวางการดูดซึมแคลเซียมที่ลำไส้ ทำให้ร่างกายได้รับแคลเซียมจากอาหารลดลง ซึ่งปัญหาดังกล่าวพบได้บ่อยในผู้ป่วยโรคโลหิตจางธาลัสซีเมีย ความเข้าใจกลไกของลำไส้ที่ลดการดูดซึมแคลเซียมจากปัจจัยดังกล่าวข้างต้น จะช่วยในการพัฒนาวิธีการหรือผลิตภัณฑ์ที่สามารถเพิ่มการดูดซึมแคลเซียมให้เหมาะสมกับแต่ละบุคคลได้ (วิจัยร่วมกับ ดร.กรรณิการ์ วงศ์ดี คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา)

1.1.2 งานวิจัยประยุกต์

องค์ความรู้พื้นฐานเรื่องบทบาทของ FGF-23 เป็นปัจจัยที่จำกัดการดูดซึมแคลเซียมที่ลำไส้ และช่วยป้องกันไม่ให้เกิดการดูดซึมแคลเซียมและฟอสฟอรัสสูงมากจนเกิดอันตราย นำไปสู่งานวิจัยเชิงประยุกต์ เช่น การใช้ FGF-23 เป็น biomarker เพื่อบ่งชี้ความเพียงพอของการสะสมแคลเซียมหรือการรับประทานแคลเซียม, การปรับวิธีการให้แคลเซียมเสริมอย่างปลอดภัย, การเพิ่มอัตราการดูดซึมแคลเซียมและธาตุเหล็ก และการลดการเคลื่อนไหวของทางเดินอาหารที่เกิดจากการรับประทานแคลเซียมเสริม เป็นต้น (วิจัยร่วมกับ รศ. ดร.กรรณิการ์ วงศ์ดี,

ดร.กรกมล เลิศสุวรรณ และ ผศ. ดร.พิศเรศ ค่วย่วน โดย ผศ. ดร.พิศเรศ สังกัดภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์) ตลอดจนโรคกระดูกพรุนที่เป็นผลพวงจากอายุและความเสื่อมต่าง ๆ ของร่างกาย เช่น โรคกระดูกพรุนจากความดันโลหิตสูง และโรคกระดูกพรุนจากเบาหวาน เป็นต้น

มีงานวิจัยชี้ให้เห็นถึงความสัมพันธ์ของการเปลี่ยนแปลงชุมชนจุลินทรีย์ในลำไส้ (gut microbiota) กับการดูดซึมสารอาหาร วิตามินและแร่ธาตุ เช่น วิตามินบี 12 แคลเซียม แมกนีเซียม กรดน้ำดี เป็นต้น อีกทั้งเป็นตัวการทำให้เกิดโรคเบาหวาน โรคอ้วน รวมถึงภาวะเบาหวานขณะตั้งครรภ์ โดยรบกวนเมแทบอลิซึมของกรดน้ำดี กระบวนการอักเสบ ทำให้ร่างกายดื้อต่อฤทธิ์อินซูลินและรบกวนการสร้างฮอร์โมนจากลำไส้ มีงานวิจัยยืนยันความสัมพันธ์ของอาหารที่รับประทาน จุลินทรีย์ในลำไส้ และสุขภาพของกระดูก^{1,2} ภาวะกระดูกบางที่พบในผู้ป่วยโรคเบาหวาน โรคอ้วน ภาวะดื้ออินซูลินขณะตั้งครรภ์ รวมถึงระยะตั้งครรภ์และให้นมบุตรอาจสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ในลำไส้ การศึกษาเรื่องนี้จะนำไปสู่การพัฒนาผลิตภัณฑ์เสริมแคลเซียมที่มีประสิทธิภาพตัวใหม่ที่เหมาะสมในแต่ละสภาวะ กล่าวคือ สูตรแคลเซียมที่พัฒนาขึ้นจะต้องมีส่วนผสมที่เหมาะสมเพื่อปรับสภาวะในลำไส้ให้เหมาะกับการดูดซึมแคลเซียม เช่น ผลิตภัณฑ์เสริมแคลเซียมผสมโพลิฟอสเฟตหรืออินนูลินซึ่งเป็นอาหารของจุลินทรีย์ช่วยเพิ่มการดูดซึมแคลเซียม และ/หรือ เชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่ช่วยในเรื่องการดูดซึมแคลเซียมหรือสูตรต้นแบบแคลเซียมเสริมผสมน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวและกรดแอมิโนลิวซีน เป็นต้น (วิจัยร่วมกับ **ดร.ปาทัน สุนทรสารทูล** คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล และ **ดร.วรรณพ วิเศษสงวน** ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ)

นอกจากนั้น ทีมวิจัยได้วางแผนที่จะขยายขอบเขตของการวิจัยด้านแคลเซียมและกระดูกในประเทศไทย โดยสร้างทีมวิจัยรุ่นใหม่ในวิทยาศาสตร์สาขาอื่น ๆ เช่น การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำและวัสดุศาสตร์ ซึ่งจะช่วยสร้างงานวิจัยแบบสหสาขาแนวหน้าในด้านแคลเซียมเมแทบอลิซึมในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ เช่น การผลิตปลาและเพาะเลี้ยงกบ พันธุ์ที่สามารถรับประทานได้ (วิจัยร่วมกับ **ผศ. ดร.ละอียด นาคกระแสน์** ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น) และการพัฒนาวัสดุประเภทไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่เสริมความแข็งแรงของกระดูก (วิจัยร่วมกับ **ผศ. ดร.วิวัฒน์ พลอัน** ภาควิชาฟิสิกส์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์) เป็นต้น

1.2 การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์และการพัฒนานวัตกรรม

ปัจจุบัน ทีมวิจัยมีความร่วมมือกับบริษัทยาชื่อ บริษัทไบโอฟาร์ม เคมีคัลส์ จำกัด (Biopharm Chemicals Co. Ltd.) เพื่อร่วมกันพัฒนาผลิตภัณฑ์ยาเสริมแคลเซียมที่ดูดซึมได้ดีกว่าผลิตภัณฑ์ที่จำหน่ายในท้องตลาด (มี MOU ร่วมกัน โดย ศ. ดร. นพ.นรุตพล ได้รับมอบอำนาจจากอธิการบดีมหาวิทยาลัยมหิดลในการลงนามข้อตกลงร่วมกับทางบริษัท) ในอนาคต ทีมวิจัยวางแผนจะนำความรู้จากงานวิจัยไปใช้ประโยชน์และพัฒนาวิธีการหรือนวัตกรรมในรูปแบบต่าง ๆ เพิ่มเติมอีก เช่น

1. การเผยแพร่ความรู้และสร้างความตระหนักถึงวิธีการรับประทานแคลเซียมร่วมกับอาหารประเภทอื่น ๆ เช่น เหล็ก สังกะสี กรดแอมิโน และน้ำตาล อย่างถูกวิธี เพื่อการมีสุขภาพกระดูกที่ดีไปจนถึงวัยสูงอายุ
2. การพัฒนาผลิตภัณฑ์เสริมแคลเซียมและธาตุเหล็กสำหรับผู้ที่อยู่ในระหว่างการตั้งครรภ์
3. การพัฒนาผลิตภัณฑ์เสริมแคลเซียม วิตามินดี วิตามินซี และสังกะสีสำหรับผู้ป่วยโรคโลหิตจางธาลัสซีเมีย
4. การพัฒนากระดูกเทียมเพื่อใช้ซ่อมแซมกระดูกหัก (การซ่อมแซมบาดแผลของกระดูกที่เกิดจากการผ่าตัดเจาะกระดูก หรือ Burr hole)

โครงการวิจัยนี้ประกอบด้วย 5 โครงการย่อย โดยจัดแบ่งเป็น 3 กลุ่มหลัก (basic domain) ได้แก่

Domain 1: Local and systemic control of calcium homeostasis

¹ Review article: Weaver CM. Diet, gut microbiome, and bone health. Curr Osteoporos Rep 2015;13(2):125–30.

² Review article: McCabe L, Britton RA, Parameswaran N. Prebiotic and probiotic regulation of bone health: role of the intestinal and its microbiome. Curr Osteoporos Rep 2015;13(6):363–71.

Sub-project 1: Beneficial effect of gut microbial bioactive products on intestinal calcium transport and bone metabolism in insulin resistant beta-thalassemia

Sub-project 2: The beneficial effects of iron and calcium supplementation in pregnant rats: the interrelationships of gut microbiota and bone health in gestational diabetes

Domain 2: Metabolic diseases and osteoporosis: prevention and treatment

Sub-project 3: Effects of iron chelators on the reciprocal intestinal iron and calcium transport and bone structure in thalassemia

Sub-project 4: Effects of calcium and vitamin D supplementation on blood pressure and bone metabolisms in salt-induced hypertensive rats

Domain 3: Bone scaffold for fracture treatment

Sub-project 5: Development of a novel three dimensional (3D) porous bioactive nutrient elements co-doped calcium phosphate based bioceramics/ biopolymer nanocomposite scaffolds for bone tissue regeneration

สรุปรายละเอียดของแต่ละ Subproject

Sub project	Domain	Title	Principal investigator	Co-researcher
1	1, 2	Beneficial effect of gut microbial bioactive products on intestinal calcium transport and bone metabolism in insulin resistant beta-thalassemia	NC	PS, KW, PK,
2	1, 2	The beneficial effects of iron and calcium supplementation in pregnant rats: the interrelationships of gut microbiota and bone health in gestational diabetes	PS	NC, NT
3	1, 2	Effects of iron chelators on the reciprocal intestinal iron and calcium transport and bone structure in thalassemia	KL	MR, RA
4	2	Effects of calcium and vitamin D supplementation on blood pressure and bone metabolisms in salt-induced hypertensive rats	WT	PS
5	3	Development of a novel three dimensional (3D) porous bioactive nutrient elements co-doped calcium phosphate based bioceramics / biopolymer nanocomposite scaffolds for bone tissue regeneration	WP	NC

Note:

NC	=	Narattaphol Charoenphandhu	(Mahidol University)
KL	=	Kornkamon Lertsuwan	(Mahidol University)
KW	=	Kannikar Wongdee	(Burapha University)
PK	=	Pissared Khuituan	(Prince of Songkla University)
PS	=	Panan Suntornsaratoon	(Mahidol University)
WP	=	Weerapat Pon-on	(Kasetsart University)
WT	=	Wacharaporn Tiyasatkulkovit	(Chulalongkorn University)
MR	=	Mayuree Rodrat (Ph.D. student)	(Mahidol University)
NT	=	Nithipak Thammayon (Ph.D. student)	(Mahidol University)
RA	=	Rachaneevan Aeimlapa (Ph.D. student)	(Mahidol University)

วัตถุประสงค์โดยรวมของโครงการ

The principal objectives of the present research project are as follows.

1. To expand and strengthen research team

Currently we have recruited 4 new young researchers into our team, i.e., Dr. Panan Suntornsaratoon, Dr. Kornkamon Lertsuwan, Dr. Wacharaporn Tiyasatkulkovit and Dr. Pissared Khuituan. Therefore, our current team is well organized, consisting of professor, associate professor, assistant professor, new academic staffs (lecturers and senior researchers), post-doctoral fellows, and graduate students. Since calcium and bone physiology is a multidisciplinary research discipline, researchers in this field must be fostered to form a collaborative team with various research skills, including electrophysiology, biophysics, molecular biology, materials science, nanotechnology, etc. Our research team consists of researchers from various universities in Bangkok and other provinces, i.e., Mahidol University, Chulalongkorn University, Kasetsart University, Burapha University, and Prince of Songkla University.

2. To explore an unseen area in the field of calcium and bone physiology

Currently we focus on the discovery of novel local and systemic control of calcium homeostasis, and provide explanation as to how dietary nutrients, microbiota, luminal minerals, various local factors and systemic hormones interact to modulate calcium and bone metabolism. We aim to publish 20 international papers in high-quality journals.

3. To apply basic knowledge for future research utilization as well as commercialization

We have already known that simple calcium supplementation (e.g., calcium tablet) is not an effective procedure to supplement calcium. Calcium-fortified formulae have to contain dietary nutrients or small molecules (e.g, amino acids or microbiota-derived organic molecules) that can enhance calcium absorption. Our acquired knowledge can also help increase awareness for better understanding of how to consume calcium-rich products (e.g, which forms of diets are suitable, or do healthy individuals need to supplement calcium before aging?).

4. To perform a target-based research in the fields of bone-like materials and calcium-rich food

Some sub-projects aims to produce bone-like materials for treatment of osteoporosis fracture. We also aim to acquire a suitable proportion of components in calcium-fortified products (e.g., appropriate ratio of amino acids, short-chain fatty acids, zinc, and calcium in the product).

5. To foster collaboration between national and international researchers

Our research group currently collaborates with several research leaders in Thailand and abroad. For example, we are working with Thalassemia Research Center, Institute of Molecular Biosciences, Mahidol University (Associate Professor M.L. Saovaros Svasti and Professor Suthat Fucharoen for thalassemia-related sub-project) , and Cardiac Electrophysiology Research and Training Center, Faculty of Medicine, Chiang Mai University (Professor Nipon Chattipakorn and Professor Siriporn Chattipakorn for sub-projects related to microbiome and metabolic diseases). We also have a strong collaboration with Professor David N. Sheppard at the University of Bristol, UK in a project related to intestinal ion transport. We are planning to expand our collaborative network with other world-leading research groups that are adept at sophisticated bone-related techniques, such as high-resolution micro/nano-computed tomography.

ความก้าวหน้าของการวิจัย ณ ช่วงเวลารายงาน

สถานที่ทำการวิจัย

- ห้องปฏิบัติการ พีอาร์ 405 และพีอาร์ 409 ภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาเขต พญาไท (โครงการย่อยที่ 1, 2, 3 และ 4)
- ห้องปฏิบัติการภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาเขตพญาไท (โครงการย่อยที่ 3)
- ห้องปฏิบัติการ เค 643 และ 645 หน่วยวิจัยด้านแคลเซียมและกระดูก คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาเขตพญาไท (โครงการย่อยที่ 1 และ 2)
- หน่วยสัตว์ทดลอง คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาเขตพญาไท (โครงการย่อยที่ 1, 2, 4)
- ห้องปฏิบัติการ 207 คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา (โครงการย่อยที่ 1)

- **โครงการย่อยที่ 1**

Beneficial effect of gut microbial bioactive products on intestinal calcium transport in normal female rats

ความสำคัญและปัญหาวิจัย

เป็นที่ทราบกันดีว่า จุลินทรีย์ภายในลำไส้ใหญ่มีบทบาทที่สำคัญหลายประการ เช่น ช่วยในการย่อย สลาย หมัก และดูดซึมสารอาหารรวมถึงวิตามินต่าง ๆ เข้าสู่ร่างกาย อีกหนึ่งหน้าที่ที่สำคัญของกลุ่มจุลินทรีย์ คือ การสร้างสารอินทรีย์และวิตามินบางชนิดขณะเกิดกระบวนการหมัก (Microbial metabolite products) เช่น กรดไขมันชนิดสายสั้น (Short-chain fatty acids) กรดแลคติก วิตามินบี และวิตามินเค ซึ่งการศึกษาก่อนหน้านี้ พบว่ากรดไขมันชนิดสายสั้น เช่น butyrate, acetate และ propionate ที่ถูกสร้างขึ้นโดยกลุ่มจุลินทรีย์ภายในลำไส้ใหญ่นี้ สามารถช่วยเพิ่มการดูดซึมของแคลเซียมและแร่ธาตุอื่นๆ เช่น แมกนีเซียม เนื่องด้วยสภาวะความเป็นกรดที่เพิ่มขึ้นภายในโพรงลำไส้ จึงทำให้แคลเซียมสามารถแตกตัวให้อยู่ในรูปแบบอิสระ (free-ionized calcium) อีกทั้งการศึกษาก่อนหน้า พบว่าหนูที่ถูกตัดลำไส้ส่วนซีคัมจะมีภาวะกระดูกพรุน แสดงให้เห็นว่า ซีคัม (และอาจจะรวมถึงสารเคมีภายในซีคัม) มีประสิทธิภาพทำให้การดูดซึมแคลเซียมสูง เมื่อร่างกายขาดลำไส้ส่วนนี้ไปจึงส่งผลกระทบต่อสมดุลแคลเซียม และทำให้เกิดภาวะกระดูกบางและกระดูกพรุนตามมา แต่กลไกที่แท้จริงของกลุ่มจุลินทรีย์ในการควบคุมการดูดซึมแคลเซียมที่ลำไส้ใหญ่นั้น ยังไม่เป็นที่ ทราบแน่ชัด โดยเฉพาะเส้นทางที่เซลล์เยื่อบุลำไส้ใช้ขนส่งแคลเซียมและการแสดงออกของโปรตีนขนส่งแคลเซียม

วัตถุประสงค์ของการวิจัยหลัก (ณ ช่วงเวลารายงาน 30 มิถุนายน 2560 ถึง 29 มิถุนายน 2562)

1. วัตถุประสงค์หลักของการทดลองคือ เพื่อแสดงว่า FGF-23 ทำหน้าที่เป็นตัวยับยั้งการขนส่งแคลเซียมโดยลำไส้ ในเซลล์เยื่อบุลำไส้ชนิดคาโคทู (Caco-2) และการยับยั้งการส่งสัญญาณของ FGF-23 (เช่นการใช้แอนติบอดีต่อ FGF-23) สามารถยับยั้งกลไกการควบคุมนี้ในระหว่างที่เซลล์ได้รับวิตามินดี นอกจากนี้ผู้วิจัยยังมีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาว่า CaSR มีความเกี่ยวข้องกับกลไกการยับยั้งการดูดซึมแคลเซียมโดย FGF-23 หรือไม่ (ในการทดลองนี้ผู้วิจัยใช้เซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 เพื่อเป็นโมเดลสำหรับการทดลอง)
2. เพื่อศึกษาบทบาทของสารอาหารหรือวิตามินต่าง ๆ ที่ถูกสร้างขึ้นโดยกลุ่มจุลินทรีย์ต่ออัตราการดูดซึมของแคลเซียมในลำไส้ใหญ่ส่วนซีคัมและโคลอน ค่าตัวแปรทางไฟฟ้า รวมถึงกลไกที่ทำให้เกิดผลดังกล่าว

วัตถุประสงค์ 1 : เพื่อแสดงว่า FGF-23 ทำหน้าที่เป็นตัวยับยั้งการขนส่งแคลเซียมโดยลำไส้ ในเซลล์เยื่อบุลำไส้ชนิดคาโค-2 (Caco-2) และการยับยั้งการส่งสัญญาณของ FGF-23 (เช่นการใช้แอนติบอดีต่อ FGF-23) สามารถยับยั้งกลไกการควบคุมนี้ในระหว่างที่เซลล์ได้รับวิตามินดี

การออกแบบการทดลอง

การทดลองที่ 1 เพื่อยืนยันว่าการขนส่งแคลเซียมจากเซลล์ที่กระตุ้นด้วยวิตามินดีเป็นการขนส่งโดยผ่านเซลล์ ผู้วิจัยจึงใช้สารยับยั้งการขนส่งแคลเซียมออกจากด้าน basolateral ได้แก่ trifluoperazine (TFP) และ KB-R7943 เพื่อยับยั้ง PMCA_{1b} และ NCX1 ตามลำดับ ผู้วิจัยใช้เซลล์ Caco-2 ซึ่งเลี้ยงบนสแนปเวล (Snapwell) จะถูกพรีทรีตด้วย 1,25(OH)₂D₃ 10 นาโนโมลาร์ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้น Snapwell จะนำมาวางลงใน Ussing chamber เซลล์จะถูกพรีทรีตด้วย 200 หรือ 400 ไมโครโมลาร์ สำหรับ TFP หรือ 150 ไมโครโมลาร์ สำหรับ KB-R7943 เป็นเวลา 35 นาที ก่อนที่จะวัดการขนส่งแคลเซียม

การทดลองที่ 2 เพื่อศึกษาผลของ FGF-23 ในระยะเฉียบพลัน (acute) และกึ่งเฉียบพลัน (subacute) ต่อการขนส่งแคลเซียมโดยลำไส้ Caco-2 ถูกพรีทรีตด้วย 1,25(OH)₂D₃ 10 นาโนโมลาร์ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ก่อนที่จะนำ Snapwell มาวางลงใน Ussing chamber เพื่อวัดการขนส่งแคลเซียมต่อไป การศึกษาผลของ FGF-23 ในระยะเฉียบพลันนั้น Caco-2 ถูกพรีทรีตด้วยโปรตีน recombinant human (rh)FGF-23 100 หรือ 200 นาโนกรัม/มล. ที่ด้าน apical หรือ basolateral เป็นเวลา 25 นาทีก่อนที่จะวัดการขนส่งแคลเซียม สำหรับการศึกษาผลของ FGF-23 ในระยะกึ่งเฉียบพลันนั้น Caco-2 ถูกพรีทรีตด้วย

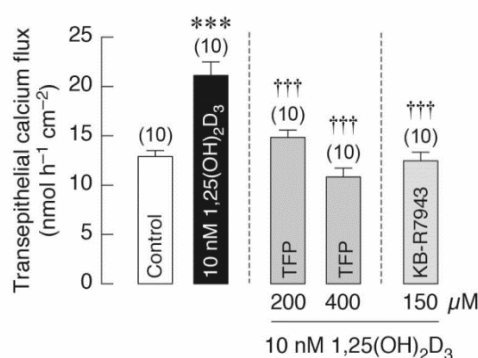
rhFGF-23 ขนาด 50 100 200 และ 400 นาโนกรัม/มล. ที่ด้าน apical basolateral หรือทั้งสองด้านของ Snapwell เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนนำมาวัดการขนส่งแคลเซียม

การทดลองที่ 3 เพื่อศึกษาผลของการมีปริมาณแคลเซียมสูงด้านโพรงลำไส้ต่อการขนส่งแคลเซียมและการแสดงออกของโปรตีน FGF-23 เซลล์ Caco-2 ที่เลี้ยงบน Snapwell และพรีทรีตด้วย $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 10 นาโนโมลาร์ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ตามด้วยแคลเซียมพรีทรีตที่ด้าน apical ขนาด 10 20 และ 30 มิลลิโมลาร์ ก่อนที่จะนำ Snapwell มาวางลงใน Ussing chamber เพื่อวัดการขนส่งแคลเซียม ในการศึกษาการแสดงออกของโปรตีน Caco-2 ถูกเลี้ยงบน Transwell และพรีทรีตด้วย $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ขนาด 1 10 หรือ 100 นาโนโมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทั้งด้าน apical และ basolateral นอกจากนี้ยังมีการพรีทรีต $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 10 นาโนโมลาร์ พร้อมกับแคลเซียม 10 20 หรือ 30 มิลลิโมลาร์ ทางด้าน apical หลังจาก 24 ชั่วโมง จึงทำการเก็บเซลล์เพื่อนำมาศึกษาการแสดงออกของโปรตีนด้วยเทคนิคเวสเทิร์นบลอต (Western blot analysis)

การทดลองที่ 4 เพื่อศึกษาว่ามีการสร้าง FGF-23 เฉพาะแห่งโดยเซลล์ลำไส้หรือไม่ เซลล์ Caco-2 ที่เลี้ยงบน Snapwell ถูกพรีทรีตด้วย $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 10 นาโนโมลาร์ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ตามด้วยแคลเซียม 30 มิลลิโมลาร์ และแอนติบอดีต่อ FGF-23 ที่ขนาดต่าง ๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่ด้าน basolateral ก่อนนำมาวัดการขนส่งแคลเซียมด้วย Ussing chamber

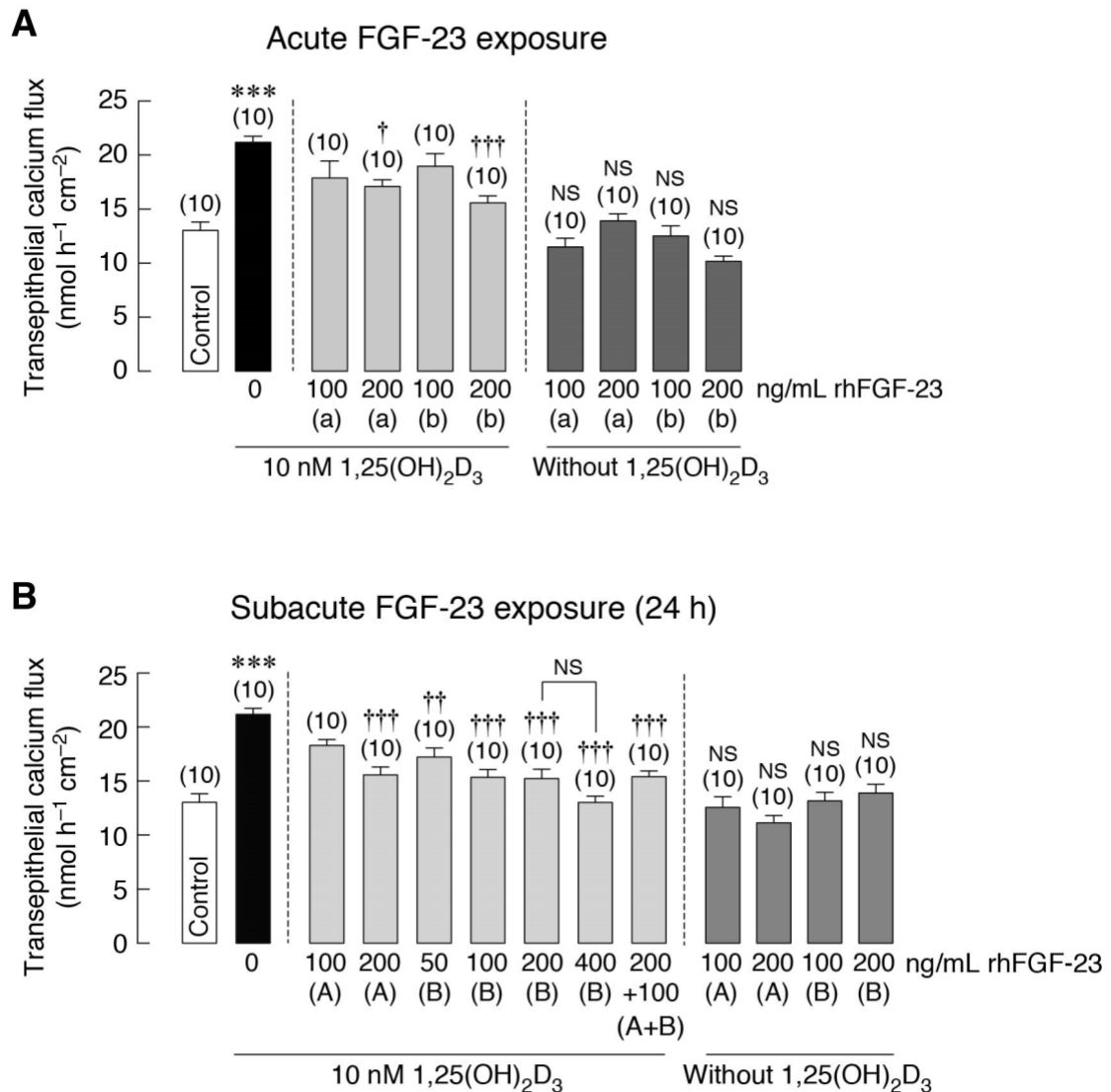
การทดลองที่ 5 เพื่อศึกษาบทบาทของ CaSR ต่อการควบคุมการขนส่งแคลเซียมโดยลำไส้ เซลล์ Caco-2 ที่เลี้ยงบน Snapwell ถูกพรีทรีตด้วย $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 10 นาโนโมลาร์ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตามด้วยการผสมกันของ $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 10 นาโนโมลาร์ แคลเซียม 30 มิลลิโมลาร์ และสารยับยั้ง CaSR ขนาด 0.5 1 หรือ 2 ไมโครโมลาร์ ทางด้าน apical เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำเซลล์บน Snapwell ไปวัดการขนส่งแคลเซียมด้วย Ussing chamber สำหรับการศึกษาการแสดงออกของโปรตีน FGF-23 นั้น Caco-2 ถูกพรีทรีตด้วย $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 10 นาโนโมลาร์ แคลเซียม 30 มิลลิโมลาร์ และสารยับยั้ง CaSR เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ผลการวิจัย



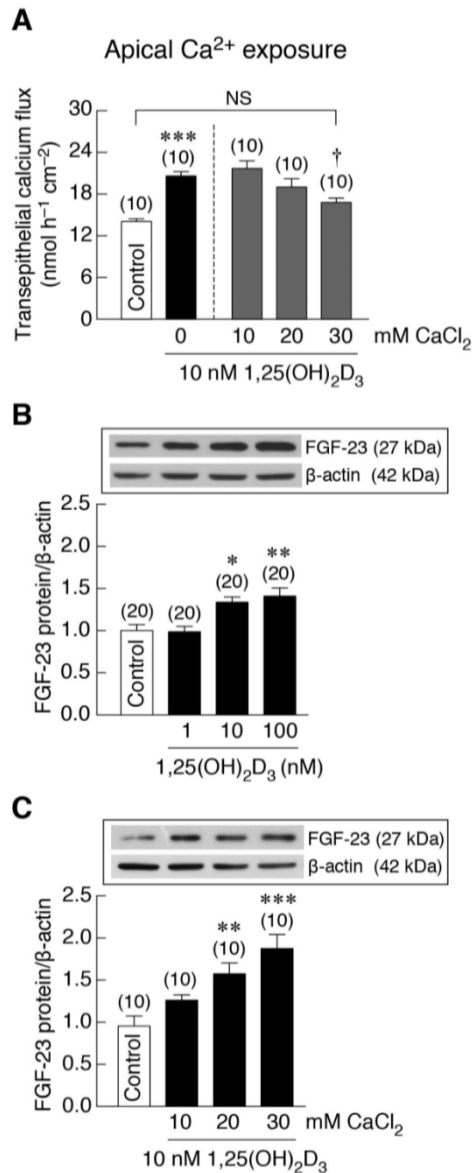
รูปที่ 1.1 การขนส่งแคลเซียมผ่านเซลล์ Caco-2 ที่ถูกกระตุ้นด้วย $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ และได้รับสารยับยั้งตัวขนส่งแคลเซียมออกทางด้าน basolateral ใน Ussing chamber (** $P < 0.001$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม; และ $^{†††}P < 0.001$ เมื่อเทียบกับกลุ่มที่พรีทรีต $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$)

จากผลการทดลองดังรูปที่ 1.1 แสดงให้เห็นว่าการให้ $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 10 นาโนโมลาร์ สามารถกระตุ้นการขนส่งแคลเซียมโดยเซลล์ Caco-2 ได้ โดยที่ไม่มีความแตกต่างของแคลเซียมระหว่างด้าน apical และ basolateral การใช้สารยับยั้งตัวขนส่งแคลเซียมด้าน basolateral ได้แก่ TFP 200 หรือ 400 ไมโครโมลาร์ และ KB-R7943 150 ไมโครโมลาร์ สามารถลดการขนส่งแคลเซียมโดยเซลล์ Caco-2 ซึ่งถูกกระตุ้นด้วย $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ จากผลการทดลองจึงยืนยันได้ว่า ค่าการขนส่งแคลเซียมที่ได้นั้นมาจากการขนส่งแคลเซียมโดยผ่านเซลล์



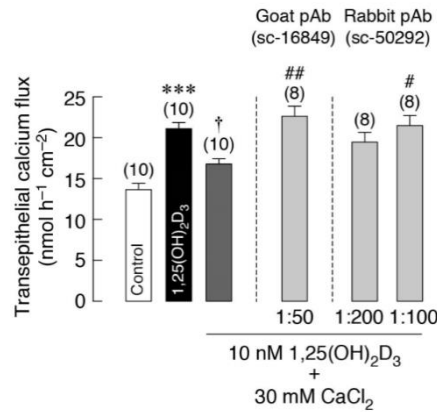
รูปที่ 1.2 การขนส่งแคลเซียมผ่านเซลล์ Caco-2 ที่ได้รับ rhFGF-23 100 และ 200 นาโนกรัม/มล. ที่ด้าน apical หรือ basolateral เป็นเวลา 25 นาที (A) หรือการได้รับ rhFGF-23 50 100 200 และ 400 นาโนกรัม/มล. ที่ด้าน apical basolateral หรือทั้งสองด้านของ Snapwell เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (B) (*** $P < 0.001$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม; $^{\dagger}P < 0.01$ และ $^{\dagger\dagger}P < 0.001$ เมื่อเทียบกับกลุ่มที่หริต 1,25(OH)₂D₃; NS ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม)

ผลการทดลองดังรูปที่ 1.2 พบว่าผลโดยฉับพลันจากการได้รับ rhFGF-23 100 และ 200 นาโนกรัม/มล. และผลกึ่งฉับพลันจากการได้รับ rhFGF-23 50 100 200 และ 400 นาโนกรัม/มล. สามารถลดการขนส่งแคลเซียมโดยเซลล์ Caco-2 ซึ่งถูกกระตุ้นด้วย 1,25(OH)₂D₃ ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อย่างไรก็ตาม FGF-23 ไม่มีผลต่อการขนส่งแคลเซียมระดับปกติในเซลล์ Caco-2 (เช่น ในภาวะที่ไม่ได้ถูกกระตุ้นด้วย 1,25(OH)₂D₃) จากผลการทดลองนี้จึงมีความเป็นไปได้ว่า FGF-23 เป็นตัวยับยั้งการดูดซึมแคลเซียมที่มากเกินไป ซึ่งถูกกระตุ้นโดย 1,25(OH)₂D₃



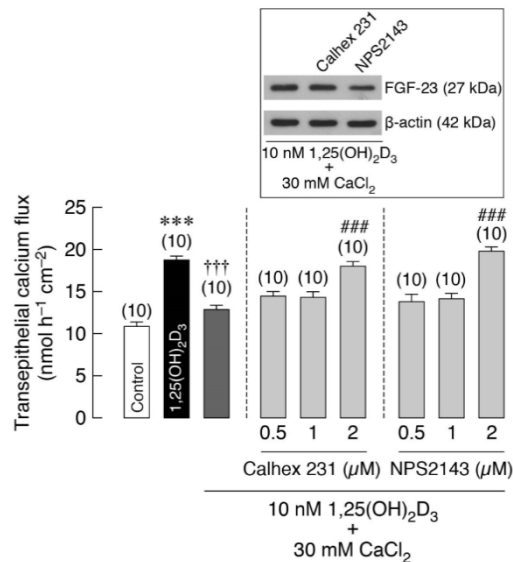
รูปที่ 1.3 (A) การขนส่งแคลเซียมผ่านเซลล์ Caco-2 ที่กระตุ้นด้วย $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 72 ชั่วโมง และได้รับแคลเซียมด้าน apical ขนาด 10 20 และ 30 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (B) การแสดงออกของโปรตีน FGF-23 ในเซลล์ Caco-2 ที่ได้รับ $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ขนาด 1 10 หรือ 100 นาโนโมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (C) การแสดงออกของโปรตีน FGF-23 ในเซลล์ Caco-2 ที่ได้รับ $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 10 นาโนโมลาร์ และแคลเซียมด้าน apical 10 20 หรือ 30 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ และ *** $P < 0.001$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม; † $P < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มที่รีต $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$; NS ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม)

ผลการทดลองดังรูป 1.3A พบว่าการได้รับแคลเซียมสูงที่ด้าน apical จะยับยั้งผลของ $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ในลักษณะที่แปรผันตามขนาดของ $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ นอกจากนี้ยังเห็นว่าการดูดซึมแคลเซียมในกลุ่มที่ได้รับแคลเซียม 30 มิลลิโมลาร์ ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม นั่นคือแคลเซียมสามารถกลบล้างผลของ $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ และทำให้ค่าการขนส่งแคลเซียมกลับคืนสู่ค่าปกติ การวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค Western blot แสดงให้เห็นชัดเจนว่ามีการเพิ่มขึ้นของโปรตีน FGF-23 จากเซลล์ Caco-2 ที่ได้รับ $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ขนาด 10 และ 100 นาโนโมลาร์ หรือแคลเซียมด้าน apical ขนาด 20 และ 30 มิลลิโมลาร์ จึงเป็นไปได้ว่า $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ และการมีแคลเซียมสูงด้าน apical ซึ่งทั้งสองสิ่งนี้สามารถที่ทำให้เกิดการดูดซึมแคลเซียมที่มากเกินไป อาจจะเป็นปัจจัยที่กระตุ้นการแสดงออกและการหลั่ง FGF-23 ออกมา และจึงทำหน้าที่ในการยับยั้งการขนส่งแคลเซียมในที่สุด



รูปที่ 1.4 การขนส่งแคลเซียมผ่านเซลล์ Caco-2 กลุ่มควบคุม กลุ่มที่กระตุ้นด้วย 1,25(OH)₂D₃ และกลุ่มที่ให้ 1,25(OH)₂D₃ พร้อมกับแคลเซียม 30 มิลลิโมลาร์ และแอนติบอดีต่อ FGF-23 ที่ด้าน apical เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (***) $P < 0.001$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม; † $P < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ทรีต 1,25(OH)₂D₃; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ทรีต 1,25(OH)₂D₃ และแคลเซียม 30 มิลลิโมลาร์)

ผลการทดลองดังรูปที่ 1.4 พบว่าการให้แอนติบอดี ได้แก่ 1:50 goat polyclonal (sc-16849) และ 1:100 และ 1:200 rabbit polyclonal antibody (sc-50292) ที่ด้าน apical ของเซลล์ลำไส้ สามารถทำให้ผลของ 1,25(OH)₂D₃ กลับสู่ภาวะปกติ คือกระตุ้นการดูดซึมแคลเซียมในภาวะที่มีแคลเซียมสูง จากผลการทดลองนี้จึงยืนยันได้ว่า FGF-23 ถูกหลั่งออกมาทางด้าน apical ของลำไส้ เพื่อทำหน้าที่ให้การยับยั้งผลของวิตามินดีในการกระตุ้นการดูดซึมแคลเซียม



รูปที่ 1.5 การขนส่งแคลเซียมผ่านเซลล์ Caco-2 ซึ่งถูกทรีตด้วย 1,25(OH)₂D₃ 10 นาโนโมลาร์ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตามด้วยการผสมกันของ 1,25(OH)₂D₃ 10 นาโนโมลาร์ แคลเซียม 30 มิลลิโมลาร์ และสารยับยั้ง CaSR ขนาด 0.5 1 หรือ 2 ไมโครโมลาร์ ที่ด้าน apical เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (***) $P < 0.001$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม; ††† $P < 0.001$ เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ทรีต 1,25(OH)₂D₃; ### $P < 0.001$ เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ทรีต 1,25(OH)₂D₃ และแคลเซียม 30 มิลลิโมลาร์)

ผลการทดลองดังรูปที่ 1.5 แสดงให้เห็นว่ามีความเกี่ยวข้องกันระหว่าง FGF-23 และ CaSR ที่ด้าน apical เนื่องจากการทรีต Caco-2 ด้วย สารยับยั้ง CaSR ที่ด้าน apical ได้แก่ Calhex 231 หรือ NPS2143 พร้อมกับ 1,25(OH)₂D₃ 10 นาโนโมลาร์ ทำให้ผลการกระตุ้นการดูดซึมแคลเซียมของ 1,25(OH)₂D₃ กลับคืนมาสู่ภาวะปกติ ในลักษณะที่แปรผันตามขนาดของสารยับยั้ง CaSR ที่ให้แก่เซลล์

อภิปรายผลการวิจัย

จากผลการศึกษาวิจัยนี้ แสดงให้เห็นว่า FGF-23 ถูกสร้างขึ้นโดยเซลล์เยื่อบุลำไส้เพื่อตอบสนองต่อ $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ และภาวะที่มีแคลเซียมทางด้านโพรงลำไส้สูง การใช้แอนติบอดีต่อ FGF-23 เพื่อทำลาย FGF-23 ที่ถูกหลั่งออกมาด้านโพรงลำไส้ส่งผลให้ $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ มีผลในการเพิ่มการดูดซึมแคลเซียมเช่นเดียวกับสภาวะปกติ แสดงให้เห็นว่ามีการสร้างและหลั่ง FGF-23 ออกมาทางด้าน apical จาก Caco-2

จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า ลักษณะที่มีการสร้างและหลั่งสารออกมาจากเซลล์เยื่อบุลำไส้สามารถพบได้ทั่วไป ยกตัวอย่างเช่น FGF-2 ทรานสฟอร์มมิงโกรทแฟคเตอร์แอลฟา (transforming growth factor; TGF- α) และอีพิดอร์มอลโกรทแฟคเตอร์ (epidermal growth factor; EGF) ซึ่งหลั่งออกมาในลักษณะของสารน้ำในโพรงลำไส้ เพื่อช่วยในการแบ่งเซลล์และรักษาความสมบูรณ์ของเซลล์ ดังนั้น FGF-23 จึงอาจเป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่สามารถถูกสร้างและหลั่งออกมาเพื่อทำหน้าที่เป็นส่วนหนึ่งของกลไกการควบคุมแบบวงจรป้อนกลับ เพื่อยับยั้งการดูดซึมแคลเซียมไม่ให้มากเกินไป

โดยสรุปคือ การศึกษานี้ชี้ให้เห็นอย่างชัดเจนว่า FGF-23 มีบทบาทในการยับยั้งการขนส่งแคลเซียมโดยผ่านเซลล์ในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วย $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ การใช้แอนติบอดีต่อ FGF-23 ส่งผลให้ $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ มีผลในการเพิ่มการดูดซึมแคลเซียมเช่นเดียวกับสภาวะปกติ ทั้ง $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ และแคลเซียมทางด้าน apical สามารถเพิ่มการแสดงออกของโปรตีน FGF-23 ในเซลล์ Caco-2 ได้ จากผลการวิจัยทั้งหมดจึงสามารถยืนยันได้ว่า FGF-23 ถูกสร้างโดยเซลล์เยื่อบุลำไส้เพื่อตอบสนองต่อการดูดซึมแคลเซียมที่สูงเกินไป ถึงแม้ว่าการทดลองนี้จะแสดงให้เห็นถึงการมีกลไกการควบคุมแบบป้อนกลับเฉพาะแห่งเพื่อควบคุมการดูดซึมแคลเซียม แต่ก็ยังคงต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อจะอธิบายรายละเอียดเกี่ยวกับกลไกการควบคุมการแสดงออกของโปรตีน FGF-23 โดย CaSR รวมถึงการส่งสัญญาณจาก FGF-23 เพื่อยับยั้งการดูดซึมแคลเซียมที่ลำไส้

ผลการศึกษาได้รับการตีพิมพ์เรียบร้อยแล้ว ดังนี้

1. **Wongdee K, Rodrat M, Keadsai C, Jantarajit W, Teerapornpuntakit J, Thongbunchoo J, Charoenphandhu N.** Activation of calcium-sensing receptor by allosteric agonists cinacalcet and AC-265347 abolishes the $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -induced Ca^{2+} transport: evidence that explains how the intestine prevents excessive Ca^{2+} absorption. Archives of Biochemistry and Biophysics 2018;657:15-22.
2. Rodrat M, **Wongdee K**, Panupinthu N, Thongbunchoo J, Teerapornpuntakit J, Krishnamra N, **Charoenphandhu N.** Prolonged exposure to $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ and high ionized calcium induces FGF-23 production in intestinal epithelium-like Caco-2 monolayer: a local negative feedback for preventing excessive calcium transport. Archives of Biochemistry and Biophysics 2018;640:10-16.

วัตถุประสงค์ 2 : เพื่อศึกษาบทบาทของสารอาหารหรือวิตามินต่าง ๆ ที่ถูกสร้างขึ้นโดยกลุ่มจุลินทรีย์ต่ออัตราการดูดซึมของ แคลเซียมในลำไส้ใหญ่ส่วนซีคัมและโคลอน ค่าตัวแปรทางไฟฟ้า รวมถึงกลไกที่ทำให้เกิดผลดังกล่าว

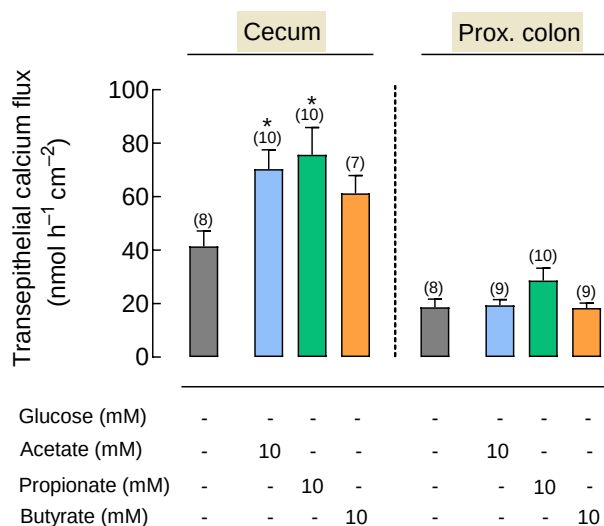
การทดลองที่ 2.1

เพื่อศึกษาผลของสารอาหารต่าง ๆ ที่ถูกสร้างขึ้นโดยกลุ่มจุลินทรีย์ต่ออัตราการดูดซึมของ แคลเซียมในลำไส้ใหญ่ส่วนซีคัมและโคลอน

เนื่องจากการศึกษาก่อนหน้า พบว่า สารอาหารต่าง ๆ ที่ถูกสร้างขึ้นโดยกระบวนการหมักของกลุ่มจุลินทรีย์ภายในลำไส้ใหญ่ เช่น กรดไขมันชนิดสายสั้น (Short-chain fatty acids, SCFAs) สามารถช่วยเพิ่มการดูดซึมของแคลเซียมและแร่ธาตุอื่น ๆ เนื่องด้วยสถานะความเป็นกรดที่เพิ่มขึ้นภายในโพรงลำไส้ จึงทำให้แคลเซียมสามารถแตกตัวให้อยู่ในรูปแบบอิสระ (free-ionized calcium) ได้มากขึ้น แต่กลไกที่แท้จริงก็ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด ดังนั้น เพื่อยืนยันว่า สารที่ถูกสร้างขึ้นโดยกลุ่มจุลินทรีย์เหล่านี้ มีผลต่ออัตราการดูดซึมแคลเซียมที่ลำไส้ใหญ่ ผู้วิจัยจึงศึกษาผลของ Microbial metabolite products เหล่านี้ เช่น กรดไขมันชนิดสายสั้น ชนิด acetate propionate และ butyrate ต่อการดูดซึมแคลเซียมที่ลำไส้ใหญ่ โดยศึกษาในลำไส้ใหญ่ส่วนซีคัมและโคลอนส่วนต้นของหนูทดลองด้วยเทคนิคของอุซซิง (Ussing chamber technique) ลำไส้ใหญ่ส่วนซีคัมและโคลอนส่วนต้นถูกขึงบน Ussing chamber จากนั้นเติมด้วยสารละลายที่มีคุณสมบัติคล้ายเลือดทั้งในด้านโพรงลำไส้ (Mucosal side) และด้านเลือด (Serosal side) ในสภาวะแวดล้อม 5% CO₂ 95% O₂ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส หลังจากนั้น ด้านโพรงลำไส้ของซีคัมและโคลอนส่วนต้นจะสัมผัสกับสารละลายที่มีส่วนประกอบของสารอาหารต่าง ๆ เช่น acetate propionate และ butyrate (ความเข้มข้น 10 mM) ซึ่งเป็นสารที่ถูกสร้างขึ้นโดยกลุ่มจุลินทรีย์ เพื่อศึกษาอัตราการดูดซึมของแคลเซียมผ่านเยื่อผิวลำไส้

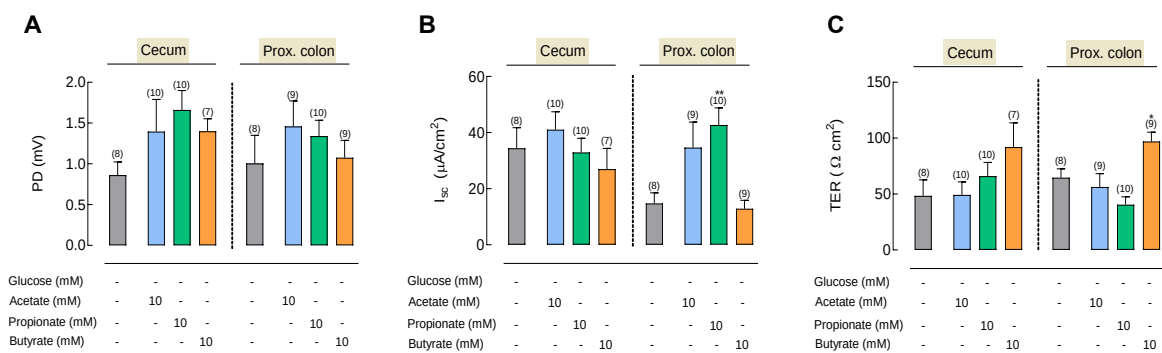
สัตว์ทดลอง

งานวิจัยนี้ ในขั้นแรก มีการใช้หนูขาว *Rattus norvegicus* สายพันธุ์ Sprague-Dawley (อายุ 8 สัปดาห์) จากบริษัท Siam Nomura International ซึ่งได้รับการพิสูจน์แล้วว่า มีสายพันธุ์ที่ได้มาตรฐานระดับสากลและมีกลไกการดูดซึมแคลเซียมในลำไส้ใกล้เคียงกับที่พบในมนุษย์ โดยโครงการนี้ได้ผ่านความเห็นชอบจากคณะกรรมการจริยธรรมการใช้สัตว์ทดลองของคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล เป็นที่เรียบร้อยแล้ว



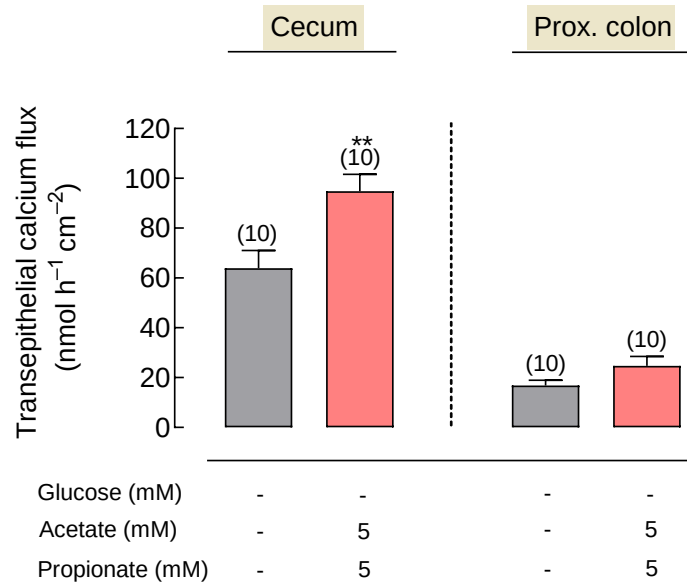
รูปที่ 1.6 แสดงอัตราการขนส่งแคลเซียมผ่านลำไส้ใหญ่ส่วนซีคัมและโคลอนส่วนต้นที่ถูกสัมผัสด้วยสารอาหารต่าง ๆ ทางด้านโพรงลำไส้ ใน Ussing chamber ได้แก่ Control group (กลุ่มควบคุม—สารละลายที่ปราศจากน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว), Acetate group (สารละลายที่ปราศจากน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว แต่มีสาร acetate เป็นองค์ประกอบ), Propionate group (สารละลายที่ปราศจากน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว แต่มีสาร propionate เป็นองค์ประกอบ), Butyrate group (สารละลายที่ปราศจากน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว แต่มีสาร butyrate เป็นองค์ประกอบ), * $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

ผลการศึกษา แสดงให้เห็นว่า เมื่อด้านโพรงลำไส้ได้รับสัมผัสกับกรดไขมันชนิดสายสั้น ชนิด acetate และ propionate สามารถกระตุ้นการขนส่งแคลเซียมผ่านเยื่อบุผิวลำไส้ใหญ่ส่วนซีคัม เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (control) แต่ไม่พบผลดังกล่าวในลำไส้ใหญ่บริเวณโคลอนส่วนต้น (รูปที่ 1.6) จึงสามารถยืนยันได้ว่า สารที่ถูกสร้างขึ้นโดยกลุ่มจุลินทรีย์ในลำไส้ใหญ่ (เฉพาะส่วนซีคัม) สามารถช่วยเพิ่มอัตราการดูดซึมแคลเซียมได้ นอกจากนี้ การศึกษาอัตราการขนส่งแคลเซียมด้วยเทคนิคของอุซซิง ยังสามารถทราบถึงค่าตัวแปรทางไฟฟ้าต่าง ๆ ซึ่งเป็นสิ่งบ่งบอกถึงคุณสมบัติของเยื่อบุผิว เช่น ค่าความต่างศักย์ของเยื่อบุผิว (potential difference, PD) ปริมาณอออนที่เคลื่อนผ่านเยื่อบุผิว (short-circuit current, I_{sc}) และค่าความต้านทานของเยื่อบุผิว (transepithelial resistance, TER) โดยผลการทดลองพบว่า เมื่อด้านโพรงลำไส้ของหนูขาว สัมผัสกับกรดไขมันชนิดสายสั้นชนิด acetate ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของค่าตัวแปรทางไฟฟ้าต่าง ๆ (เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม) ทั้งในลำไส้ใหญ่ส่วนซีคัมและโคลอนส่วนต้น ซึ่งแสดงให้เห็นว่า ไม่มีการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของเยื่อบุผิว ในทางตรงกันข้าม สารอาหารในโพรงลำไส้ชนิด propionate มีผลเพิ่มปริมาณอออนที่เคลื่อนผ่านเยื่อบุผิวในลำไส้ใหญ่ส่วนโคลอนส่วนต้น (รูปที่ 1.7B) แต่ไม่มีผลกับค่าความต้านทานของเยื่อบุผิว (รูปที่ 1.7C) ในขณะที่สารอาหารชนิด Butyrate มีผลเพิ่มค่าความต้านทานของเยื่อบุผิว แต่ไม่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่าตัวแปรทางไฟฟ้าอื่น ๆ ซึ่งผลการเปลี่ยนแปลงดังกล่าว เกิดขึ้นในลำไส้ใหญ่บริเวณ โคลอนส่วนต้นเช่นเดียวกัน (รูปที่ 1.7C)



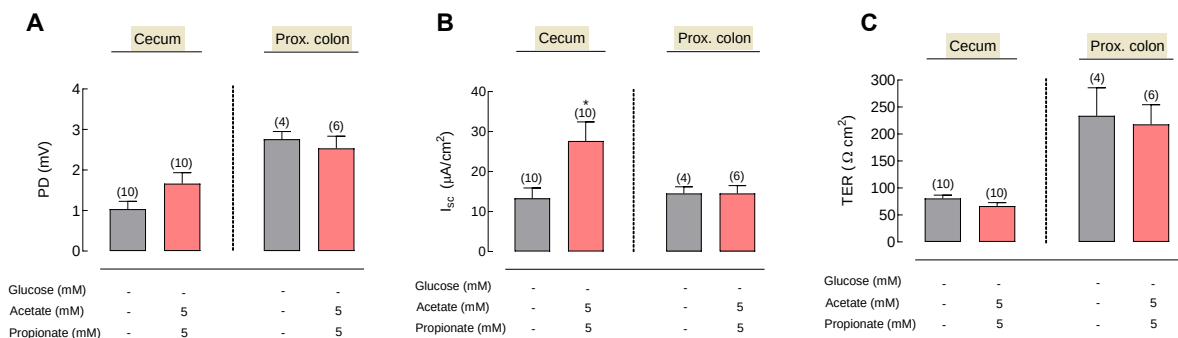
รูปที่ 1.7. แสดงค่าตัวแปรทางไฟฟ้าเมื่อมีการขนส่งแคลเซียมผ่านเยื่อบุผิวลำไส้ใหญ่ ส่วนซีคัมและโคลอนส่วนต้น ในขณะที่ถูกสัมผัสด้วยสารอาหารต่าง ๆ ทางด้านโพรงลำไส้ ใน Ussing chamber ได้แก่ Control group (กลุ่มควบคุม—สารละลายที่ปราศจากน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว), Acetate group (สารละลายที่ปราศจากน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว แต่มีสาร acetate เป็นองค์ประกอบ), Propionate group (สารละลายที่ปราศจากน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว แต่มีสาร propionate เป็นองค์ประกอบ), Butyrate group (สารละลายที่ปราศจากน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว แต่มีสาร butyrate เป็นองค์ประกอบ), * $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม, ** $P < 0.01$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม. PD, Potential difference; I_{sc} , short-circuit current; TER, transepithelial resistance.

จากการทดลองที่ผ่านมา พบว่ากรดไขมันชนิดสายสั้น acetate และ propionate มีผลเพิ่มอัตราการดูดซึมของแคลเซียมในลำไส้ใหญ่ส่วนซีคัม ดังนั้นผู้วิจัยจึงอยากทราบผลร่วมกันของ acetate และ propionate ต่ออัตราการดูดซึมของแคลเซียมในลำไส้ใหญ่ โดยศึกษาในลำไส้ใหญ่ส่วนซีคัมและโคลอนส่วนต้นของหนูทดลองด้วยเทคนิคของอุซซิง (Ussing chamber technique) ลำไส้ใหญ่ส่วนซีคัมและโคลอนส่วนต้นถูกขึงบน Ussing chamber จากนั้นเติมด้วยสารละลายที่มีคุณสมบัติคล้ายเลือดทั้งในด้านโพรงลำไส้ (Mucosal side) และด้านเลือด (Serosal side) ในสภาวะแวดล้อม 5% CO_2 95% O_2 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส หลังจากนั้น ด้านโพรงลำไส้ของซีคัมและโคลอนส่วนต้นจะสัมผัสกับสารละลายที่มีส่วนประกอบของกรดไขมันชนิดสายสั้น acetate และ propionate (ความเข้มข้นอย่างละ 5 mM) ซึ่งเป็นสารที่ถูกสร้างขึ้นโดยกลุ่มจุลินทรีย์ เพื่อศึกษาอัตราการดูดซึมของแคลเซียมผ่านเยื่อบุผิวลำไส้



รูปที่ 1.8 แสดงอัตราการขนส่งแคลเซียมผ่านลำไส้ใหญ่ส่วนซีคัมและโคลอนส่วนต้นในขณะที่ถูกสัมผัสด้วยสารอาหารต่าง ๆ ทางด้านโพรงลำไส้ ใน Ussing chamber ได้แก่ Control group (กลุ่มควบคุม—สารละลายที่ปราศจากน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว), Acetate and propionate group (สารละลายที่ปราศจากน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว แต่มีสาร acetate และ propionate เป็นองค์ประกอบ), ** $P < 0.01$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

ผลการศึกษาพบว่า เมื่อโพรงลำไส้สัมผัสกับสารอาหารชนิด acetate และ propionate ในเวลาเดียวกัน อัตราการดูดซึมของแคลเซียมในลำไส้ใหญ่เฉพาะส่วนซีคัมมีปริมาณมากขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ดังแสดงในรูปที่ 1.8 นอกจากนี้ สารอาหารชนิด acetate และ propionate ยังมีผลเพิ่มปริมาณไอออนที่เคลื่อนผ่านเยื่อบุผิวเฉพาะลำไส้ใหญ่ส่วนซีคัม โดยไม่ส่งผลต่อค่าตัวแปรทางไฟฟ้าชนิดอื่น ๆ (รูปที่ 1.9)

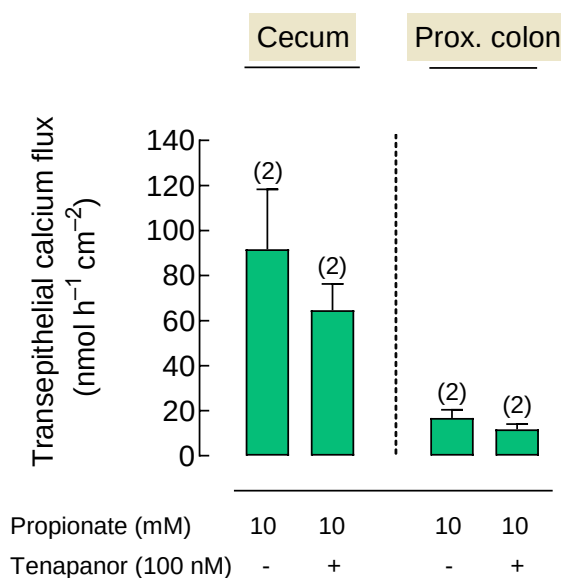


รูปที่ 1.9 แสดงค่าตัวแปรทางไฟฟ้าเมื่อมีการขนส่งแคลเซียมผ่านเยื่อบุผิวลำไส้ใหญ่ ส่วนซีคัมและโคลอนส่วนต้น ในขณะที่ถูกสัมผัสด้วยสารอาหารต่าง ๆ ทางด้านโพรงลำไส้ ใน Ussing chamber ได้แก่ Control group (กลุ่มควบคุม—สารละลายที่ปราศจากน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว), Acetate and propionate group (สารละลายที่ปราศจากน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว แต่มีสาร acetate และ propionate เป็นองค์ประกอบ), * $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม. PD, Potential difference; I_{sc} , short-circuit current; TER, transepithelial resistance.

การทดลองที่ 2.2

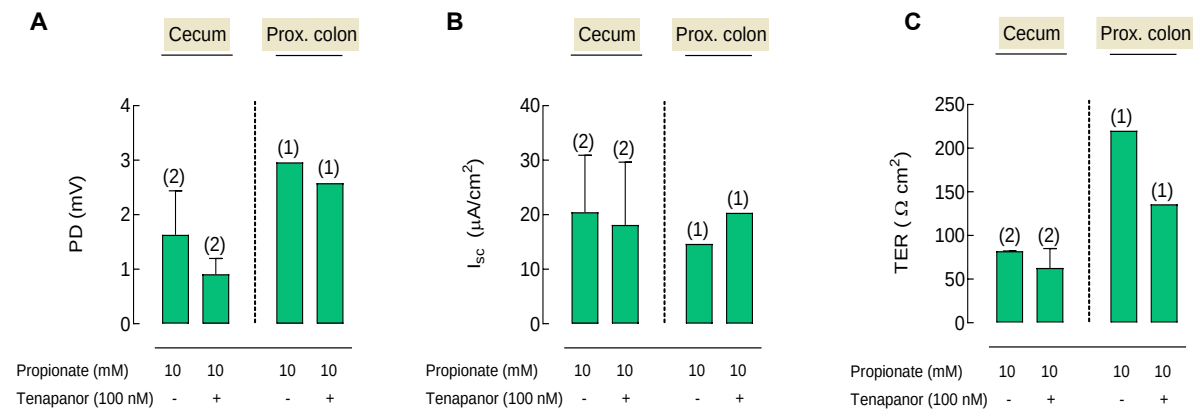
เพื่อศึกษากลไกการเพิ่มขึ้นของอัตราการดูดซึมแคลเซียมที่ลำไส้ใหญ่ จากการถูกกระตุ้นด้วยกรดไขมันชนิดสายสั้นที่ถูกสร้างขึ้นโดยกลุ่มจุลินทรีย์

จากการทดลองที่ผ่านมาพบว่า กรดไขมันชนิดสายสั้น ได้แก่ acetate และ propionate ที่ถูกสร้างขึ้นโดยกระบวนการหมักของกลุ่มจุลินทรีย์ภายในลำไส้ใหญ่ สามารถช่วยเพิ่มอัตราการดูดซึมของแคลเซียม แต่กลไกยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด โดยเฉพาะเส้นทางที่เซลล์เยื่อบุลำไส้ใช้และโปรตีนขนส่งแคลเซียมที่เกี่ยวข้อง ดังนั้น ในการทดลองนี้ ผู้วิจัยจึงศึกษาบทบาทของโปรตีนขนส่งที่เกี่ยวข้อง เช่น Na^+/H^+ -exchanger 3 (NHE-3) ต่ออัตราการดูดซึมแคลเซียมที่ลำไส้ใหญ่ในภาวะที่มีสารอาหารต่าง ๆ ที่ถูกสร้างขึ้นโดยกระบวนการหมักของกลุ่มจุลินทรีย์ภายในลำไส้ใหญ่ การทำงานของโปรตีนชนิดนี้จะถูกยับยั้งด้วยตัวยับยั้งแบบจำเพาะ (specific NHE-3 inhibitor, Tenapanor) โดยทำการศึกษาในลำไส้ใหญ่ส่วนซีคัมและโคลอนส่วนต้นของหนูทดลองด้วยเทคนิคของอุซซิง (Ussing chamber technique) ลำไส้ใหญ่ส่วนซีคัมและโคลอนส่วนต้นถูกขึงบน Ussing chamber จากนั้นเติมด้วยสารละลายที่มีคุณสมบัติคล้ายเลือดทั้งในด้านโพรงลำไส้ (Mucosal side) และด้านเลือด (Serosal side) ในสภาวะแวดล้อม 5% CO_2 95% O_2 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส หลังจากนั้น ด้านโพรงลำไส้ของซีคัมและโคลอนส่วนต้นจะสัมผัสกับสารละลายที่มีส่วนประกอบของสารอาหารต่าง ๆ เช่น propionate (ความเข้มข้น 10 mM) ซึ่งเป็นสารที่ถูกสร้างขึ้นโดยกลุ่มจุลินทรีย์และตัวยับยั้งแบบจำเพาะของโปรตีนขนส่งชนิด NHE3 (Tenapanor ความเข้มข้น 100 nM) เพื่อศึกษาอัตราการดูดซึมของแคลเซียมผ่านเยื่อบุลำไส้ในภาวะที่ไม่มีการทำงานของ NHE-3



รูปที่ 1.10 แสดงอัตราการขนส่งแคลเซียมผ่านลำไส้ใหญ่ส่วนซีคัมและโคลอนส่วนต้น ในขณะที่ถูกสัมผัสด้วยสารอาหารชนิด Propionate (สารละลายที่ปราศจากน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว แต่มีสาร propionate เป็นองค์ประกอบ) ทางด้านโพรงลำไส้ ใน Ussing chamber. Tenapanor, specific NHE3 inhibitor.

จากผลการทดลองพบว่า เมื่อด้านโพรงลำไส้ใหญ่สัมผัสกับสารละลายที่มีส่วนประกอบของสารอาหารชนิด Propionate (ความเข้มข้น 10 mM) พร้อมกับตัวยับยั้งการทำงานของโปรตีนขนส่งชนิด NHE-3 (ความเข้มข้น 100 nM) อัตราการดูดซึมของแคลเซียมในลำไส้ใหญ่เฉพาะส่วนซีคัม มีแนวโน้มลดลง (รูปที่ 1.10) แต่ไม่ส่งผลให้เยื่อบุลำไส้มีคุณสมบัติเปลี่ยนแปลงไป (รูปที่ 1.11) อย่างไรก็ตาม ผลการทดลองยังไม่เป็นที่แน่ชัด เนื่องจากจำนวนประชากรในกลุ่มการทดลองมีน้อยเกินไป (n=2) ทั้งนี้ ทางผู้วิจัยกำลังดำเนินการทดลองให้ประชากรในกลุ่มการทดลองมีจำนวนที่เหมาะสม (n=8) เพื่อให้ทราบผลที่แน่ชัดต่อไป



รูป 1.11 แสดงค่าตัวแปรทางไฟฟ้าเมื่อมีการขนส่งแคลเซียมผ่านเยื่อผิวลำไส้ใหญ่ส่วนซีคัมและโคลอนส่วนต้น ในขณะที่ถูกสัมผัสด้วยสารอาหาร ชนิด propionate ทางด้านโพรงลำไส้ ใน Ussing chamber, Propionate group (สารละลายที่ปราศจากน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว แต่มีสาร เป็นองค์ประกอบ). PD, Potential difference; I_{sc} , short-circuit current; TER, transepithelial resistance; Tenapanor, specific NHE3 inhibitor.

- โครงการย่อยที่ 2

The beneficial effects of iron and calcium supplementation in pregnant rats: the interrelationships of gut microbiota and bone health in gestational diabetes

วัตถุประสงค์หลัก

1. To study the interrelationships of gut microbiome, its activity and bone metabolism in gestational diabetes

Specific objectives

- 1.1 To validate model of gestational diabetes
 - 1.2 To study the alteration of intestinal calcium and iron transport in gestational diabetes
 - 1.3 To study the alteration of bone microstructure and strength in gestational diabetes by bone histomorphometry, μ CT, and 3-point bending test.
 - 1.4 To investigate the effect of diabetes in mothers on insulin sensitivity and bone structure of their offsprings
 - 1.5 To study the alteration of gut microbiome and level of microbial products during normal pregnancy and gestational diabetes.
2. To study the beneficial effect of ascorbic acid on calcium and iron transport during pregnancy.
Specific objectives
 - 2.1 To find the effective dose of ascorbic acids stimulate both intestinal iron and calcium transport simultaneously.
 - 2.2 To investigate the effect of iron and calcium supplementation on the prevention of pregnancy-associated osteopenia.

Hypotheses

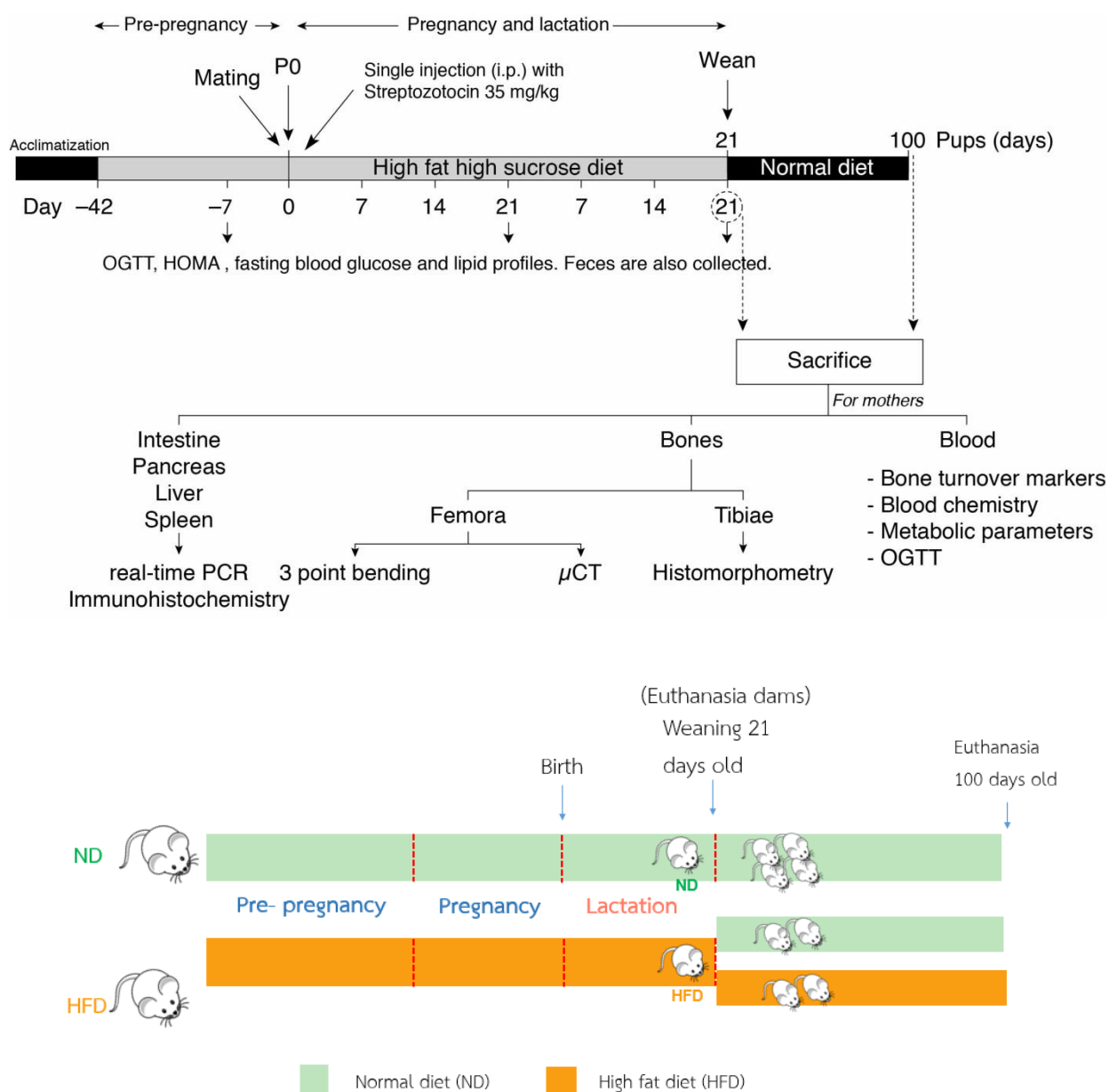
1. There is adaptive change of gut microbiome to favor species that had high metabolic activity
2. Gestational diabetes caused negative effect on intestinal calcium transport and bone microstructure and strength.
3. Diabetes during gestation might impair glucose tolerance in their offspring in later life.
4. Ascorbic at concentration lower than 0.5 mM is able to stimulate iron transport without diminish calcium transport.
5. Supplementation of micronutrient solution containing calcium, iron and ascorbic acid has positive effect on bone health in pregnancy.

วิธีการดำเนินงานวิจัย

วัตถุประสงค์ที่ 1 แบ่งการวิจัยเป็น 2 ส่วน

- ส่วนที่ 1 (วัตถุประสงค์ที่ 1.1–1.4) เพื่อศึกษาภาวะของเบาหวานระหว่างตั้งครรภ์ตลอดจนให้นมต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและคุณสมบัติเชิงกลของกระดูกแม่และลูก รวมถึงการวิเคราะห์โครงข่ายของอินซูลินในน้ำนม วิเคราะห์ความสัมพันธ์ของ 1) metabolic parameters (ได้แก่ ระดับ LDL, HDL, total cholesterol, glucose, insulin, ดัชนี HOMA ในเลือด) กับ bone parameters (ได้แก่ osteoblast surface, osteoclast surface และ bone volume) ในแม่หนูที่เป็นเบาหวาน 2) ความสัมพันธ์ของ metabolic parameters ของแม่และลูกหนู (ลูกหนูหลังหย่านมเลี้ยงด้วยอาหารสูตรปกติ)
- ส่วนที่ 2 (วัตถุประสงค์ที่ 1.5) เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของการเปลี่ยนแปลงของ gut microflora ในแม่หนูที่เป็นเบาหวานกับการเปลี่ยนแปลงของ bone parameters

แผนการดำเนินงานวิจัยในส่วนที่ 1 แสดงในรูปที่ 2.1



รูปที่ 2.1 แสดงวิธีการดำเนินการวิจัยวัตถุประสงค์ที่ 1 ส่วนที่ทำในหนูท้องและให้นม (วัตถุประสงค์ที่ 1.1–1.4)

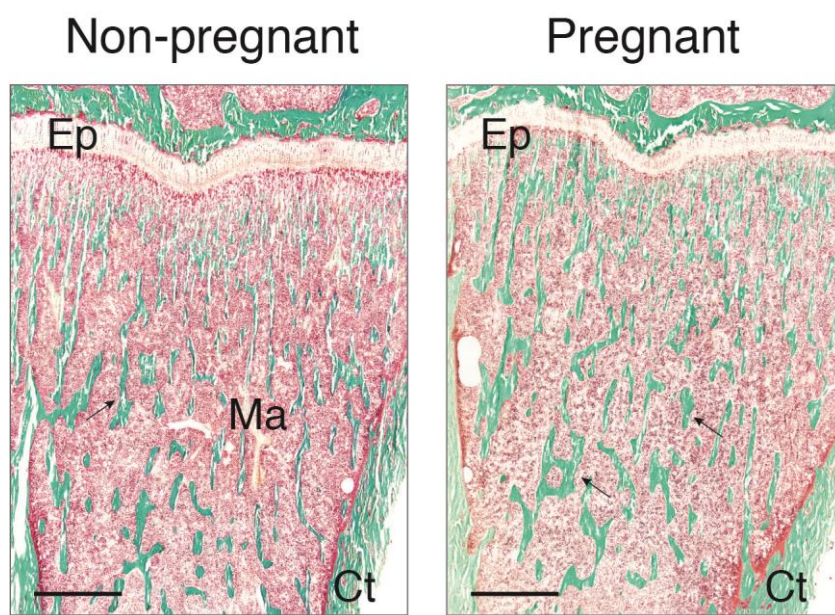
งานวิจัยในส่วนนี้ใช้หนูตัวเมียสายพันธุ์ Sprague-Dawley อายุ 3 สัปดาห์ หลังจากกักกัน 1 สัปดาห์ หนูแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ หนูไม่ท้อง หนูท้อง-ให้นมปกติ และหนูท้อง-ให้นมที่เป็นเบาหวาน สำหรับกลุ่มหนูท้องจะทำ vaginal smear เพื่อหาระยะ estrous การผสมพันธุ์จะเลี้ยงหนูเพศผู้:เมีย เป็น 1:1 วันที่พบสุจิในช่องคลอดจากการทำ vaginal smear ถือเป็นวันตั้งท้องวันที่ 0 (P0) ก่อนการผสมพันธุ์จะเลี้ยงด้วยอาหารไขมันและน้ำตาลซูโครสสูงหรืออาหารปกติเป็นเวลา 6 สัปดาห์ หนูท้องปกติเลี้ยงด้วยอาหารสูตรมาตรฐาน ประกอบด้วย (%) Crude protein 25.48, Crude fat 4.61, Crude fiber 5.14 [CE-2 for rearing and breeding, CLEA, Japan] ส่วนหนูท้อง-ให้นมเบาหวานเลี้ยงด้วยอาหารพิเศษคือ high fat + high sucrose [45.0 kcal% + 17.28% Sucrose] ซึ่งประกอบด้วย 24.0% Protein (20 % kcal), 41.0% Carbohydrate (35.0% kcal), 24.0% Fat (45.0% kcal); D12451, Research Diets Inc., New Brunswick, NJ, USA (Pereira et al., 2015; Journal of Physiology)

ผู้วิจัยจะทำการทดสอบว่าการเลี้ยงด้วยอาหารไขมันสูงก่อนและระหว่างตั้งท้องตลอดจนให้นมทำให้เกิด impaired glucose tolerance ด้วยการทดสอบ OGTT ที่ 3 ช่วงเวลา คือ baseline (ก่อนผสมพันธุ์ 7 วัน), ตั้งท้องวันที่ 18–20 และให้นมวันที่ 18–20 โดยหลังคลอดจะปรับลูกหนูให้เท่ากันทุกครอก 8 ตัว/ครอก (ผู้ 4 เมีย 4 เพื่อควบคุมให้ได้อาหารและน้ำนมไม่ต่างกันในแต่ละครอก) ผู้วิจัยจะเก็บตัวอย่างกระดูก ลำไส้และเลือดของแม่หนูให้นม 21 วัน หลังจากหย่านมลูกหนูจะเลี้ยงต่อด้วยอาหารปกติจนกระทั่งอายุ 100 วัน และเก็บตัวอย่างเลือดและกระดูกต่อไป

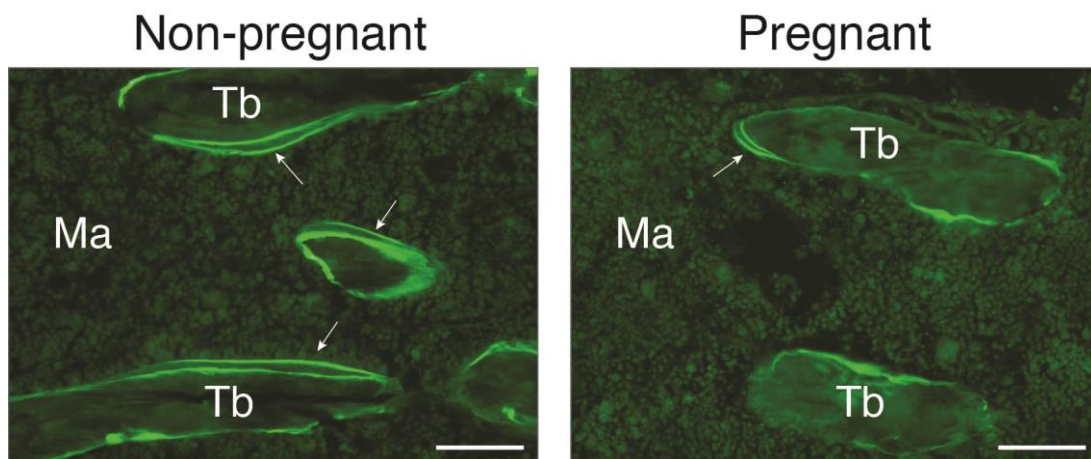
รายงานผลการวิจัย

ผลการวิจัยนำร่องวิเคราะห์โครงสร้างกระดูกแม่หนูท้อง 21 วัน ที่เลี้ยงด้วยอาหารปกติ

กระดูกหน้าแข้งหนูท้อง 21 วันที่เลี้ยงอาหารปกติ (CP, Bangkok, Thailand) ย้อมด้วยสี Goldner's trichrome เปรียบเทียบกับหนูไม่ท้องอายุ 11 สัปดาห์ พบว่ามีเนื้อกระดูกโครงข่ายใกล้เคียงกัน (รูปที่ 2.2) จากภาพเนื้อเยื่อกระดูกที่ติดด้วยสี calcein 2 ครั้ง พบว่ามี double-labeled surface ลดลงอย่างชัดเจน (รูปที่ 2.3) ผู้วิจัยจะทำการศึกษาหนูท้องที่ได้รับอาหารไขมันสูงเปรียบเทียบกับอาหารปกติ (จากบริษัท Research Diets Inc., New Brunswick, NJ, USA) ต่อไป



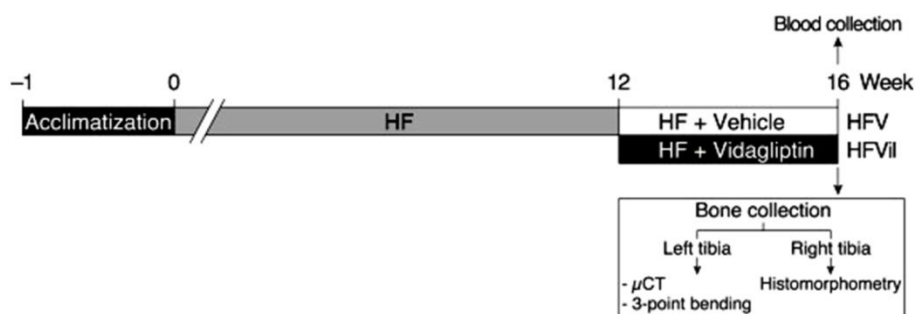
รูปที่ 2.2 รูปเนื้อเยื่อกระดูกหน้าแข้งย้อมด้วยสี Golner's trichrome จากหนูกลุ่มไม่ท้องและหนูท้องวันที่ 21 อายุ 11 สัปดาห์
Ep: epiphyseal plate, Ma: bone marrow, Ct: cortical shell ลูกศรชี้ขึ้นกระดูก trabecular scale bar = 1,000 μ m



รูปที่ 2.3 รูปเนื้อเยื่อกระดูกหน้าแข้งย้อมด้วยสี Goldner's trichrome จากหนูกลุ่มไม่ท้องและหนูท้องวันที่ 21 อายุ 11 สัปดาห์ Tb: trabecular bone, Ma: bone marrow, ลูกศรชี้ double labeled surface ซึ่งเป็นบริเวณที่มีการสร้างกระดูกเกิดขึ้น scale bar = 1,000 μ m

ผลของอาหาร high fat ต่อความหนาแน่นกระดูกและโครงสร้างทางจุลภาคของกระดูก

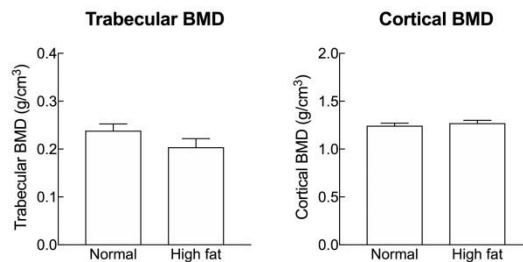
นอกจากศึกษาผลของ obesity-related insulin resistance ต่อโครงสร้างกระดูกในหนูท้องและให้นม ผู้วิจัยได้ศึกษาผลในหนูปกติ โดยเลี้ยงหนูด้วยอาหารสูตรไขมันสูงนาน 3 เดือน หลังจากนั้นหนูจะได้รับยา Vildagliptin (Vil) (Dipeptidyl peptidase inhibitor) นาน 1 เดือน หลังจากได้รับยานี้จะมีการสลายของฮอร์โมน incretins ลดลง ซึ่งมีรายงานว่าฮอร์โมน incretins ยับยั้งการสลายกระดูก อีกทั้งยา Vil สามารถลดความเสี่ยงของการแตกหักของกระดูกในผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิด 2 ได้³



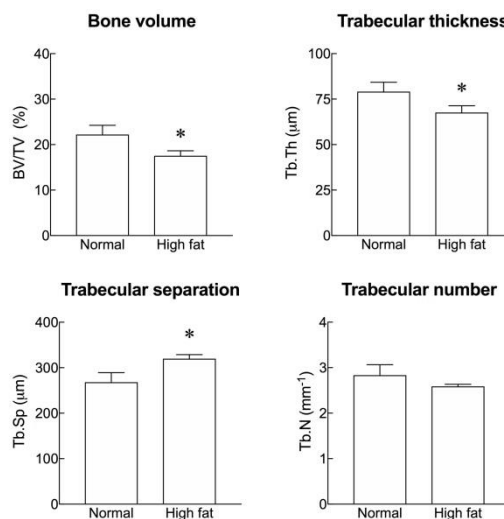
รูปที่ 2.4 แสดงวิธีการดำเนินงานวิจัยวัตถุประสงค์ที่ 1 (ส่วนที่ทำในหนูปกติ)

³ Monami M, Dicembrini I, Antenore A, Mannucci E. Dipeptidyl peptidase-4 inhibitors and bone fractures: A meta-analysis of randomized clinical trials. Diabetes Care 2011;34:2474–2476.

ผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค μ CT พบว่า ความหนาแน่นกระดูกมีแนวโน้มลดลงในกลุ่มที่ได้อาหารไขมันสูง (รูปที่ 2.5) เมื่อวิเคราะห์โครงสร้างทางจุลภาคกระดูกด้วยเทคนิค bone histomorphometry พบว่า มีค่า bone volume, trabecular thickness ลดลง และ trabecular separation เพิ่มขึ้น (รูปที่ 2.6) สรุปได้ว่า ภาวะ prediabetes ทำให้มีมวลกระดูกลดลง

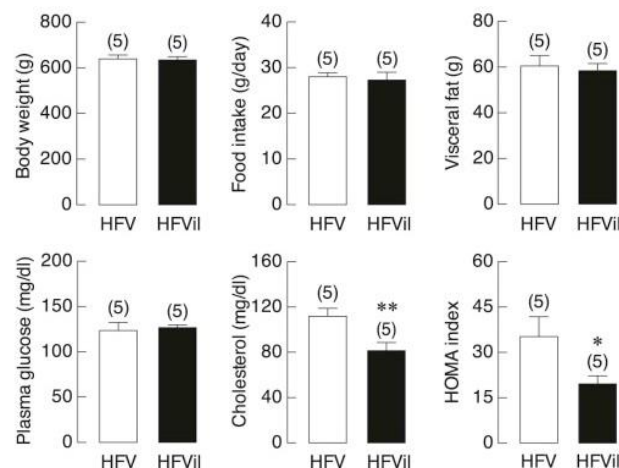


รูปที่ 2.5 แสดงความหนาแน่นกระดูกโครงข่าย (trabecular bone mineral density, BMD) และกระดูกเนื้อแน่น (Cortical BMD) (n = 5–8 ต่อกลุ่ม)



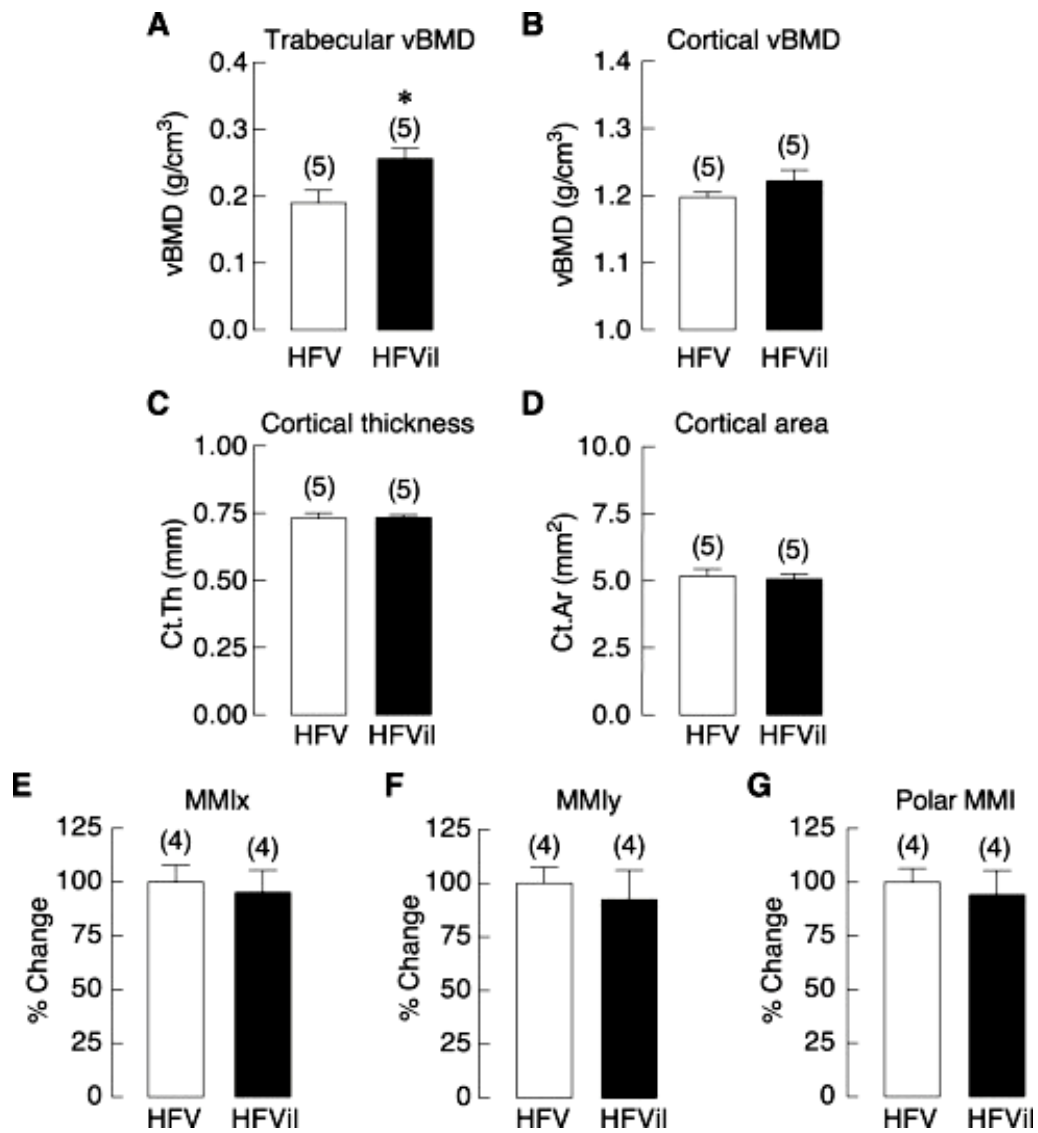
รูปที่ 2.6 แสดงผลการวิเคราะห์โครงสร้างทางจุลภาคกระดูกด้วยเทคนิค bone histomorphometry (n=8 ต่อกลุ่ม) * $P < 0.05$.

หนูที่เลี้ยงด้วยอาหารไขมันสูงเมื่อได้รับยา Vil พบว่าไม่มีความแตกต่างของน้ำหนักตัว ปริมาณอาหารที่กิน ปริมาณ visceral fat ระดับน้ำตาลในเลือดไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม แต่มีระดับของคลอเลสเตอรอลและค่าดัชนี HOMA ลดลง (รูปที่ 2.7) บ่งชี้ว่า เนื้อเยื่อมีการตอบสนองต่ออินซูลินดีขึ้น

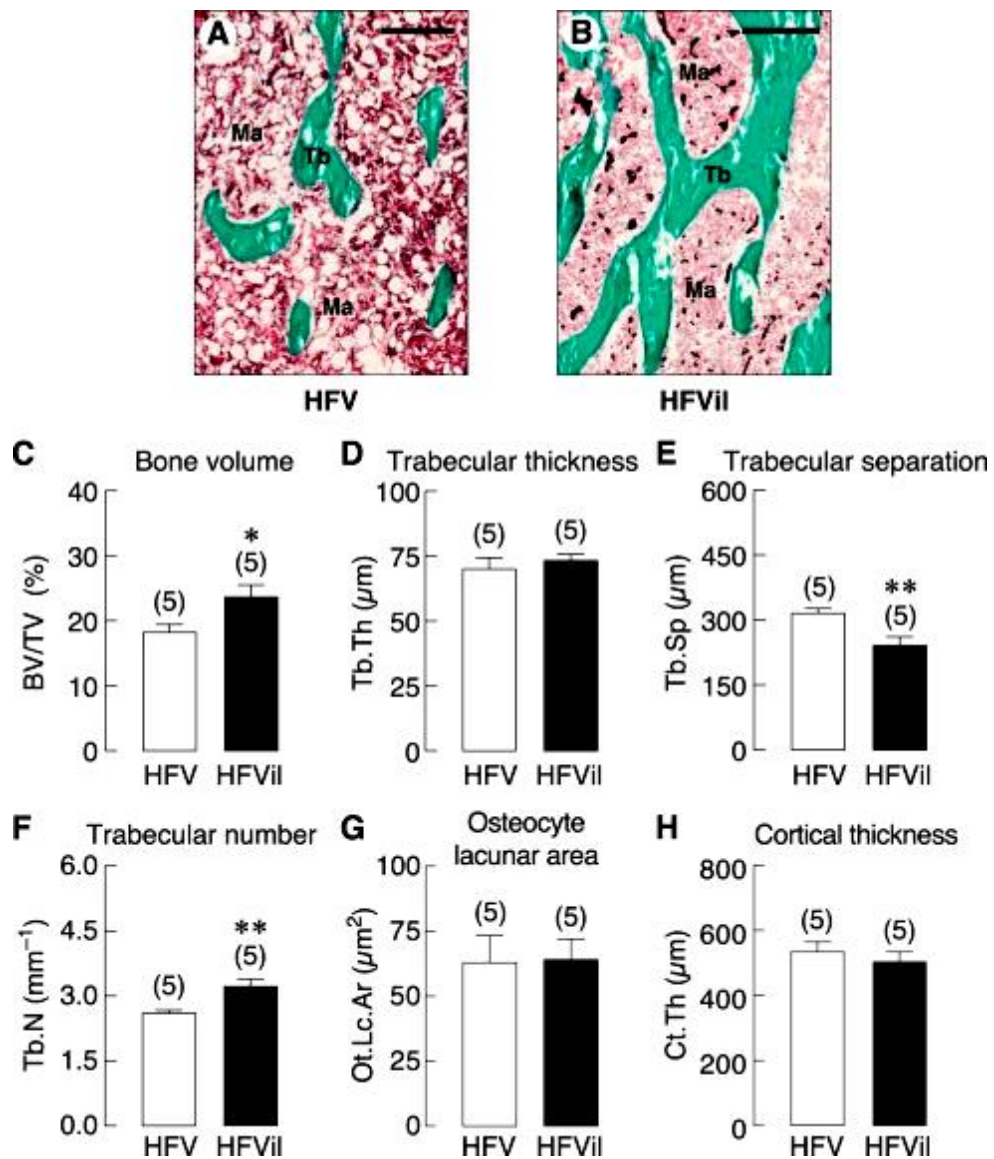


รูปที่ 2.7 แสดงผล metabolic parameters (n = 5 ต่อกลุ่ม) * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

หนูที่ได้รับยา Vil มีความหนาแน่นกระดูกเนื้อโปรงเพิ่มขึ้น และมีไม่มีการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างกระดูกเนื้อแน่น จากการวิเคราะห์กระดูกเนื้อโปรงพบว่ามี bone volume เพิ่มขึ้น โดยมีค่า trabecular number เพิ่มขึ้นและค่า trabecular separation ลดลง (รูปที่ 2.8 และ 2.9)



รูปที่ 2.8 แสดงผลการวิเคราะห์ความหนาแน่นและโครงสร้างกระดูกเนื้อแน่นด้วยเทคนิค μ CT (n=4-5 ต่อกลุ่ม), MMI=moment of inertia * $P < 0.05$.

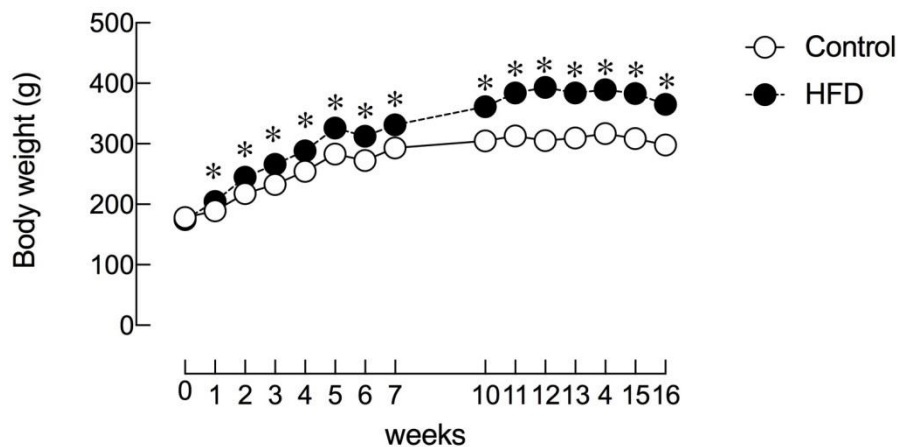


รูปที่ 2.9 แสดงภาพเนื้อเยื่อกระดูกย้อมด้วยสี Goldner's trichrome และผลการวิเคราะห์โครงสร้างจุลภาคของกระดูกเนื้อโปรง ความหนาของชั้นกระดูกเนื้อแน่นและพื้นที่ของ osteocyte lacunar (n=5 ต่อกลุ่ม), Ma=bone marrow, Tb=trabecular bone, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. Scale bar=1,000 μm .

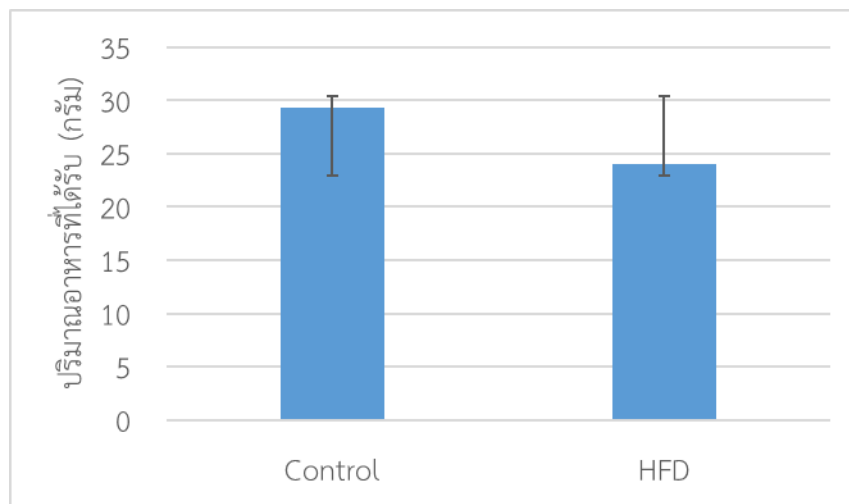
ผลของอาหาร high fat ต่อ metabolic parameters ในหนูไม่ท้องที่เลี้ยงด้วยอาหารไขมันสูงนาน 15 สัปดาห์

จากรูปที่ 2.10 หนูที่เลี้ยงด้วยอาหารไขมันสูงมีน้ำหนักตัวสูงกว่ากลุ่มอาหารปกติตั้งแต่สัปดาห์แรกของการทดลอง เมื่อกินอาหารปริมาณไม่ต่างกัน (รูปที่ 2.11) เมื่อทดสอบความทนทานต่อน้ำตาลด้วย oral glucose tolerance test (รูปที่ 2.12) พบว่าหนูทั้งสองกลุ่มมีค่า fasting glucose ปกติ (< 100 mg/dL) ในหนูกลุ่มอาหารปกติระดับน้ำตาลในเลือดจะกลับมามีค่าปกติหลังจาก glucose loading นาน 120 นาที ในหนูที่ได้รับอาหารไขมันสูงนาน 6 สัปดาห์ มีค่า 136 mg/dL ซึ่งใกล้ที่จะเป็น prediabetes (ตามเกณฑ์สากล ถ้าค่าน้ำตาลอยู่ระหว่าง 140 และ 199 mg/dL ถือว่าเป็น prediabetes)

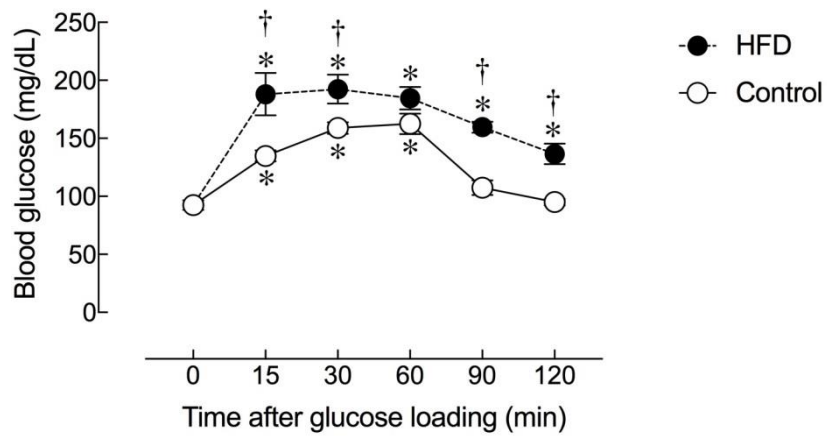
เมื่อเลี้ยงหนูด้วยอาหารไขมันสูงต่อไปจนครบ 15 สัปดาห์พบว่า หนูมีภาวะเบาหวาน คือ ระดับ fasting glucose > 126 mg/dL และมีระดับน้ำตาลหลังจากทำ OGTT สูงกว่า 200 mg/dL (รูปที่ 2.13) แต่มีน้ำหนักของตัวไม่แตกต่างกัน (รูปที่ 2.14) (ถ้ามีภาวะไขมันพอกตับมากพอจะทำให้ตับมีขนาดใหญ่ขึ้น)



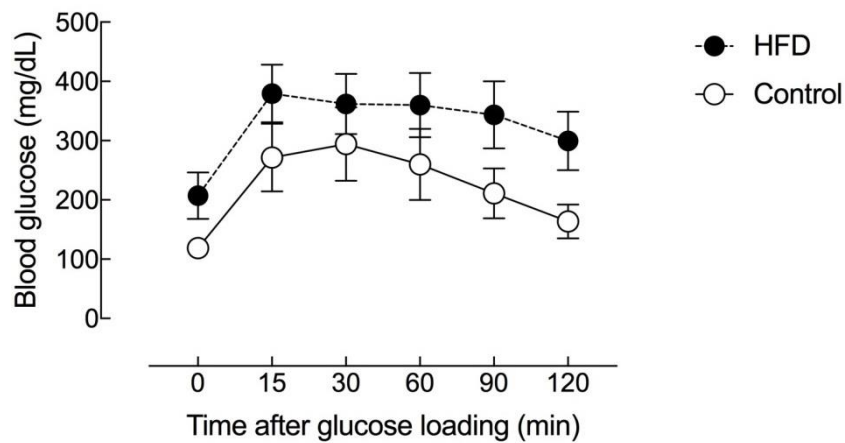
รูปที่ 2.10 แสดงน้ำหนักตัวเมื่อเลี้ยงหนูเพศเมียด้วยอาหารไขมันสูงเปรียบเทียบกับอาหารปกติ ($n=8$ ต่อกลุ่ม), * $P < 0.05$



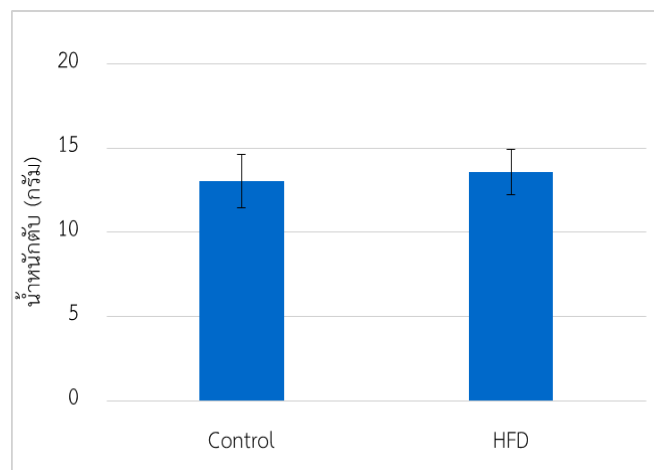
รูปที่ 2.11 แสดงปริมาณอาหารที่กินต่อวัน เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารไขมันสูงเปรียบเทียบกับอาหารปกติ ($n=6$ ต่อกลุ่ม)



รูปที่ 2.12 แสดงระดับน้ำตาลในเลือดเมื่อทดสอบความทนทานต่อน้ำตาล (OGTT, oral glucose tolerance test) ในหนูเพศเมียเมื่อเลี้ยงด้วยอาหารไขมันสูงนาน 6 สัปดาห์เปรียบเทียบกับอาหารปกติ (n=8 ต่อกลุ่ม) * $P < 0.05$ เทียบกับ time=0 ในกลุ่มเดียวกัน, † $P < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่เวลาเดียวกัน

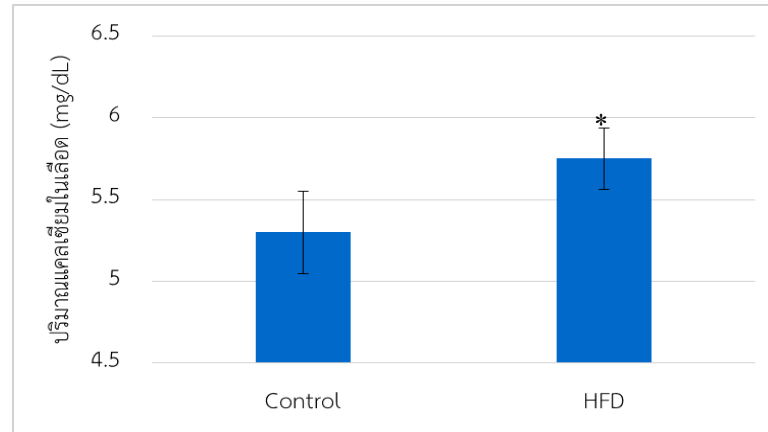


รูปที่ 2.13 แสดงระดับน้ำตาลในเลือดเมื่อทดสอบความทนทานต่อน้ำตาล (OGTT, oral glucose tolerance test) ในหนูเพศเมียเมื่อเลี้ยงด้วยอาหารไขมันสูงนาน 15 สัปดาห์เปรียบเทียบกับอาหารปกติ (n=5-8 ต่อกลุ่ม)

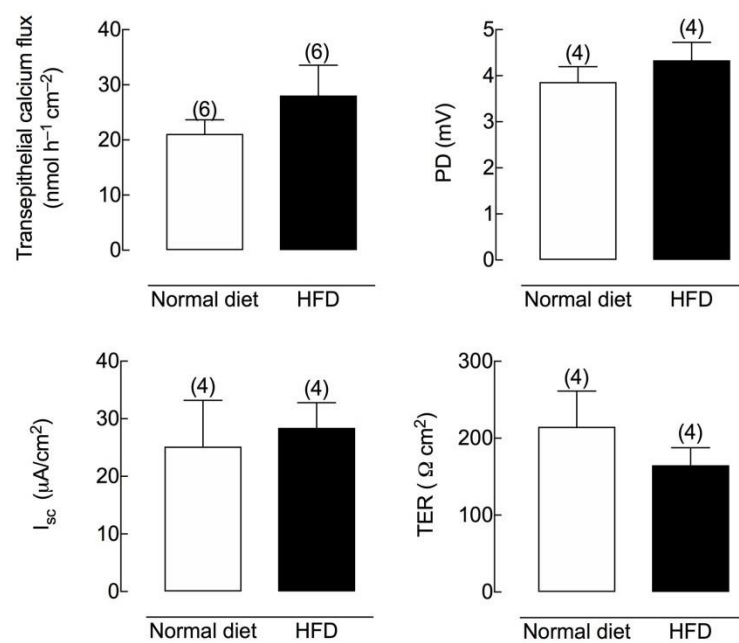


รูปที่ 2.14 แสดงน้ำหนักรับเมื่อเลี้ยงด้วยอาหารไขมันสูงนาน 15 สัปดาห์ (n=6 ต่อกลุ่ม)

เมื่อวิเคราะห์ระดับแคลเซียมอิสระในเลือดพบว่าปริมาณมากขึ้นซึ่งส่วนหนึ่งอาจเนื่องมาจากภาวะ metabolic acidosis ในเบาหวาน (รูปที่ 2.15) นอกจากนี้ผู้วิจัยจะทำการศึกษาผลของภาวะ hyperglycemia และ dyslipidemia ต่อโครงสร้างกระดูกแล้ว ได้ติดตามดูแลต่ออัตราการดูดซึมแคลเซียมที่ลำไส้ด้วยซึ่งพบว่าภาวะดังกล่าวไม่ส่งผลกระทบต่อ การดูดซึมแคลเซียมผ่านลำไส้ (รูปที่ 2.16)



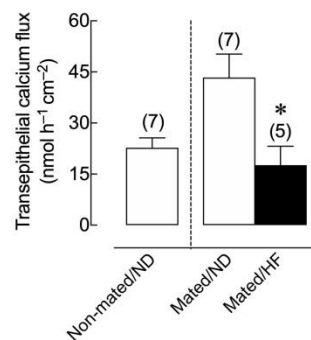
รูปที่ 2.15 แสดงระดับแคลเซียมอิสระในเลือด (ionized calcium) เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารไขมันสูงนาน 15 สัปดาห์ (n=6 ต่อกลุ่ม), * $P < 0.05$



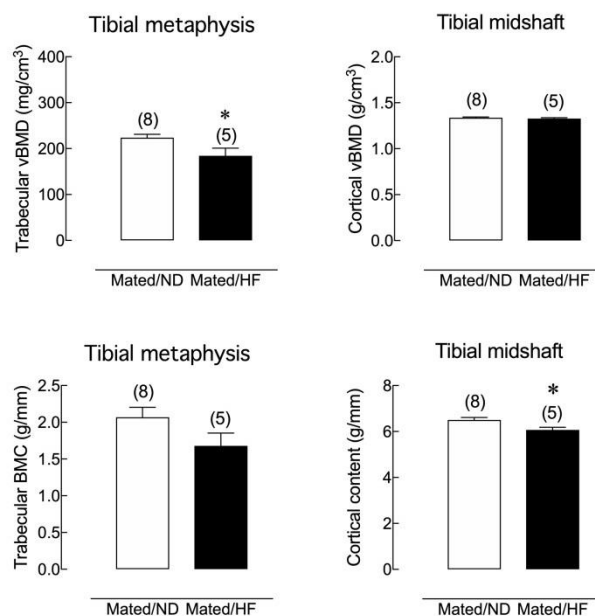
รูปที่ 2.16 แสดงการขนส่งแคลเซียมผ่านลำไส้ส่วน duodenum และความต่างศักย์ ค่ากระแสไฟฟ้าและความต้านทานของ epithelium ในหนูที่เลี้ยงด้วยอาหารไขมันสูงนาน 15 สัปดาห์ (n=6 ต่อกลุ่ม)

ผลของอาหาร high fat ต่อ metabolic parameters ในหนูท้องที่เลี้ยงด้วยอาหารไขมันสูงนาน 10 สัปดาห์

หนูเพศเมียอายุ 9 สัปดาห์แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ ได้รับอาหารปกติ (16–20 ตัว) หรือ high fat นาน 4 สัปดาห์ (16–20 ตัว) จำนวนครึ่งหนึ่งของแต่ละกลุ่ม (8–10 ตัว) ถูกผสมพันธุ์กับหนูตัวผู้แบบ 1:1 หนูตัวที่ดั่งท้องถูกเลี้ยงด้วยอาหาร high fat ต่อในระหว่างท้อง (เฉลี่ย 3 สัปดาห์) และให้นม (เฉลี่ย 3 สัปดาห์) หนูตัวที่ไม่ดั่งท้องถูกคัดออกจากการทดลอง หลังจากนั้นทำการการุณฆาตแม่หนูให้นม 21 วัน เก็บเลือด น้ำนม ลำไส้ส่วนต้น (duodenum) กระดูกหน้าแข้ง กระดูกต้นขา เพื่อวิเคราะห์ข้อมูลที่น่าสนใจ จากรูปที่ 2.12 แสดงว่า การเลี้ยงด้วยอาหาร high fat ทำให้เกิด impaired glucose tolerance จากรูปที่ 2.17 แสดงการวิเคราะห์การขนส่งแคลเซียมผ่านลำไส้ด้วยเทคนิค Ussing chamber พบว่า แม่หนูให้นมกลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารปกติมีการดูดซึมแคลเซียมสูงขึ้นเมื่อเทียบกับหนูไม่ท้อง แต่เมื่อแม่หนูเลี้ยงด้วยอาหาร high fat อัตราการดูดซึมแคลเซียมลดลง (เทียบกราฟแท่งที่ 2 และ 3) จากเทคนิค pQCT พบว่าแม่หนูที่เลี้ยงด้วยอาหาร high fat มี trabecular BMD น้อยกว่ากลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ แต่ค่า trabecular BMC มีแนวโน้มลดลง ส่วนของกระดูกเนื้อแน่นบริเวณ midshaft มี cortical BMD ไม่เปลี่ยนแปลง และมีค่า cortical BMC ลดลง (รูปที่ 2.18)



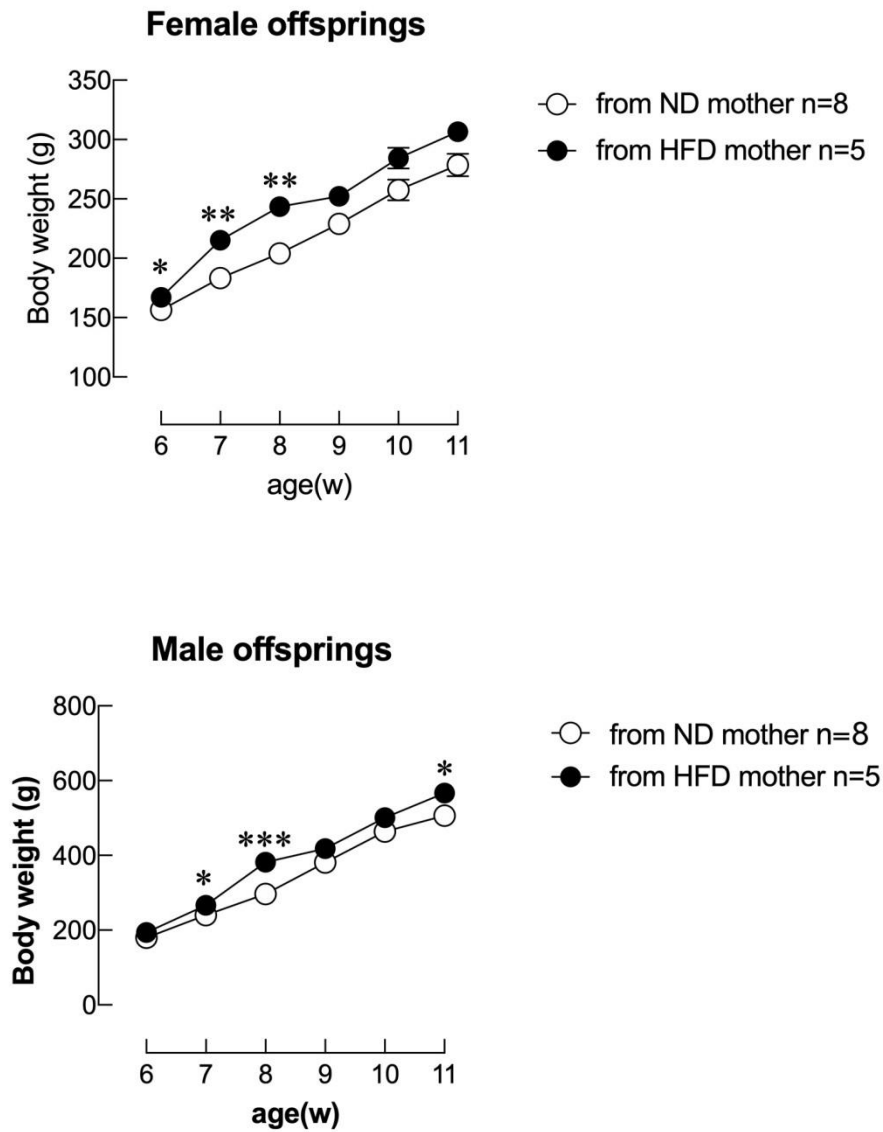
รูปที่ 2.17 แสดงการอัตราขนส่งแคลเซียมผ่านลำไส้ส่วน duodenum ในหนูไม่ท้องและหนูให้นมที่เลี้ยงด้วยอาหารปกติ (กราฟขาว) และแม่หนูให้นมที่เลี้ยงด้วยอาหารไขมันสูง (กราฟดำ) (n = 5–7 ต่อกลุ่ม)



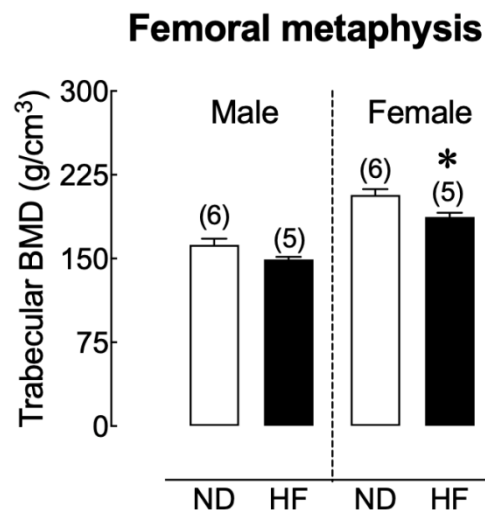
รูปที่ 2.18 แสดงการ bone mineral density (BMD) และ bone mineral content (BMC) กระดูกหน้าแข้งส่วน proximal metaphysis และ midshaft หนูให้นมที่ได้รับอาหารปกติ (กราฟขาว) และอาหาร high fat (กราฟดำ)

ผลของแม่หนูที่เลี้ยงด้วยอาหาร high fat ต่อการเจริญเติบโตของลูกหนู การเปลี่ยนแปลงของ metabolic parameters และความหนาแน่นของกระดูกลูกหนู

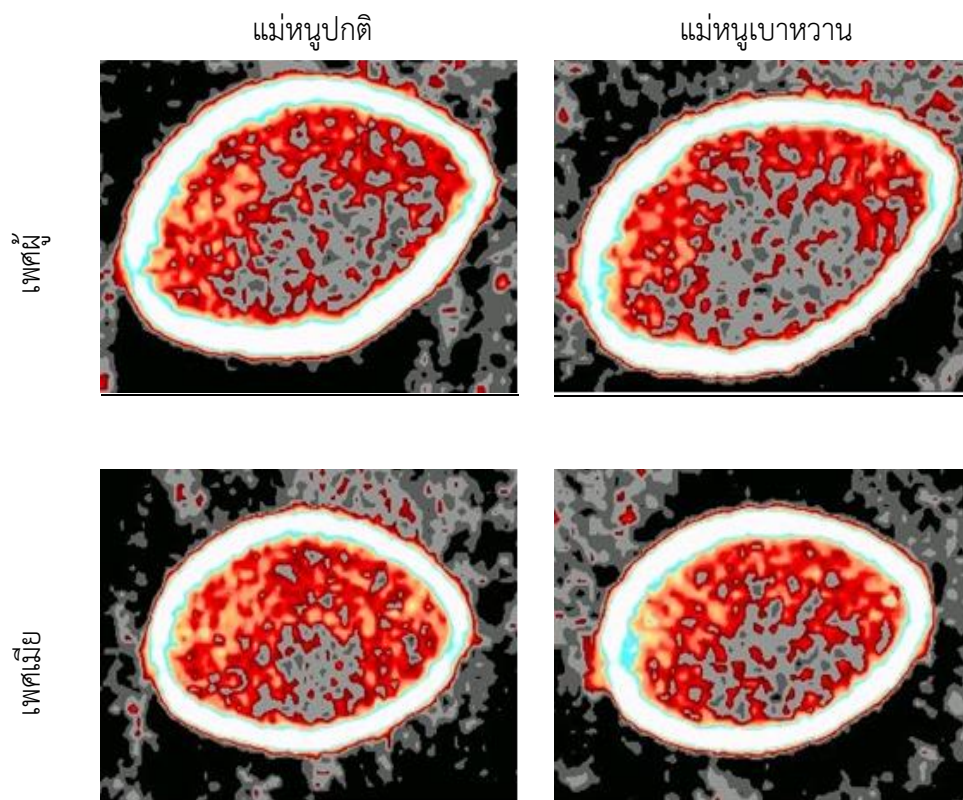
หลังจากลูกหนูหย่านม ลูกหนูทุกตัวถูกเลี้ยงด้วยอาหารสูตรปกติ ผู้วิจัยเก็บข้อมูลน้ำหนักตัวและปริมาณอาหารที่กินของลูกหนูทั้งเพศผู้และเพศเมียจนกระทั่งอายุ 13 สัปดาห์ พบว่า ลูกหนูทั้งเพศผู้และเมียจากกลุ่มแม่หนูเลี้ยงด้วยอาหาร high fat มีน้ำหนักตัวสูงกว่ากลุ่มอาหารปกติ รูปที่ 2.19 เมื่อวิเคราะห์ความหนาแน่นกระดูกโครงข่ายด้วยเทคนิค pQCT พบว่า ลูกหนูเพศเมียอายุ 13 สัปดาห์ที่เลี้ยงด้วยแม่หนูเบาหวานมีความหนาแน่นกระดูกลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และพบมีแนวโน้มลดลงในลูกหนูเพศผู้ (รูปที่ 2.20) รูปตัวแทนความหนาแน่นกระดูกจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค pQCT แสดงในรูปที่ 2.21



รูปที่ 2.19 แสดงน้ำหนักตัวลูกหนูอายุ 6–13 สัปดาห์ (แสดงผลถึงอายุ 11 สัปดาห์ ณ วันที่รายงานผล), * $P < 0.05$



รูปที่ 2.20 แสดงความหนาแน่นกระดูกโครงข่ายลูกหนูอายุ 13 สัปดาห์ ทั้งเพศผู้และเมีย ND = ลูกหนูที่เลี้ยงด้วยแม่หนูปกติ HF = ลูกหนูที่เลี้ยงด้วยแม่หนู GDM * $P < 0.05$



รูปที่ 2.21 ภาพตัวอย่างแสดงความหนาแน่นกระดูกโครงข่ายลูกหนูอายุ 13 สัปดาห์ เพศผู้ (แถวบน) และเพศเมีย (แถวล่าง) วิเคราะห์ด้วยเทคนิค pQCT พื้นที่สีแดงคือกระดูกโครงข่าย

สรุปและวิจารณ์ผลงานวิจัยที่ได้ดำเนินการมาแล้ว

แม่หนูท้องปกติวันที่ 21 มีการสร้างกระดูกลดลงเมื่อเทียบกับหนูไม่ท้อง วิธีการเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานขณะตั้งท้องอ้างอิงจากผลงานวิจัยอื่นมีทั้งแบบที่ใช้ยา Streptozotocin เพื่อทำลายเซลล์ตับอ่อน (ระดับฮอร์โมนอินซูลินในเลือดลดลง) ร่วมกับให้อาหารไขมันสูงและแบบที่ให้อาหารไขมันสูงเพียงอย่างเดียว ซึ่งผู้วิจัยจะทำการทดลองเปรียบเทียบทั้ง 2 แบบ เพื่อให้ได้โมเดลที่เหมาะสม เนื่องจากกว่า 10% ของสตรีตั้งครรภ์เป็น gestational diabetes และมีแนวโน้มสูงขึ้นเรื่อย ๆ เนื่องจากสตรีที่มีน้ำหนักเกินเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องโดยเฉพาะในสหรัฐอเมริกา ซึ่งภาวะน้ำตาลสูงในเลือดอาจส่งผลเสียโดยตรงต่อความแข็งแรงของกระดูกแม่ แม้โดยทั่วไปภาวะเบาหวานระหว่างตั้งครรภ์จะหายไปหลังคลอดลูก แต่หากไม่มีการควบคุมระดับน้ำตาลในช่วงนี้ ผลเสียที่กระทบต่อกระดูกที่เกิดขึ้นอาจไม่กลับมาสู่ภาวะปกติได้ งานวิจัยนี้อาจเพิ่มความตระหนักให้กับแม่ในเรื่องการดูแลสุขภาพระหว่างตั้งครรภ์ อีกส่วนของงานวิจัยพบว่าการได้รับอาหารไขมันสูงเป็นเวลานานทำให้เนื้อกระดูกลดลง ยา vildagliptin ซึ่งเป็นยาที่ใช้รักษาภาวะเบาหวาน สามารถลดระดับ cholesterol, HOMA index และเพิ่มความหนาแน่นกระดูกในหนูเพศผู้ได้ เมื่อพิจารณาตัวแปร metabolic หลังจากที่หนูเพศเมียเลี้ยงด้วยอาหารไขมันสูง มีน้ำหนักตัวมากขึ้น พบความบกพร่องของความทนทานต่อระดับน้ำตาลด้วยการทดสอบ oral glucose tolerance test การรับประทานอาหารไขมันสูงอาจทำให้กระดูกมีความแข็งแรงลดลง มีการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างกระดูก แต่ไม่ส่งผลกระทบต่อการขนส่งแคลเซียมที่ลำไส้ในหนูเพศเมียที่ไม่ท้อง

โดยทั่วไปแล้ว ประสิทธิภาพการดูดซึมแคลเซียมที่ลำไส้จะสูงขึ้นในระหว่างท้องและให้นมเพื่อปรับให้ร่างกายได้รับแคลเซียมให้เพียงพอกับที่ใช้ในการเจริญเติบโตของทารกในครรภ์และผลิตน้ำนม พบว่าประสิทธิภาพการดูดซึมแคลเซียมที่สูงขึ้นนี้จะหายไปในแม่หนูที่มีภาวะดื้อต่ออินซูลินซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อเจริญเติบโตของลูกหนู จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค pQCT พบว่าลูกหนูเพศเมียมีความหนาแน่นกระดูกต้นขาลดลงเมื่อเทียบกับแม่หนูที่เลี้ยงด้วยอาหารปกติ ในช่วงที่รายงานครั้งนี้ผู้วิจัยได้ตัดชิ้นเนื้อเยื่อเสร็จสิ้นแล้ว และจะรายงานผลการวิเคราะห์กระดูกหนูด้วยเทคนิค bone histomorphometry ในรายงานผลครั้งถัดไป

● **โครงการย่อยที่ 3**

Effects of iron chelators on the reciprocal intestinal iron and calcium transport and bone structure in thalassemia

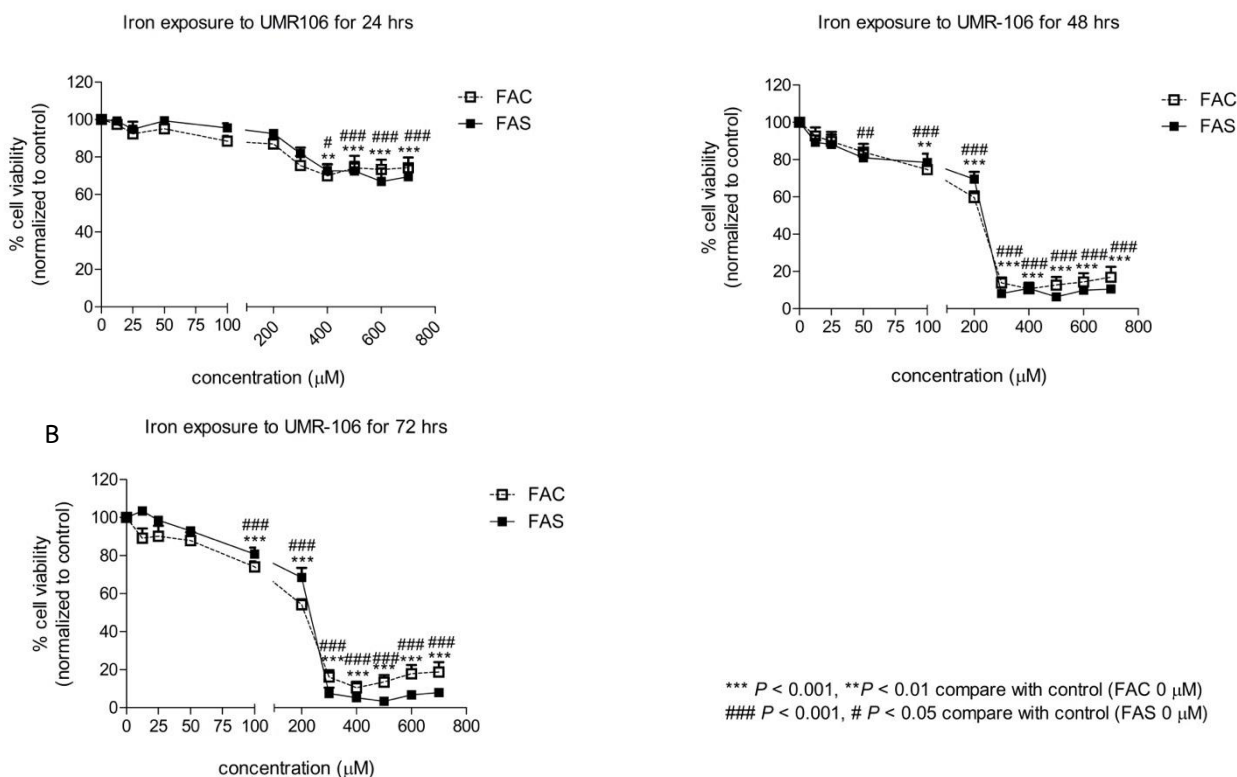
วัตถุประสงค์หลัก (ณ ช่วงเวลารายงาน 30 มิถุนายน 2560 ถึงวันที่ 29 มิถุนายน 2563)

1. เพื่อศึกษาผลของธาตุเหล็กในรูปแบบเฟอร์รัสและเฟอร์ริกต่อการมีชีวิต และการแบ่งเซลล์ของออสติโอเบลาสต์
2. เพื่อศึกษาผลของธาตุเหล็กในรูปแบบเฟอร์รัสและเฟอร์ริกต่อการตายของเซลล์ออสติโอเบลาสต์ และการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนในการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส ของออสติโอเบลาสต์หลังได้รับเหล็ก
3. เพื่อศึกษาการนำเข้าเหล็กของออสติโอเบลาสต์ และผลของธาตุเหล็กในรูปแบบเฟอร์รัสและเฟอร์ริกต่อการแสดงออก และการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนที่ทำหน้าที่ในการขนส่งเหล็กในออสติโอเบลาสต์
4. เพื่อศึกษาผลของธาตุเหล็กในรูปแบบเฟอร์รัสและเฟอร์ริกต่อการทำงานและแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของออสติโอเบลาสต์ในการสร้างกระดูก
5. เพื่อศึกษาผลของธาตุเหล็กในรูปแบบเฟอร์รัสและเฟอร์ริกต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการทำงานของออสติโอคลาสต์ ในออสติโอเบลาสต์ (osteoblast-derived osteoclastogenic genes)
6. เพื่อศึกษาผลของธาตุเหล็กในรูปแบบเฟอร์รัสและเฟอร์ริกต่อการทำงานและแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาและการทำงานของออสติโอเบลาสต์ เมื่อได้รับเหล็กในระยะเวลาต่างๆกัน
7. เพื่อศึกษาผลของวิตามินดี ต่อการนำเข้าเหล็กของออสติโอเบลาสต์ และการมีชีวิตรอดของออสติโอเบลาสต์ภายใต้ภาวะเหล็กเกิน
8. เพื่อศึกษาผลของธาตุเหล็กในรูปแบบเฟอร์รัสและเฟอร์ริกต่อการสะสมแคลเซียมของเซลล์ออสติโอเบลาสต์
9. เพื่อศึกษาผลของสารยับยั้งการตายแบบ Ferroptosis ต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์ออสติโอเบลาสต์ ภายใต้ภาวะเหล็กเกิน
10. เพื่อศึกษาผลของแคลเซียมต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์ออสติโอเบลาสต์ ภายใต้ภาวะเหล็กเกิน
11. เพื่อศึกษาความเกี่ยวข้องของ Reactive oxygen species ต่อการตายของเซลล์ออสติโอเบลาสต์ ภายใต้ภาวะเหล็กเกิน
12. เพื่อศึกษาผลของสารต้านอนุมูลอิสระ (N-acetyl cysteine; NAC) ต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์ออสติโอเบลาสต์ ภายใต้ภาวะเหล็กเกิน
13. เพื่อศึกษาผลของสารจับธาตุเหล็ก (iron chelator) ต่อระดับธาตุเหล็กภายในเซลล์ออสติโอเบลาสต์ และการมีชีวิตรอดของเซลล์ออสติโอเบลาสต์ ภายใต้ภาวะเหล็กเกิน
14. เพื่อศึกษาผลของสารยับยั้งเอนไซม์ NADPH oxidases (NOXs) ต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์ออสติโอเบลาสต์ ภายใต้ภาวะเหล็กเกิน
15. เพื่อศึกษาผลของธาตุเหล็กในรูปแบบเฟอร์รัสและเฟอร์ริกต่อการเปลี่ยนแปลงของระดับ Glutathione peroxidase 4 (GPX4)
16. เพื่อศึกษาผลของสารต้านอนุมูลอิสระ Trolox (อนุพันธ์ของวิตามิน E) ต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์ออสติโอเบลาสต์ และระดับ Reactive oxygen species ภายใต้ภาวะเหล็กเกิน
17. เพื่อศึกษาผลของธาตุเหล็กในรูปแบบเฟอร์รัสและเฟอร์ริกต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ตามวัฏจักร
18. เพื่อศึกษาผลของเหล็ก แคลเซียม วิตามินซี และวิตามินดีต่อความสัมพันธ์ระหว่างความสามารถในการขนส่งเหล็กและแคลเซียมภายในเซลล์ลำไส้ของมนุษย์
19. การศึกษาผลของกรดแอสคอบิกและธาตุเหล็กต่อการขนส่งแคลเซียมผ่านเซลล์ลำไส้เล็ก
20. การศึกษาผลของกรดแอสคอบิกต่อการละลายของแคลเซียมคาบอเนต

รายงานผลการวิจัย

1. ผลของเหล็กในรูปแบบเฟอร์รัสและเฟอร์ริก ต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์ออสติโอเบลาสต์

เซลล์ยูเอ็มอาร์ 106 ถูกเลี้ยงในอาหารที่มีเหล็กเฟอร์รัสจากเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต หรือ เฟอร์ริกจาก เฟอร์ริก นิยมซีเตรท ที่ความเข้มข้น 0, 25, 50, 75, 100, 200, 400, 600 และ 800 ไมโครโมลาร์ เป็นระยะเวลา 24, 48 หรือ 72 ชั่วโมง หลังจากนั้นการมีชีวิตของเซลล์จะถูกวัดด้วยวิธี MTT assay ผลการทดลองพบว่าเหล็กทั้งสองรูปแบบทำให้เกิดการลดลงของประชากรเซลล์ออสติโอเบลาสต์ตามความเข้มข้นและระยะเวลาของการเลี้ยงในอาหารที่มีเหล็ก (ภาพที่ 3.1)



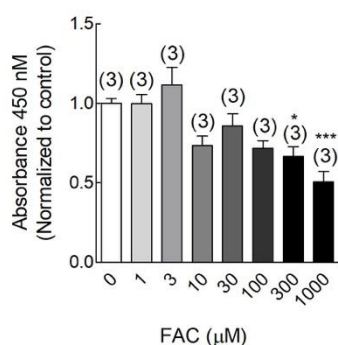
ภาพที่ 3.1 เหล็กเฟอร์ริกและเหล็กเฟอร์รัสลดการมีชีวิตรอดของเซลล์ออสติโอเบลาสต์ ยูเอ็มอาร์ 106 ตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น และเวลาที่ได้รับเหล็ก ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ (เมื่อเทียบกับเหล็กเฟอร์ริกกลุ่มควบคุม), ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ (เมื่อเทียบกับเหล็กเฟอร์รัสกลุ่มควบคุม)

หลังจากให้สารไปเป็นเวลา 24 ชั่วโมงพบว่าไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์ยูเอ็มอาร์ 106 ได้มากกว่าร้อยละ 50 แม้จะให้สารเข้มข้นสูงสุดที่ 800 ไมโครโมลาร์ก็ตาม พบว่าการมีชีวิตของเซลล์ยูเอ็มอาร์ 106 ลดลงร้อยละ 30.56 และ 25.74 เมื่อให้เหล็กเฟอร์รัส และเหล็กเฟอร์ริกตามลำดับ (ภาพที่ 3.1A) การตอบสนองของเซลล์ยูเอ็มอาร์ 106 ต่อเหล็กเฟอร์รัส และเหล็กเฟอร์ริกนั้นที่เวลา 48 และ 72 ชั่วโมงนั้นไม่แตกต่างกัน โดยพบว่าเซลล์ยูเอ็มอาร์ 106 รอดชีวิตลดลงอย่างมากเมื่อให้เหล็กความเข้มข้นสูงกว่า 200 ไมโครโมลาร์ และคำนวณค่าความเข้มข้นที่ยับยั้งการมีชีวิตรอดของเซลล์ยูเอ็มอาร์ 106 ได้ครั้งหนึ่ง (ไอซี₅₀) 232.35 และ 221.64 ไมโครโมลาร์ สำหรับเหล็กเฟอร์รัส และเหล็กเฟอร์ริกตามลำดับที่ 48 ชั่วโมง (ภาพที่ 3.1B) เซลล์ยูเอ็มอาร์ 106 มีค่าไอซี₅₀ ที่ 72 ชั่วโมงลดลงเล็กน้อย คือ 229.76 และ 211.45 ไมโครโมลาร์ สำหรับเหล็กเฟอร์รัส และเหล็กเฟอร์ริกตามลำดับ (ภาพที่ 3.1C) โดยภาพรวมแล้วพบว่าเหล็กเฟอร์ริกมีผลยับยั้งเซลล์ยูเอ็มอาร์ 106 สูงกว่าเหล็กเฟอร์รัส

2. ผลของเหล็กเฟอร์รัส และเหล็กเฟอร์ริกต่อความสามารถในการแบ่งเซลล์ของเซลล์ยูเอ็มอาร์ 106

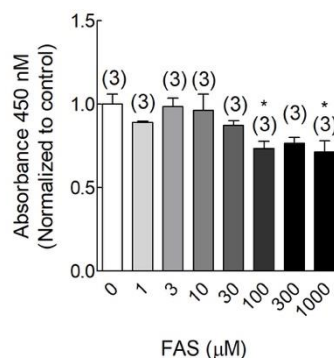
เซลล์ยูเอ็มอาร์ 106 ได้รับเหล็กเฟอร์รัส และเหล็กเฟอร์ริก ที่ความเข้มข้น 0, 1, 3, 10, 30, 100, 300 หรือ 1000 ไมโครโมลาร์ และวัดการเจริญของเซลล์ด้วยการอ่านปียอร์ดิยู (BrdU assay) หลังจากให้เหล็กไปแล้ว 24 ชั่วโมง การรวมเข้าของสารปียอร์ดิยูสู่สายดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ใหม่แสดงถึงการเจริญของเซลล์ พบว่าเหล็กเฟอร์รัสยับยั้งการเจริญของเซลล์อย่างมีนัยสำคัญ โดยยับยั้งไปร้อยละ 26.55 ที่ความเข้มข้นเหล็ก 100 ไมโครโมลาร์ และร้อยละ 28.53 ที่ความเข้มข้นเหล็ก 1000 ไมโครโมลาร์ ส่วนเหล็กเฟอร์รัสที่ 300 ไมโครโมลาร์แม้ว่าผลจะไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ แต่ก็แสดงถึงทิศทางการยับยั้งการเจริญของเซลล์ยูเอ็มอาร์ 106 โดยสามารถยับยั้ง การเจริญของเซลล์ได้ร้อยละ 23.43 (ภาพที่ 3.2A) ส่วนเหล็กเฟอร์ริกนั้นสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์ยูเอ็มอาร์ 106 อย่างมีนัยสำคัญ โดยยับยั้งไปร้อยละ 33.44 และ 49.48 เมื่อให้เหล็กความเข้มข้น 300 และ 1000 ไมโครโมลาร์ตามลำดับ (ภาพที่ 3.2B) ซึ่งผลที่ได้นี้สอดคล้องกับการวัดค่าความมีชีวิตที่แสดงในภาพที่ 3.1 ที่แสดงให้เห็นว่าเหล็กเฟอร์ริกมีผลกระทบต่อเซลล์ยูเอ็มอาร์ 106 มากกว่าเหล็กเฟอร์รัส

A FAC 24h mix 3 rep (normalized to control)



*** $P < 0.001$, * $P < 0.05$ compare with control (0 μM)
(n: biological replication = 3)

B FAS 24h mix 3 rep (normalized to control)



* $P < 0.05$ compare with control (0 μM)
(n: biological replication = 3)

UMR-106 Passage 20, 22, 21 Seeding density 2,500 cells/well

UMR-106 Passage 20, 22, 21 Seeding density 2,500 cells/well

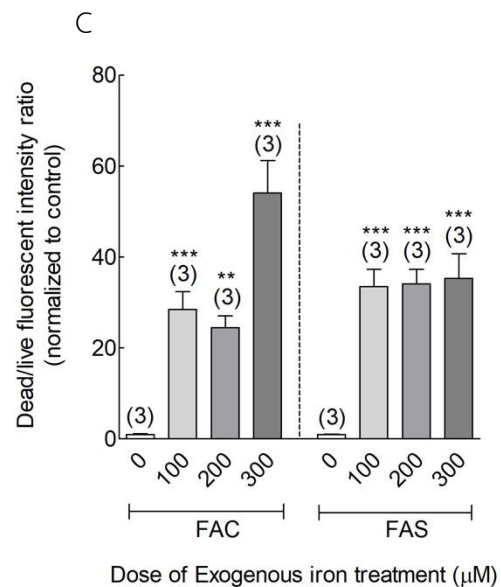
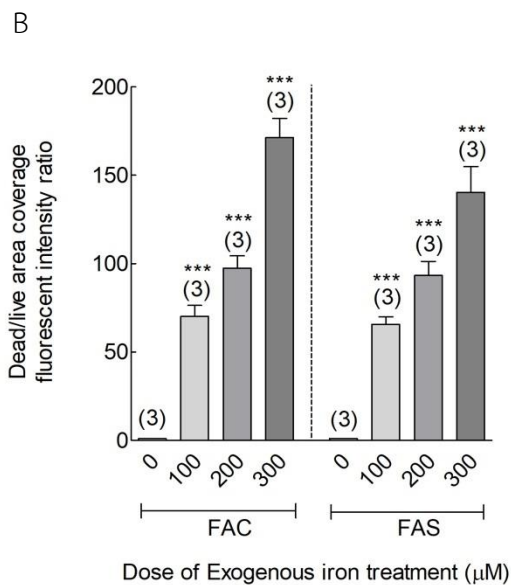
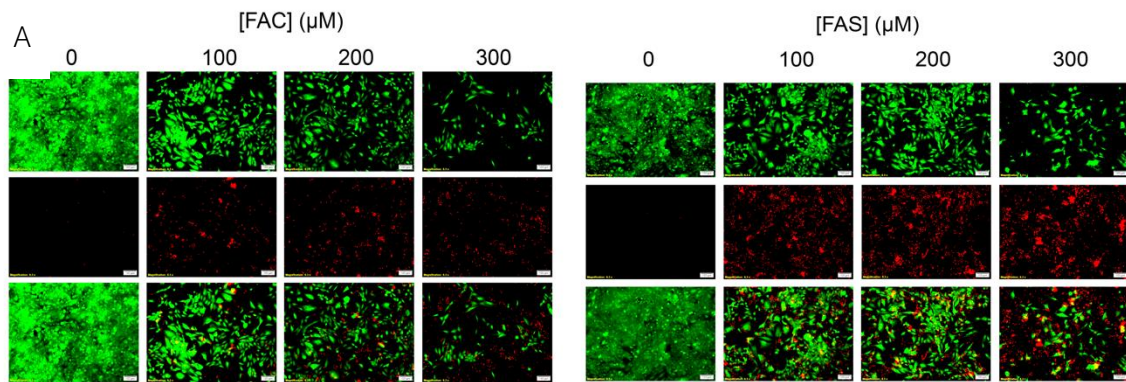
ภาพที่ 3.2 เหล็กทั้งสองรูปแบบลดการเจริญของเซลล์ออสติโอเบลาสต์ยูเอ็มอาร์ 106 (A) เหล็กเฟอร์ริกที่ 300 และ 1000 ไมโครโมลาร์ ลดการเจริญของออสติโอเบลาสต์ยูเอ็มอาร์ 106 อย่างมีนัยสำคัญ (B) เหล็กเฟอร์รัสที่ 100, 300 และ 1000 ไมโครโมลาร์ ลดการเจริญของออสติโอเบลาสต์ยูเอ็มอาร์ 106 อย่างมีนัยสำคัญ

3. ผลของเหล็กเฟอร์ริก และเหล็กเฟอร์รัสต่อการตายของเซลล์ออสติโอเบลาสต์

ความสมบูรณ์คงรูปของเยื่อหุ้มเซลล์ รวมถึงกิจกรรมของเอนไซม์ภายในเซลล์เป็นเครื่องบ่งชี้ถึงความมีชีวิตของเซลล์ ในการศึกษาครั้งนี้วัดความสมบูรณ์คงรูปของเยื่อหุ้มเซลล์ด้วยการใช้เอธิเดียมโฮโมไดเมอร์ (ethidium homodimer) ซึ่งจะแทรกเข้าไปในเซลล์ และเยื่อหุ้มนิวเคลียสของเซลล์ที่ตายแล้วได้ หลังจากเข้าไปในเซลล์แล้วเอธิเดียมโฮโมไดเมอร์ ซึ่งสามารถปล่อยแสงฟลูออเรสเซนส์สีแดงได้เมื่อถูกกระตุ้น จะไปเกาะกับดีเอ็นเอและทำให้เซลล์ที่ตายแล้วมีแสงฟลูออเรสเซนส์สีแดง ในทางกลับกัน กิจกรรมของเอนไซม์เอสเทอเรส (esterase) ภายในเซลล์ที่มีชีวิตจะเปลี่ยนแคลซีน-เอเอ็ม (calcein-AM) ไปเป็นผลิตภัณฑ์ที่ให้แสงฟลูออเรสเซนส์สีเขียวได้ เมื่อถูกกระตุ้น ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ว่าเซลล์นั้นยังมีชีวิตอยู่ เซลล์ยูเอ็มอาร์ 106 ได้รับเหล็กเฟอร์ริก และเหล็กเฟอร์รัสที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน ได้แก่ 0, 100, 200 และ 300 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง หลังจากนั้นเซลล์จะถูกติดฉลากด้วยเอธิเดียมโฮโมไดเมอร์ และแคลซีน-เอเอ็ม พร้อมๆ กัน ความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนส์ทั้งเขียว และแดง และพื้นที่ที่มีแสงฟลูออเรสเซนส์ถูกวัดเพื่อคำนวณหาสัดส่วนของเซลล์ที่ตายต่อเซลล์ที่มีชีวิต ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเหล็กทั้งสองรูปแบบนั้นกระตุ้นการตายของเซลล์ยูเอ็มอาร์ 106 ในทุกกลุ่มการทดลอง (ภาพที่ 3.3A) สัดส่วนความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนส์ระหว่างสีแดงจากเอธิเดียมโฮโมไดเมอร์ (เซลล์ตาย) และสีเขียวจากแคลซีน-เอเอ็ม (เซลล์มี

ชีวิต) มีค่าอยู่ที่ 33.50, 34.07 และ 35.29 ในเซลล์ยูเอ็มอาร์ 106 ที่ได้รับเหล็กเฟอร์ริสความเข้มข้น 100, 200 และ 300 ไมโครโมลาร์ตามลำดับ ในขณะที่สัดส่วนความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนซ์ระหว่างสีแดงจากเอธิเดียมไฮโมไดเมอร์ (เซลล์ตาย) และสีเขียวจากแคลซิน-เอเอ็ม (เซลล์มีชีวิต) ของเซลล์ยูเอ็มอาร์ 106 ที่ได้รับเหล็กเฟอร์ริกนั้นมีค่าต่ำกว่าเล็กน้อย คือ 28.47 และ 24.50 ที่ความเข้มข้นเหล็ก 100 และ 200 ไมโครโมลาร์ตามลำดับ แต่มีค่าสูงถึง 54.09 เมื่อให้เหล็กเฟอร์ริก 300 ไมโครโมลาร์ (ภาพที่ 3.3A)

นอกจากนี้พื้นที่ที่แสดงแสงฟลูออเรสเซนซ์ทั้งแดงและเขียวยังถูกวัดด้วย ซึ่งเป็นตัวแทนของจำนวนเซลล์ที่แสดงแสงฟลูออเรสเซนซ์ดังกล่าว ค่าสัดส่วนของพื้นที่ที่แสดงแสงฟลูออเรสเซนซ์สีแดง ต่อแสงฟลูออเรสเซนซ์สีเขียวมีค่าเท่ากับ 70.28, 97.43 และ 171.32 สำหรับเซลล์ที่ได้รับเหล็กเฟอร์ริกเข้มข้น 100, 200 และ 300 ไมโครโมลาร์ตามลำดับ ค่าสัดส่วนของพื้นที่ที่แสดงแสงฟลูออเรสเซนซ์สีแดงต่อพื้นที่ที่แสดงแสงฟลูออเรสเซนซ์เขียวในเซลล์ที่ได้รับเหล็กเฟอร์ริกนั้นมีค่าต่ำกว่าเล็กน้อย คือ 65.77, 93.33 และ 140.44 เมื่อได้รับเหล็กเฟอร์ริสความเข้มข้น 100, 200 และ 300 ไมโครโมลาร์ตามลำดับ (ภาพที่ 3.3B) จากข้อมูลเหล่านี้บ่งชี้ให้เห็นว่าเหล็กเฟอร์ริกมีความสามารถในการกระตุ้นการตายของเซลล์ออสติโอเบลาสต์ได้มากกว่าเหล็กเฟอร์ริส โดยมีค่าสัดส่วนความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนซ์ระหว่างสีแดงจากเอธิเดียมไฮโมไดเมอร์ (เซลล์ตาย) และสีเขียวจากแคลซิน-เอเอ็ม (เซลล์มีชีวิต) และค่าสัดส่วนของพื้นที่ที่แสดงแสงฟลูออเรสเซนซ์สีแดงต่อพื้นที่ที่แสดงแสงฟลูออเรสเซนซ์สีเขียว สูงกว่าค่าเหล่านี้ของเซลล์ยูเอ็มอาร์ 106 ที่ได้รับเหล็กเฟอร์ริสที่ความเข้มข้นเดียวกัน



*** $P < 0.001$ compare with control (0 μM)

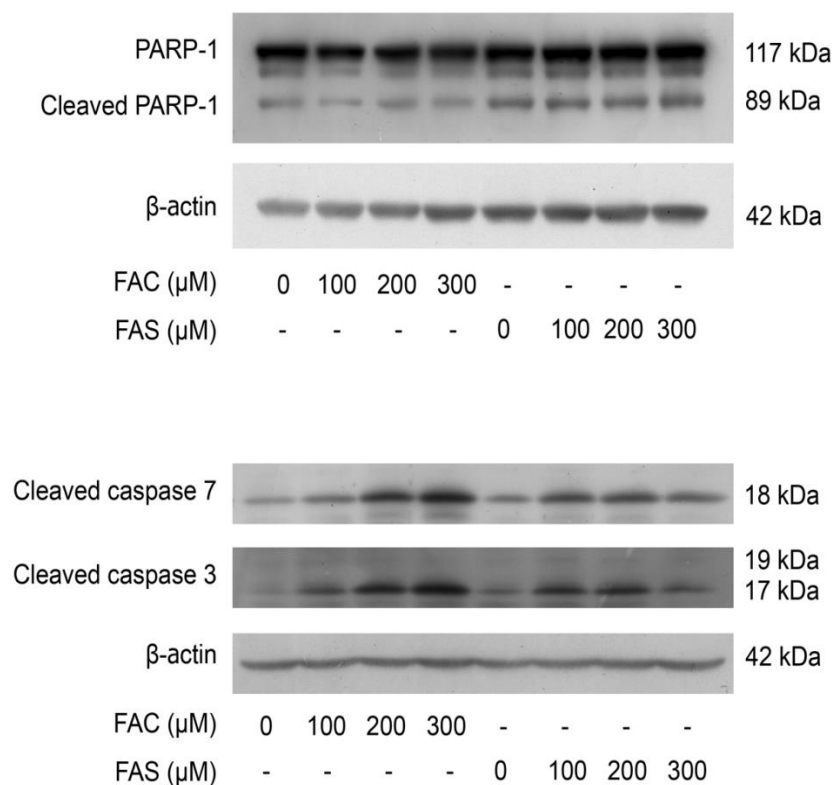
*** $P < 0.001$ compare with control (0 μM)

** $P < 0.01$ compare with control (0 μM)

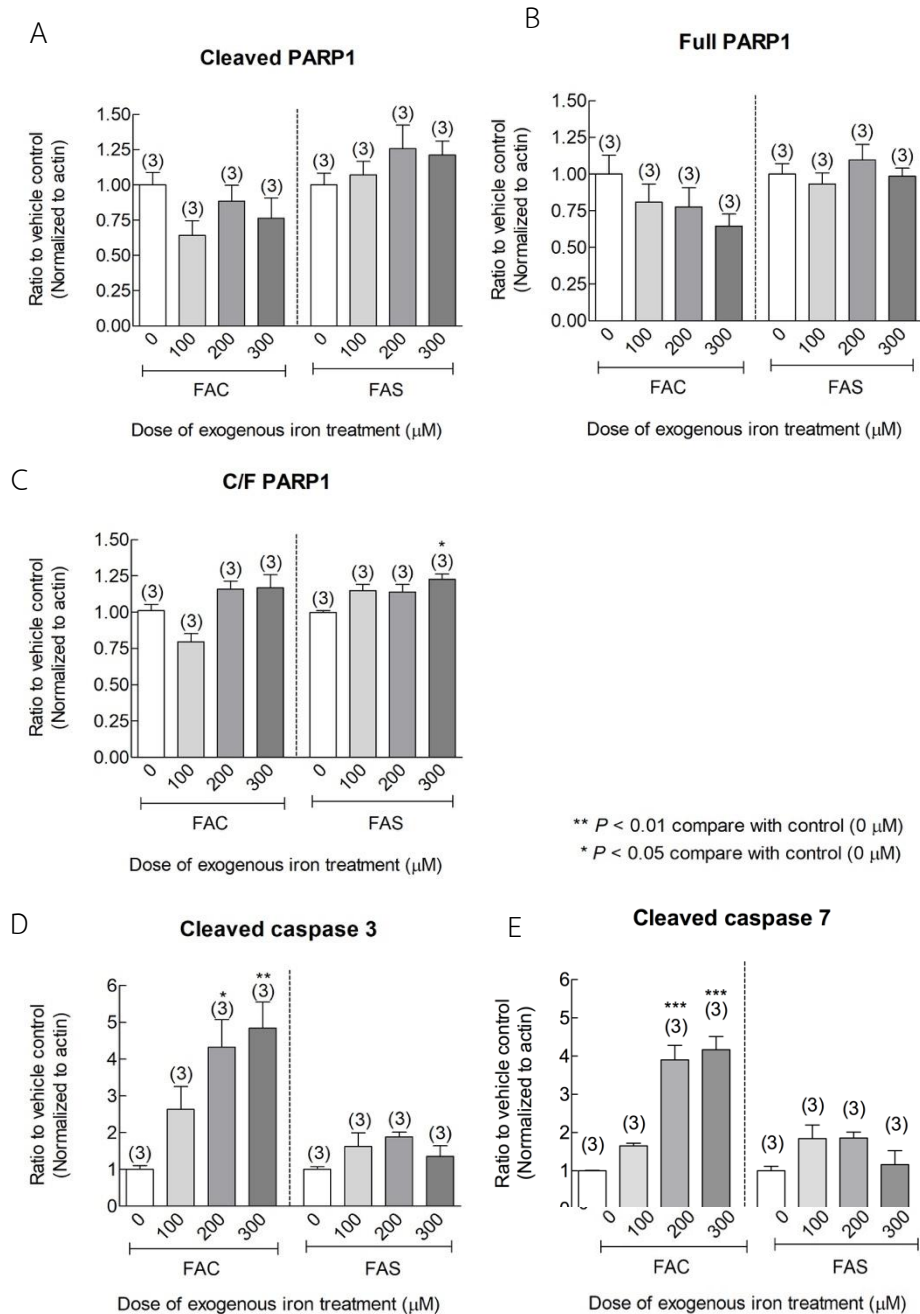
ภาพที่ 3.3 เหล็กเฟอร์ริกและเหล็กเฟอร์รัสทำให้เซลล์ออสติโอเบลาสต์ยูเอ็มอาร์ 106 ตาย โดยขึ้นอยู่กับปริมาณเหล็กที่ได้รับ (A) แสดงเซลล์ตายที่ติดฉลากด้วยเอธิเดียมโฮโมไดเมอร์ (สีแดง) และเซลล์มีชีวิตติดฉลากด้วยแคลซิน (สีเขียว) (B) เหล็กทั้งสองรูปแบบส่งผลให้เซลล์ออสติโอเบลาสต์ยูเอ็มอาร์ 106 ตายโดยขึ้นอยู่กับปริมาณความเข้มข้นของเหล็ก โดยวัดจากพื้นที่ที่มีแสงฟลูออเรสเซนส์แดงต่อสีเขียวที่เพิ่มขึ้น (C) เหล็กทั้งสองรูปแบบส่งผลให้เซลล์ออสติโอเบลาสต์ยูเอ็มอาร์ 106 ตายโดยขึ้นอยู่กับปริมาณความเข้มข้นของเหล็ก โดยวัดจากปริมาณสัดส่วนความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนส์แดงต่อสีเขียวที่เพิ่มขึ้น

4. ผลของเหล็กเฟอร์ริกและเหล็กเฟอร์รัส ต่อการตายของเซลล์ออสติโอเบลาสต์แบบเอพอพโทซิส

โปรตีนจากเซลล์ยูเอ็มอาร์ 106 ที่ได้รับเหล็กเฟอร์ริก หรือเหล็กเฟอร์รัสเป็นเวลา 72 ชั่วโมงถูกใช้เพื่อศึกษาผลของเหล็กเฟอร์ริก และเหล็กเฟอร์รัสต่อการเปลี่ยนแปลงของตัวบ่งชี้การตายแบบเอพอพโทซิส ตัวอย่างโปรตีนถูกนำไปศึกษาด้วยวิธีเวสเทิร์นบลอตเพื่อตรวจสอบระดับของตัวบ่งชี้เอพอพโทซิส ได้แก่ โพลีเอดีพีไรโบสโพลิเมอร์-เรส 1, คลิพด์โพลีเอดีพีไรโบสโพลิเมอร์เรส 1, คลิพด์แคสเปส 3 และ คลิพด์แคสเปส 7 หลังจากเซลล์ได้รับเหล็กทั้งสองรูปแบบ (ภาพที่ 3.4) ผลการทดลองพบว่าปริมาณโพลีเอดีพีไรโบสโพลิเมอร์เรส 1 นั้นลดลงอย่างชัดเจนในเซลล์ออสติโอเบลาสต์ที่ได้รับเหล็กเฟอร์ริก แต่ระดับนั้นค่อนข้างไม่เปลี่ยนแปลงในเซลล์ที่ได้รับเหล็กเฟอร์รัส (ภาพที่ 3.5A และ 3.5B) และแม้ว่าระดับของคลิพด์โพลีเอดีพีไรโบสโพลิเมอร์เรส 1 หลังจากได้รับเหล็กทั้งสองรูปแบบนั้นจะไม่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ แต่เมื่อคำนวณหาสัดส่วน คลิพด์โพลีเอดีพีไรโบสโพลิเมอร์เรส 1 ต่อโพลีเอดีพีไรโบสโพลิเมอร์เรส 1 พบว่ามีสัดส่วนเพิ่มขึ้นหลังจากได้รับเหล็กทั้งสองรูปแบบ (ภาพที่ 3.5C) โดยระดับที่เพิ่มขึ้นสอดคล้องไปในทิศทางเดียวกันกับระดับความเข้มข้นของเหล็กที่เพิ่มขึ้น แม้ว่าผลที่ได้จะไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในกลุ่มที่ได้รับเหล็กเฟอร์รัส แต่ก็แสดงให้เห็นถึงทิศทางแบบเดียวกันกับกลุ่มที่ได้รับเหล็กเฟอร์ริก (ภาพที่ 3.5C) ผลนี้ชี้ให้เห็นว่าเหล็กทั้งสองรูปแบบ กระตุ้นการตายในเซลล์ออสติโอเบลาสต์ผ่านทางกระบวนการเอพอพโทซิส ตัวบ่งชี้อื่นๆ ได้แก่ คลิพด์แคสเปส 3 และ คลิพด์แคสเปส 7 ได้รับการประเมินเพื่อเป็นการยืนยันกระบวนการเอพอพโทซิสเซลล์ออสติโอเบลาสต์ หลังจากได้รับเหล็กทั้งสองรูปแบบ (ภาพที่ 3.4) โดยพบว่าเซลล์ยูเอ็มอาร์ 106 มีระดับคลิพด์-แคสเปส 3 และ 7 เพิ่มขึ้นอย่างมากหลังจากให้เหล็กเฟอร์ริก โดยขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของเหล็กเฟอร์ริก ส่วนเหล็กเฟอร์รัสทำให้ระดับคลิพด์แคสเปส 3 และ 7 เพิ่มขึ้นเล็กน้อย จากผลเหล่านี้สรุปได้ว่าเหล็กทั้งสองรูปแบบกระตุ้นให้เซลล์ออสติโอเบลาสต์เกิดกระบวนการเอพอพโทซิส โดยเหล็กเฟอร์ริกส่งผลมากกว่าเหล็กเฟอร์รัส



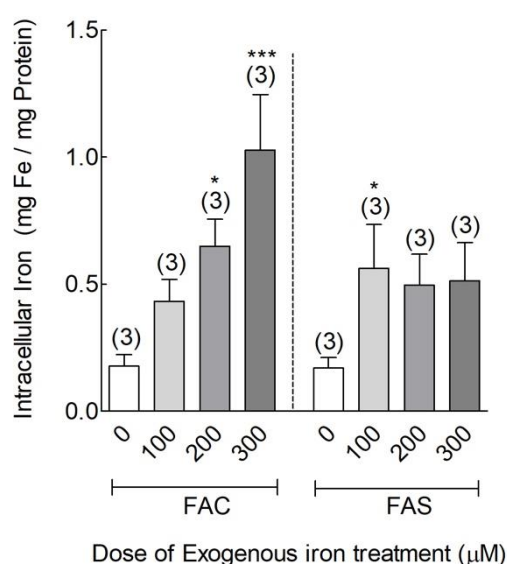
ภาพที่ 3.4 เหล็กทั้งสองชนิดทำให้ตัวบ่งชี้การตายแบบเอพอพโทซิสเพิ่มขึ้นหลังจากได้รับเหล็กเป็นเวลา 72 ชั่วโมง



ภาพที่ 3.5 ระดับตัวบ่งชี้การตายแบบเอพออโทซิสเพิ่มขึ้นหลังจากได้รับเหล็กเฟอร์ริก และเหล็กเฟอร์รัส (A) ระดับคลิฟด์โพลีเอติพีโรโบสโพลีเมอร์-เรส 1 ไม่เปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อได้รับเหล็กทั้งสองรูปแบบ (B) ระดับ โพลีเอติพีโรโบสโพลีเมอร์-เรส 1 มีแนวโน้มลดลงในกลุ่มที่ได้รับเหล็กเฟอร์ริกตามความเข้มข้นที่ได้รับ แม้จะไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (C) สัดส่วนของคลิฟด์โพลีเอติพีโรโบสโพลีเมอร์-เรส 1 ต่อโพลีเอติพีโรโบสโพลีเมอร์-เรส 1 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในกลุ่มที่ได้รับเหล็กเฟอร์รัส 300 ไมโครโมลาร์ เหล็กเฟอร์ริกทำให้ (D) ระดับคลิฟด์แคสเปส 3 และ (E) ระดับคลิฟด์แคสเปส 7 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญโดยขึ้นอยู่กับความเข้มข้นที่ได้รับ ในขณะที่เหล็กเฟอร์รัสไม่ทำให้ระดับเพิ่มอย่างมีนัยสำคัญ แต่แสดงแนวโน้มไปในทางเพิ่มขึ้น

5. ผลของเหล็กเฟอร์ริก และเหล็กเฟอร์รัสต่อการเพิ่มขึ้นของเหล็กไอออนภายในเซลล์ และการเปลี่ยนแปลงของการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการขนส่งเหล็กในเซลล์ออสติโอเบลาสต์

การวัดระดับเหล็กไอออนภายในเซลล์หลังจากให้เหล็กทั้งสองรูปแบบไปเป็นเวลา 24 ชั่วโมงด้วยการใช้ เพลมอะตอมมิก แอปซอร์ปชัน สเปกโตรสโกปี (flame atomic absorption spectroscopy; FAAS) เพื่อจะศึกษาว่าการให้เหล็กทั้งสองรูปแบบทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของเหล็กไอออนภายในเซลล์หรือไม่ พบว่าระดับเหล็กไอออนภายในเซลล์เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญหลังจากให้เหล็กเฟอร์ริก โดยเพิ่มจาก 0.18 มิลลิกรัมเหล็ก ต่อ มิลลิกรัมโปรตีนในกลุ่มควบคุม เป็น 0.43, 0.65 และ 1.03 มิลลิกรัมเหล็ก ต่อ มิลลิกรัมโปรตีนในกลุ่มที่ได้รับเหล็กเฟอร์ริก 100, 200 และ 300 ไมโครโมลาร์ตามลำดับ ในทางเดียวกันพบว่าระดับเหล็กไอออนภายในเซลล์เพิ่มขึ้นจาก 0.17 มิลลิกรัมเหล็ก ต่อ มิลลิกรัมโปรตีนในควบคุม เป็น 0.56, 0.50 และ 0.51 เมื่อให้เหล็กเฟอร์รัสเข้มข้น 100, 200 และ 300 ไมโครโมลาร์ตามลำดับ (ภาพที่ 3.6) เห็นได้ว่าเหล็กเฟอร์ริกส่งผลต่อการนำเหล็กไอออนเข้าสู่เซลล์ออสติโอเบลาสต์มากกว่าผลจากเหล็กเฟอร์รัส



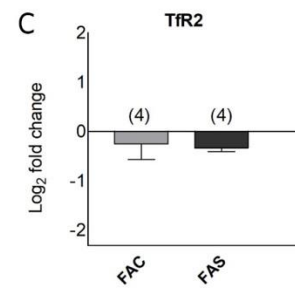
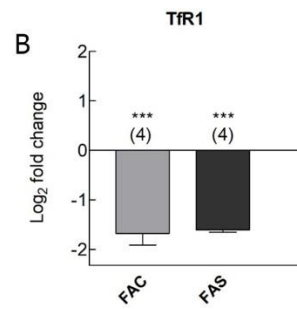
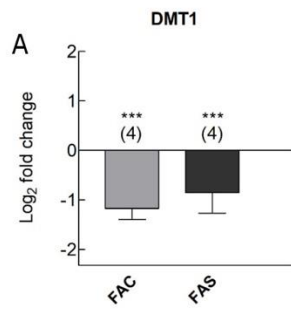
*** $P < 0.001$ compare with control (0 μM)

* $P < 0.05$ compare with control (0 μM)

ภาพที่ 3.6 เหล็กเฟอร์ริกกระตุ้นการนำเข้าสู่เซลล์อย่างมีนัยสำคัญเมื่อให้ที่ความเข้มข้น 200 และ 300 ไมโครโมลาร์ ในขณะที่เหล็กเฟอร์รัสทำให้ระดับเหล็กไอออนภายในเซลล์เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์

เพื่อที่จะศึกษาว่าตัวขนส่งเหล็กในเซลล์ออสติโอเบลาสต์ชนิดใดที่อาจเป็นตัวขนส่งหลักในกระบวนการนี้ การศึกษาครั้งนี้จึงได้ศึกษาการแสดงออกของตัวขนส่งเหล็กหลังจากได้รับเหล็กทั้งชนิดเฟอร์ริก และเฟอร์รัสเป็นเวลา 24 ชั่วโมงด้วยวิธี qRT-PCR โดยศึกษาการแสดงออกของยีนของตัวขนส่งเหล็ก และยีนอื่นๆ ที่เกี่ยวข้อง พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงไปหลังจากได้รับเหล็กทั้งสองรูปแบบ (ภาพที่ 3.7) โดยระดับของ ไตวาเลนท์ เมทอล ทรานสปอเตอร์ (DMT1) ลดลงร้อยละ 56 และ 45 หลังจากได้รับเหล็กเฟอร์ริก และเหล็กเฟอร์รัสตามลำดับ (ภาพที่ 3.7A) การลดลงในลักษณะเดียวกันพบได้ในการแสดงออกของยีนตัวรับทรานส์เฟอร์ริน1 (transferrin receptor 1; TfR1) และตัวรับทรานส์เฟอร์ริน2 (transferrin receptor 2; TfR2) โดยลดลงประมาณร้อยละ 70 และ 20 สำหรับ ตัวรับทรานส์เฟอร์ริน1 และ ตัวรับทรานส์เฟอร์ริน2 ตามลำดับ เมื่อได้รับเหล็กทั้งสองรูปแบบ (ภาพที่ 3.7B และ C)

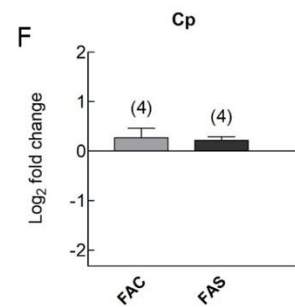
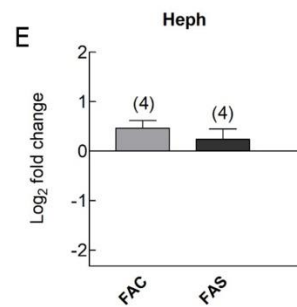
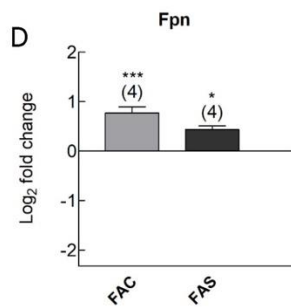
ในทางกลับกันพบว่าการแสดงออกของยีนเฟอร์โรพอริน (ferroportin; Fpn), ฮีฟาอีสติน (hephaestin; Heph) และ เซรูโลพลาสมิน (ceruloplasmin; Cp). กลับเพิ่มขึ้น การแสดงออกของยีนเฟอร์โรพอริน เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเป็น 1.71 และ 1.36 เท่าเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม หลังจากให้เหล็กเฟอร์ริก และเฟอร์รัส ตามลำดับ (ภาพที่ 3.7D) เช่นเดียวกับฮีฟาอีสตินที่เพิ่มเป็น 1.38 และ 1.18 เท่าเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม หลังจากให้เหล็กเฟอร์ริก และเฟอร์รัส ตามลำดับ (ภาพที่ 3.7E) และแม้ว่าการแสดงออกของเซรูโลพลาสมินจะไม่แตกต่างทางสถิติ แต่ก็แสดงออกถึงทิศทางในการเปลี่ยนแปลงเพิ่มขึ้น (ภาพที่ 3.7F) ส่วนการแสดงออกของยีนดูโอตินัม ไซโตโครมบี (duodenum cytochrome b; DCytb) และ ยีนโปรตีนเฮโมโครมาโตซิส (hemochromatosis protein; HFE) ไม่เปลี่ยนแปลงหลังจากได้เหล็กทั้งสองรูปแบบ (ภาพที่ 3.7G และ H)



*** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ vs control

*** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ vs control

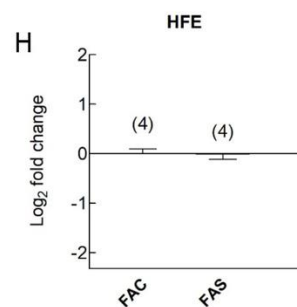
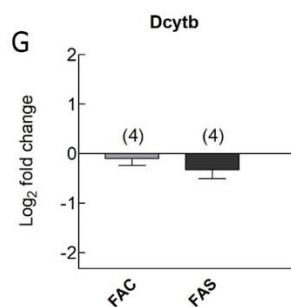
*** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ vs control



*** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ vs control

*** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ vs control

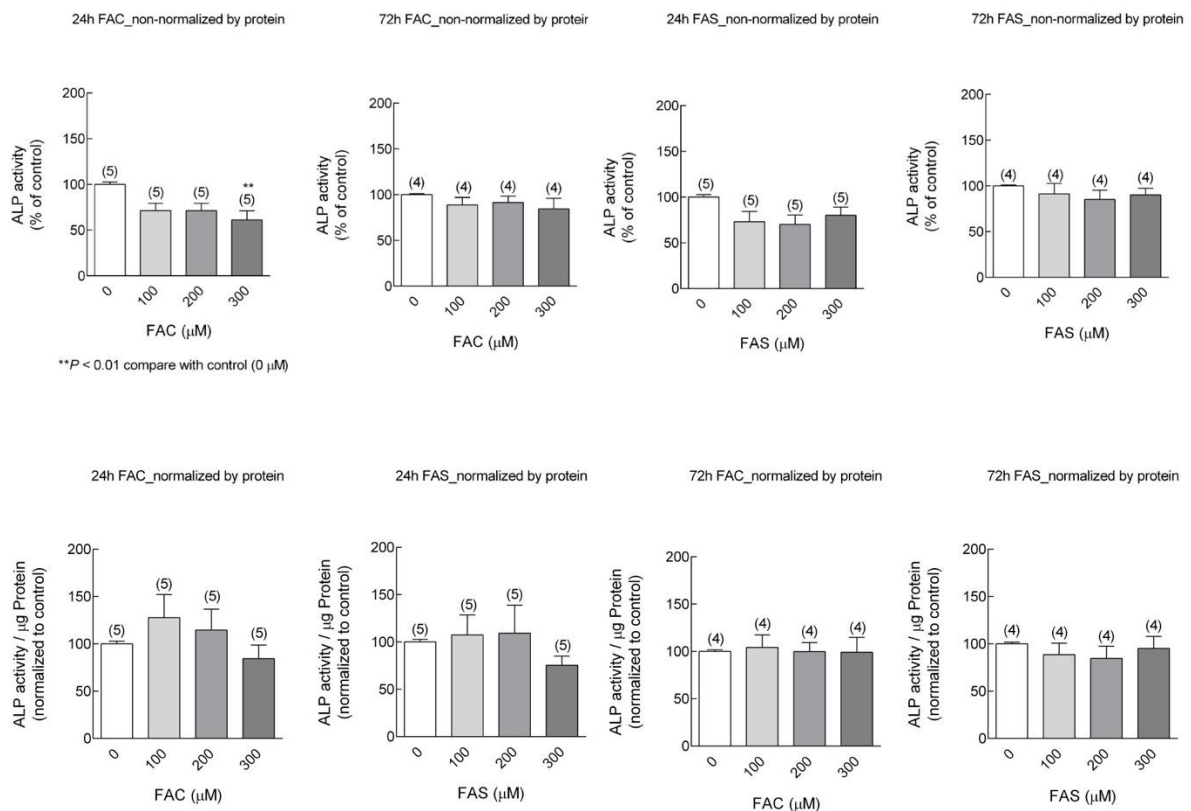
*** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ vs control



ภาพที่ 3.7 เหล็กทั้งสองรูปแบบส่งผลต่อการแสดงออกของยีนไปในทิศทางเดียวกัน แต่เหล็กเฟอร์ริกส่งผลให้การแสดงออกของยีนมีการเปลี่ยนแปลงมากกว่าเหล็กเฟอร์รัส

6. ผลหลักทั้งสองรูปแบบต่อกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส (alkaline phosphatase; ALP) ในออสติโอเบลาสต์

ผลของหลักเฟอร์ริก และหลักเฟอร์รัสต่อการพัฒนา และกิจกรรมของเซลล์ออสติโอเบลาสต์ถูกประเมินโดยกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส โดยวัดกิจกรรมของเอนไซม์ดังกล่าว และกิจกรรมของเอนไซม์ต่อหน่วยโปรตีนของตัวอย่าง หลังจากทำให้หลักทั้งสองรูปแบบที่ความเข้มข้น 100, 200 หรือ 300 ไมโครโมลาร์เป็นเวลา 24 และ 72 ชั่วโมง พบว่าแม้ว่าหลักทั้งสองรูปแบบไม่ส่งผลให้กิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในผลการทดลองส่วนใหญ่ อย่างไรก็ตามแนวโน้มในการลดลงของกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสสามารถพบได้ในเซลล์ออสติโอเบลาสต์ที่ได้รับหลักทั้งสองรูปแบบ และพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์เอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสในเซลล์ออสติโอเบลาสต์มีการลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในกลุ่มที่ได้รับหลักเฟอร์ริกที่ความเข้มข้น 300 ไมโครโมลาร์เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง (ภาพที่ 3.8)

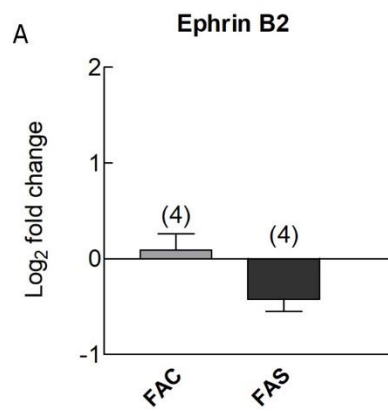


ภาพที่ 3.8 หลักทั้งสองรูปแบบมีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส การลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เกิดกับเซลล์ออสติโอเบลาสต์ที่ได้รับหลักเฟอร์ริกที่ความเข้มข้น 300 ไมโคร-โมลาร์ เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง

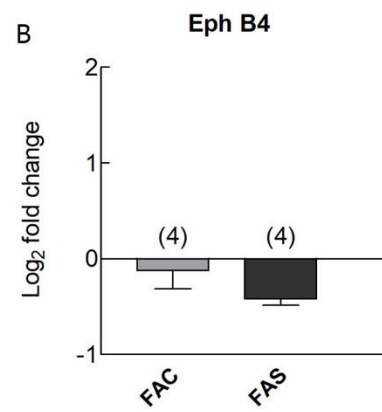
7. ผลของเกล็ดเพอร์ริกและเกล็ดเพอร์ริสส่งผลต่อการแสดงออกของยีนที่ส่งเสริมการทำงานของเซลล์ออสติโอเบลาสต์และเซลล์ออสติโอคลาสต์ ในเซลล์ออสติโอเบลาสต์

นอกจากการแสดงออกของยีนออสติโอเบลาสต์ที่ส่งผลโดยตรงต่อการพัฒนาของเซลล์ออสติโอเบลาสต์ ดังแสดงไว้ในภาพที่ 3.7 เซลล์ออสติโอเบลาสต์ยังควบคุมการพัฒนา และการทำงานของเซลล์ออสติโอคลาสต์ผ่าน การมีปฏิสัมพันธ์ และการหลั่งสารกระตุ้นหลายชนิด การศึกษานี้แสดงให้เห็นถึงการแสดงออกของยีนแบบออสติโอเบลาสต์ซึ่งกระตุ้นให้เกิดการพัฒนาของเซลล์ออสติโอเบลาสต์ แต่ยับยั้งการพัฒนาของเซลล์ออสติโอคลาสต์ (ภาพที่ 3.9) ผลการทดลองชี้ว่าการแสดงออกของยีนอีรีโทรพอยติน-โพรตีนซึ่ง ฮิวแมนด์ เฮปาทอเซลล์ลูล่า รีเซปเตอร์-อินเตอร์แอคตติ้ง โพรตีน บี2 (erythropoietin-producing human hepatocellular receptor-interacting protein B2; Ephrin B2), ยีนออสติโอโปรทีเกริน (osteoprotegerin; OPG) และไซโคล-ออกซีจีเนส 2 (Cyclo-oxygenase 2; COX-2) นั้นเพิ่มขึ้นร้อยละ 23, 54 และ 74 เท่าเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม หลังจากให้เกล็ดเพอร์ริก แต่ไม่พบว่ายีนอีรีโทรพอยติน-โพรตีนซึ่ง ฮิวแมนด์ เฮปาทอเซลล์ลูล่า รีเซปเตอร์ บี4 (erythropoietin-producing human hepatocellular receptors B4; Eph B4) เปลี่ยนแปลงไปหลังจากให้เกล็ดเพอร์ริก แต่เมื่อให้เกล็ดเพอร์ริสพบว่ายีนอีรีโทรพอยติน-โพรตีนซึ่ง ฮิวแมนด์ เฮปาทอเซลล์ลูล่า รีเซปเตอร์-อินเตอร์แอคตติ้ง โพรตีน บี2 และยีนอีรีโทรพอยติน-โพรตีนซึ่ง ฮิวแมนด์ เฮปาทอเซลล์ลูล่า รีเซปเตอร์ บี4 ลดลงร้อยละ 16 และ 25 ตามลำดับเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม นอกจากนี้ยังพบว่ามี的增加ขึ้นเล็กน้อยของยีนยีนออสติโอโปรทีเกริน และไซโคล-ออกซีจีเนส 2 หลังจากให้เกล็ดเพอร์ริส (ภาพที่ 3.9)

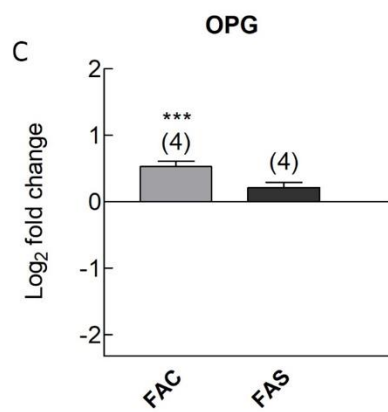
ในอีกด้านหนึ่งได้มีการวัดค่าการแสดงออกของยีนแบบออสติโอคลาสโตเจนิก ซึ่งเป็นยีนที่ส่งผลให้เกิด การพัฒนาของเซลล์ออสติโอคลาสต์ (ภาพที่ 3.10) พบว่าเกล็ดเพอร์ริกส่งผลให้ยีนโมโนไซต์ คีโมแทคติก โปรตีน 1 (monocyte chemotactic protein 1; MCP-1) และ ยีนอินเตอร์ลิวคิน 6 (interleukin 6; IL-6) เพิ่มขึ้นร้อยละ 75 และ 109 ตามลำดับเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม แต่เกล็ดเพอร์ริกมีผลเพียงเล็กน้อยเท่านั้นต่อการแสดงออกของยีนแมคโครฟาจ โคลนีสติมูเลตติ้ง แฟคเตอร์ (macrophage colony-stimulating factor; M-CSF) และ ยีนอินเตอร์ลิวคิน 1บีต้า (interleukin 1 β ; IL-1 β) เป็นที่น่าสนใจว่าเกล็ดเพอร์ริกยับยั้งการแสดงออกของยีน รีเซปเตอร์ แอคติเวเตอร์ ออฟ นิวเคลียร์ แฟคเตอร์ แคปปา บี ไกลแคนด์ (Receptor activator of nuclear factor κ B ligand; RANKL) ส่วนเกล็ดเพอร์ริสนั้นเพิ่มการแสดงออกของยีนอินเตอร์ลิวคิน 6 เล็กน้อย แต่ลด การแสดงออกของยีนแมคโครฟาจ โคลนีสติมูเลตติ้ง แฟคเตอร์ และไม่มีผลต่อการแสดงออกของยีนโมโนไซต์ คีโมแทคติก โปรตีน 1, ยีนอินเตอร์ลิวคิน 1บีต้า และยีนรีเซปเตอร์ แอคติเวเตอร์ ออฟ นิวเคลียร์ แฟคเตอร์ แคปปา บี ไกลแคนด์ (ภาพที่ 3.10)



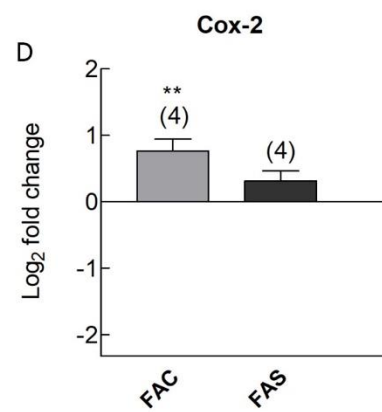
*** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ vs control



*** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ vs control

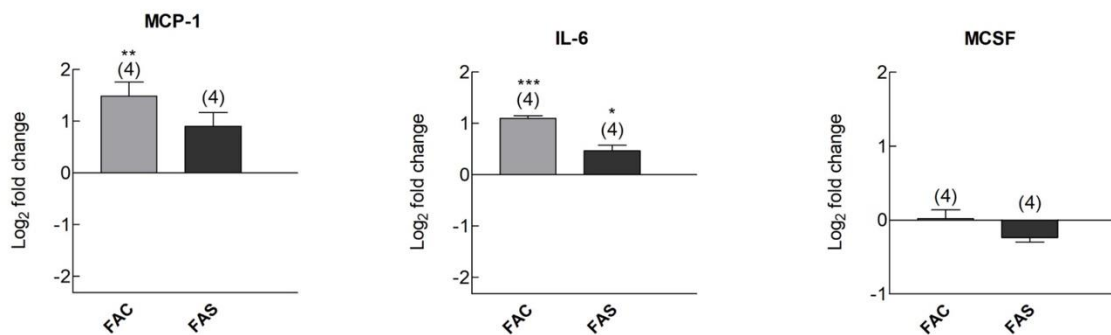


*** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ vs control

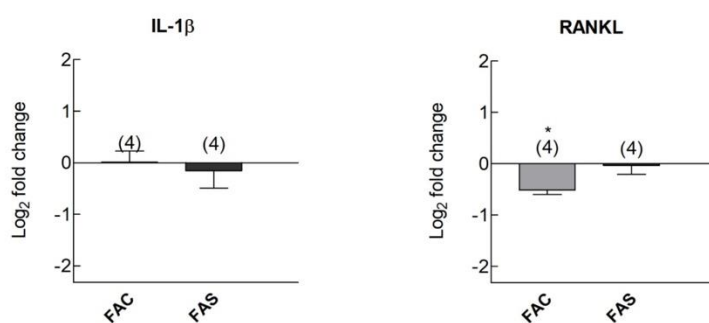


*** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ vs control

ภาพที่ 3.9 แสดงผลของเหล็กในรูปแบบเฟอร์ริกและเฟอร์รัสที่มีต่อการแสดงออกของยีนในกลุ่มออสติโอเบลาสต์



*** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ vs control *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ vs control *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ vs control



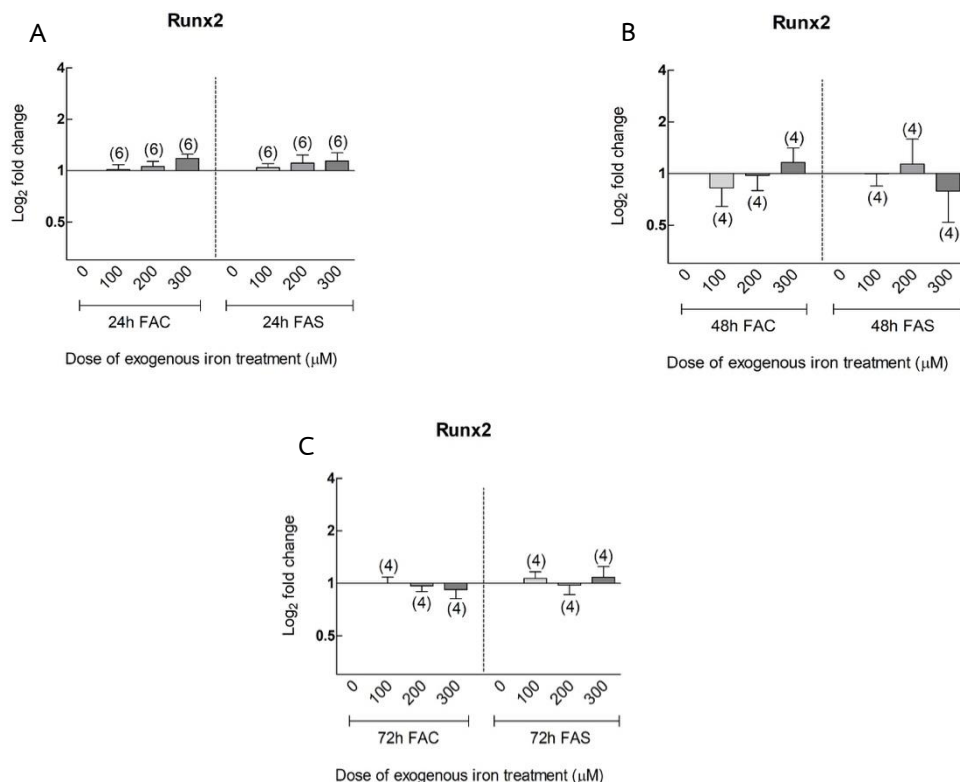
*** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ vs control *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ vs control

ภาพที่ 3.10 แสดงผลของเซลล์ในรูปแบบเพอร์ริกและเพอร์ริสที่มีต่อการแสดงออกของยีนในกลุ่มออสติโอคลาสโตเจนิก

8. ผลของธาตุเหล็กในรูปแบบเพอร์ริสและเพอร์ริกต่อการทำงานและแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาและการทำงานของออสติโอคลาสต์

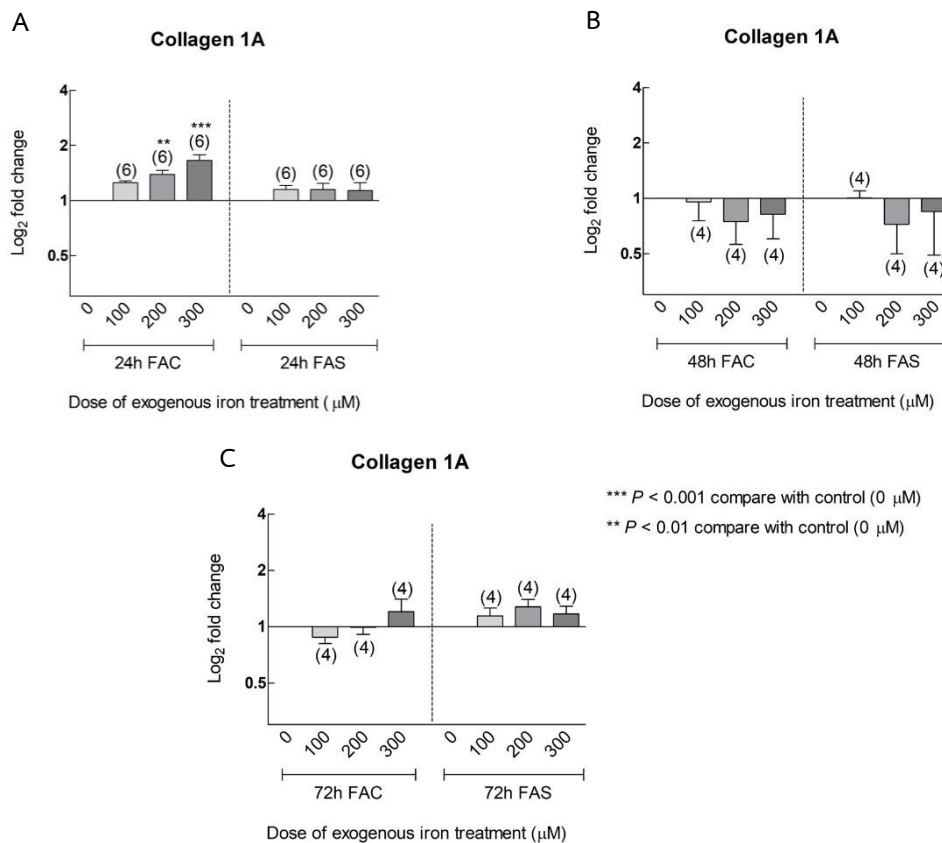
เซลล์ยูเอ็มอาร์ 106 ถูกเลี้ยงในอาหารที่มีเหล็กเพอร์ริสจากเพอร์ริสแอมโมเนียมซัลเฟต หรือ เพอร์ริกจาก เพอร์ริกแอมโมเนียมซัลเฟต ที่ความเข้มข้น 0, 100, 200 หรือ 300 ไมโครโมลาร์ เป็นระยะเวลา 24, 48 หรือ 72 ชั่วโมง หลังจากนั้น การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาและการทำงานของเซลล์ออสติโอคลาสต์ ด้วยวิธี qRT-PCR โดยได้ทำการศึกษการเปลี่ยนแปลงของ ยีน Runt-related transcription factor 2 (RUNX2), คอลลาเจนชนิดที่ 1A, ยีนของเอนไซม์อัลคาไลน์ ฟอสฟาเตส (Alkaline phosphatase; ALP) และ ออสติโอแคลซิน (Osteocalcin)

Runx2 เป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่ควบคุมการพัฒนาของเซลล์ออสติโอคลาสต์ ซึ่งจะมีการแสดงออกในเซลล์ออสติโอคลาสต์ระยะกำลังพัฒนา (preosteoblast and immature osteoblast) และจะลดบทบาทลงเมื่อเซลล์ออสติโอคลาสต์พัฒนาเต็มที่แล้ว (mature osteoblast) ดังนั้นการแสดงออกของยีนนี้จะบ่งชี้ถึงความสามารถในการพัฒนาของเซลล์ออสติโอคลาสต์ ผลการทดลองพบว่า หลังจากให้เหล็กทั้งสองชนิดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทั้งเหล็กเพอร์ริก (FAC) และเพอร์ริส (FAS) ทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของการแสดงออกของยีน Runx2 อย่างไม่มีนัยสำคัญ (ภาพที่ 3.11A) ในขณะที่ 48 ชั่วโมง เหล็ก FAC ที่ความเข้มข้น 100 และ 200 ไมโครโมลาร์ ทำให้เกิดการลดการแสดงออกของ Runx2 กลุ่มที่ได้รับ FAC ที่ 300 ไมโครโมลาร์ กลับให้ผลตรงกันข้าม ซึ่งผลของเหล็กที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของ Runx2 ในทิศทางตรงข้ามในความเข้มข้นที่แตกต่างกัน ก็สามารถพบได้ในกลุ่มของเซลล์ออสติโอคลาสต์ที่ได้รับเหล็ก FAS (ภาพที่ 3.11B) ในขณะเดียวกันการแสดงออกของยีน Runx2 หลังจากได้รับเหล็กทั้งสองชนิดเป็นเวลา 72 ชั่วโมง กลับทำให้มีการเปลี่ยนแปลงน้อยที่สุดเมื่อเทียบกับอีกสองช่วงเวลา (ภาพที่ 3.11C)



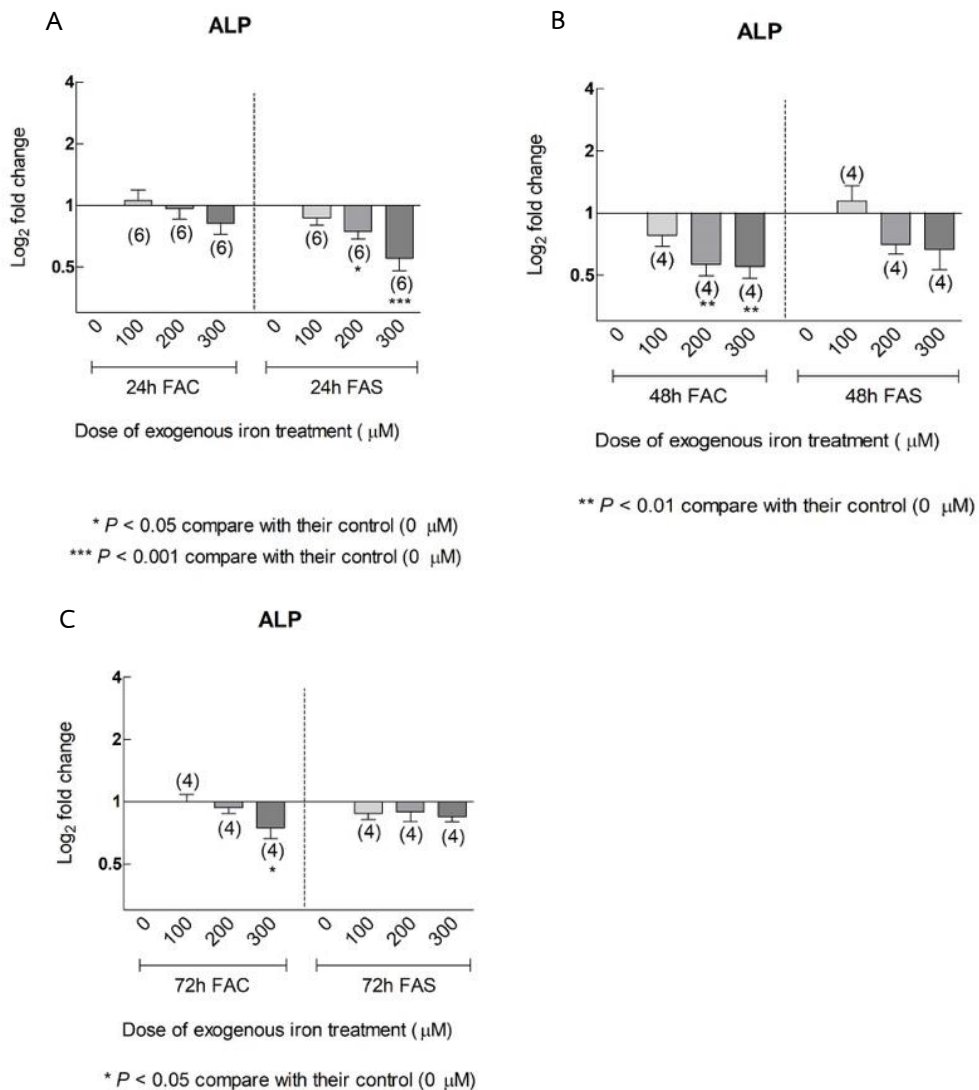
ภาพที่ 3.11 เหล็กเฟอร์ริกและเหล็กเฟอร์รัสมีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของ Runx2 ในเซลล์ออสติโอเบลาสต์ (ยูเอ็มอาร์ 106) แตกต่างกันตามระยะเวลาที่ได้รับเหล็กทั้งสองรูปแบบ

คอลลาเจนชนิดที่ 1 อัลฟา (Collagen type 1A) เป็นองค์ประกอบหลักของ extracellular matrix ในกระดูก ซึ่งถูกสร้างโดยเซลล์ออสติโอเบลาสต์ ซึ่งถูกสร้างจากเซลล์ออสติโอเบลาสต์ในระยะกำลังพัฒนา (immature osteoblast) และระยะที่พัฒนาเต็มที่แล้ว (mature osteoblast) นอกจากนี้การศึกษาหลายชิ้นที่ผ่านมาพบว่าคอลลาเจนชนิดที่ 1 นี้ยังมีบทบาทสำคัญในการส่งเสริมการทำงานและการแสดงออกของโปรตีนอัลคาไลน์ฟอสฟาเตสซึ่งจำต่อการทำงานของเซลล์ออสติโอเบลาสต์อีกด้วย ดังนั้นการแสดงออกของโปรตีนชนิดนี้จะเป็นตัวชี้วัดการพัฒนาและการทำงานของออสติโอเบลาสต์ในการสร้างเนื้อกระดูกอีกด้วย จากการศึกษาผลของเหล็กทั้งสองรูปแบบต่อการแสดงออกของยีนดังกล่าว พบว่าเมื่อเซลล์ออสติโอเบลาสต์ได้รับเหล็กทั้งสองรูปแบบในระยะเวลา 24 ชั่วโมง จะสามารถกระตุ้นให้เกิดการเพิ่มขึ้นของการแสดงออกของคอลลาเจนชนิดที่ 1 ได้โดยเฉพาะ FAC ซึ่งสามารถทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพที่ 3.12A) ในทางกลับกัน เหล็กทั้งสองรูปแบบกลับให้ผลในทางตรงกันข้าม เมื่อได้รับเหล็กเป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง (ภาพที่ 3.12B) ที่ระยะเวลา 72 ชั่วโมง FAC ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ สามารถลดการแสดงออกของคอลลาเจนชนิดที่ 1 ได้ แต่ที่ความเข้มข้น 300 ไมโครโมลาร์กลับทำให้มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น ในกรณีการให้ FAS ที่ระยะเวลา 72 ชั่วโมง ทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของการแสดงออกของคอลลาเจนชนิดที่ 1 อย่างไม่มีนัยสำคัญ (ภาพที่ 3.12C)



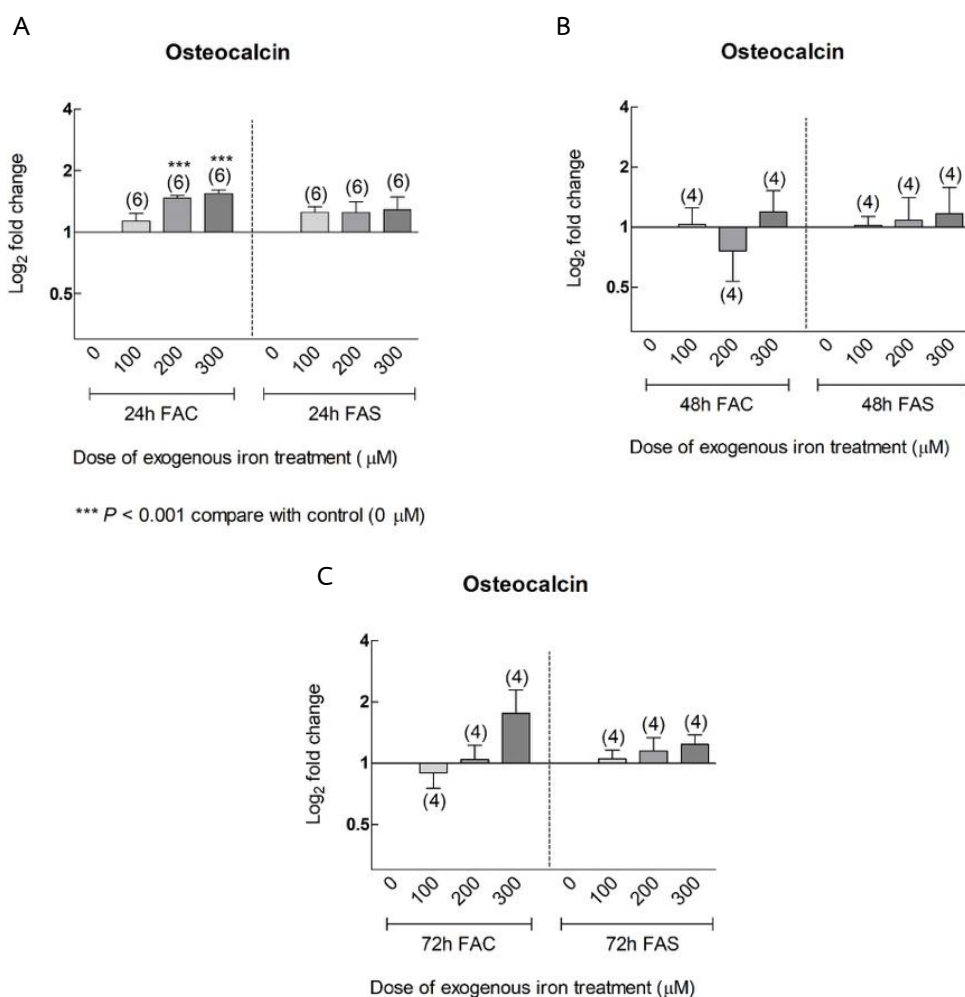
ภาพที่ 3.12 เหล็กเฟอร์ริกและเหล็กเฟอร์รัสมีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของคอลลาเจน ชนิดที่ 1A ในเซลล์ออสติโอเบลาสต์ (ยูเอ็มอาร์ 106) แตกต่างกันตามระยะเวลาที่ได้รับเหล็กทั้งสองรูปแบบ

โปรตีนอีกชนิดหนึ่งซึ่งจำเป็นต่อการทำงานของเซลล์ออสติโอเบลาสต์และสามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้การทำงานของเซลล์ออสติโอเบลาสต์ได้ ได้แก่ เอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส (Alkaline phosphatase) เอนไซม์เหล่านี้เป็นเอนไซม์ที่จำเป็นต่อกระบวนการสร้างกระดูกแข็ง (bone mineralization) ดังนั้นจึงเป็นเอนไซม์ที่มีการแสดงออกในเซลล์ออสติโอเบลาสต์ระยะกำลังทำงาน (active osteoblast) ดังนั้นการแสดงออกของเอนไซม์ชนิดนี้จะเป็นตัวชี้วัดความสามารถในการทำงานของเซลล์ออสติโอเบลาสต์ได้ ในการศึกษาครั้งนี้พบว่า เมื่อเซลล์ออสติโอเบลาสต์ได้รับเหล็กทั้งสองรูปแบบ ทำให้เกิดการลดลงของการแสดงออกของเอนไซม์ดังกล่าว ทั้งในระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง โดยการลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพที่ 3.13) พบได้เมื่อเซลล์ออสติโอเบลาสต์ได้รับเหล็ก FAS ความเข้มข้น 200 และ 300 ไมโครโมลาร์ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง (ภาพที่ 3.13A) และ FAC ความเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง (ภาพที่ 3.13B) และที่ความเข้มข้น 300 ไมโครโมลาร์ที่ระยะเวลา 48 และ 72 ชั่วโมง (ภาพที่ 3.13B-C)



ภาพที่ 3.13 เหล็กเฟอร์ริกและเหล็กเฟอร์รัสมีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส ในเซลล์ออสติโอเบลาสต์ (ยูเอ็มอาร์ 106) แตกต่างกันตามระยะเวลาที่ได้รับเหล็กทั้งสองรูปแบบ

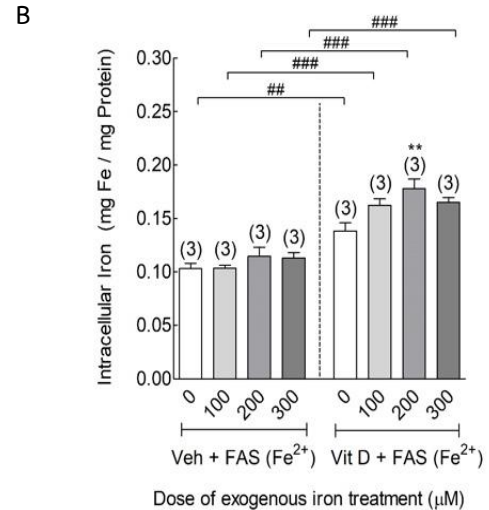
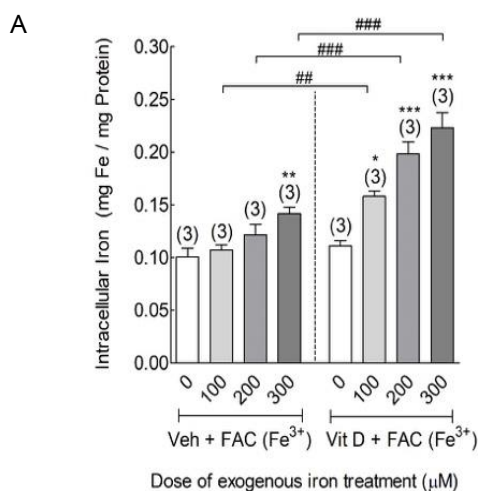
ออสติโอแคลซิน (Osteocalcin) เป็นโปรตีนที่ถูกสร้างขึ้น และขับออกมาโดยเซลล์ออสติโอเบลาสต์ระยะพัฒนา ทำหน้าที่ในการกระตุ้นการทำงานและการพัฒนาของเซลล์ออสติโอเบลาสต์ และออสติโอคลาสต์ รวมไปถึงกระบวนการสะสมแคลเซียมในกระดูก เพื่อสร้างกระดูกแข็ง ปริมาณของโปรตีนชนิดนี้ถูกใช้เป็นตัวบ่งชี้กิจกรรมการสร้างและสลายกระดูกของร่างกาย (bone remodeling process) ในขณะเดียวกัน เนื่องจากโปรตีนชนิดนี้จะถูกผลิตจากเซลล์ออสติโอเบลาสต์ในระยะพัฒนาเท่านั้น การแสดงออกของโปรตีนชนิดนี้ จึงเป็นตัวบ่งชี้การพัฒนาและการทำงานของเซลล์ออสติโอเบลาสต์ได้เป็นอย่างดี ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าเมื่อเซลล์ออสติโอเบลาสต์ได้รับเหล็กทั้งสองรูปแบบ ทำให้เกิดการแสดงออกของออสติโอแคลซินเพิ่มขึ้น (ภาพที่ 3.14) และการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สามารถพบได้ในเซลล์ออสติโอเบลาสต์ที่ได้รับเหล็ก FAC เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง (ภาพที่ 3.14A) แม้ว่าผลการทดลองนี้จะมีความขัดแย้งกับการแสดงออกของตัวบ่งชี้การพัฒนาของเซลล์ออสติโอเบลาสต์อื่นๆที่ผ่านมา แต่การแสดงออกของออสติโอแคลซินซึ่งสามารถกระตุ้นการสลายกระดูกได้ ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงนี้จึงอาจจะเป็นการปรับตัวให้กระดูกอยู่ในระยะของการสลายกระดูกหลังได้รับเหล็ก เช่นเดียวกับการศึกษาจากหลายกลุ่มวิจัยก่อนหน้านี้



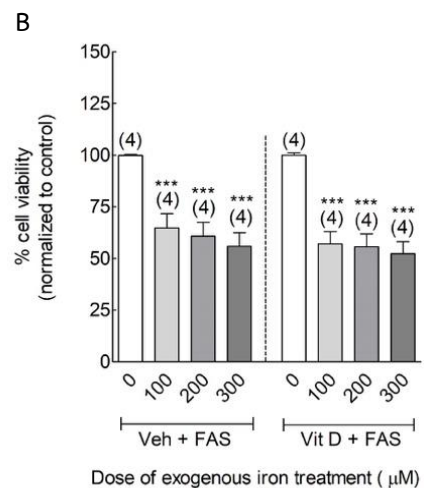
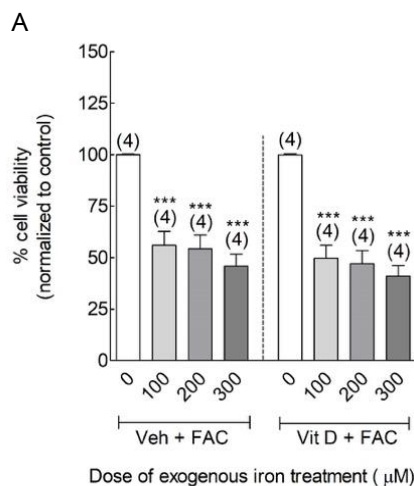
ภาพที่ 3.14 เหล็กเฟอร์ริกและเหล็กเฟอร์รัสมีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของออสติโอแคลซิน ในเซลล์ออสติโอเบลาสต์ (ยูเอ็มอาร์ 106) แตกต่างกันตามระยะเวลาที่ได้รับเหล็กทั้งสองรูปแบบ

9. ผลของวิตามินดี ต่อการนำเข้าเหล็กของออสติโอเบลาสต์ และการมีชีวิตรอดของออสติโอเบลาสต์ภายใต้ภาวะเหล็กเกิน

งานวิจัยมากมายในอดีตแสดงว่าวิตามินดี เป็นหนึ่งในฮอร์โมนที่กระตุ้นการดูดซึมแคลเซียมผ่านลำไส้เล็ก ไม่น่าแปลกใจว่าวิตามินดี ถูกใช้ในผลิตภัณฑ์เสริมแคลเซียมอย่างแพร่หลาย ดังนั้นการทดลองนี้จึงมีขึ้นเพื่อทดสอบผลกระทบที่อาจจะเป็นไปได้ของวิตามินดี ต่อการนำเข้าเหล็ก และการมีชีวิตรอดของเซลล์ออสติโอเบลาสต์ภายใต้ภาวะเหล็กเกิน การศึกษาครั้งนี้ได้ทำการให้วิตามินดี 3 เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมงก่อนที่จะได้รับเหล็ก FAC หรือ FAS เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ผลการศึกษาพบว่า เมื่อเซลล์ออสติโอเบลาสต์ได้รับเหล็กทั้งสองรูปแบบเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง วิตามินดี 3 สามารถกระตุ้นให้เกิดการนำเข้าเหล็กมากขึ้นในเซลล์ออสติโอเบลาสต์ บ่งชี้ได้จากการเพิ่มขึ้นของเหล็กภายในเซลล์ โดยวิตามินดี 3 มีผลให้กระตุ้นให้เกิดการนำเข้าเหล็กเมื่อเซลล์ออสติโอเบลาสต์ได้รับเหล็ก FAC มากกว่าเมื่อเซลล์ได้รับเหล็ก FAS (ภาพที่ 3.15) ในขณะเดียวกัน การมีชีวิตรอดของเซลล์ออสติโอเบลาสต์ในกลุ่มที่ได้รับทั้งวิตามินดี 3 และเหล็ก มีค่าลดลงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับเพียงเหล็กเท่านั้น ปรากฏการณ์นี้พบได้ทั้งในกลุ่มที่ได้รับเหล็ก FAC และ FAS (ภาพที่ 3.16)



ภาพที่ 3.15 วิตามินดีมีผลให้เกิดการเพิ่มขึ้นของเหล็กภายในเซลล์ออสติโอเบลาสต์ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับสารควบคุมแทนวิตามินดี (vehicle control) ปรากฏการณ์นี้พบได้ทั้งในกลุ่มที่ได้รับเหล็กเฟอร์ริก (FAC) (A) และเฟอร์รัส (FAS) (B)



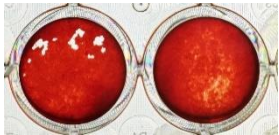
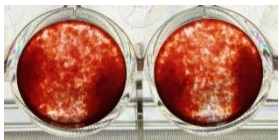
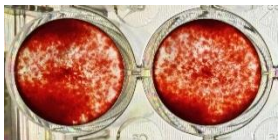
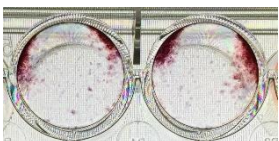
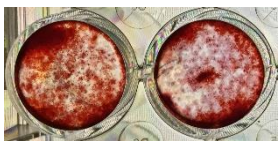
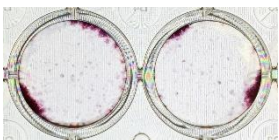
ภาพที่ 3.16 วิตามินดีมีผลให้เกิดการตายของเซลล์ออสติโอเบลาสต์เพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ในเซลล์ออสติโอเบลาสต์ที่ได้รับเหล็กทั้งสองรูปแบบ

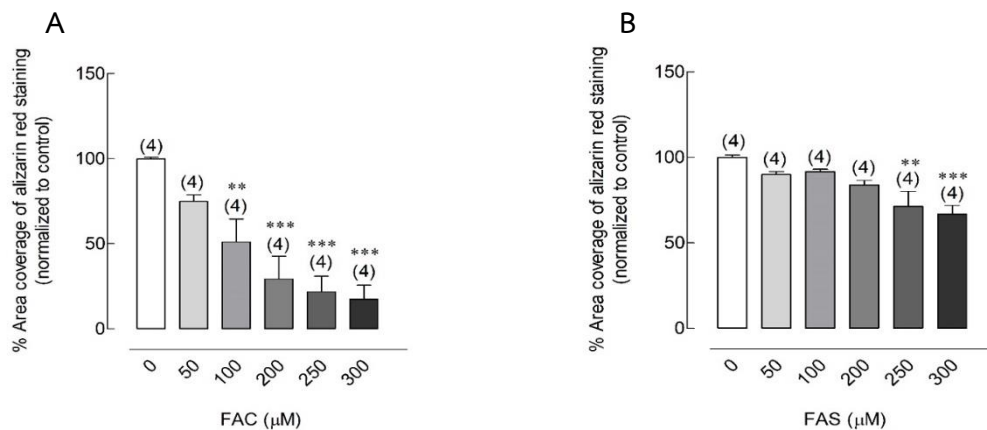
10. การศึกษาผลของธาตุเหล็กในรูปแบบเฟอร์รัสและเฟอร์ริกต่อการสะสมแคลเซียมของเซลล์ออสติโอเบลาสต์

เซลล์ยูเอ็มอาร์ 106 ได้รับเหล็กเฟอร์ริก (FAC) และเหล็กเฟอร์รัส (FAS) ที่ความเข้มข้น 0, 50, 100, 200, 250 หรือ 300 ไมโครโมลาร์ เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้น ความสามารถในการสะสมแคลเซียมในเซลล์ และที่ extracellular matrix ของเซลล์ออสติโอเบลาสต์จะถูกวัดโดยการย้อมด้วยสี Alizarin red ซึ่งจะย้อมติดแคลเซียมที่สะสมในเซลล์ และที่ extracellular matrix ได้ ผลการทดลองพบว่า เหล็กทั้งสองรูปแบบ สามารถลดการสะสมแคลเซียมของเซลล์ออสติโอเบลาสต์

ได้อย่างชัดเจน โดยเหล็กเฟอร์ริกมีผลในการยับยั้งการสะสมแคลเซียมของออสติโอเบลาสต์ได้มากกว่าเหล็กฟอร์รัส ดังแสดงในตารางที่ 3.1 และภาพที่ 3.17

ตารางที่ 3.1 แสดงผลของเหล็กต่อการสะสมของแคลเวียม โดยออสติโอเบลาสต์ ด้วยการย้อมสี Alizarin red (สีแดง)

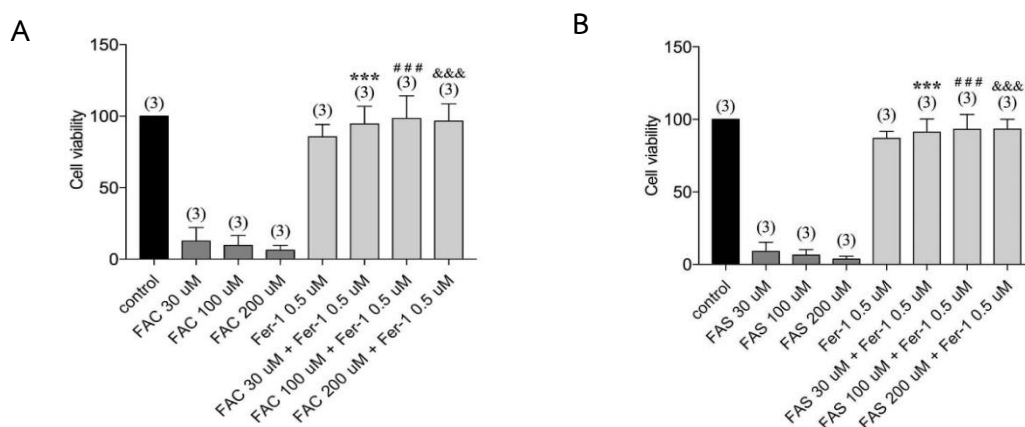
Alizarin staining	FAC conc. (μM)	Alizarin staining	FAS conc. (μM)
	0		0
	50		50
	100		100
	200		200
	250		250
	300		300



ภาพที่ 3.17 ผลของเหล็กในรูปแบบเฟอร์ริก (A) และเฟอร์รัส (B) ต่อความสามารถในการสะสมแคลเซียมของเซลล์ออสติโอเบลาสต์ ผลการทดลองพบว่าเหล็กทั้งสองรูปแบบสามารถยับยั้งการสะสมแคลเซียมโดยออสติโอเบลาสต์ โดยเหล็กแบบเฟอร์ริกมีผลต่อการยับยั้งการสะสมของแคลเซียมของเซลล์ออสติโอเบลาสต์มากกว่าเหล็กเฟอร์รัส (** P < 0.01, *** P < 0.001 as compared to control group (0 μM))

11. การศึกษาผลของสารยับยั้งการตายแบบ Ferroptosis ต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์ออสติโอเบลาสต์ ภายใต้ภาวะเหล็กเกิน

Ferroptosis เป็นกระบวนการตายของเซลล์ที่มีเหล็กเป็นองค์ประกอบสำคัญ เพื่อทำการทดสอบว่ากระบวนการดังกล่าวเกิดขึ้นในเซลล์ออสติโอเบลาสต์ที่ได้รับเหล็กหรือไม่ เซลล์ออสติโอเบลาสต์ ยูเอ็มอาร์ 106 ได้รับเหล็กพร้อมด้วย สารยับยั้งกระบวนการตายแบบ Ferroptosis ได้แก่สาร Ferrostatin-1 ผลการศึกษาพบว่าเซลล์ออสติโอเบลาสต์มีการตายลดลงอย่างชัดเจน และมีนัยสำคัญทางสถิติ ทั้งในกลุ่มที่ได้รับ FAC และ FAS (ภาพที่ 3.18) ทำให้เชื่อได้ว่า เซลล์ออสติโอเบลาสต์ที่ได้รับเหล็ก มีการตายผ่านกระบวนการ Ferroptosis และ สารยับยั้งการตายแบบ Ferroptosis ได้แก่ Ferrostatin-1 นี้สามารถใช้ในการป้องกันการตายของออสติโอเบลาสต์ภายใต้ภาวะเหล็กเกินได้

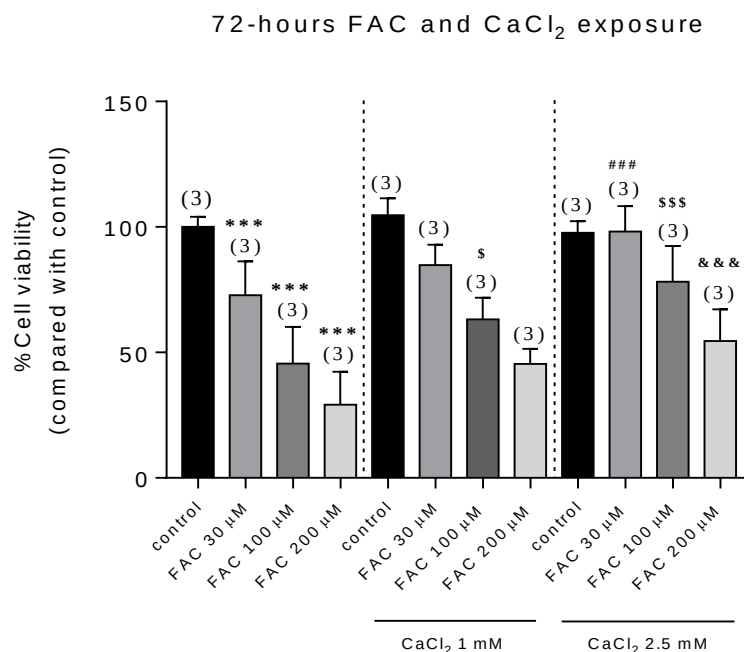


ภาพที่ 3.18 สารยับยั้งการตายแบบ Ferroptosis (Ferrostatin-1) สามารถยับยั้งการตายของเซลล์ออสติโอเบลาสต์ภายใต้เหล็กทั้งรูปแบบได้แก่ เหล็กเฟอร์ริก (A) และเหล็กเฟอร์รัส (B) (***) P < 0.001 compared to the treatment at 30 μM, ### P < 0.001 compared to the treatment at 100 μM, &&& P < 0.001 compared to the treatment at 200 μM)

12. การศึกษาผลของแคลเซียมต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์ออสติโอเบลาสต์ ภายใต้ภาวะเหล็กเกิน

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าการขนส่งของแคลเซียมและเหล็กมีความสัมพันธ์เชิงผกผันกันในเซลล์ลำไส้เล็ก กล่าวคือ การขนส่งทั้งสองระบบนี้อาจมีการใช้องค์ประกอบบางอย่างภายในเซลล์ที่ใช้ร่วมกัน นำไปสู่การแข่งขันกันของระบบขนส่ง แคลเซียมและเหล็ก ในเซลล์ลำไส้เล็ก อีกทั้งจากผลการทดลองที่ได้รายงานก่อนหน้านี้ในการศึกษาคั้งนี้ พบว่าเหล็กทั้งรูปแบบ เฟอร์ริกและเฟอร์รัส ทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของเหล็กภายในเซลล์ออสติโอเบลาสต์ซึ่งสอดคล้องกับการตายของเซลล์ออสติโอเบลาสต์ที่เพิ่มขึ้นเมื่อได้รับเหล็กที่มีความเข้มข้นสูงขึ้น แสดงถึงการขนส่งเหล็กจากภายนอกเซลล์เข้าสู่เซลล์ออสติโอเบลาสต์ อีกทั้งพบว่าเซลล์ออสติโอเบลาสต์ มีการแสดงออกของตัวขนส่งในระบบการขนส่งเหล็กเช่นเดียวกับเซลล์ลำไส้เล็ก ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อ ทำการศึกษาผลของแคลเซียมต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์ เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ของการเกิด ความสัมพันธ์เชิงผกผันของการขนส่งเหล็กและแคลเซียมในเซลล์ออสติโอเบลาสต์

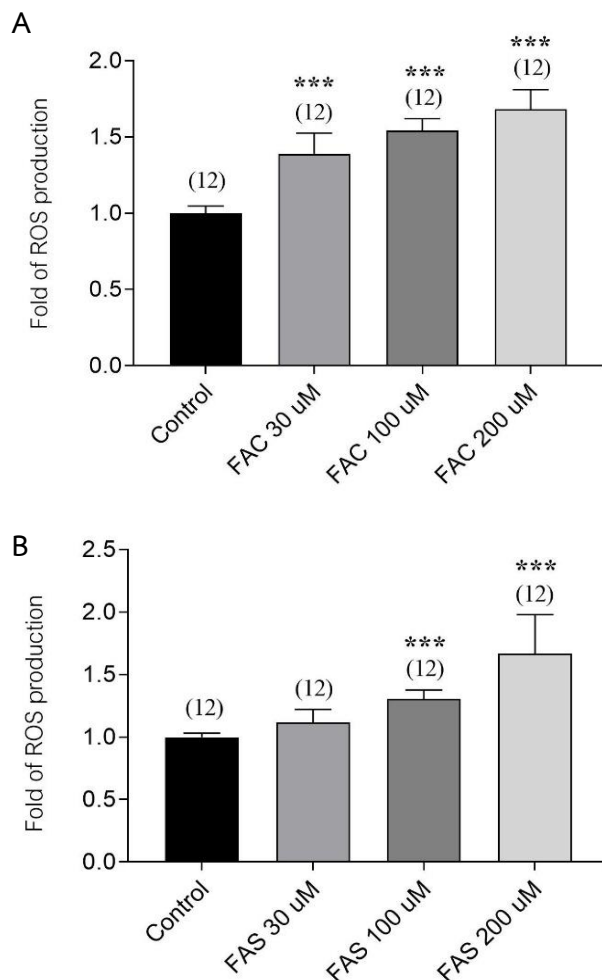
ผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นว่า เมื่อเซลล์ออสติโอเบลาสต์ได้รับเหล็กชนิดเฟอร์ริกจะทำให้เกิดการตายของเซลล์ ออสติโอเบลาสต์เพิ่มตามความเข้มข้นของเหล็กที่เพิ่มขึ้น แต่เมื่อเซลล์ได้รับเหล็กพร้อมกับแคลเซียมคลอไรด์ จะพบว่ากลุ่มของ เซลล์ออสติโอเบลาสต์ที่ได้รับทั้งเหล็กและแคลเซียมคู่กันมีการรอดชีวิตของเซลล์ออสติโอเบลาสต์สูงกว่าเซลล์ที่ได้รับเหล็กเพียง อย่างเดียว และเมื่อได้รับแคลเซียมในความเข้มข้นที่สูงขึ้น (2.5 mM) เซลล์จะมีการรอดชีวิตที่สูงขึ้นกว่าเซลล์ที่ได้รับแคลเซียมที่ ความเข้มข้นที่ต่ำกว่า (1 mM) เมื่อทั้งสองกลุ่มได้รับความเข้มข้นของเหล็กที่เท่ากัน (ภาพที่ 3.19) ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็น ว่าแคลเซียมมีผลให้เกิดการป้องกันการตายของเซลล์ออสติโอเบลาสต์ภายใต้ภาวะเหล็กเกิน ซึ่งเป็นการสอดคล้องกับข้อมูลที่พบ ในเซลล์ลำไส้เล็กกว่า การขนส่งเหล็กและแคลเซียมของเซลล์ออสติโอเบลาสต์ก็อาจจะมีความสัมพันธ์ผกผันกันเช่นกัน ซึ่งการ ทดลองเพิ่มเติมเพื่อศึกษาผลของแคลเซียมต่อการขนส่งเหล็กเข้าสู่เซลล์ออสติโอเบลาสต์จะอยู่ในแผนการดำเนินการในระยะต่อไป



ภาพที่ 3.19 แสดงผลของแคลเซียมต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์ออสติโอเบลาสต์ภายใต้ภาวะเหล็กเกิน (***) $P \leq 0.001$ compared with control, ^{###} $P \leq 0.001$ compared with FAC 30 μM , ^s $P \leq 0.05$ & ^{\$\$\$} $P \leq 0.001$ compared to FAC 100 μM , ^{&&&} $P \leq 0.001$ compared with FAC 200 μM)

13 การศึกษาความเกี่ยวข้องของ Reactive oxygen species (ROS) ต่อการตายของเซลล์ออสติโอเบลาสต์ ภายใต้ภาวะ เหล็กเกิน

จากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่า ภาวะเหล็กเกินสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการผลิต ROS ในเซลล์หลายชนิด นำไปสู่การตายของเซลล์ ทั้งแบบอะพอพโทซิส และแบบอื่น ๆ ดังนั้นการศึกษานี้ จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง ROS ภายในเซลล์ออสติโอเบลาสต์ที่ได้รับเหล็กทั้งสองรูปแบบ ผลการศึกษาพบว่าเมื่อได้รับเหล็กทั้งสองรูปแบบ เซลล์ออสติโอเบลาสต์มีการสร้าง ROS เพิ่มขึ้น ตามความเข้มข้นของเหล็กที่เซลล์ได้รับ เพอร์ริกทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของ ROS อย่างมีนัยสำคัญในเซลล์ออสติโอเบลาสต์ที่ได้รับเหล็กเพอร์ริกที่ความเข้มข้น 30, 100 และ 200 μM ในขณะที่เหล็กเฟอร์รัสทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของ ROS ภายในเซลล์ออสติโอเบลาสต์อย่างมีนัยสำคัญที่ความเข้มข้น 100 และ 200 μM (ภาพที่ 3.20)

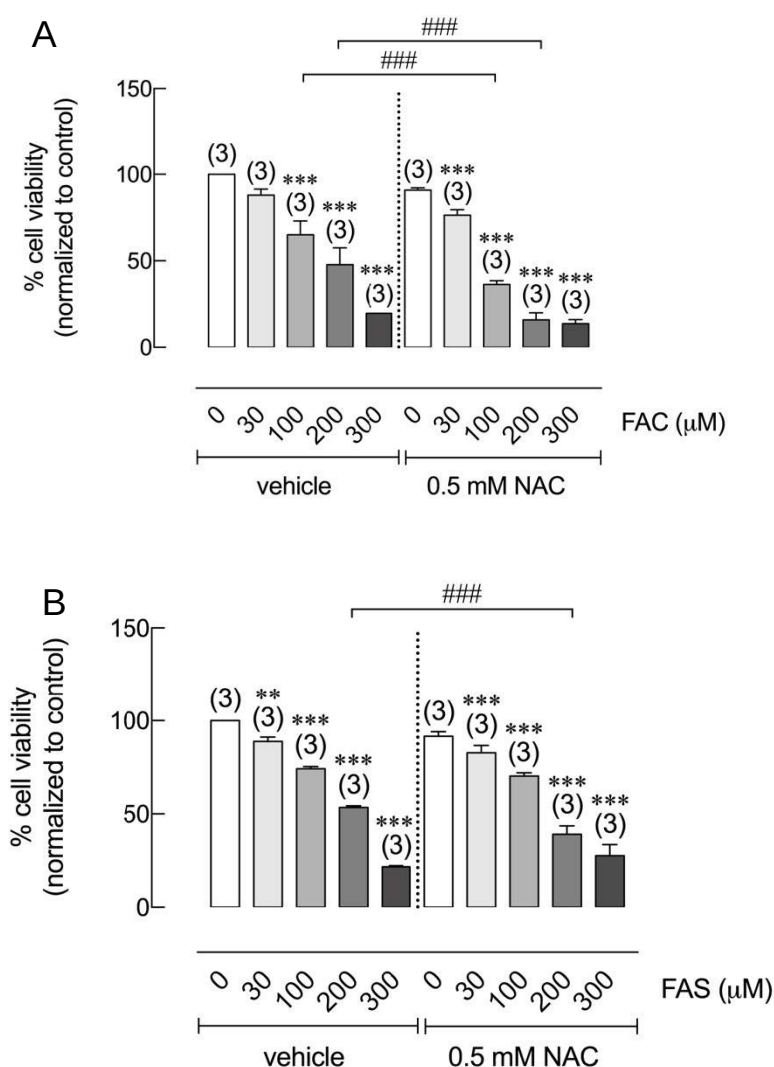


ภาพที่ 3.20 แสดงผลของเหล็กในรูปแบบเพอร์ริก (A) และเฟอร์รัส (B) ต่อการผลิต ROS ภายในเซลล์ออสติโอเบลาสต์ (*** $P \leq 0.001$ compared to control)

14. การศึกษาผลของสารต้านอนุมูลอิสระ (N-acetyl cysteine; NAC) ต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์ออสติโอเบลาสต์ ภายใต้ภาวะเหล็กเกิน

การได้รับเหล็กในรูปแบบเฟอร์ริก และ เฟอร์รัส ส่งผลให้ระดับของ Reactive oxygen species เพิ่มขึ้น ดังที่ได้รายงานไว้ก่อนหน้านี้แล้ว ดังนั้นการทดสอบสารต้านอนุมูลอิสระ (N-acetyl cysteine; NAC) ต่อการตายของเซลล์ออสติโอเบลาสต์ภายใต้ภาวะเหล็กเกิน จึงอาจเป็นแนวทางในการลดผลกระทบของเหล็กเกินในเซลล์ออสติโอเบลาสต์ได้

เซลล์ออสติโอเบลาสต์ ได้แก่ เซลล์ยูเอ็มอาร์ 106 ได้รับเหล็กเฟอร์ริก (FAC) และเหล็กเฟอร์รัส (FAS) ที่ความเข้มข้น 0, 30, 100, 200 หรือ 300 ไมโครโมลาร์ เพียงอย่างเดียว หรือได้รับร่วมกับ NAC เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าเหล็กทั้งรูปแบบเฟอร์ริกและเฟอร์รัส ทำให้เกิดการตายของเซลล์ออสติโอเบลาสต์ ยูเอ็มอาร์ 106 (ภาพที่ 3.21A และ 3.21B) แต่การให้สารต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ NAC ไม่สามารถลดการตายของเซลล์ออสติโอเบลาสต์ ยูเอ็มอาร์ 106 ได้ (ภาพที่ 3.21A และ 3.21B)

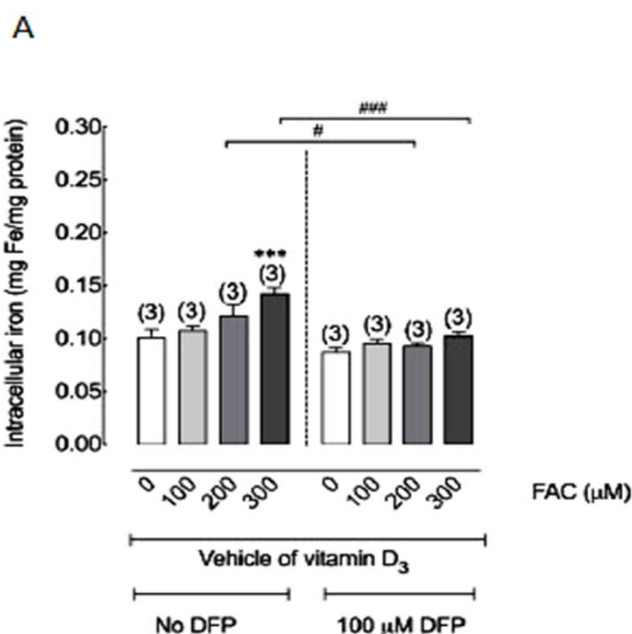


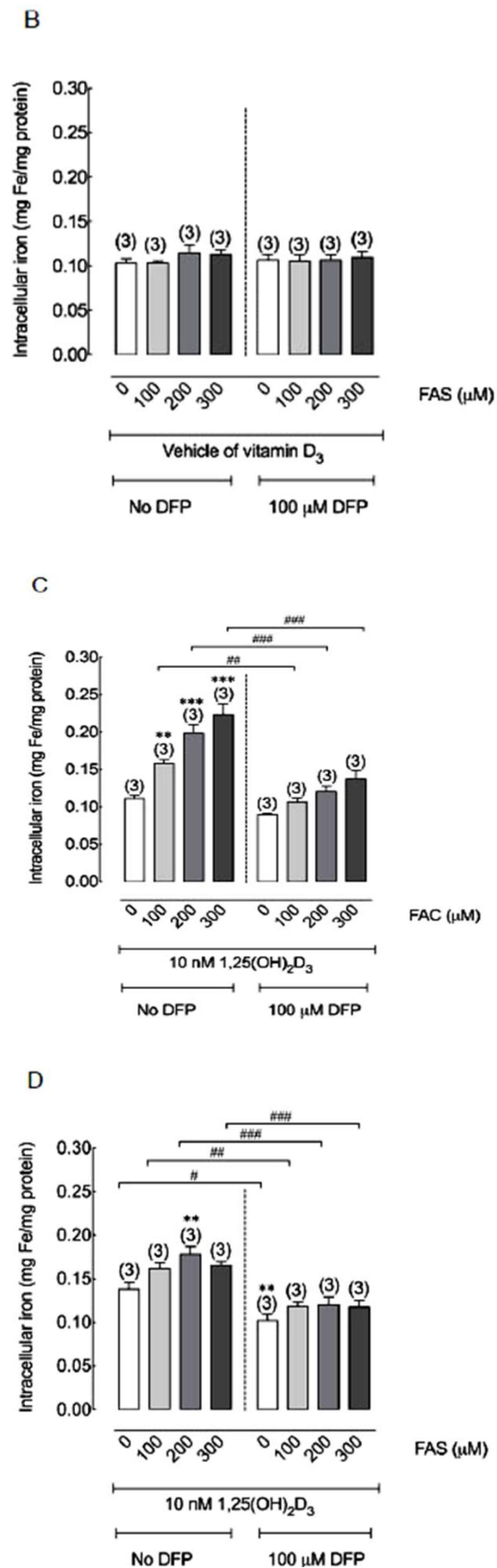
ภาพที่ 3.21 ผลของเหล็กในรูปแบบเฟอร์ริก (A) และเฟอร์รัส (B) ต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์ออสติโอเบลาสต์ ภายใต้ภาวะเหล็กเกิน เมื่อได้รับร่วมกับสารต้านอนุมูลอิสระ (N-acetyl cysteine; NAC) เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าเหล็กทั้งสองชนิดลดการมีชีวิตรอดของเซลล์ออสติโอเบลาสต์ และ NAC ไม่สามารถลดผลของเหล็กลงได้ (** P < 0.01, *** P < 0.001 as compared to control group (0 μM))

15. การศึกษาผลของสารจับธาตุเหล็ก (iron chelator) ต่อระดับธาตุเหล็กภายในเซลล์ออสติโอเบลาสต์ และการมีชีวิตรอดของเซลล์ออสติโอเบลาสต์ ภายใต้ภาวะเหล็กเกิน

จากผลที่รายงานไปก่อนหน้านี้พบว่าระดับของเหล็กภายในเซลล์นั้นเพิ่มขึ้นเมื่อได้รับเหล็กในรูปแบบเฟอร์ริก และเฟอร์รัส ดังนั้นจึงสันนิษฐานได้ว่าระดับของเหล็กภายในเซลล์มีความสัมพันธ์กับการตายของเซลล์ออสติโอเบลาสต์ ดังนั้นการใช้ iron chelator ได้แก่ Deferiprone (DFP) ซึ่งเป็นสารที่ใช้ในผู้ป่วยที่มีภาวะเหล็กเกิน จึงอาจช่วยลดผลของเหล็กที่ทำให้เซลล์ออสติโอเบลาสต์ตายได้

เซลล์ออสติโอเบลาสต์ ได้แก่ เซลล์ยูเอ็มอาร์ 106 ได้รับ $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ เข้มข้น 10 นาโนโมลาร์ โดยใช้ 9:1 propylene glycol-ethanol เป็นตัวทำละลาย เป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยไม่มีเหล็ก หลังจากนั้นเซลล์ได้รับเหล็กในรูปแบบเฟอร์ริก หรือ ชนิดเฟอร์รัส ความเข้มข้น 0, 100, 200 หรือ 300 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ หรือ 9:1 propylene glycol-ethanol เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ระดับเหล็กภายในเซลล์ถูกวัดด้วย FAAS (PinAAcle 900T Atomic Absorption Spectrometer พบว่า ระดับของเหล็กภายในเซลล์ลดลงเมื่อได้รับ DFP เข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ (ภาพที่ 3.22) และเมื่อไม่มี $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ พบว่า FAC ที่ความเข้มข้น 300 ไมโครโมลาร์เท่านั้นที่สามารถเพิ่มระดับเหล็กภายในเซลล์ได้ ส่วนเหล็กในรูปแบบเฟอร์รัส ไม่มีผล (ภาพที่ 3.22A และ 3.22B) และพบว่า DFP ลดระดับเหล็กภายในเซลล์ที่ได้รับเหล็กในรูปแบบเฟอร์ริกที่ความเข้มข้น 300 ไมโครโมลาร์ได้ (ภาพที่ 3.22A) นอกจากนี้พบว่าเมื่อได้รับ $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ร่วมกับเหล็กในรูปแบบเฟอร์ริก หรือ เฟอร์รัส ระดับเหล็กภายในเซลล์มีปริมาณเพิ่มขึ้นในหลายความเข้มข้น และ DFP สามารถลดระดับเหล็กภายในเซลล์ลงมาได้ (ภาพที่ 3.22C และ 3.22D) แสดงให้เห็นว่า DFP สามารถลดผลการเพิ่มของเหล็กภายในเซลล์ที่ได้รับการกระตุ้นจาก $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ได้

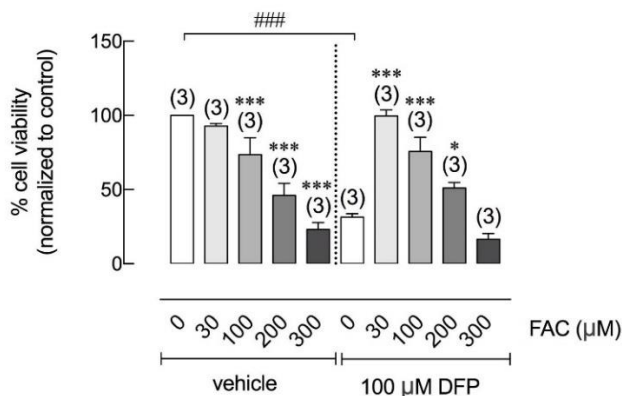




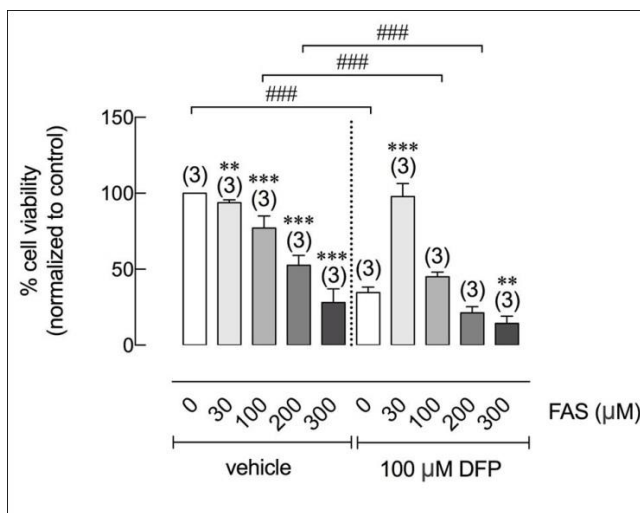
ภาพที่ 3.22 ระดับของเหล็กภายในเซลล์หลังจากได้รับเหล็กในสภาวะปกติ (A-B) หรือในสภาวะกระตุ้นด้วย 1,25(OH)₂D₃ (C-D) โดยได้ร่วมกับ deferiprone (DFP) โดยให้ทั้งเหล็กในรูปแบบเฟอร์ริก (A และ C) และเหล็กในรูปแบบเฟอร์รัส (B และ D).(** P < 0.01, *** P < 0.001 as compared to control group (0 μM))

ดังที่แสดงในการทดลองก่อนหน้านี้ว่า iron chelator ได้แก่ Deferiprone (DFP) สามารถลดระดับเหล็กภายในเซลล์ได้ (ภาพที่ 3.22) ดังนั้นผลของ DPF ต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์ออสติโอเบลาสต์จึงได้รับการศึกษา พบว่า DFP ไม่ส่งผลให้เซลล์ ออสติโอเบลาสต์มีชีวิตรอดได้ดีขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ในกลุ่มที่ได้รับเหล็กในรูปแบบเฟอร์ริก (ภาพที่ 3.23A) เป็นที่น่าตระหนักว่าเซลล์ออสติโอเบลาสต์ที่ได้รับ DFP เพียงอย่างเดียวนั้นส่งผลให้เซลล์มีชีวิตรอดลดลงอย่างมาก (ภาพที่ 3.23A และ 3.23B) ส่วนในกลุ่มที่ได้รับเหล็กในรูปแบบเฟอร์รัส พบว่าเมื่อได้ร่วมกับ DFP เซลล์ออสติโอเบลาสต์มีชีวิตรอดลดลง (ภาพที่ 3.23B)

A



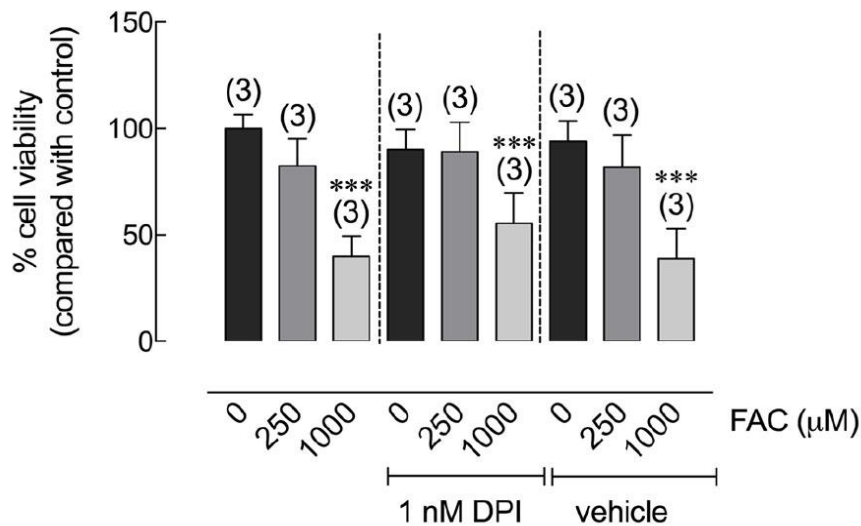
B



ภาพที่ 3.23 ผลของเหล็กในรูปแบบเฟอร์ริก (A) และเฟอร์รัส (B) ต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์ออสติโอเบลาสต์ เมื่อได้รับสาร iron chelator ได้แก่ Deferiprone (DFP). (** P < 0.01, *** P < 0.001 as compared to control group (0 μM))

16. เพื่อศึกษาผลของสารยับยั้งเอนไซม์ NADPH oxidases (NOXs) ต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์ออสติโอเบลาสต์ ภายใต้ภาวะเหล็กเกิน

การยับยั้งเอนไซม์ NADPH oxidases (NOXs) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ผลิตอนุมูลอิสระนั้น ถูกใช้ในการป้องกัน และลดความเสียหายต่อเซลล์ในการศึกษาต่าง ๆ diphenylene iodonium (DPI) ซึ่งเป็นตัวยับยั้ง NOXs หลายชนิด ถูกเลือกมาใช้ในการทดลองนี้ โดยเซลล์ออสติโอเบลาสต์ ชนิด ยูเอ็มอาร์-106 ได้รับเหล็กชนิดเฟอร์ริกความเข้มข้น 0, 250 หรือ 1000 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยได้รับเดี่ยว หรือร่วมกับ DPI พบว่าเหล็กชนิดเฟอร์ริกลดการมีชีวิตรอดของเซลล์ในทุกความเข้มข้น และพบว่า DPI นั้นไม่สามารถเพิ่มการมีชีวิตรอดของเซลล์ออสติโอเบลาสต์ได้อย่างมีนัยสำคัญ (ภาพที่ 3.24)

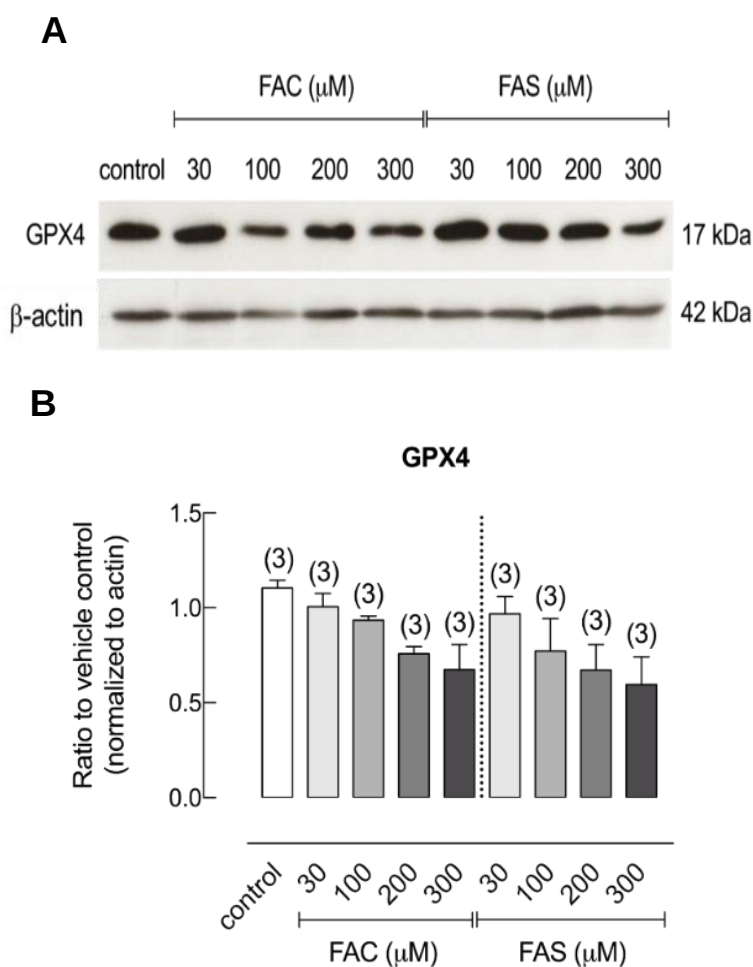


ภาพที่ 3.24 การมีชีวิตรอดของเซลล์ออสติโอเบลาสต์เมื่อได้รับเหล็กชนิดเฟอร์ริกพร้อมกับสารยับยั้งเอนไซม์ NADPH oxidases (NOXs) ได้แก่ diphenylene iodonium (DPI). ***P < 0.001 as compared to control group (0 μM) without DPI

17. การศึกษาผลของธาตุเหล็กในรูปแบบเฟอร์ริกและเฟอร์ริกต่อการเปลี่ยนแปลงของระดับ Glutathione peroxidase 4 (GPX4)

Glutathione peroxidase 4 (GPX4) เป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญในการยับยั้งการตายแบบ Ferroptosis โดยลดการเกิดขึ้นของ lipid peroxides ภายในเซลล์ ดังนั้นการสูญเสียความสามารถในการทำงานหรือการลดระดับของเอนไซม์นี้จึงใช้เป็นตัวบ่งชี้การตายแบบ Ferroptosis ภายในเซลล์ เพื่อศึกษาและยืนยันการเกิดขึ้นของการตายแบบ Ferroptosis ในเซลล์ออสติโอเบลาสต์ภายใต้ภาวะเหล็กเกิน เซลล์ออสติโอเบลาสต์ ยูเอ็มอาร์ 106 ได้รับเหล็กเฟอร์ริก (FAC) และเหล็กเฟอร์รัส (FAS) ที่ความเข้มข้น 0, 30, 100, 200 หรือ 300 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นระดับของโปรตีน Glutathione peroxidase 4 (GPX4) จะถูกวัดโดยเทคนิค Western blot

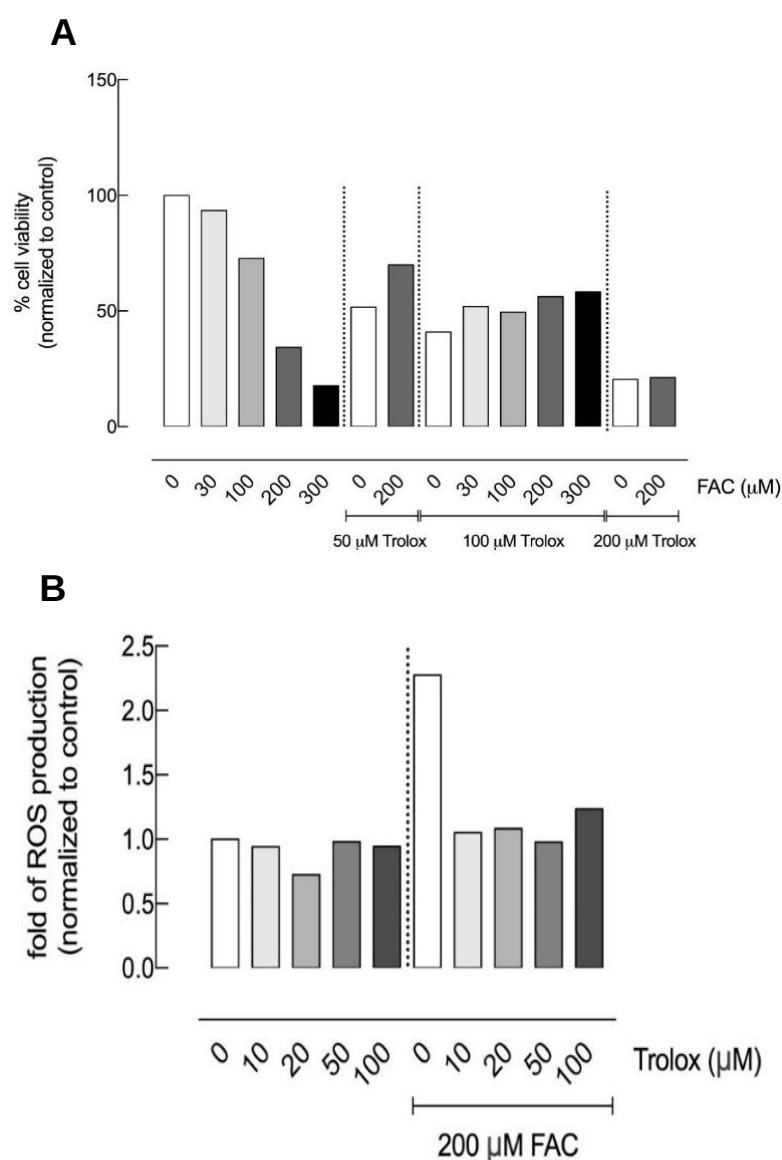
ผลการทดลองพบว่าเหล็กทั้งสองรูปแบบ มีแนวโน้มในการลดระดับโปรตีน Glutathione peroxidase 4 (GPX4) ภายในเซลล์ออสติโอเบลาสต์ ถึงแม้ว่าการลดลงของโปรตีนนี้จะไม่มีความสำคัญทางสถิติ โดยเหล็กเฟอร์รัสมีแนวโน้มในการลดระดับโปรตีน Glutathione peroxidase 4 (GPX4) ได้มากกว่าเหล็กเฟอร์ริก (ภาพที่ 3.25) จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเหล็กทั้งสองรูปแบบส่งผลให้เกิดการตายแบบ Ferroptosis ในเซลล์ออสติโอเบลาสต์



ภาพที่ 3.25 เหล็กเฟอร์ริก (FAC) และเหล็กเฟอร์รัส (FAS) มีแนวโน้มในการลดระดับโปรตีน Glutathione peroxidase 4 (GPX4) ภายในเซลล์ออสติโอเบลาสต์ ; representative blot (A), quantified data (B)

18. การศึกษาผลของสารต้านอนุมูลอิสระ Trolox (อนุพันธ์ของวิตามิน E) ต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์ออสติโอเบลาสต์และระดับ Reactive oxygen species ภายใต้ภาวะเหล็กเกิน

Trolox เป็นสารอนุพันธ์ของวิตามิน E โดยทั่วไปแล้ววิตามิน E มีบทบาทหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของกรดไขมันไม่อิ่มตัวภายในเซลล์ได้ ดังนั้นการศึกษานี้ จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาว่า Trolox จะสามารถช่วยให้ระดับการมีชีวิตรอดของเซลล์ออสติโอเบลาสต์เพิ่มขึ้นได้หรือไม่ ภายใต้ภาวะเหล็กเกิน ผลการศึกษาเบื้องต้นพบว่าเซลล์ออสติโอเบลาสต์ที่ได้รับเหล็กเฟอร์ริกร่วมกับ Trolox ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ สามารถเพิ่มระดับการมีชีวิตรอดของเซลล์ออสติโอเบลาสต์ในภาวะเหล็กเกินได้ดีที่สุด นอกจากนั้นผลการศึกษาเบื้องต้นยังแสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของ Trolox ที่มากเกินไปนั้นเป็นพิษต่อเซลล์ออสติโอเบลาสต์ (ภาพที่ 3.26 A) ดังนั้นในการวัดระดับ ROS ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ออสติโอเบลาสต์ที่ได้รับเหล็กเฟอร์ริก จึงได้ลดระดับความเข้มข้นของ Trolox ลงอีก (10, 20 ไมโครโมลาร์) เพื่อลดความเป็นพิษที่มีต่อเซลล์ ผลการทดลองเบื้องต้นพบว่า Trolox ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ สามารถลดระดับ ROS ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ได้อย่างดีภายใต้ภาวะเหล็กเกิน (ภาพที่ 3.26 B)



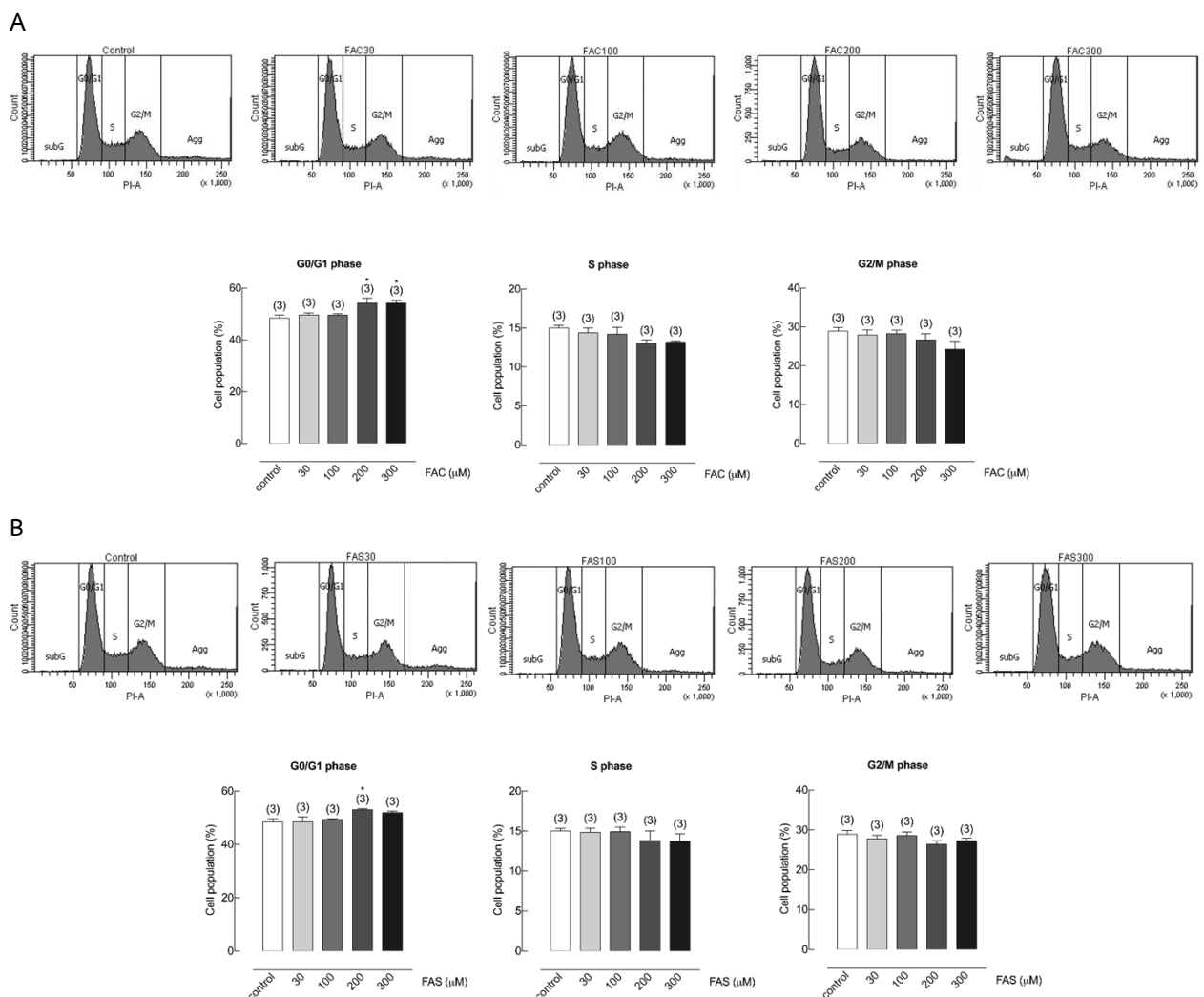
ภาพที่ 3.26 Trolox สามารถลดการตายของเซลล์ออสติโอเบลาสต์ (A) และระดับ ROS (B) ภายในเซลล์ได้ ภายใต้ภาวะเหล็กเกิน (Preliminary results)

19. การศึกษาผลของธาตุเหล็กในรูปแบบเฟอร์ริคและเฟอร์ริกต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ตามวัฏจักร

ปกติเซลล์มีการเจริญเติบโตและแบ่งตัวตามวัฏจักรของเซลล์ ในระยะอินเตอร์เฟส เป็นระยะเตรียมตัวก่อนการแบ่งเซลล์ แบ่งออกเป็น 3 ระยะย่อย ได้แก่ 1) ระยะ G₀/G₁ เป็นระยะที่สร้างสารที่จำเป็นต่อการสร้าง DNA ในระยะต่อไป 2) ระยะ S เป็นระยะที่มีการสังเคราะห์ DNA อีก 1 เท่าตัว 3) ระยะ G₂ เป็นระยะหลังจากการสร้าง DNA และพร้อมที่จะแบ่งโครโมโซมและไซโทพลาสซึมต่อไปในระยะ M จะเห็นได้ว่าทุกระยะมีความสำคัญอย่างมาก หากมีความผิดปกติเกิดขึ้นในระยะต่างๆ ทำให้วัฏจักรของเซลล์หยุด ย่อมส่งผลต่อการเจริญเติบโตและแบ่งตัวของเซลล์

ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้ ต้องการศึกษว่าเหล็กเฟอร์ริกและเฟอร์ริคสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ตามวัฏจักรหรือไม่ เซลล์ออสติโอเบลาสต์ ยูเอ็มอาร์ 106 ได้รับเหล็กเฟอร์ริก (FAC) และเหล็กเฟอร์ริค (FAS) ที่ความเข้มข้น 0, 30, 100, 200 หรือ 300 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นการศึกษาวัฏจักรของเซลล์ในครั้งนี้ใช้เทคนิค Flow cytometry โดยใช้สีย้อม Propidium iodide (PI) ในการย้อมติดสี DNA

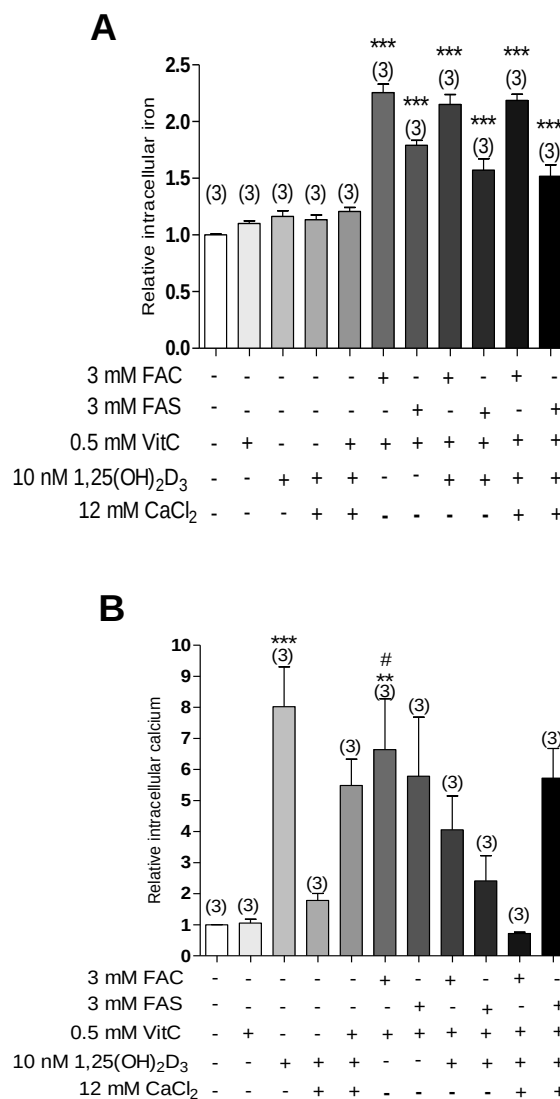
ผลการทดลองพบว่าเซลล์ออสติโอเบลาสต์ที่ได้รับเหล็กเฟอร์ริกและเฟอร์ริค มีการเพิ่มขึ้นของร้อยละของจำนวนเซลล์ในระยะ G₀/G₁ อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับเหล็ก ในขณะที่ในระยะ S และระยะ G₂/M ไม่มีการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้น (ภาพที่ 3.27) ดังนั้นผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าเหล็กเฟอร์ริกและเฟอร์ริคทำให้เกิดการหยุดของวัฏจักรเซลล์ที่ระยะ G₀/G₁ ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ออสติโอเบลาสต์



ภาพที่ 3.27 เหล็กเฟอร์ริก (A) และเหล็กเฟอร์รัส (B) หยุดการเจริญเติบโตของเซลล์ออสติโอเบลาสต์ที่ระยะ G0/G1 (* P < 0.05 compared to control group (0 μ M))

20. การศึกษาผลของเหล็ก แคลเซียม วิตามินซี และวิตามินดีต่อความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเหล็กและแคลเซียมภายในเซลล์ลำไส้ของมนุษย์

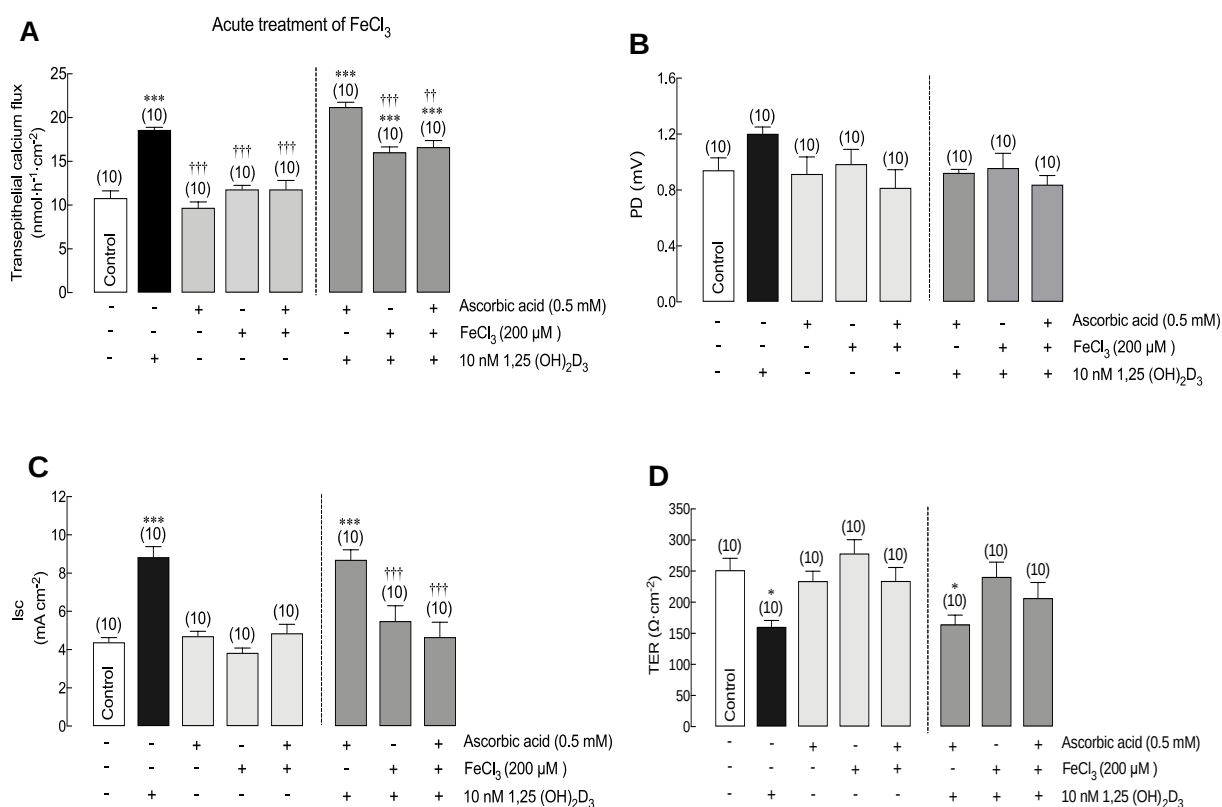
การทดลองนี้เซลล์ลำไส้ของมนุษย์ที่เจริญเต็มโตเต็มที่จะถูกเลี้ยงในอาหารที่มีสภาวะแตกต่างกัน ประกอบด้วยสารดังต่อไปนี้คือ วิตามินซี วิตามินดี แคลเซียมและเหล็ก เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของปริมาณเหล็กและแคลเซียมภายในเซลล์ลำไส้มนุษย์ ตัวอย่างจากทุกกลุ่มสภาวะจะถูกนำไปวัดปริมาณเหล็กและแคลเซียมในเวลาเดียวกัน ผลการศึกษาพบว่าทุกสภาวะที่มีเหล็กและวิตามินซีในอาหารสามารถเพิ่มระดับของเหล็กภายในเซลล์ได้ ในขณะที่ปริมาณแคลเซียมภายในเซลล์จะถูกเพิ่มอย่างมากจากการให้วิตามินดี และผลของวิตามินดีต่อการเพิ่มปริมาณแคลเซียมภายในเซลล์นี้จะลดลงเมื่อมีการใส่สารชนิดอื่นลงในอาหารด้วย นอกจากนี้ผลการศึกษาพบความสัมพันธ์แบบผกผันระหว่างเหล็กและแคลเซียมภายในเซลล์ลำไส้มนุษย์ ภายใต้สภาวะที่มี FAC ร่วมกับวิตามินซี วิตามินดีและแคลเซียมจะมีปริมาณเหล็กมากแต่มีปริมาณแคลเซียมที่น้อยกว่าสภาวะควบคุม (ภาพที่ 3.28)



ภาพที่ 3.28 แสดงความสัมพันธ์แบบผกผันระหว่างปริมาณแคลเซียมและเหล็กภายในเซลล์ลำไส้ของมนุษย์ (*** P ≤ 0.001 compared with control) ภาพแสดงปริมาณของ intracellular iron (A) และ intracellular calcium (B)

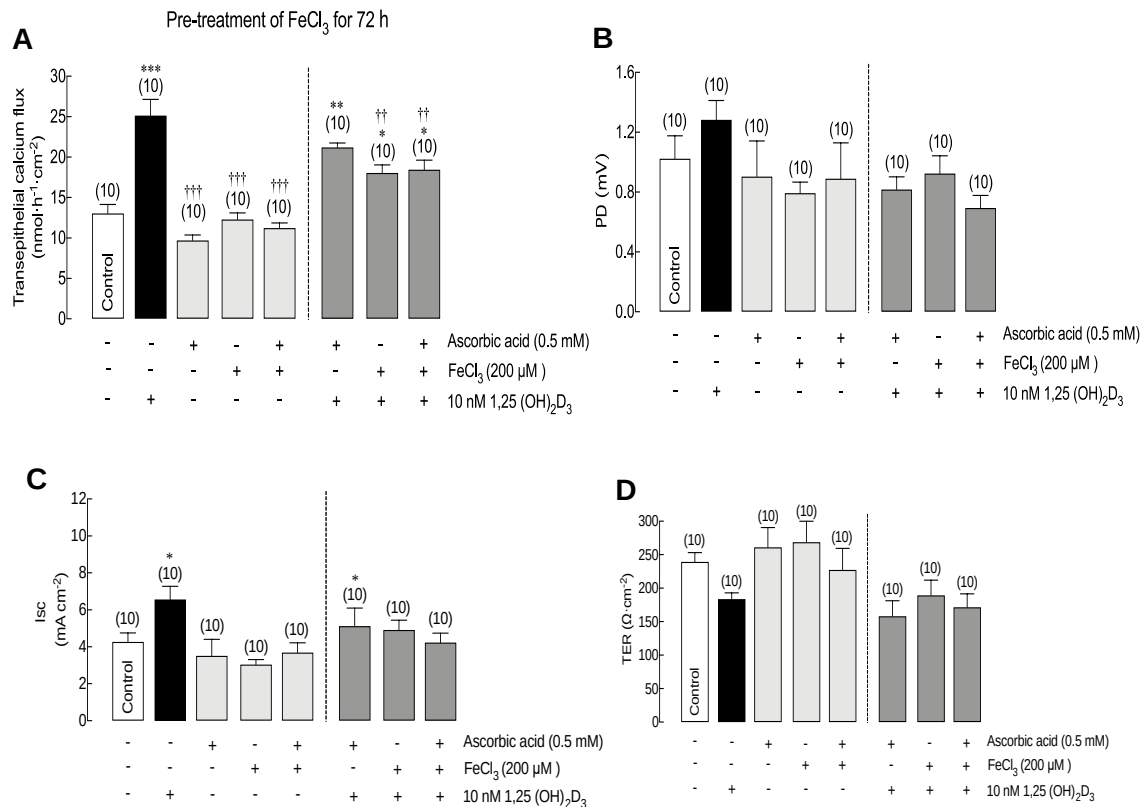
21. การศึกษาผลของกรดแอสคอร์บิกและธาตุเหล็กต่อการขนส่งแคลเซียมผ่านเซลล์

กรดแอสคอร์บิก หรือ วิตามินซีมีบทบาทหน้าที่ที่สำคัญหลายอย่าง เช่น เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และช่วยในการทำงานของเอนไซม์ต่าง ๆ ในร่างกาย งานวิจัยต่าง ๆ เปิดเผยว่ากรดแอสคอร์บิกมีส่วนช่วยในการเพิ่มการดูดซึมแคลเซียมผ่านลำไส้เล็กแต่กลไกการเพิ่มการดูดซึมแคลเซียมนั้นยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด นอกจากนี้กรดแอสคอร์บิกยังมีฤทธิ์ช่วยเพิ่มการดูดซึมธาตุเหล็กผ่านลำไส้เล็ก แต่มีรายงานว่า การดูดซึมธาตุเหล็กที่มากเกินไปจะมีผลยับยั้งการดูดซึมแคลเซียมที่ลำไส้เล็กอีกด้วย กล่าวคือการขนส่งแคลเซียมและเหล็กอาจมีการใช้องค์ประกอบบางอย่างภายในเซลล์ร่วมกัน นำไปสู่การแข่งขันและการยับยั้งการดูดซึม ดังนั้นการศึกษานี้ จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของกรดแอสคอร์บิกและธาตุเหล็กต่อการขนส่งแคลเซียมข้ามแผ่นเยื่อคาโคทูโดยใช้เทคนิค Ussing chamber ผลการศึกษาพบว่ากรดแอสคอร์บิกและธาตุเหล็กไม่มีผลโดยตรงต่อการขนส่งแคลเซียมผ่านเยื่อคาโคทู นอกจากนั้นผลของการให้ธาตุเหล็กแบบ acute ร่วมกับกรดแอสคอร์บิกก็ไม่มีผลรบกวนการดูดซึมแคลเซียมผ่านทางเยื่อคาโคทูอีกด้วย ในทางตรงกันข้ามการให้ธาตุเหล็กภายใต้สภาวะที่มีวิตามินดีช่วยกระตุ้นการดูดซึมแคลเซียมส่งผลให้การดูดซึมแคลเซียมลดน้อยลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มที่มีวิตามินดีกระตุ้นเพียงอย่างเดียว แต่กรดแอสคอร์บิกไม่มีผลยับยั้งการดูดซึมแคลเซียมเช่นเดียวกับธาตุเหล็ก การศึกษาด้วยเทคนิค Ussing chamber ยังสามารถแสดงให้เห็นถึงค่าความต่างศักย์ (PD) กระแส (Isc) และความต้านทาน (TER) ของเยื่อคาโคทูซึ่งแสดงถึงคุณสมบัติในการยอมให้สารเคลื่อนที่ผ่านของเนื้อเยื่อ จากผลการศึกษาพบว่าเมื่อเติมธาตุเหล็กภายใต้สภาวะที่มีวิตามินดีส่งผลให้ Isc ลดลงในขณะที่ TER เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มที่มีวิตามินดีเพียงอย่างเดียว อย่างไรก็ตามค่า PD ในกลุ่มของธาตุเหล็กไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มวิตามินดี ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าธาตุเหล็กส่งผลให้เยื่อคาโคทูยอมให้สารเคลื่อนที่ผ่านได้น้อยลงเนื่องจากมีค่ากระแสที่น้อยลงในขณะที่ความต้านทานเพิ่มมากขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มวิตามินดีส่งผลให้การดูดซึมแคลเซียมลดน้อยลงในกลุ่มที่เติมธาตุเหล็กอีกด้วย (ภาพที่ 3.29)



ภาพที่ 3.29 แสดงผลของกรดแอสคอร์บิกและธาตุเหล็กแบบ acute ต่อในสภาวะต่างๆ ต่อการดูดซึมแคลเซียมผ่านเยื่อคาโคทู (A), ค่าความต่างศักย์ไฟฟ้า (B), ค่ากระแสไฟฟ้า (C), และ ค่าความต้านทาน (D) ของเยื่อคาโคทู (*** $P \leq 0.001$; * $P \leq 0.05$ เทียบกับกลุ่มควบคุม และ ††† $P < 0.001$; †† $P < 0.01$ เทียบกับวิตามินดี)

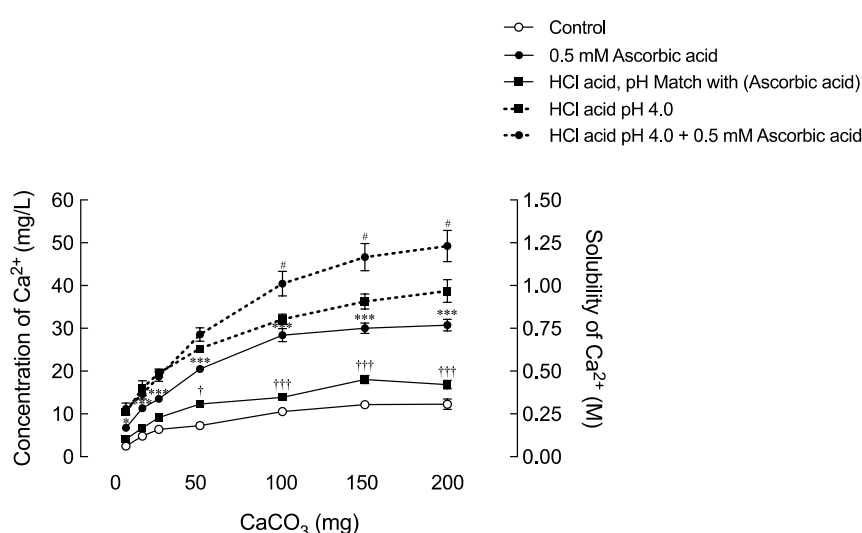
นอกจากนี้ยังได้ทำการทดลองศึกษาผลของกรดแอสคอร์บิกและธาตุเหล็กเมื่อให้ธาตุเหล็กในเวลานานขึ้น 72 ชั่วโมง (chronic effect) ผลการศึกษาพบว่า กรดแอสคอร์บิกและธาตุเหล็กไม่มีผลโดยตรงต่อการขนส่งแคลเซียมผ่านเยื่อคาโคทูเช่นเดียวกัน และการให้ธาตุเหล็กแบบ chronic ร่วมกับกรดแอสคอร์บิกก็ไม่มีผลรบกวนการดูดซึมแคลเซียมผ่านทางเยื่อคาโคทูอีกด้วย แต่การให้ธาตุเหล็กแบบ chronic ก็ยังมีผลยับยั้งการดูดซึมแคลเซียมภายใต้สภาวะที่มีวิตามินดีกระตุ้น รวมถึงค่า Isc ลดลง และ TER เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มวิตามินดี เช่นเดียวกับการทดลองก่อนหน้านี้ด้วย แสดงให้เห็นว่าธาตุเหล็กสามารถยับยั้งการดูดซึมแคลเซียมได้ภายใต้สภาวะที่มีตัวกระตุ้นเท่านั้นแต่จะไม่ยับยั้งภายใต้สภาวะการดูดซึมแคลเซียมปกติ ในขณะที่กรดแอสคอร์บิกไม่ส่งผลรบกวนการดูดซึมแคลเซียมทั้งในสภาวะที่มีวิตามินดีกระตุ้นและมีธาตุเหล็กอีกด้วย (ภาพที่ 3.30)



ภาพที่ 3.30 แสดงผลของกรดแอสคอร์บิกและธาตุเหล็กแบบ chronic ต่อในสภาวะต่างๆ ต่อการดูดซึมแคลเซียมผ่านเยื่อคาโคทู (A), ค่าความต่างศักย์ไฟฟ้า (B), ค่ากระแสไฟฟ้า (C), และ ค่าความต้านทาน (D) ของเยื่อคาโคทู (*** $P \leq 0.001$; ** $P \leq 0.01$; * $P \leq 0.05$ เทียบกับกลุ่มควบคุม และ ††† $P < 0.001$; †† $P < 0.01$ เทียบกับวิตามินดี)

22. การศึกษาผลของกรดแอสคอร์บิกต่อการละลายของแคลเซียมคาบอเนต

จากงานวิจัยที่แสดงให้เห็นถึงผลของกรดแอสคอร์บิกที่สามารถเพิ่มการดูดซึมแคลเซียมได้นั้นอาจจะเป็นผลมาจากความสามารถของกรดแอสคอร์บิกในการเพิ่มการละลายของแคลเซียม ดังนั้นจึงทำการทดลองโดยใช้เทคนิค flame atomic absorption spectrophotometer เพื่อศึกษาการละลายของแคลเซียมคาบอเนตซึ่งเป็นแคลเซียมที่สามารถละลายได้ยากภายใต้สภาวะที่มีและไม่มีกรดแอสคอร์บิก ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่ากรดแอสคอร์บิกสามารถช่วยเพิ่มความสามารถในการละลายของแคลเซียมคาบอเนตอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่มีกรดแอสคอร์บิก นอกจากนี้ในกลุ่มที่มีค่า pH เท่ากันดังตาราง (pH match) พบว่ากลุ่มที่เติมกรดแอสคอร์บิกมีการละลายของแคลเซียมคาบอเนตเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ยิ่งไปกว่านั้นกรดแอสคอร์บิกยังสามารถช่วยเพิ่มการละลายของแคลเซียมคาบอเนตให้ดียิ่งขึ้นภายใต้สภาวะความเป็นกรดอีกด้วย จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า กรดแอสคอร์บิกสามารถช่วยเพิ่มความสามารถในการละลายของแคลเซียมและเพิ่มจำนวนแคลเซียมไอออนซึ่งเป็นรูปแบบที่สามารถดูดซึมได้ในลำไส้เล็ก ดังนั้นจึงอาจจะมีผลทำให้เพิ่มจำนวนแคลเซียมที่สามารถดูดซึมผ่านทางลำไส้เล็กและสามารถช่วยเพิ่มการดูดซึมแคลเซียมได้ (ภาพที่ 3.31 และ ตารางที่ 3.2)



ภาพที่ 3.31 แสดงผลของกรดแอสคอร์บิกต่อการละลายของแคลเซียมคาบอเนต (** $P \leq 0.001$; * $P \leq 0.05$ เทียบกับกลุ่มควบคุม และ $+++P < 0.001$; $++P < 0.01$ เทียบกับกรดแอสคอร์บิก)

ตารางที่ 3.2 แสดงค่า pH ของสารละลายในการศึกษาการละลายของแคลเซียมคาบอเนต

pH	5 mg/L	15 mg/L	25 mg/L	50 mg/L	100 mg/L	150 mg/L	200 mg/L
Control	6.672	6.711	6.957	7.787	7.382	7.716	8.417
Ascorbic acid	4.248	4.190	4.907	5.616	5.668	6.280	6.415
pH Match with ascorbic acid group	4.2	4.2	4.9	5.6	5.7	6.3	6.4
pH = 4.0 + Ascorbic acid	3.360	3.636	3.923	4.435	4.823	4.659	4.794

สรุปผลงานวิจัยที่ได้ดำเนินการมาแล้ว

1. เหล็กทั้งรูปแบบเฟอร์ริก และเฟอร์รัส ยับยั้งการมีชีวิตของเซลล์ออสติโอเบลาสต์ โดยเฟอร์ริกมีผลในการยับยั้งการมีชีวิตของเซลล์ออสติโอเบลาสต์มากกว่าเฟอร์รัสโดยมีค่าความเข้มข้นที่ทำให้ประชากรของเซลล์ลดลงครึ่งหนึ่ง (IC₅₀) ที่ 72 ชั่วโมงเท่ากับ 211.45 และ 229.76 ไมโครโมลาร์ สำหรับเหล็กเฟอร์ริก และ เฟอร์รัสตามลำดับ
2. เหล็กเฟอร์ริก และเฟอร์รัส มีผลทำให้เกิดการลดลงของการแบ่งเซลล์ออสติโอเบลาสต์ โดยเฟอร์ริกมีผลต่อการลดลงของความสามารถในการแบ่งตัวของออสติโอเบลาสต์มากกว่าเหล็กในรูปเฟอร์รัส
3. เหล็กทั้งสองรูปแบบทำให้เกิดการตายของเซลล์ออสติโอเบลาสต์ โดยเฟอร์ริกทำให้เกิดการตายของเซลล์ออสติโอเบลาสต์มากกว่าเหล็กเฟอร์รัส
4. ทั้งเหล็กเฟอร์ริกและเฟอร์รัสทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการตายของเซลล์แบบเอพอโทซิส โดยเฟอร์ริกมีผลให้เกิดการเพิ่มขึ้นของโปรตีนกลุ่มนี้มากกว่าเหล็กเฟอร์รัส ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองทั้งหมดที่ผ่านมา
5. เหล็กเฟอร์ริกและเฟอร์รัสล้วนทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของเหล็กภายในเซลล์ออสติโอเบลาสต์ แสดงถึงการนำเข้าสู่เซลล์ของออสติโอเบลาสต์ โดยเหล็กเฟอร์ริกก็มีผลต่อออสติโอเบลาสต์มากกว่าเหล็กเฟอร์รัส ทำให้เกิดการนำเข้าสู่เซลล์ออสติโอเบลาสต์มากกว่า
6. เหล็กทั้งสองรูปแบบทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการขนส่งเหล็ก โดยมีการลดลงของการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการนำเหล็กเข้าสู่เซลล์ และมีการเพิ่มการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการขนส่งเหล็กออกจากเซลล์
7. เหล็กทั้งสองรูปแบบมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาของออสติโอเบลาสต์และออสติโอคลาสต์ต่างกัน ซึ่งอาจจะนำไปสู่การอธิบายผลที่แตกต่างกันของเหล็กสองรูปแบบต่อออสติโอเบลาสต์
8. เหล็กทั้งรูปแบบเฟอร์ริก และเฟอร์รัส มีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีน Runx2, คอลลาเจน ชนิดที่ 1, เอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส และ โปรตีนออสติโอแคลซิน ที่แตกต่างกันตามระยะเวลาที่ได้รับเหล็ก
9. ทั้งเหล็กเฟอร์รัส และ เฟอร์ริก สามารถยับยั้งการสะสมแคลเซียมของ เซลล์ออสติโอเบลาสต์ได้
10. วิตามินดี ทำให้เกิดการนำเข้าสู่เซลล์ออสติโอเบลาสต์มากขึ้น บ่งชี้ได้จากการเพิ่มขึ้นของเหล็กภายในเซลล์ออสติโอเบลาสต์ที่ได้รับวิตามินดี
11. วิตามินดี มีผลทำให้การตายของเซลล์ออสติโอเบลาสต์ที่ได้รับเหล็กทั้งสองรูปแบบเพิ่มขึ้นเล็กน้อย ในระดับที่ไม่มีความสำคัญทางสถิติ
12. ยาขับเหล็ก มีผลทำให้การนำเข้าสู่เหล็กของเซลล์ออสติโอเบลาสต์ลดลง
13. สารยับยั้งการตายแบบ Ferroptosis ได้แก่สาร Ferrostatin-1 สามารถยับยั้งการตายของออสติโอเบลาสต์ในภาวะเหล็กเกินได้ บ่งชี้ว่าการตายของเซลล์ออสติโอเบลาสต์ในภาวะเหล็กเกินเกิดจากกระบวนการ Ferroptosis
14. เหล็กทั้งสองรูปแบบ มีแนวโน้มในการลดระดับโปรตีน Glutathione peroxidase 4 (GPX4) ภายในเซลล์ออสติโอเบลาสต์ เป็นตัวบ่งชี้และยืนยันการตายแบบ Ferroptosis ของเซลล์ออสติโอเบลาสต์ในภาวะเหล็กเกิน
15. แคลเซียมมีผลทำให้เซลล์ออสติโอเบลาสต์มีการตายน้อยลงภายใต้ภาวะเหล็กเกินจากทั้งสองรูปแบบ
16. เหล็กทั้งสองรูปแบบ ทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญของ Reactive oxygen species (ROS) ภายในเซลล์ออสติโอเบลาสต์

17. สารต้านอนุมูลอิสระ N-acetyl-L-cysteine (NAC) ไม่สามารถลดการตายและลดระดับ ROS ในออสติโอเบลาสต์ ได้ ภายใต้ภาวะเหล็กเกิน
18. สารยับยั้งปฏิกิริยารีดอกซ์ภายในเซลล์ Diphenyleneiodonium (DPI) ไม่สามารถลดการตายและลดระดับ ROS ในออสติโอเบลาสต์ ได้ ภายใต้ภาวะเหล็กเกิน
19. ยาขับธาตุเหล็ก Deferxamine (DFP) ไม่สามารถลดการตายของออสติโอเบลาสต์ ในภาวะเหล็กเกินได้
20. สารต้านอนุมูลอิสระ Trolox (อนุพันธ์ของวิตามิน E) สามารถลดการตายและลดระดับ ROS ในออสติโอเบลาสต์ ได้ ภายใต้ภาวะเหล็กเกิน (Preliminary results)
21. เหล็กทั้งสองรูปแบบหยุดวัฏจักรของเซลล์ในระยะ G0/G1 ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการเจริญเติบโตและแบ่งตัวของเซลล์ออสติโอเบลาสต์
22. วิตามินดี ไม่ส่งผลกระทบต่อ การขนส่งเหล็กในเซลล์ลำไ้เล็ก
23. วิตามินซี ไม่มีผลกระทบต่อ การขนส่งแคลเซียมในเซลล์ลำไ้เล็ก
24. ภาวะเหล็กเกินมีผลในการยับยั้งการขนส่งแคลเซียมในเซลล์ลำไ้เล็ก
25. การขนส่งขนส่งแคลเซียม และเหล็กในเซลล์ลำไ้เล็ก มีความสัมพันธ์เชิงผกผันซึ่งกันและกัน
26. วิตามินซี มีผลเพิ่มการละลายของแคลเซียมคาร์บอเนต ซึ่งอาจมีผลให้ ionized calcium เพิ่มขึ้นและอาจมีผลให้การดูดซึมแคลเซียมเพิ่มขึ้นในสิ่งมีชีวิตได้

- **โครงการย่อยที่ 4**

Effects of calcium and vitamin D supplementation on blood pressure and bone metabolisms in salt-induced hypertensive rats

ความสำคัญและปัญหาวิจัย

โรคความดันโลหิตสูงและโรคกระดูกพรุนเป็นโรคที่พบได้บ่อยและเป็นโรคที่มีความสำคัญทางสาธารณสุขในกลุ่มผู้สูงอายุทั่วโลก ทั้งนี้พบว่าทั้งโรคความดันโลหิตสูงและกระดูกพรุนมีปัจจัยโน้มนำและภาวะเสี่ยงต่าง ๆ ของการเกิดโรคร่วมกัน เช่น พบส่วนใหญ่ในผู้สูงอายุ หญิงช่วงหมดประจำเดือน การสูบบุหรี่ หรือการออกกำลังกาย จากการศึกษพบว่าในผู้ป่วยที่มีความดันโลหิตสูงจะพบว่ามีความเสี่ยงสูงที่พบการหักของกระดูก ซึ่งโรคความดันโลหิตสูงและโรคกระดูกพรุนอาจจะเกิดจากความผิดปกติของยีนเดียวกัน แต่อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานที่แน่ชัดถึงกลไกและความสัมพันธ์ของสาเหตุของการเกิดโรคความดันโลหิตสูงและโรคกระดูกพรุน โรคความดันโลหิตสูงหมายถึงภาวะความดันเลือดในจังหวะที่หัวใจบีบ และ/หรือความดันเลือดในจังหวะที่หัวใจคลายตัว มีค่ามากกว่าค่าความดันเลือดปกติอย่างต่อเนื่อง (มากกว่า 90/140 mmHg) ซึ่งความดันโลหิตสูงแบ่งออกเป็นความดันโลหิตสูงปฐมภูมิ (ไม่ทราบสาเหตุ) ซึ่งเป็นกลุ่มที่พบมากที่สุด (ร้อยละ 90-95) ผู้ป่วยกลุ่มนี้จะเริ่มเป็นโรคความดันโลหิตสูงเมื่ออายุได้ประมาณ 25-55 ปี (พบได้มากในผู้ที่มีอายุตั้งแต่ 40 ปีขึ้นไป) และยิ่งอายุมากขึ้นก็จะมีโอกาสเป็นได้มากขึ้น ปัจจุบันยังไม่ทราบถึงสาเหตุของการเกิดโรคความดันโลหิตสูงชนิดนี้ แต่มีรายงานถึงปัจจัยโน้มนำที่ทำให้เกิดความดันโลหิตสูง ได้แก่ การรับประทานอาหารเค็มจัดหรือมีเกลือโซเดียมสูง การมีอายุมาก ความอ้วน และกรรมพันธุ์ ส่วนความดันโลหิตสูงแบบทุติยภูมิพบว่ามักมีสาเหตุที่มาจาก โรคไตเรื้อรัง ท่อเลือดแดงหรือหลอดเลือดแดงตีบแคบ เป็นต้น

โรคกระดูกพรุนหมายถึงภาวะที่กระดูกสูญเสียเนื้อกระดูก และโครงสร้างของกระดูกผิดไป ทำให้กระดูกมีความเปราะบาง เกิดการหักได้ง่าย มีรายงานในผู้ป่วยโรคความดันโลหิตสูงพบมีรายงานของความผิดปกติของสมดุลแคลเซียมในร่างกาย มีการดูดซึมแคลเซียมที่ลำไส้ลดลง และมีการขับออกของแคลเซียมในปัสสาวะเพิ่มมากขึ้น ซึ่งมีโอกาสที่เป็นสาเหตุทำให้เกิดการทำงานของเพิ่มขึ้นของฮอร์โมนพาราไธรอยด์ในการดึงแคลเซียมจากกระดูกมาใช้มากขึ้นเพื่อรักษาสมดุลและทำให้เกิดภาวะการลดลงของมวลกระดูก จนกระดูกเปราะบางและหักง่ายตามมา อย่างไรก็ตามการอธิบายถึงกลไกและการศึกษาถึงความสัมพันธ์ของการลดลงของมวลกระดูกและการเปลี่ยนแปลงต่าง ๆ ในระดับเซลล์กระดูกในผู้ป่วยโรคความดันโลหิตสูง ยังไม่ชัดเจนและมีข้อจำกัดมาก การศึกษาในสัตว์ทดลองที่มีภาวะความดันโลหิตสูงชนิดปฐมภูมิ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการศึกษาในสัตว์ทดลองที่มีภาวะความดันโลหิตสูงโดยการเหนี่ยวนำด้วยการได้รับเกลือโซเดียมในอาหารปริมาณสูง (8% NaCl) ซึ่งพบเป็นปัจจัยเสี่ยงหลักของการเกิดโรคความดันโลหิตสูงในสังคมปัจจุบันเนื่องจากพฤติกรรมการกินอาหารที่มีปริมาณโซเดียมสูง จึงมีความสำคัญที่จะทำให้สามารถอธิบายและเข้าใจถึงกลไกและความสัมพันธ์ของการเกิดโรคความดันโลหิตสูงและโรคกระดูกพรุน อันที่จะนำไปสู่การป้องกันและรักษาโรคทั้งสองชนิดนี้ต่อไปในอนาคต

ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาถึงการเปลี่ยนแปลงของแคลเซียมเมตาบอลิซึม และการเปลี่ยนแปลงของมวลกระดูก โครงสร้างทางจุลภาคของกระดูก รวมทั้งการเปลี่ยนแปลงต่าง ๆ ในระดับเซลล์กระดูก ที่สัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของความดันโลหิตในหนูทดลองที่ได้รับอาหารโซเดียมในปริมาณสูง อีกทั้งยังสนใจที่ศึกษาผลของการได้รับแคลเซียมและวิตามินดีต่อป้องกันและรักษาภาวะความดันโลหิตสูงและการเกิดโรคกระดูกพรุนในหนูที่ได้รับอาหารโซเดียมในปริมาณสูงอีกด้วย

วัตถุประสงค์หลัก (ณ ช่วงเวลารายงาน 30 มิถุนายน 2560 ถึงวันที่ 29 มิถุนายน 2563)

1. เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเซลล์กระดูกภายหลังจากการได้รับฮอร์โมนต่าง ๆ ที่มีบทบาทควบคุมและเกิดการเปลี่ยนแปลงไปในภาวะความดันโลหิตสูง ได้แก่ angiotensin II, atrial natriuretic peptide (ANP), antidiuretic hormone (ADH) และ β -adrenergic agonist (epinephrine) โดยการตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงในระดับยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างและการสลายกระดูก ได้แก่ osteopontin (OPN) และ receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL) ในเซลล์สร้างกระดูกออสทีโอเบลาสต์ (osteoblasts UMR-106 cell line)
2. เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงเมทาบอลิซึมของแคลเซียม ในหนูแรทที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดความดันโลหิตสูงโดยการได้รับอาหารที่มีเกลือปริมาณสูง (salt-induced hypertensive male rats) โดยศึกษาการดูดซึมและการขับออกของแคลเซียมรวมทั้งการเปลี่ยนแปลงของฮอร์โมนที่มีผลต่อการควบคุมแคลเซียมของร่างกาย
3. เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของมวลกระดูกและโครงสร้างของกระดูกในหนูแรทที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดความดันโลหิตสูงโดยการได้รับอาหารที่มีเกลือปริมาณสูง (salt-induced hypertensive male rats)

รายงานผลการวิจัย

ผลของฮอร์โมนที่มีบทบาทควบคุมภาวะความดันโลหิตสูงต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างและการสลายกระดูก

ร่างกายมีกลไกในการควบคุมภาวะความดันโลหิตที่เพิ่มสูงขึ้นผ่านทั้งระบบประสาทและระบบฮอร์โมน ความดันโลหิตที่เพิ่มขึ้นจะเกี่ยวข้องกับประสิทธิภาพการบีบตัวของหัวใจและแรงดันการไหลเวียนของหลอดเลือดส่วนปลายของร่างกาย โดยความดันโลหิตคือปริมาณเลือดที่ออกจากหัวใจใน 1 นาที (cardiac output) และความต้านทานของหลอดเลือดส่วนปลาย ซึ่งการเพิ่มขึ้นของปัจจัยใดปัจจัยหนึ่งหรือทั้งสองปัจจัยจะส่งผลให้ความดันโลหิตในร่างกายสูงขึ้น นอกจากนั้นการควบคุมปริมาณของเหลวในร่างกาย ได้แก่ extracellular volume (ECV) ก็มีความสำคัญต่อการทำงานของหัวใจและหลอดเลือด การรักษาความดันของร่างกาย โดยกลไกการรักษาสมดุลของปริมาณน้ำในร่างกายจะอาศัยการควบคุมปริมาณโซเดียมเป็นหลัก (sodium balance) เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงของ ECV ร่างกายจะรับสัญญาณการเปลี่ยนแปลงโดย baroreceptor ที่อยู่บริเวณ carotid sinus, aortic arch, glomerular arterioles และ cardiac atrium เมื่อ receptor เหล่านี้ถูกกระตุ้นร่างกายก็จะมีการเปลี่ยนแปลง ทั้งทางระบบประสาทอัตโนมัติ และระบบฮอร์โมน เพื่อควบคุมการขับโซเดียมทางไตให้เหมาะสมกับปริมาณ ECV ดังนั้นความไม่สมดุลของกลไกต่าง ๆ ได้แก่ ระบบประสาทซิมพาธิก (sympathetic nervous system) ระบบเรนิน-แองจิโอเทนซิน (renin-angiotensin system) และระบบการทำงานของไต ก็ส่งผลให้มีการเพิ่มความดันโลหิตที่ผิดปกติไป

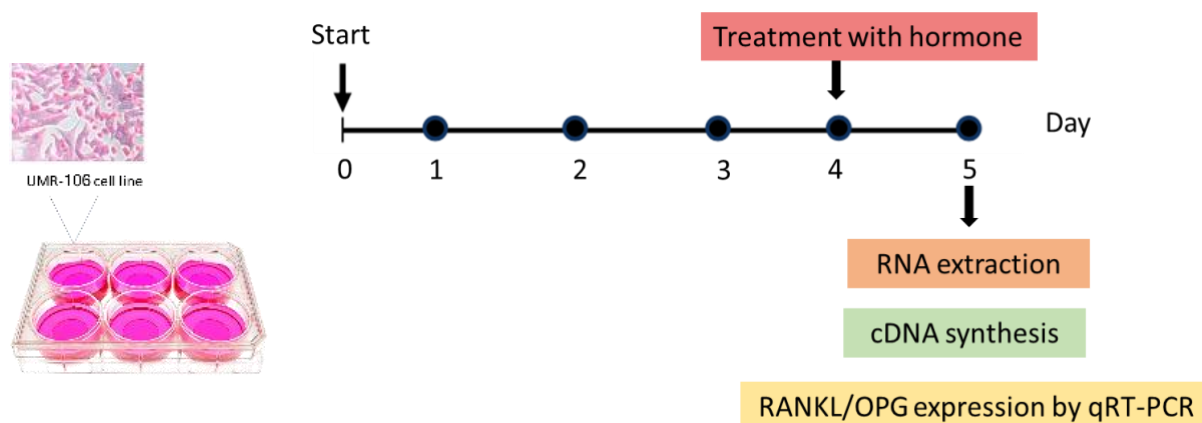
การกระตุ้นประสาทซิมพาธิกส่วนแอลฟาทำให้หลอดเลือดแดงหดตัวจึงมีความต้านทานของหลอดเลือดเพิ่มขึ้น และจะมีผลต่อการทำงานของระบบเรนิน-แองจิโอเทนซินทำให้ผลิตแองจิโอเทนซินทู (angiotensin II) เพิ่มมากขึ้น ส่งผลให้หลอดเลือดแดงหดตัวและทำให้ความต้านทานของหลอดเลือดส่วนปลายเพิ่มขึ้น นอกจากนั้นการกระตุ้นประสาทซิมพาธิกส่วนเบต้า จะทำให้อัตราการเต้นของหัวใจเพิ่มมากขึ้น แรงบีบตัวของหัวใจแรงขึ้นจึงเพิ่มปริมาณเลือดที่ออกจากหัวใจและส่งผลให้ความดันโลหิตเพิ่มมากขึ้น นอกจากนั้นต่อมใต้สมองส่วนหลังจะมีการหลั่งฮอร์โมน antidiuretic hormone (ADH) หรือวาโซเพรสซิน (vasopressin) เพื่อควบคุมของเหลวในระบบไหลเวียน และฮอร์โมนดังกล่าวมีผลต่อกล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือดทำให้หลอดเลือดหดตัวซึ่งส่งผลให้ความดันโลหิตเพิ่มมากขึ้น อีกทั้งการเพิ่มการบีบตัวของกล้ามเนื้อเรียบหัวใจเนื่องมาจากการเพิ่ม atrial volume หรือ pressure จะทำให้มีการสร้างและหลั่งฮอร์โมน atrial natriuretic peptide (ANP) จาก myocardium ของ atrium เพิ่มขึ้น และออกฤทธิ์ทำให้มีการขับโซเดียมออกทางไตมากขึ้น

จากกลไกการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาของฮอร์โมนที่พบในภาวะความดันโลหิตสูงดังกล่าว ผู้วิจัยจึงสนใจทำการวิจัยนำร่องเพื่อศึกษาถึงความสัมพันธ์ของฮอร์โมนต่าง ๆ ที่เพิ่มขึ้นในภาวะความดันโลหิตสูงดังกล่าวต่อการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาของกระดูก โดยการศึกษาในระดับเซลล์ของเซลล์สร้างกระดูกเพื่อตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงในระดับยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างและการสลายกระดูกจากเซลล์สร้างกระดูกออสทีโอเบลาสต์ (osteoblasts) ได้แก่ osteoprotegerin (OPG) และ

receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL) ซึ่งในกระบวนการสร้างกระดูกและสลายกระดูก เซลล์สร้างกระดูก osteoblast จะหลั่ง RANKL และ OPG ซึ่งมีบทบาทไปกระตุ้นการเปลี่ยนแปลงสภาพของเซลล์สลายกระดูกออสทีโอคลาสต์ osteoclast วัยอ่อนเป็น osteoclast เจริญวัย โดย RANKL จะจับกับตัวรับ (RANK receptor) บนเยื่อเซลล์ของ osteoclast วัยอ่อน ในขณะที่ OPG จะเข้าไปแย่งจับ (decoy protein receptor) กับ RANKL และทำให้ RANKL ไม่สามารถกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสภาพของเซลล์ออสทีโอคลาสต์ได้

วิธีการดำเนินงานวิจัย

ทำการศึกษาในเซลล์สร้างกระดูกออสทีโอเบลาสต์ (osteosarcoma UMR-106 cell line) โดยทำการเลี้ยงเซลล์ osteoblast-like UMR106 ของหนูแรทสายพันธุ์ *Rattus norvegicus* (American Type Culture Collection (ATCC) no.CRL-1661) โดยใช้ Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Sigma) ที่มี 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco, USA) และ 100 หน่วยต่อมิลลิลิตร ของ antibiotic-antimycotic (AA; Gibco; Grand Island, NY, USA) ในสภาวะแวดล้อม 5% CO₂ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการบ่มด้วยสารต่าง ๆ ได้แก่ Angiotensin II, β -adrenergic agonist (epinephrine), ADH และ ANP ที่ความเข้มข้น 10 และ 1000 nM เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการสกัดเอ็มอาร์เอ็นเอจากเซลล์ UMR106 โดยใช้ TRIzol® reagent (Invitrogen) วัดปริมาณอาร์เอ็นเอด้วยเครื่อง NanoDrop 2000C (Thermo Scientific, USA) สังเคราะห์ cDNA จาก 1 μ g ของ total RNA โดยใช้ iScript kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) to cDNA และ a thermal cycler (model MyCycler; Bio-Rad) ตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างและการสลายกระดูก ได้แก่ RANKL และ OPG โดยใช้ GAPDH เป็นยีนควบคุม ตรวจสอบด้วยวิธี qRT-PCR ด้วยเครื่อง QuantStudio TM3 Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)

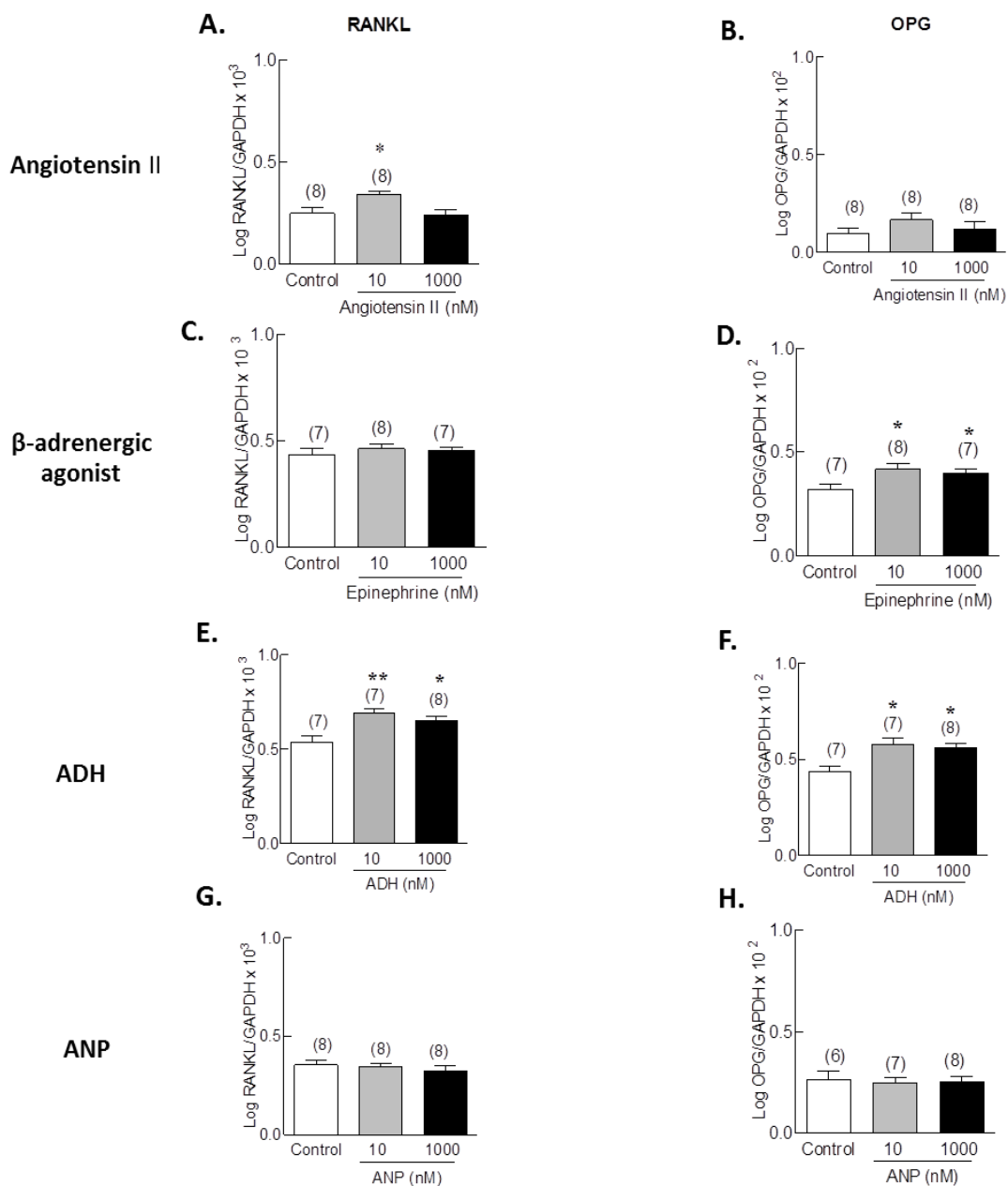


รูปที่ 4.1 แสดงวิธีการดำเนินการวิจัยนำร่องโครงการย่อยที่ 4

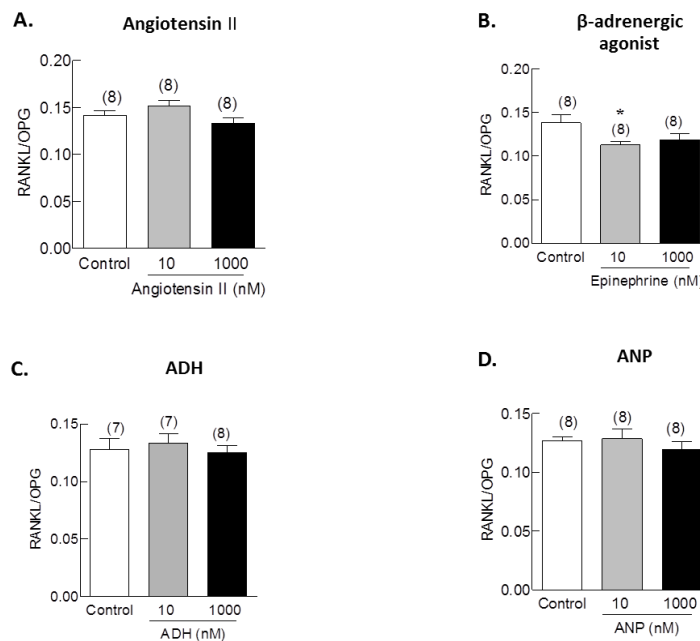
ผลการศึกษา

ผลการศึกษา (รูปที่ 4.2) พบว่าภายหลังจากได้รับ angiotensin II ที่ความเข้มข้น 10 nM เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบการแสดงออกของ RANKL mRNA ที่เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยไม่พบการเปลี่ยนแปลงของ OPG mRNA และกลุ่มที่ได้รับ ADH ที่ความเข้มข้น 10 และ 1000 nM พบการเพิ่มขึ้นของทั้ง RANKL และ OPG ส่วน β -adrenergic agonist ที่ความเข้มข้น 10 และ 1000 nM พบมีผลต่อการเพิ่มขึ้นของ OPG โดยไม่มีผลต่อการแสดงออกของ RANKL นอกจากนี้ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของทั้งสองยีนภายหลังจากการได้รับ ANP แต่อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาสัดส่วนปริมาณการแสดงออกของ RANKL/OPG (รูปที่ 4.3) พบว่าฮอร์โมน angiotensin II, ADH และ ANP ทุกความเข้มข้นไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของสัดส่วน RANKL/OPG ratio แต่พบว่า β -adrenergic agonist มีผลทำให้ RANKL/OPG ratio ที่ความเข้มข้น 10 nM ลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

จากผลการศึกษาข้างต้นจะเห็นว่าฮอร์โมนที่มีผลควบคุมทำให้เกิดภาวะความดันโลหิตสูง Angiotensin II และ ADH ทำให้เซลล์สร้างกระดูก osteoblasts มีการแสดงออกของยีน RANKL ที่เพิ่มขึ้น ซึ่ง RANKL สามารถจับกับตัวรับ RANK ที่บริเวณผิวเซลล์สลายกระดูก osteoclasts และทำหน้าที่กระตุ้นการเจริญและการทำงานของเซลล์สลายกระดูกได้ แต่อย่างไรก็ตามไม่พบการเปลี่ยนแปลงสัดส่วนของ RANKL/OPG ratio แสดงว่าเซลล์ osteoblasts มีการสร้าง OPG มาเพียงพอในการเป็น decoy receptor และจับกับ RANKL ทำให้ RANKL ที่สร้างเพิ่มขึ้นมานั้น ไม่สามารถจับกับตัวรับที่ผิวเซลล์ osteoclasts ได้ ทำให้ไม่สามารถเพิ่มการเจริญและการทำงานของเซลล์สลายกระดูกได้ แต่เป็นที่น่าสนใจว่าเมื่อเซลล์ osteoblasts ได้รับ β -adrenergic agonist กลับส่งผลให้มีการสร้าง OPG เพิ่มขึ้น และพบสัดส่วนของ RANKL/OPG ลดลง แสดงให้เห็นว่า RANKL สามารถไปกระตุ้นเซลล์ osteoclasts ได้น้อยลงส่งผลให้การเจริญและการทำงานในการสลายกระดูกได้ลดลงด้วย



รูปที่ 4.2 แสดง mRNA expression ของ RANKL (A, C, E, G) และ OPG (B, D, F, H) ภายหลังจากการได้รับ angiotensin II (A และ B), β -adrenergic agonist (C และ D), ADH (E และ F), ANP (G และ H), * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม



รูปที่ 4.3 แสดงสัดส่วนของการแสดงออกของ RANKL และ OPG (RANKL/OPG ratio) ภายหลังจากการได้รับ angiotensin II (A), β-adrenergic agonist (B), ADH (C), ANP (D), * $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

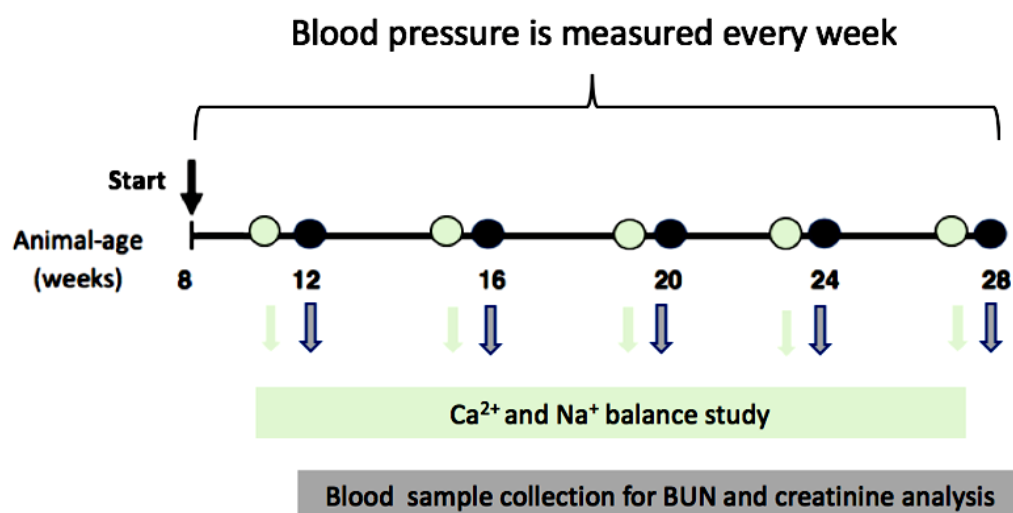
การเปลี่ยนแปลงเมแทบอลิซึมของแคลเซียมในหนูแรทที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดความดันโลหิตสูงโดยการได้รับอาหารที่มีเกลือปริมาณสูง (salt-induced hypertensive male rats)

การบริโภคอาหารที่ไม่เหมาะสมเป็นปัจจัยเสี่ยงที่จะก่อให้เกิดความผิดปกติต่อทางโภชนาการและมีผลกระทบต่อสุขภาพของคนทั่วโลก อาหารที่ไม่เหมาะสมและส่งผลเสียต่อสุขภาพ ได้แก่ อาหารที่มีไขมัน น้ำตาล และเกลือในปริมาณสูง โดยเฉพาะอย่างยิ่งการบริโภคอาหารที่มีปริมาณเกลือสูงเกินมาตรฐาน ปัจจุบันพบว่าคนส่วนใหญ่บริโภคอาหารที่มีเกลือเฉลี่ย 9–12 กรัมต่อวัน ซึ่งปริมาณนี้สูงกว่าปริมาณที่องค์การอนามัยโลกแนะนำต่อวันคือ 5.0 กรัม (WHO Media centre, 2012) เนื่องจากเกลือเป็นแหล่งของโซเดียม แม้ว่าโซเดียมจะเป็นแร่ธาตุที่จำเป็นต่อการทำงานของเซลล์ และภาวะธำรงดุล (homeostasis) ของร่างกาย แต่มีรายงานว่า การบริโภคอาหารที่มีโซเดียมสูงมีส่วนทำให้เกิดความดันโลหิตสูง และเพิ่มความเสี่ยงต่อโรคหัวใจและหลอดเลือดสมอง (Adekunbi, 2016; Hendriksen, 2018; William, 2015)

การรับประทานอาหารที่มีโซเดียมสูงเป็นปัจจัยที่ทำให้เกิดโรคความดันโลหิตสูง มีรายงานพบอัตราการตายของประชากรในที่เพิ่มขึ้นเนื่องมาจากโรคความดันโลหิตสูงที่เกี่ยวข้องกับการได้รับโซเดียมสูง (Mozaffarian et al., 2014) จากการศึกษาพบว่า การเพิ่มขึ้นของโซเดียม ส่งผลให้การขับแคลเซียมในปัสสาวะเพิ่มขึ้น ซึ่งทำให้ระดับแคลเซียมในพลาสมา มีระดับที่ต่ำกว่าปกติ (Massey, 2005) เมื่อมีแคลเซียมที่ต่ำกว่าปกติจะมีการกระตุ้นต่อมพาราไทรอยด์ให้มีการสร้างพาราไทรอยด์ฮอร์โมน (parathyroid hormone; PTH) เพิ่มขึ้น ส่งผลให้มีการสลายแคลเซียมออกจากกระดูกเพิ่มมากขึ้น (McCarron et al., 1980; Cappuccio et al., 1999) อย่างไรก็ตาม ปัจจุบันการศึกษากลไกการเกิดความดันโลหิตสูงที่มีสาเหตุมาจากการได้รับอาหารที่มีโซเดียมสูงและการเปลี่ยนแปลงเมแทบอลิซึมของแคลเซียมในร่างกายจากการได้รับโซเดียมสูงยังไม่มีผลสรุปที่แน่ชัด ด้วยเหตุนี้ผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาผลของการกินอาหารที่มีปริมาณโซเดียมสูงต่อการเกิดภาวะความดันโลหิตสูงและการเปลี่ยนแปลงเมแทบอลิซึมของแคลเซียม ได้แก่ การดูดซึมและการขับออกของแคลเซียมในร่างกาย การเปลี่ยนแปลงของระดับแคลเซียมและระดับ PTH ในเลือด รวมทั้งศึกษาการเปลี่ยนแปลงของการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการดูดซึมแคลเซียมที่ลำไส้เล็กและการดูดกลับแคลเซียมจากท่อไต โดยทำการศึกษาในหนูแรทเพศผู้สายพันธุ์ Sprague-Dawley rat ซึ่งได้รับอาหารที่มีโซเดียมสูง ผลงานวิจัยนี้สามารถนำมาใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการพัฒนาแนวทางการป้องกันและรักษาผู้ป่วยที่มีความดันโลหิตสูงที่มีสาเหตุจากการรับประทานโซเดียมสูงและความผิดปกติของสมดุลเมแทบอลิซึมของแคลเซียมต่อไป

วิธีการดำเนินงานวิจัย

ในการศึกษาครั้งนี้ใช้หนูแรทสายพันธุ์ Sprague-Dawley rat (SD rat) เพศผู้ อายุ 8 สัปดาห์ แบ่งหนูออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มละ 12 ตัว ดังนี้ กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุม (control) จะได้รับอาหารสูตรที่มี 0.4% sodium (standard diet; 0.4% sodium; SD diet) และหนูกลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มได้รับอาหารโซเดียมสูง (High salt; HSD) ซึ่งจะได้รับอาหารที่มีปริมาณโซเดียมสูง 8% (High salt diet; 8% sodium; HS diet) ทำการเลี้ยงสัตว์การทดลองเป็นเวลา 5 เดือน โดยทุกสัปดาห์ ทำการการตรวจวัดความดันโลหิตจากบริเวณโคนหาง (tail cuff method) ตรวจการเปลี่ยนแปลงของแคลเซียมเมตาบอลิซึมโดยวิธี calcium balance study รวมทั้งทำการตรวจประเมินการทำงานของไตโดยตรวจวัดระดับ BUN และ creatinine ในน้ำเลือดและเมื่อสิ้นสุดการทดลองจะทำการการุณยฆาต และนำเนื้อเยื่อหัวใจ ไต และกระดุมมาตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยาต่าง ๆ โครงการวิจัยได้รับการพิจารณาอนุมัติใช้สัตว์ตามโครงการวิจัยเลขที่ MUSC60-045-395 (แผนการทดลองแสดงดังแผนภาพ)



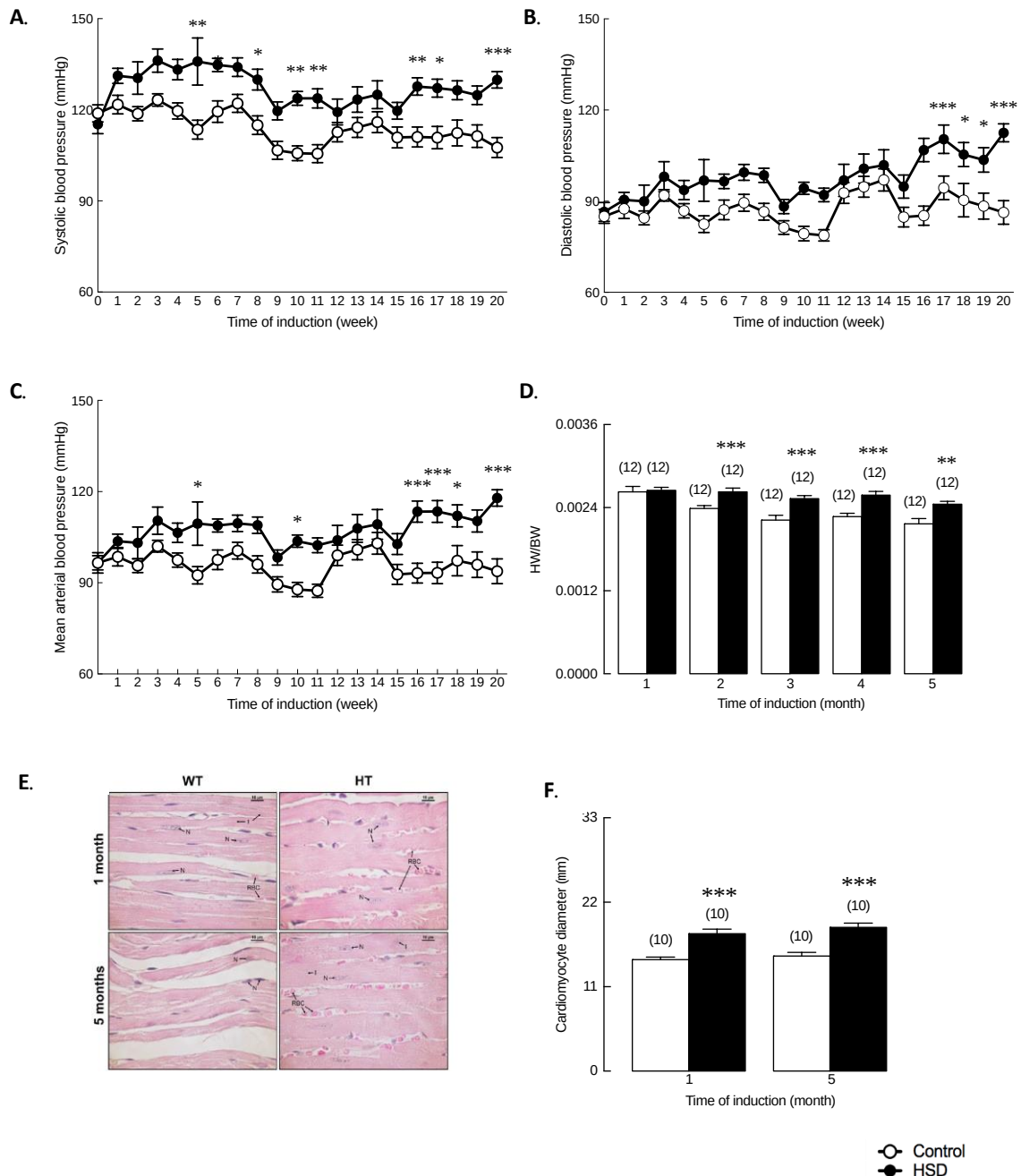
แผนภาพ แสดงขั้นตอนการศึกษาการเปลี่ยนแปลงเมตาบอลิซึมของแคลเซียมในหนูแรทที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดความดันโลหิตสูงโดยการได้รับอาหารที่มีเกลือปริมาณสูง (salt-induced hypertensive male rats)

ผลการศึกษา

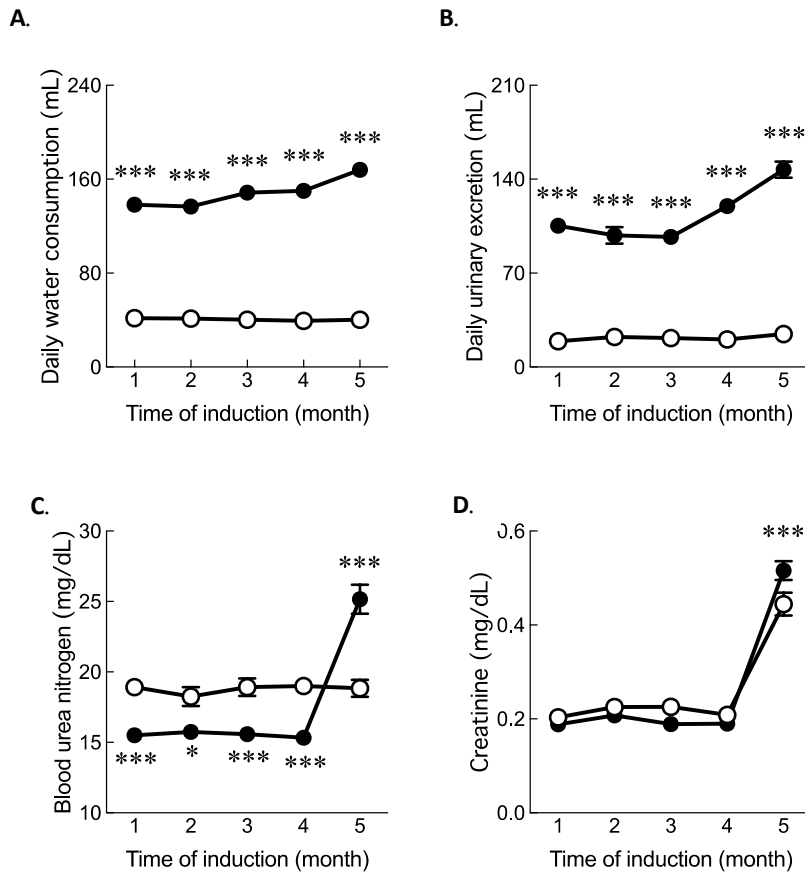
ผลของการได้รับอาหารที่มีโซเดียมสูงต่อการเปลี่ยนแปลงความดันโลหิต การทำงานของไตและหัวใจ

จากการตรวจวัดความดันโลหิตจากบริเวณโคนหาง (tail cuff method) โดยเครื่องวัดความดันโลหิตสำหรับสัตว์ทดลอง CODA-MNTRTM (KENT Scientific cooperation, Connecticut, USA) ในหนูทดลองทั้งกลุ่ม control ซึ่งได้รับอาหารมีโซเดียมปริมาณ 0.4% และกลุ่ม HSD ที่ได้รับอาหารที่มีโซเดียมปริมาณ 8% พบว่าหนูกลุ่ม HSD ภายหลังจากได้รับโซเดียมสูงต่อเนื่องเป็นเวลา 5 สัปดาห์ ความดันชนิด systolic pressure สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญและความดันชนิดนี้สูงตลอดช่วง 20 สัปดาห์ ที่ได้รับอาหารที่มีปริมาณโซเดียม 8% ทั้งนี้ความดันชนิด diastolic blood pressure พบว่ามีค่าสูงขึ้นเช่นกันในกลุ่ม HSD เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม แต่การเปลี่ยนแปลงพบในสัปดาห์ที่ 5 และสัปดาห์ที่ 10 เกิดแบบไม่ต่อเนื่อง ทั้งนี้พบว่าในกลุ่ม HSD ค่า mean arterial pressure มีค่าเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องตั้งแต่สัปดาห์ที่ 16 เป็นต้นไป (รูปที่ 4.4 A, B,C) อีกทั้งเมื่อตรวจสุขภาพของกล้ามเนื้อหัวใจห้องล่างซ้าย พบว่าขนาดของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจมีค่าเพิ่มขึ้นในกลุ่ม HSD (รูปที่ 4.4 D, E,F) นอกจากนั้นพบว่าหนูกลุ่ม HSD มีค่าเฉลี่ยของการกินอาหารและน้ำต่อวันรวมทั้งปริมาณของปัสสาวะสูงกว่ากลุ่มควบคุม แต่อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาน้ำหนักเฉลี่ยในหนูกลุ่ม HSD ภายหลังจากได้รับอาหารโซเดียมสูงเป็นเวลา 1 เดือนเป็นต้นไปมีค่าน้อยกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ

การตรวจสอบการทำงานของไตพบว่าปริมาณการคั่งน้ำและปริมาณปัสสาวะของ หนูกลุ่ม HSD มีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 4.5 A,B) นอกจากนั้นยังพบว่าหนูกลุ่มควบคุมและ HSD มีระดับ BUN และ creatinine ในกระแสเลือดอยู่ในเกณฑ์ปกติ (BUN 15–21 mg/dL และ creatinine 0.2–0.8 mg/dL ตามลำดับ) แสดงให้เห็นว่าในช่วง 4 เดือนแรกปริมาณโซเดียมที่ร่างกายได้รับ ไม่ส่งผลต่อการทำงานของไต แต่อย่างไรก็ตามพบระดับ ระดับ BUN และ creatinine ที่สูงขึ้นในกลุ่ม HSD เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ 5 เดือน (รูปที่ 4.5 C,D) ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าการได้รับโซเดียมปริมาณสูงเริ่มส่งผลต่อประสิทธิภาพการทำงานของไต ซึ่งอาจจะเป็นสาเหตุโน้มนำให้เกิด secondary hypertension ได้



รูปที่ 4.4 แสดงค่าความดันโลหิต systolic blood pressure diastolic blood pressure และ mean arterial blood pressure (A,B,C); สัดส่วนน้ำหนักหัวใจต่อน้ำหนักตัว (D) และ ขนาดของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจห้องล่างซ้าย (E,F) ในหนูกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับโซเดียมปริมาณ 8% (two-way ANOVA, * $P < 0.05$, ** $P < 0.005$ และ *** $P < 0.001$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม)



รูปที่ 4.5 ปริมาณการกินน้ำ (A), ปริมาณปัสสาวะ(B), ระดับBUN (C) และระดับ creatinine (D) ในเลือด ในหนูกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ได้รับโซเดียมปริมาณ 8% (two-way ANOVA, * $P < 0.05$, ** $P < 0.005$ และ *** $P < 0.001$ เมื่อเปรียบเทียบกับ กลุ่มควบคุม)

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการที่หนูได้รับโซเดียมในปริมาณสูง ร่างกายมีการดูดซึมโซเดียมมากขึ้นส่งผลให้ออสโมลาลิตีและโซเดียมในเลือดสูงขึ้น ภาวะออสโมลาลิตีสูงจะทำให้น้ำออกจากเซลล์มากขึ้น กระตุ้นความกระหายน้ำ สัตว์จึงดื่มน้ำเพิ่มขึ้นเพื่อรักษาสมดุลของออสโมลาลิตีให้ลดลงเป็นปกติ โซเดียมในร่างกายเกือบทั้งหมดจะอยู่ในน้ำนอกเซลล์ การรักษาสมดุลของร่างกายโดยไม่ทำให้ระดับโซเดียมในซีรัมหรือออสโมลาลิตีเปลี่ยนแปลง นั้นร่างกายมีการเพิ่มปริมาตรของพลาสมาและปริมาตรน้ำระหว่างเซลล์ (interstitial fluid) ภาวะนี้สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของความดันหลอดเลือดทั้งชนิด systolic และ diastolic blood pressure ในหนูทดลองได้ โดยพบว่าภายหลังจากการได้รับ 5 สัปดาห์ มีผลทำให้ค่าความดัน systolic สูงขึ้นในระดับเกินกว่า 120 mmHg นอกจากนั้นความดันที่เพิ่มสูงขึ้นยังส่งผลให้มวลของกล้ามเนื้อหัวใจเพิ่มขึ้น แต่อย่างไรก็ตามจากผลการศึกษานี้พบว่าระยะเวลา 4 เดือนที่ได้รับโซเดียมในปริมาณสูงไม่ส่งผลกระทบต่อการทำงานของไตเนื่องจากระดับของ BUN และ creatinine ยังปกติ แต่การได้รับโซเดียมปริมาณสูงเป็นระยะเวลา 5 เดือนเริ่มส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพการทำงานของไต ซึ่งอาจจะเป็นสาเหตุโน้มนำให้เกิด secondary hypertension ได้

ผลของการได้รับอาหารที่มีโซเดียมสูงต่อการเปลี่ยนแปลงเมทาบอลิซึมของแคลเซียม

การเปลี่ยนแปลงระดับแคลเซียมในเลือด

แคลเซียมเป็นแร่ธาตุที่มีปริมาณมากที่สุดในร่างกายโดยเป็นองค์ประกอบของโครงสร้างกระดูกและฟัน แคลเซียมในร่างกายจะอยู่ในกระแสเลือดไม่ถึง 1% เมื่อเทียบกับปริมาณแคลเซียมทั้งหมด โดยอยู่ในรูปแบบต่าง ๆ ได้แก่ 1) proteinbound calcium ซึ่งเป็นรูปที่ inactive 2) ionized calcium แคลเซียมอยู่ในรูปนี้ มากสุดถึงกว่า 50% ซึ่งจะเป็รูปแบบ physiologically active 3) complex calcium เป็นรูปที่แคลเซียมไอออนจับอยู่กับสารประกอบอื่น เช่น carbonate และ sulfate จากผลการตรวจวัดปริมาณ ionized calcium ในหนูทั้งสองกลุ่มพบว่า ภายหลังจากการได้รับอาหารที่มีโซเดียมสูงเป็นเวลา 5 เดือน ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของระดับ ionized calcium เมื่อเทียบกับหนูกลุ่ม control (แสดงดังรูปที่ 4.6 G)

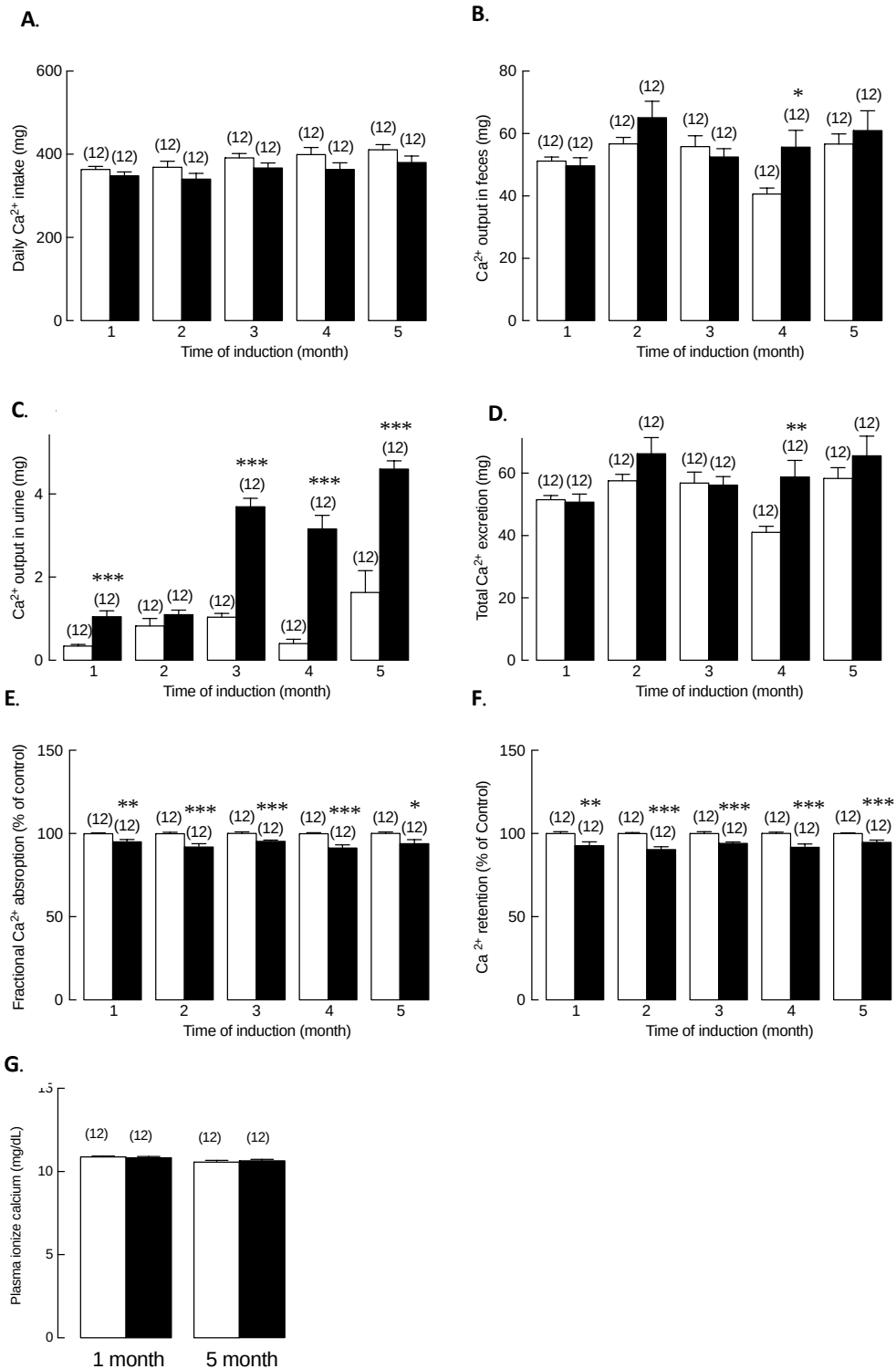
การเปลี่ยนแปลงของปริมาณแคลเซียมที่หนูกขับออกจากร่างกายทางปัสสาวะและอุจจาระ

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของปริมาณแคลเซียมที่หนูกขับออกจากร่างกายทางปัสสาวะและอุจจาระ โดยวิธี calcium balance study ภายหลังจากการได้รับอาหารใน 1, 2, 3, 4 และ 5 เดือน ของหนูทั้งสองกลุ่ม ปริมาณแคลเซียมที่หนูกได้รับระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่ม HSD ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (แสดงดังภาพที่ 4.6 A) เมื่อตรวจระดับแคลเซียมในปัสสาวะหรือ urine ในทุกเดือนหลังจากได้รับอาหารพบว่า ระดับแคลเซียมของหนูกลุ่ม HSD มากกว่าในหนูกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ และผลของปริมาณแคลเซียมในอุจจาระหรือ feces พบว่า ในเดือนที่ 4 หลังจากได้รับอาหาร หนูกลุ่ม HSD มีระดับแคลเซียมใน feces มากกว่าหนูกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (แสดงดังภาพที่ 4.6 B,C) ทั้งนี้เมื่อนำผลรวมของแคลเซียมในปัสสาวะ และในอุจจาระของหนูกลุ่มควบคุมและ HSD มาเปรียบเทียบกับ พบว่าในกลุ่ม HSD มีการขับแคลเซียมออกจากร่างกายมากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญโดยเฉพาะที่ 4 และ 5 เดือน (แสดงดังภาพที่ 4.6 D)

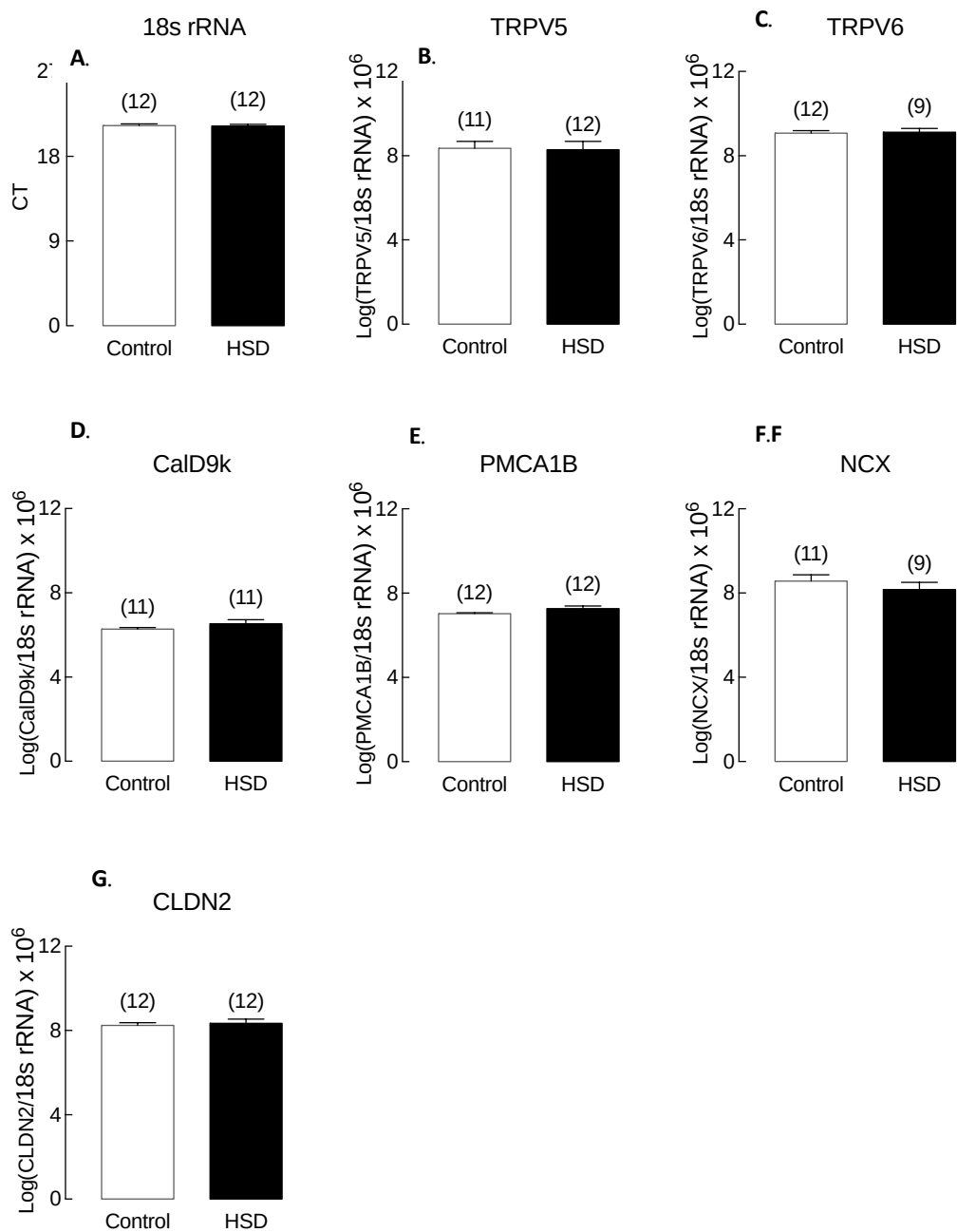
จากการทราบค่า calcium intake และค่า calcium excretion ผ่านอุจจาระและปัสสาวะข้างต้นทำให้เราสามารถหาค่า percent calcium absorption ที่ดูดซึมที่บริเวณบริเวณลำไส้ได้ ผลพบว่า percent calcium absorption ในหนู HSD น้อยกว่า กลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ตั้งแต่ 1 เดือนภายหลังจากที่ทำการทดลอง (แสดงดังภาพที่ 4.6 E)

การเปลี่ยนแปลงของระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการดูดซึมแคลเซียมที่ลำไส้และไต

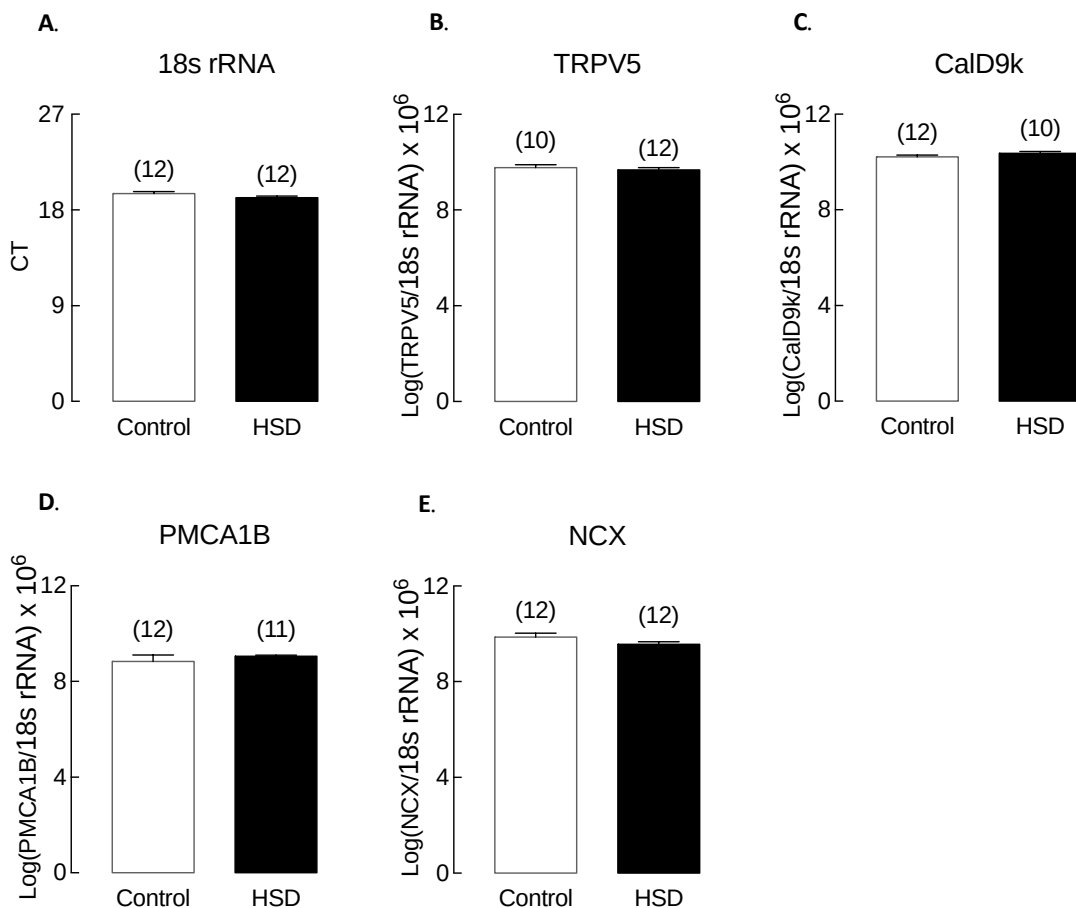
จากผล calcium balance study ข้างต้นซึ่งพบการดูดซึมแคลเซียมที่เพิ่มขึ้นอีกทั้งมีการขับออกของแคลเซียมที่เพิ่มขึ้น จึงทำการศึกษากลไกการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นที่บริเวณลำไส้เล็กและไต ซึ่งเป็นบริเวณที่มีความสำคัญในการควบคุมสมดุลแคลเซียมของร่างกาย โดยการศึกษาการแสดงออกของ mRNA ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการดูดซึมแคลเซียมที่ลำไส้เล็กส่วน duodenum พบว่าหนูกลุ่มควบคุมและกลุ่ม HSD ที่ระยะเวลา 5 เดือน มีการแสดงออกของยีนต่างๆไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของ ได้แก่ TRPV5 และ TRPV6 ที่ทำหน้าที่สร้างโปรตีนขนส่งแคลเซียมเข้าสู่เซลล์ที่วางตัวอยู่ทางด้าน apical membrane และยีน Calbindin-D_{9k} ที่ทำหน้าที่สร้างโปรตีนที่ทำหน้าที่ขนส่งแคลเซียมภายในเซลล์, PMCA1B และ NCX1 ที่ทำหน้าที่ในการขนส่งแคลเซียมออกจากเซลล์ที่วางตัวอยู่ทางด้าน basolateral membrane และ CLDN2 ที่บริเวณ paracellular membrane (แสดงดังภาพที่ 4.7) นอกจากนั้นยังพบว่าการแสดงออกของ mRNA ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการดูดกลับแคลเซียมที่บริเวณท่อไต ได้แก่ TRPV5, CalD9k, PMCA1B และ NCX ก็ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเช่นเดียวกัน ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าการเปลี่ยนแปลงการการแสดงออกในระดับ mRNA อาจจะมีการปรับเปลี่ยนตามระยะเวลาของการได้รับโซเดียมที่เปลี่ยนแปลงไป โดยที่ 5 เดือนอาจมีการปรับระดับทดแทนให้ในกลุ่ม HSD มีค่าไม่ต่างจากกลุ่มควบคุม (แสดงดังภาพที่ 4.8)



รูปที่ 4.6 แสดงผลการทดสอบ calcium balance study, ปริมาณ calcium ที่ได้รับ(A), ปริมาณแคลเซียมที่ขับออกทางอุจจาระ (B) ปัสสาวะ (C) และผลรวมการขับออกของแคลเซียม (D), สัดส่วนการดูดซึมแคลเซียมที่สำไส้ (E), สัดส่วนการสะสมแคลเซียมในร่างกาย (F) และระดับ ionized calcium ในเลือด (G) ในแรทกลุ่มควบคุม และกลุ่ม HSD ในช่วง 5 เดือน หลังได้รับอาหาร, * $P < 0.05$, ** $P < 0.005$ และ *** $P < 0.001$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม



รูปที่ 4.7 ระดับการแสดงออกของ mRNA expression ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการดูดซึมแคลเซียมที่ลำไส้เล็กส่วนต้น ได้แก่ TRPV5, TRPV6, CalD9k PMCA1B, NCX และ CLDN2 โดยมี 18s rRNA เป็น housekeeping gene



รูป 4.8 ระดับการแสดงออกของ mRNA expression ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการดูดซึมแคลเซียมที่ไต ได้แก่ TRPV5, CalD9k, PMCA1B และ NCX โดยมี 18s rRNA เป็น housekeeping gene

การเปลี่ยนแปลงของมวลกระดูกและโครงสร้างของกระดูกในหนูแรทที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดความดันโลหิตสูงโดยการได้รับอาหารที่มีเกลือปริมาณสูง (salt-induced hypertensive male rats)

วิธีการดำเนินงานวิจัย

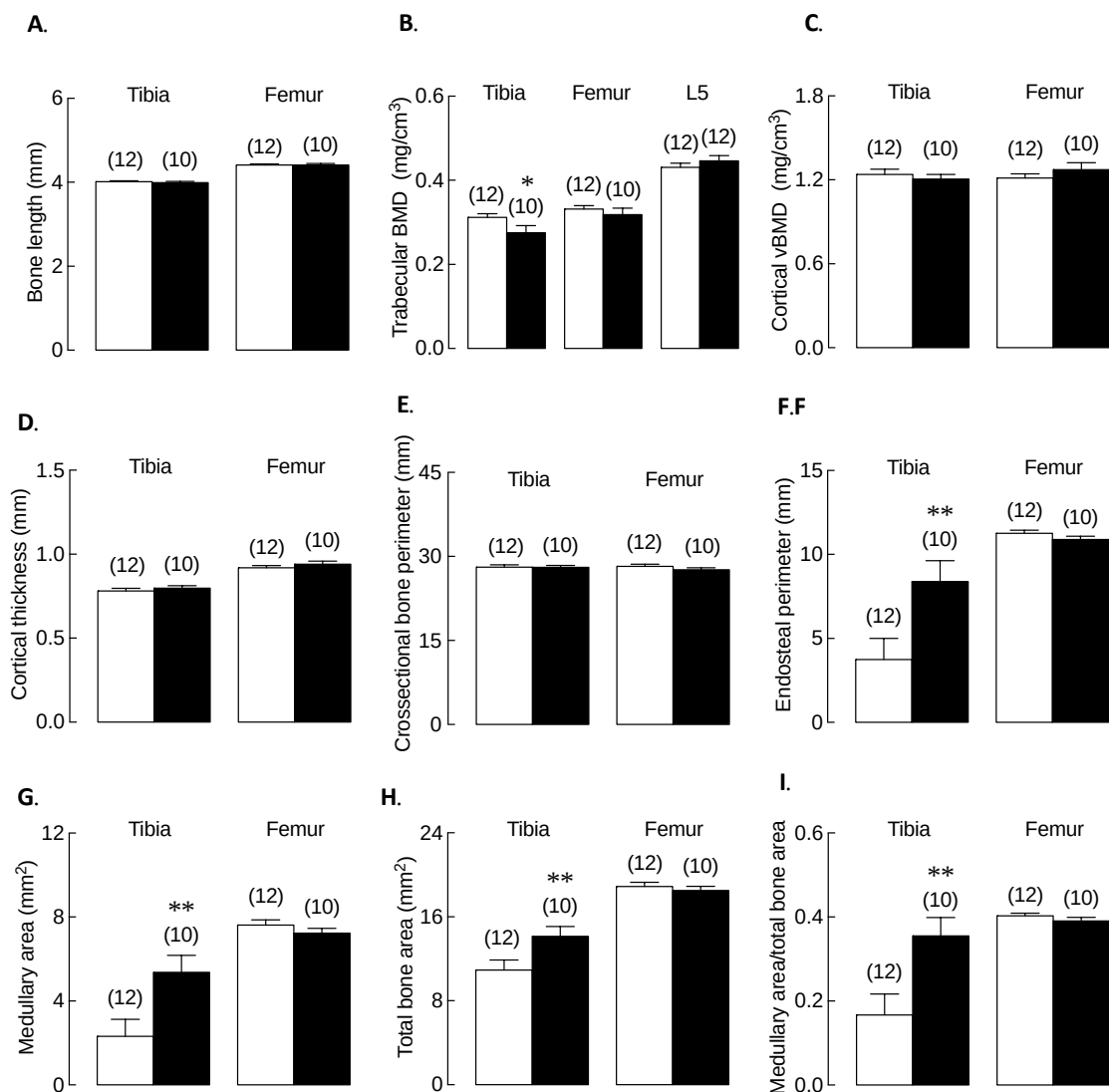
ในการศึกษาครั้งนี้ใช้หนูแรทสายพันธุ์ Sprague-Dawley rat (SD rat) เพศผู้ อายุ 8 สัปดาห์ แบ่งหนูออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มละ 12 ตัว ดังนี้ กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุม (control) จะได้รับอาหารสูตรที่มี 0.4% sodium (standard diet; 0.4% sodium; SD diet) และหนูกลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มได้รับอาหารโซเดียมสูง (High salt; HSD) ซึ่งจะได้รับอาหารที่มีปริมาณโซเดียมสูง 8% (High salt diet; 8% sodium; HS diet) ทำการเลี้ยงสัตว์การทดลองเป็นเวลา 5 เดือน จากนั้นทำการการุณยฆาตและทำการเก็บตัวอย่างกระดูกส่วน tibia และส่วน femur โดยทำการเลาะกระดูกส่วน tibia และ femur เพื่อนำไปตรวจวัดค่าความหนาแน่นของกระดูก (bone mineral density; BMD) ด้วยเครื่อง Micro-Computed Tomography (μCT) และทำการตรวจวัดความพรุนของกระดูก (bone porosity) โดยใช้เทคนิค Synchrotron radiation X-ray tomographic imaging (SRXTM) นอกจากนี้ทำการตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงทางจุลภาคของเซลล์กระดูกโดยวิธี bone histomorphometry

ผลการศึกษา

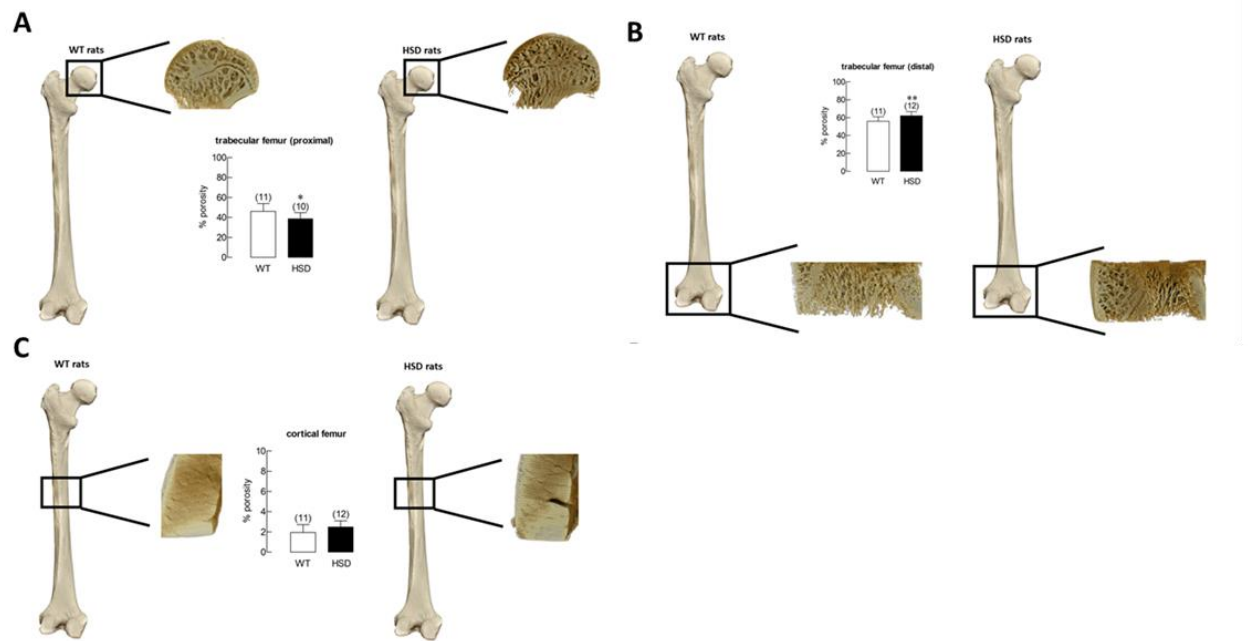
จากผลการวัดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของกระดูกด้วยเครื่อง μCT หนูกลุ่มที่ได้รับอาหารโซเดียมสูงพบว่าค่าความหนาแน่นของกระดูกบริเวณ trabecular bone ของกระดูก tibia มีค่าลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ แต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงความหนาแน่นของกระดูกบริเวณ cortical bone ของ tibia นอกจากนี้ยังพบการลดลงของ periosteal

perimeter ของกระดูก tibia แต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของ endosteal perimeter และ medullary perimeter (แสดงดังรูปที่ 4.9) อย่างไรก็ตามไม่พบการเปลี่ยนแปลงของค่าความหนาแน่นของกระดูกและโครงสร้างอื่นๆในกระดูก femur

ทั้งนี้เนื่องจากข้อจำกัดของเครื่อง μ CT ที่มีความละเอียดไม่เพียงพอในการวัดค่าความหนาแน่นของกระดูก จึงทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของกระดูกโดยใช้เทคนิค Synchrotron radiation X-ray tomographic imaging (SRXTM) ซึ่งภาพที่ได้จะมี resolution ที่มีความละเอียดที่ดีกว่า ผลจากการศึกษาพบว่า ที่บริเวณ distal trabecular ของกระดูก femur ในหนูกลุ่ม HSD พบลักษณะของ bone porosity ที่สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ แต่ไม่พบความเปลี่ยนแปลงใน cortical bone จากการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าภาวะความดันโลหิตสูงจากการได้รับโซเดียมสูงเป็นเวลานานจะส่งผลต่อการลดลงความหนาแน่นของกระดูกโดยพบลักษณะของรูพรุนในกระดูกที่เพิ่มมากขึ้น (แสดงดังรูปที่ 4.10)

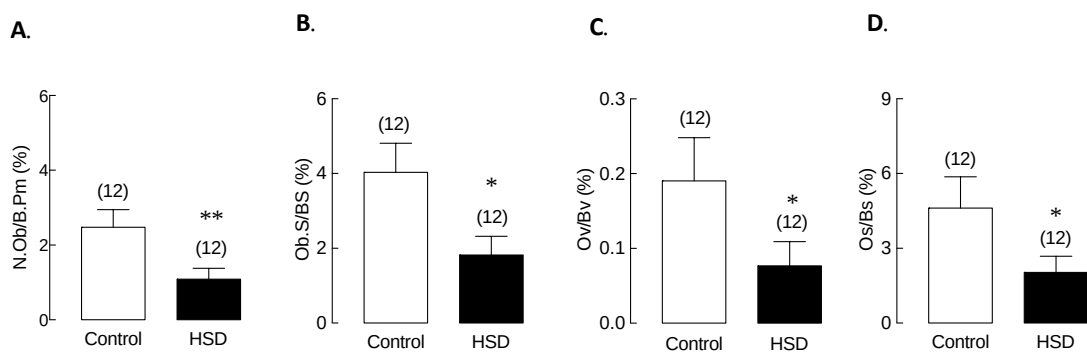


รูปที่ 4.9 การแสดงค่าความหนาแน่นของกระดูกและการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างต่างๆของกระดูก femur และ tibia โครงสร้างของกระดูกด้วยเครื่อง μ CT ในหนูกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับโซเดียมปริมาณ 8% (Unpair t-test, * $P < 0.05$ และ** $P < 0.005$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม)

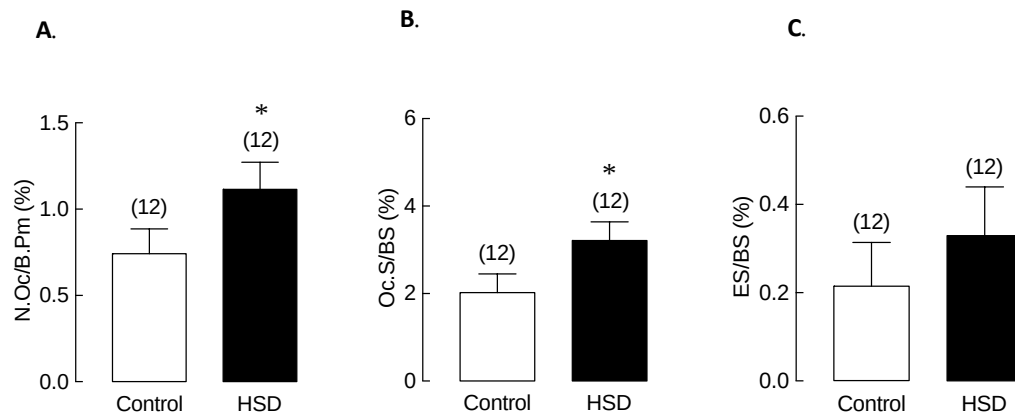


รูปที่ 4.10 การแสดงค่าความหนาแน่นของกระดูกและการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างต่างๆของกระดูก femur และ tibia โครงสร้างของกระดูกด้วยวิธี SRXTM ในหนูกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับโซเดียมปริมาณ 8% (Unpair t-test, * $P < 0.05$ และ** $P < 0.005$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม)

นอกจากนั้นผลการตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงทางจุลภาคของกระดูก (bone histomorphometry) หนูกลุ่ม HSD พบว่าจำนวนเซลล์สร้างกระดูก (osteoblast number) พื้นผิวของเซลล์สร้างกระดูก (osteoblast surface) ปริมาณ osteoid และพื้นผิวของ osteoid ลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (รูปที่ 14.11) อีกทั้งพบการเปลี่ยนแปลงของจำนวนเซลล์สลายกระดูก (osteoclast number) และพื้นผิวของออสทีโอคลาส (osteoclast surface) ที่เพิ่มขึ้นในกลุ่ม HSD อีกด้วย (รูปที่ 14.12) จากการพบการลดลงของ BMD ร่วมกับการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการรักษาสมดุลของมวลกระดูกแสดงให้เห็นว่าภาวะความดันโลหิตที่สูงขึ้นจากได้รับโซเดียมปริมาณสูงส่งผลให้การทำงานของเซลล์สร้างและสลายกระดูกไม่สมดุลกัน โดยพบการสลายกระดูกที่เพิ่มมากขึ้นในขณะที่การสร้างกระดูกลดลงจึงส่งผลให้เกิดการลดลงของมวลกระดูก

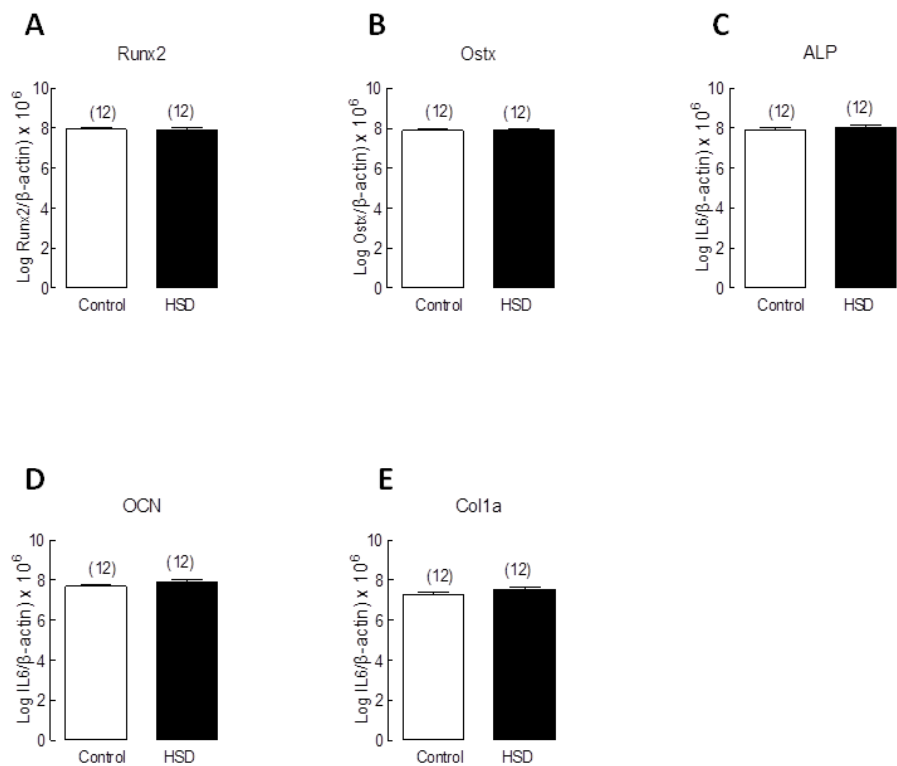


รูปที่ 4.11 แสดงการเปลี่ยนแปลงทางจุลภาคของกระดูก (bone histomorphometry) ของเซลล์สร้างกระดูก (osteoblast) ในกระดูก tibia

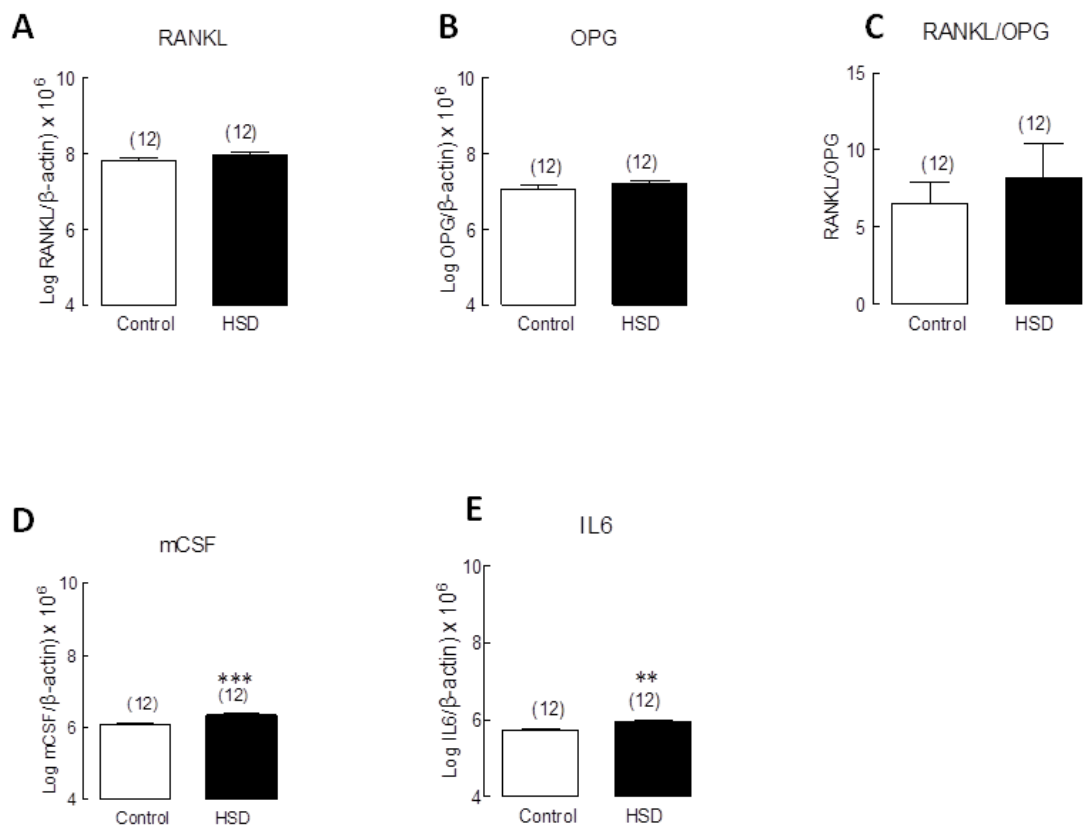


รูปที่ 4.12 แสดงการเปลี่ยนแปลงทางจุลภาคของกระดูก (bone histomorphometry) ของเซลล์สลายกระดูก (osteoclast) ในกระดูก tibia

เพื่ออธิบายถึงกลไกการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในเซลล์สร้างกระดูกและเซลล์สลายกระดูก ทำการสกัดแยก RNA จากกระดูกยาวคี่ในหนูทดลองทั้งสองกลุ่ม เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างและสลายกระดูก โดยในกระบวนการสร้างกระดูก เซลล์สร้างกระดูก osteoblast จะหลั่ง Runx2, osterix, alkaline phosphatase (ALP), osteocalcin และ collagen type I เพื่อกระตุ้นให้เกิดการสะสมแคลเซียมซึ่งเป็นสารสำคัญของเนื้อกระดูก นอกจากนั้น osteoblast จะหลั่ง receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL) และ osteoprotegerin (OPG) ซึ่งมีบทบาทไปกระตุ้นการเปลี่ยนแปลงสภาพของเซลล์สลายกระดูก osteoclast วัยอ่อนเป็น osteoclast เจริญวัย โดย RANKL จะจับกับตัวรับ (RANK receptor) บนเยื่อเซลล์ของ osteoclast วัยอ่อน ในขณะที่ OPG จะเข้าไปแย่งจับ (decoy protein receptor) กับ RANKL และทำให้ RANKL ไม่สามารถกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสภาพของเซลล์สลายกระดูกได้ อีกทั้งยังมีการหลั่ง m-CSF และ IL-6 ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญในการกระตุ้นการเจริญของเซลล์สลายกระดูก ผลการศึกษาพบว่าไม่พบการเปลี่ยนแปลงของการแสดงออกในระดับยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างกระดูกในกลุ่ม HSD เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ได้แก่ Runx2, osterix, alkaline phosphatase (ALP), osteocalcin (OCN) และ collagen type I (col1a) (รูปที่ 4.13) แต่ทั้งนี้พบการเพิ่มขึ้นของระดับการแสดงออกของยีน m-CSF และ IL-6 (รูปที่ 4.14)



รูปที่ 4.13 การแสดงออกในระดับยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างกระดูก ได้แก่ Runx2, osterix, alkaline phosphatase (ALP), osteocalcin (OCN) และ collagen type I (col1a)



รูปที่ 4.14 การแสดงออกในระดับยีนที่เกี่ยวข้องกับการสลายกระดูก ได้แก่ RANKL, OPG, mCSF และ IL6

● โครงการย่อยที่ 5

Development of a novel three dimensional (3D) porous bioactive nutrient elements co-doped calcium phosphate based bioceramics/biopolymer nanocomposite scaffolds for bone tissue regeneration

วัตถุประสงค์หลัก (ณ ช่วงเวลารายงาน 30 มิถุนายน 2560 ถึงวันที่ 29 มิถุนายน 2563)

1. สังเคราะห์ชีววัสดุโครงร่าง 3 มิติ ของสารผสมระหว่างสารอนินทรีย์แคลเซียมฟอสเฟต (calcium phosphate (CaP)) ที่ถูกปรับปรุงคุณสมบัติด้วยการเติมธาตุอาหาร ร่วมกับไบโอพอลิเมอร์ (chitosan-alginate) (ChiAlg)-graft-(Polycaprolactone-Poly (Lactic-Co-Glycolic Acid)) (PCLA) (ChiAlg-g-PCLA) (BioCaP@ChiAlg-g-PCLA) ที่ย่อยสลายได้ภายใต้พยาธิวิทยาของการสร้างกระดูก ชีววัสดุโครงร่างชีวภาพนี้ทำหน้าที่เป็นโครงร่างให้เซลล์กระดูกมายึดเกาะและเหนี่ยวนำให้เกิดกระบวนการสร้างกระดูกอันใหม่ขึ้นมาทดแทน
2. สังเคราะห์ชีววัสดุโครงร่าง 3 มิติ ของสารผสมระหว่างสารอนินทรีย์แคลเซียมฟอสเฟต (calcium phosphate (CaP)) ที่ถูกปรับปรุงคุณสมบัติด้วยการเติมธาตุอาหาร ร่วมกับคอมโพสิตพอลิเมอร์ (chitosan-graft-poly(methyl methacrylate) (Chi-g-PMMA)) (mHA@Chi-g-PMMA) ทำหน้าที่เป็นโครงร่างให้เซลล์กระดูกมายึดเกาะและเหนี่ยวนำให้เกิดกระบวนการสร้างกระดูกอันใหม่ขึ้นมาทดแทนและศึกษาการปลดปล่อยสารชีวโมเลกุล
3. เพื่อศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพของชีววัสดุนาโนคอมโพสิตโครงร่างของสาร mHA@Chi-g-PMMA ที่ได้จากการสังเคราะห์ โดยการวิเคราะห์คุณสมบัติเชิงกล เช่น ความแข็งและความยืดหยุ่น
4. เพื่อศึกษาคุณสมบัติทางด้านชีวภาพของชีววัสดุนาโนคอมโพสิตโครงร่าง mHA@Chi-g-PMMA ที่ได้จากการสังเคราะห์ โดยศึกษาการเหนี่ยวนำเซลล์กระดูก การยึดเกาะของเซลล์กระดูก จำนวนเซลล์ที่เจริญเติบโต และตัวบ่งชี้ของเซลล์สร้างกระดูกที่จะพัฒนาไปสู่การสร้างกระดูก (bone mineralization) ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ในการนำไปประยุกต์ใช้เป็นวัสดุทดแทนกระดูก
5. เพื่อศึกษา กระบวนการปลดปล่อยสารชีวโมเลกุล anti-cancer drug (doxorubicin (DOX)) and of the protein (bovine serum albumin (BSA)) ของชีววัสดุโครงร่าง 3 มิติ mHA@Chi-g-PMMA ที่สังเคราะห์ขึ้น

วิธีการดำเนินงานวิจัย

ในการดำเนินงานวิจัยในช่วง 18 เดือนที่ผ่านมา ได้ทำการศึกษาและทดสอบชีววัสดุโครงร่างชีวภาพที่สร้างจากสารผสมระหว่างสารอนินทรีย์แคลเซียมฟอสเฟต (calcium phosphate (CaP)) ที่ได้จากเกล็ดปลาและถูกปรับปรุงคุณสมบัติด้วยการเติมธาตุอาหาร ร่วมกับไบโอพอลิเมอร์ (chitosan) (Chi)-graft-(poly(lactic acid)(PLA)) (Chi-g-PLA) (BioCaP@Chi-g-PLA) ที่ย่อยสลายได้ภายใต้พยาธิวิทยาของการสร้างกระดูกและศึกษาการการยึดเกาะของเซลล์กระดูก งานวิจัยที่สองได้ทำการศึกษาชีววัสดุโครงร่างที่สังเคราะห์จากสารผสมระหว่างสารอนินทรีย์แคลเซียมฟอสเฟต (calcium phosphate (CaP)) ของ hydroxyapatite (HA) และผ่านกระบวนการที่ถูกปรับปรุงคุณสมบัติด้วยการเติมธาตุอาหารที่มาจากสารละลาย SBF (mHA) ร่วมกับคอมโพสิตพอลิเมอร์ (chitosan-graft-poly(methyl methacrylate) (Chi-g-PMMA)) (mBCP@Chi-g-PMMA) ที่ย่อยสลายได้ภายใต้พยาธิวิทยาของการสร้างกระดูก และศึกษาการการยึดเกาะของเซลล์กระดูกและเหนี่ยวนำรวมถึงกระบวนการสร้างกระดูกอันใหม่ขึ้นมาทดแทนและศึกษาการปลดปล่อยสารชีวโมเลกุล cancer drug (doxorubicin (DOX)) and of the protein (bovine serum albumin (BSA)) ของชีววัสดุโครงร่าง 3 มิติ mHA@Chi-g-PMMA ที่สังเคราะห์ขึ้น ดังนั้นในการวิจัยจะแบ่งรายละเอียดการศึกษาออกเป็นสามส่วนคือ ในส่วนแรกของการวิจัยจะทำการศึกษาสังเคราะห์ชีววัสดุในห้องปฏิบัติการโดยที่จะศึกษาทางด้านกายภาพ เช่นความแข็ง ความยืดหยุ่น ส่วนในส่วนที่สองจะศึกษาการเข้ากันได้ของชีววัสดุที่สังเคราะห์ขึ้นกับเซลล์กระดูก เพื่อหาว่าวัสดุชนิดไหนเหมาะสม พร้อมทั้งรวบรวมข้อมูลศึกษาถึงความ

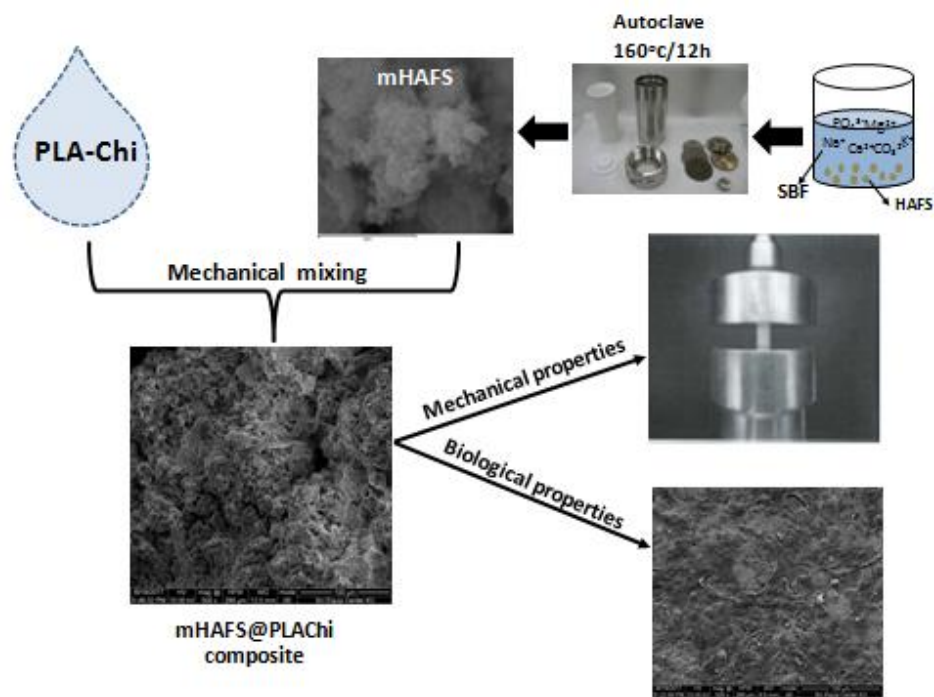
เป็นไปได้ที่จะนำไปศึกษาในสัตว์ทดลองต่อไป ในส่วนที่สามจะทำการศึกษาการปลดปล่อยสารชีวโมเลกุล doxorubicin (DOX) และ protein bovine serum albumin (BSA)

งานวิจัยที่เกี่ยวกับการสังเคราะห์ แคลเซียมฟอสเฟต (calcium phosphate (CaP)) ที่ได้จากเกล็ดปลาและถูกปรับปรุงคุณสมบัติด้วยการเติมธาตุอาหาร ร่วมกับไบโอพอลิเมอร์ (chitosan) (Chi)-graft-(poly(lactic acid)(PLA)) (Chi-g-PLA) (BioCaP@Chi-g-PLA) งานวิจัยได้ดำเนินการเสร็จสิ้นแล้ว

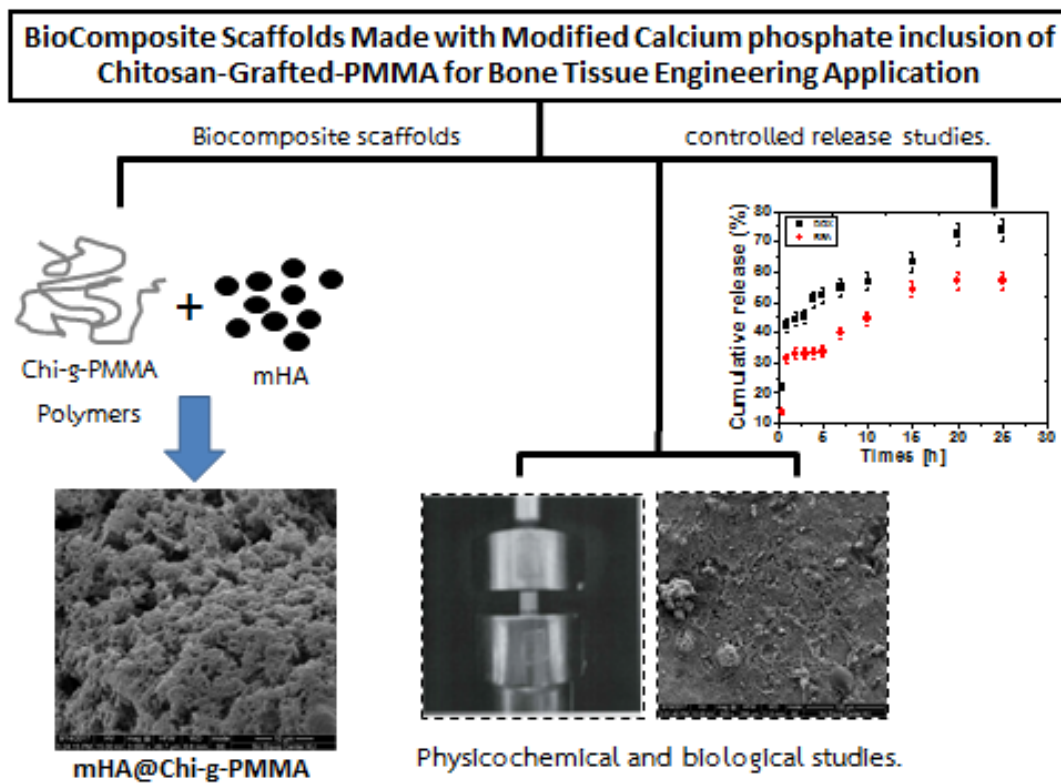
ในส่วนของงานวิจัยที่เกี่ยวกับการสังเคราะห์สารอนินทรีย์แคลเซียมฟอสเฟต (calcium phosphate (CaP)) ของ hydroxyapatite (HA) ที่ถูกปรับปรุงคุณสมบัติด้วยการเติมธาตุอาหาร แบ่งออกได้เป็นสองขั้นตอนคือเตรียมแคลเซียมฟอสเฟตของไฮดรอกซีอะพาไทต์โดยกระบวนการตกผลึกจากสารละลายจะได้อนุภาคอะพาไทต์หลังจากนั้นให้ความร้อนที่ 500°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก็จะได้ผงของสารตั้งต้นที่เป็นผลึกของไฮดรอกซีอะพาไทต์ [hydroxyapatite (HA)] ในการเตรียมการปรับปรุงด้วยการเติมธาตุอาหาร ผงไฮดรอกซีอะพาไทต์จะทำการผสมรวมกันกับสารละลาย SBF ซึ่งมีองค์ประกอบของธาตุอาหาร NaCl (136.8 mM), NaHCO₃ (4.2 mM), KCl (3.0 mM), K₂HPO₄ (1.0 mM), MgCl₂·6H₂O (1.5 mM), CaCl₂ (2.5 mM) and Na₂SO₄ (0.5 mM) ที่อัตราส่วน 1 ต่อ 4 หลังจากนั้นทำการไฮโดรเทอร์มอล ที่อุณหภูมิ 160°C เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ก็จะได้ผงแคลเซียมฟอสเฟต (calcium phosphate (CaP)) ของ hydroxyapatite (HA) ที่ถูกปรับปรุงคุณสมบัติด้วยการเติมธาตุอาหาร (mHA) เพื่อที่จะนำไปศึกษาในลำดับต่อไป

การสังเคราะห์คอมโพสิตระหว่างแคลเซียมฟอสเฟต (calcium phosphate (CaP)) ของ hydroxyapatite (HA) ที่ถูกปรับปรุงคุณสมบัติด้วยการเติมธาตุอาหาร ร่วมกับคอมโพสิตพอลิเมอร์ (chitosan-graft-poly(methyl methacrylate) (Chi-g-PMMA)) (mHA@Chi-g-PMMA) นั้นอาศัยหลักการ blending ระหว่าง mHA และ Chi-g-PMMA โดยมีสาร ammonium persulfate (APS) ทำหน้าที่สร้างกระบวนการพอลิเมอไรเซชัน โดยในกระบวนการสังเคราะห์ PMMA จะถูกละลายในสารละลายมอนอเมอร์ MMA ที่ความเข้มข้น 200 mg/mL ส่วน chitosan จะถูกละลายในกรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ในกระบวนการเตรียมคอมโพสิตโครงร่าง อัตราส่วนระหว่าง mHA ต่อ Chi-g-PMMA จะถูกจำกัดไว้ที่ 30 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ในขณะที่กระบวนการเติมสารชีวโมเลกุล DOX และ BSA นั้นอนุภาคของ mHA@Chi-g-PMMA จะถูกผสมกับสารละลายของ DOX และ BSA ที่ความเข้มข้น 1.0 mg/mL และ 0.5 mg/mL ตามลำดับ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก็จะได้สารตัวอย่าง DOX/BSA-mHA@Chi-g-PMMA ในการศึกษาการปลดปล่อยสารชีวโมเลกุล อนุภาค DOX/BSA-mHA@Chi-g-PMMA จะถูกศึกษาในสารละลายบัฟเฟอร์ ที่ช่วงเวลา 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 7, 10, 15, 20 และ 25 ชั่วโมง ปริมาณสารชีวโมเลกุลที่ปลดปล่อยถูกคำนวณด้วยการวัดอัตราการดูดกลืนแสงยูวี

ในส่วนของการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับการเกิด bone mineralization การเข้ากันได้กับเซลล์กระดูก rat osteoblast-like UMR-106 cells (*In vitro* study) ในระดับห้องปฏิบัติการนั้นจะทำการศึกษาโดยการนำชีววัสดุ mHA@Chi-g-PMMA มาทำการเลี้ยงในจานเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 1 สัปดาห์ ปริมาณตัวบ่งชี้ไม่ว่าจะเป็น MTT และ ALP จะถูกวัดและทำการวิเคราะห์เพื่อดูแนวโน้มความเป็นไปได้ในการเกิด bone mineralization สัตว์ทดลอง (หนู) ระเบียบวิธีการของงานวิจัยที่เกี่ยวกับชีววัสดุBioCaP@Chi-g-PLAและ mHA@Chi-g-PMMA (รูปที่ 5.1 และ รูปที่ 5.2)



รูปที่ 5.1 แสดงระเบียบวิธีวิจัยตลอดระยะเวลาดำเนินงานวิจัย และการวิเคราะห์ผลการวิจัยที่เกี่ยวกับชีววัสดุ BioCaP@Chi-g-PLA

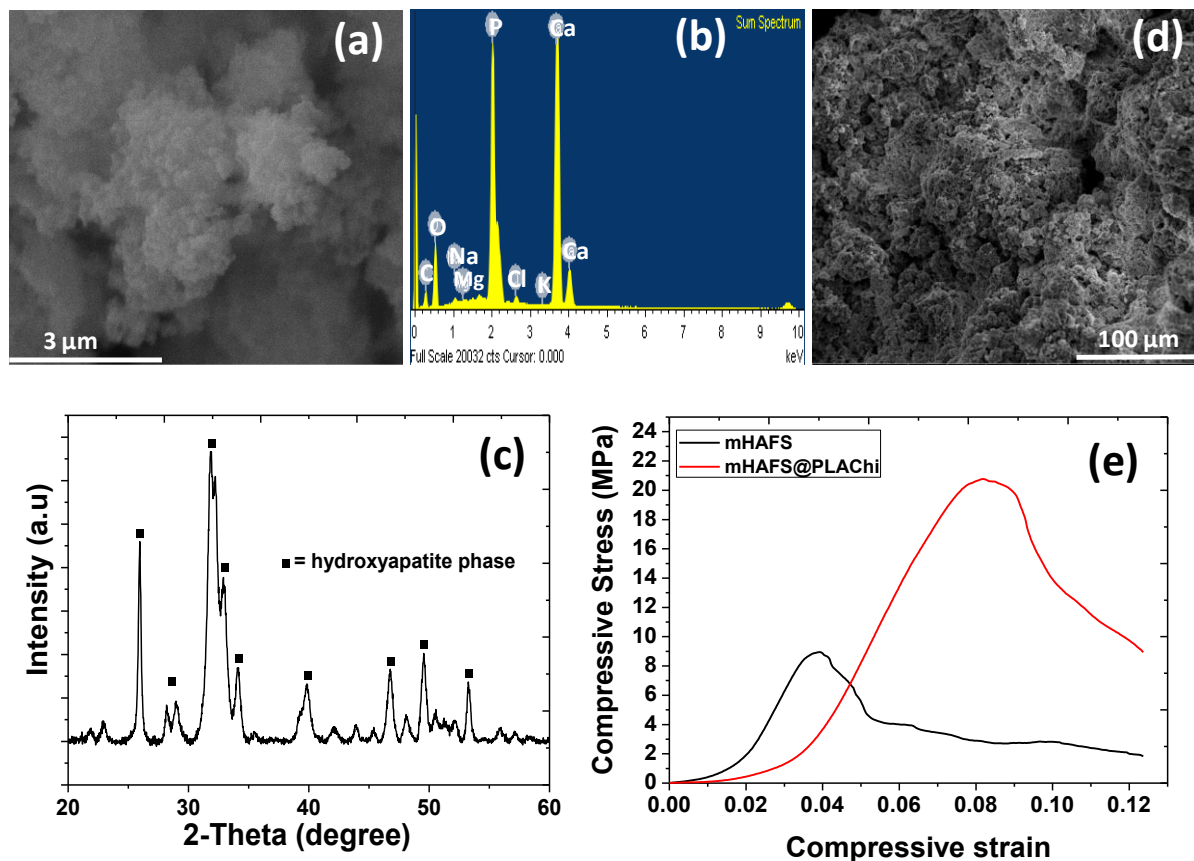


รูปที่ 5.2 แสดงระเบียบวิธีวิจัยตลอดระยะเวลาดำเนินงานวิจัย และการวิเคราะห์ผลการวิจัยที่เกี่ยวกับชีววัสดุ mHA@Chi-g-PMMA

รายงานผลการวิจัย

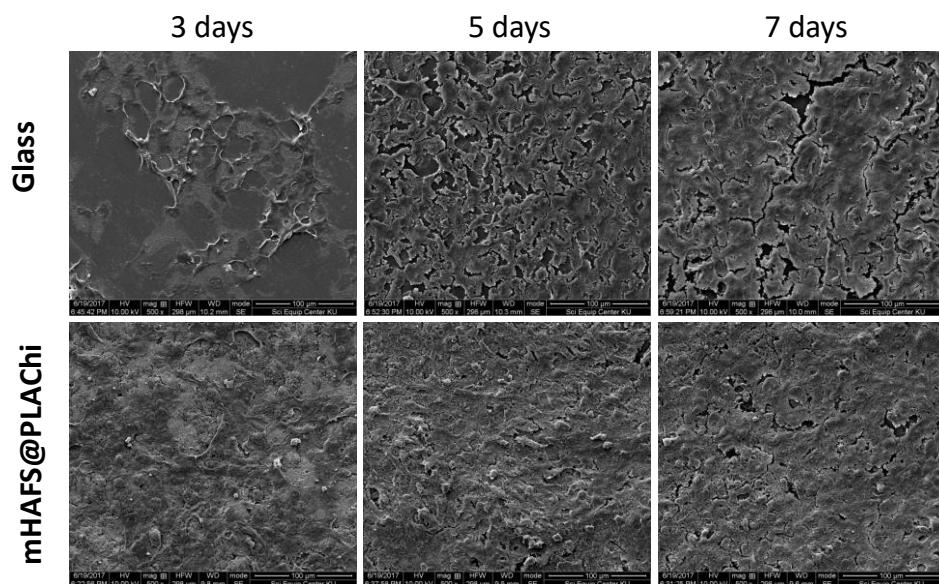
ชีววัสดุแคลเซียมฟอสเฟต (calcium phosphate (CaP)) ที่ถูกปรับปรุงคุณสมบัติด้วยการเติมธาตุอาหาร ร่วมกับไบโอพอลิเมอร์ (chitosan) (Chi)-graft-(poly(lactic acid)(PLA)) (Chi-g-PLA) (BioCaP@Chi-g-PLA)

จากการศึกษาในช่วงที่ผ่านมาของโครงการวิจัยพบว่าที่อัตราส่วนของ ที่สารอนินทรีย์แคลเซียมฟอสเฟต (calcium phosphate (CaP)) ที่ถูกปรับปรุงคุณสมบัติด้วยการเติมธาตุอาหารร่วมกับสารไบโอพอลิเมอร์ที่อัตราส่วนเท่ากับ 20เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักของวัสดุโครงร่างชีวภาพ ร่วมกับ ไบโอพอลิเมอร์ ไคโตซาน [chitosan (1wt%)] (Chi) ผสมพอลิเมอร์ในกรดอะซิตรีกร่วมกับ poly(lactic acid) ที่อัตราส่วน 3:1 พบว่าอนุภาคแคลเซียมฟอสเฟต (calcium phosphate (CaP)) ที่ถูกปรับปรุงคุณสมบัติด้วยการเติมธาตุอาหารมีการรวมกันของอนุภาคแท่งนาโนและเมื่อทำการวิเคราะห์ธาตุทางเคมีพบว่าอนุภาคที่สังเคราะห์ขึ้นประกอบด้วยธาตุ Ca, P, Mg, Na, K, Cl และ C ดังนั้นจึงเป็นการยืนยันว่าธาตุอาหารสามารถที่จะแทรกเข้าไปในสารอนินทรีย์แคลเซียมฟอสเฟต (calcium phosphate (CaP)) ได้และเมื่อวิเคราะห์เชิงโครงสร้างพบว่าอนุภาคที่สังเคราะห์มีโครงสร้างเป็นฉนวนไฮดรอกซีอะพาไทต์ ดังแสดงในรูปภาพที่ 5.3 (a) (b) และ (c) ตามลำดับ พิจารณาคอมโพสิทของชีววัสดุที่สังเคราะห์พบว่าประกอบด้วยรูพรุนและขนาดของรูพรุนอยู่ในระดับไมโครดังแสดงในรูปภาพที่ 2(d) เมื่อทำการศึกษาสภาพยืดหยุ่นของชีววัสดุที่สังเคราะห์ขึ้นพบว่ามีความแข็งแรงที่เหมาะสมกับการนำไปศึกษาเพื่อเป็นวัสดุโครงร่างชีวภาพนั้นคือมีความแข็งแรงภายใต้แรงกดที่ประมาณ 20 MPa และให้ค่ามอดูลัส ที่ 539 MPa (รูปที่ 5.3) (e) ซึ่งสอดคล้องกับกระดูกชั้นในมีค่าประมาณ 2-20 MPa

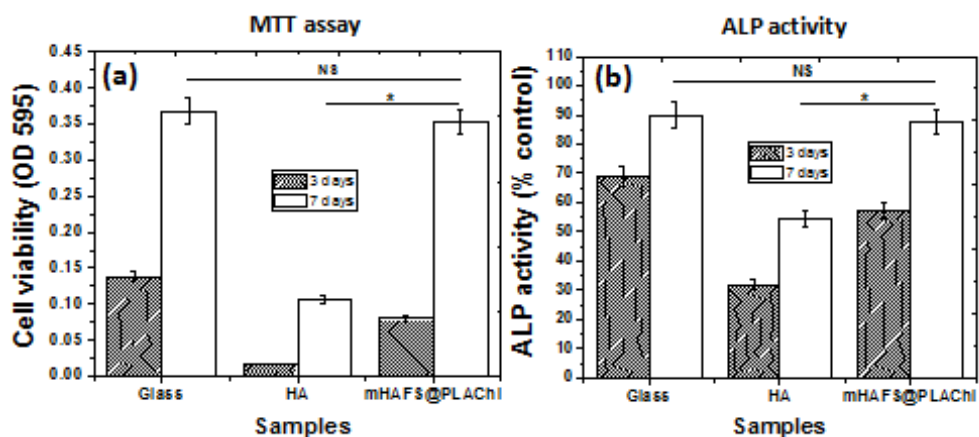


รูปที่ 5.3 แสดงผลการวิเคราะห์เชิงกายภาพของสารตัวอย่างที่สังเคราะห์ในงานวิจัย (a) ภาพ SEM ของสารอนินทรีย์แคลเซียมฟอสเฟต (calcium phosphate (CaP)) ที่ถูกปรับปรุงคุณสมบัติด้วยการเติมธาตุอาหาร (b) ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของธาตุ และ (c) ผลการวิเคราะห์เชิงโครงสร้างด้วย XRD ภาพ (d) แสดงภาพ SEM ของสารคอมโพสิทที่สังเคราะห์ขึ้นในงานวิจัย และภาพ (e) แสดงสภาวะยืดหยุ่นของสารที่สังเคราะห์ภายใต้แรงกด

ผลการศึกษาการยึดเหนี่ยวของเซลล์กระดูกบนผิวของสารชีววัสดุโครงร่าง 3 มิติ ของสารอนินทรีย์แคลเซียมฟอสเฟต (calcium phosphate (CaP)) ที่ถูกปรับปรุงคุณสมบัติด้วยการเติมธาตุอาหาร ร่วมกับไบโอพอลิเมอร์ไคโตซานและ poly(lactic acid) จากการทดสอบกับเซลล์กระดูก osteoblast-like UMR-106 เป็นเวลา 3, 5 และ 7 วัน ที่พบว่ามีความหนาแน่นของเซลล์เจริญเติบโตบนชีววัสดุโครงร่าง 3 มิติที่สังเคราะห์ได้ดีพอ ๆ กับแก้ว (ตัวเปรียบเทียบ) (รูปที่ 5.4) เมื่อทำการศึกษา MTT และ ALP (รูปที่ 5.5) (a) และ (b) ตามลำดับ เพื่อดูปริมาณของเซลล์กระดูกและการพัฒนาที่จะไปเป็นเซลล์กระดูกพบว่า ในช่วง 3 วันแรกปริมาณเซลล์ที่เลี้ยงบนชีววัสดุโครงร่าง 3 มิติที่สังเคราะห์มีค่าน้อยกว่าเมื่อทำการเลี้ยงบนแก้วถึงอย่างไรก็ตาม ปริมาณเซลล์มีค่าไม่แตกต่างกันเมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน สืบมาเหตุมาจากการปลดปล่อยธาตุอาหารของชีววัสดุโครงร่าง 3 มิติ ทำให้กระตุ้นการยึดเหนี่ยวและการเจริญเติบโตของเซลล์กระดูก ข้อสังเกตที่เห็นได้ชัดเจนนี้อาจเป็นจำนวนเซลล์กระดูกที่เจริญบนชีววัสดุที่สังเคราะห์มีค่ามากกว่าเมื่อเลี้ยงบนไฮดรอกซีอะพาไทต์อย่างเห็นได้ชัดเจนนี้อาจเป็นจำนวนเซลล์กระดูกที่เจริญบนชีววัสดุโครงร่าง 3 มิติ ของสารอนินทรีย์แคลเซียมฟอสเฟต (calcium phosphate (CaP)) ที่ถูกปรับปรุงคุณสมบัติด้วยการเติมธาตุอาหาร ร่วมกับไบโอพอลิเมอร์ไคโตซานและ poly(lactic acid) มีแนวโน้มที่จะพัฒนาไปเป็นวัสดุทดแทนกระดูกต่อไป



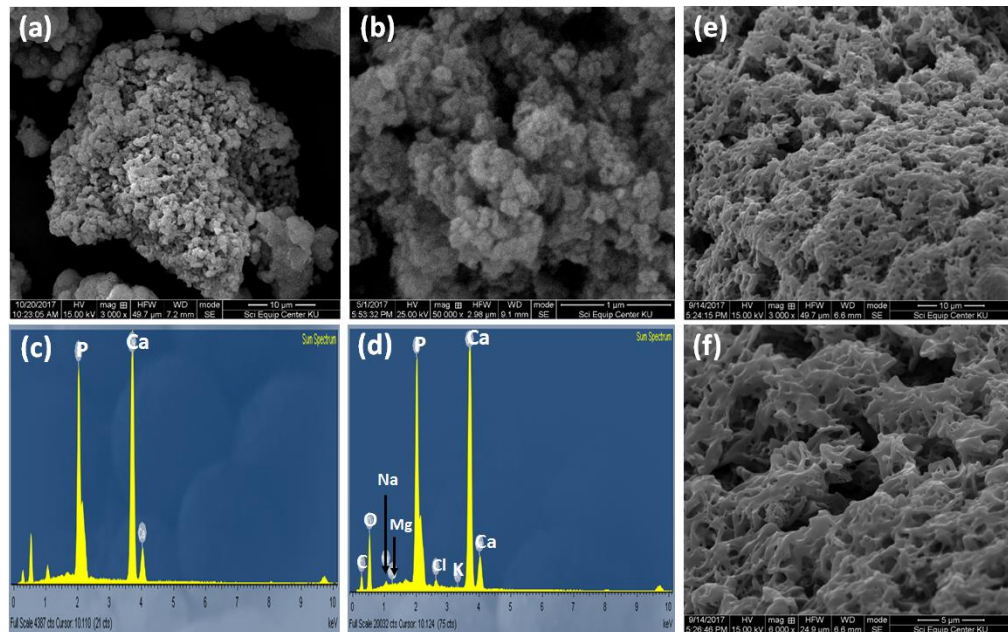
รูปที่ 5.4 แสดงการเจริญเติบโตของเซลล์กระดูกบนชีววัสดุโครงร่าง 3 มิติที่สังเคราะห์ที่เทียบกับแก้ว (ตัวเปรียบเทียบ)



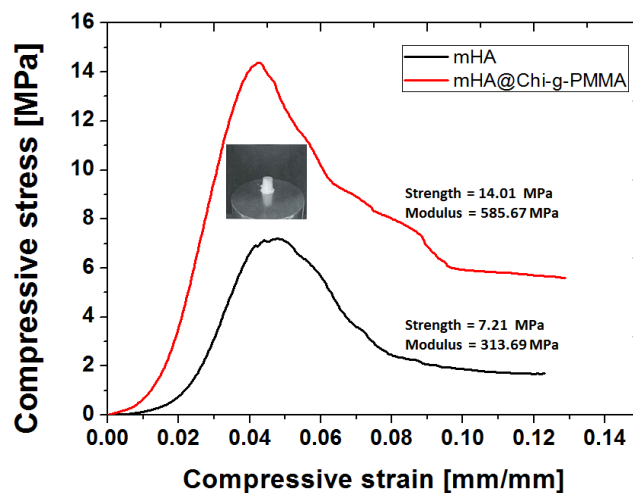
รูปที่ 5.5 แสดงจำนวนของเซลล์สร้างกระดูกบนผิวของชีววัสดุโครงร่าง 3 มิติที่สังเคราะห์ขึ้นหลังจากเลี้ยงได้นาน 3 และ 7 วัน โดยเทียบกับที่เลี้ยงบนแก้ว (กลุ่มควบคุม)

ชีววัสดุแคลเซียมฟอสเฟต (calcium phosphate (CaP)) ที่ถูกปรับปรุงคุณสมบัติด้วยการเติมธาตุอาหาร ร่วมกับ คอมพอลิเมอร์ (chitosan-graft-poly(methyl methacrylate) (Chi-g-PMMA)) (mHA@Chi-g-PMMA)

จากการศึกษาพบว่า สารชีววัสดุโครงร่าง mHA@Chi-g-PMMA ที่อัตราส่วนระหว่าง mHA:Chi-g-PMMA 30:70 โดยน้ำหนักมีลักษณะเชิงโครงสร้างที่มีความพรุนที่เกิดจากการรวมกันของอนุภาคขนาดเล็กของ mHA โดยที่มีธาตุที่เป็นองค์ประกอบคือ Ca, P, Na, Mg, K, Cl เป็นต้นและความพรุนที่ประมาณ 58.53% (รูปที่ 5.6) ในขณะที่คุณสมบัติทางกายภาพ เช่นสภาพการต้านทานแรงกดประมาณ 14.01 MPa และค้ำยงมอดุลัสประมาณ 585.67 Mpa ซึ่งมีค่าเทียบเท่ากับกระดูกส่วน cancellous bone นอกจากนี้ลักษณะเชิงโครงสร้างของชีววัสดุที่สังเคราะห์ขึ้นมีลักษณะเป็นรูพรุน (รูปที่ 5.7)

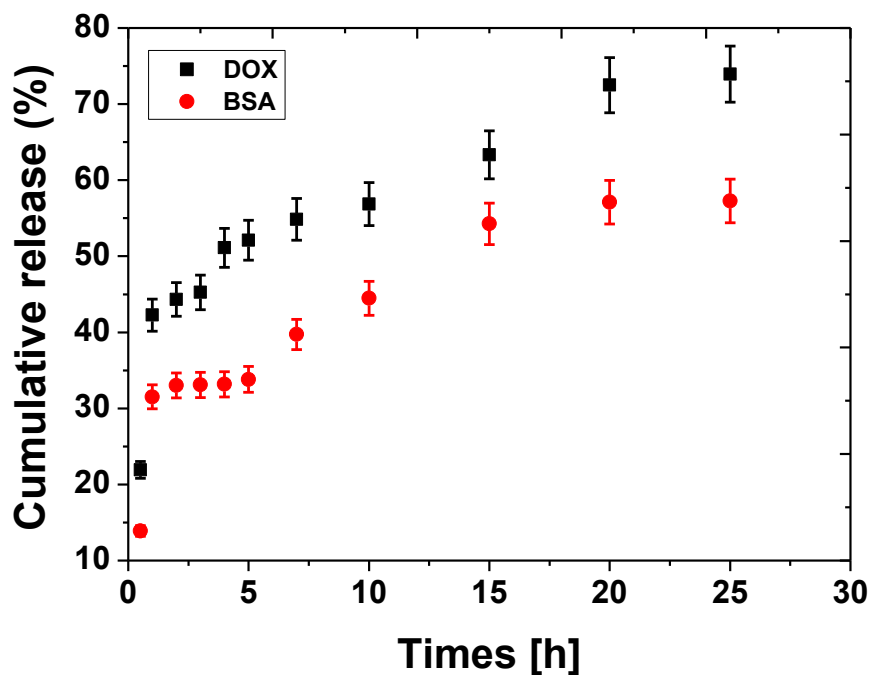


รูปที่ 5.6 แสดงผลการวิเคราะห์เชิงกายภาพของสารตัวอย่างที่สังเคราะห์ในงานวิจัย (a) ภาพ SEM ของสารอินทรีย์ฟอสเฟต (calcium phosphate (CaP)) ของ hydroxyapatite (HA) และที่ถูกปรับปรุงคุณสมบัติด้วยการเติมธาตุอาหาร (b) ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของธาตุ (c, d) และ (e, f) แสดงภาพ SEM ของสารคอมพอลิเมอร์ที่สังเคราะห์ขึ้นในงานวิจัย



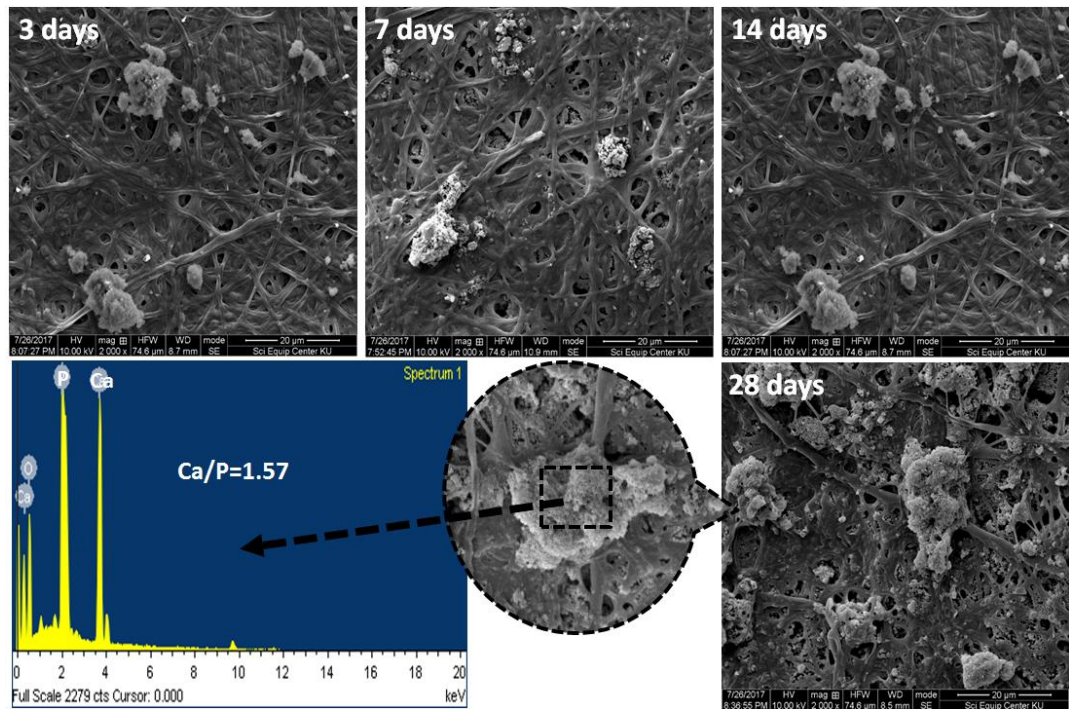
รูปที่ 5.7 แสดงผลการวิเคราะห์เชิงกายภาพของสารตัวอย่าง แสดงสภาพยืดหยุ่นของสารที่สังเคราะห์ภายใต้แรงกด ของสารคอมพอลิเมอร์ mHA@Chi-g-PMMA ที่สังเคราะห์ขึ้นในงานวิจัย

การศึกษาการปลดปล่อยสารชีวโมเลกุล ของ DOX (ตัวแทนยาต้านมะเร็งกระดูก) และ BSA (ตัวแทนโปรตีน growth factor) พบว่าพฤติกรรมการปลดปล่อยมีลักษณะ sustained release (ค่อยปลดปล่อย) ในช่วงเวลา 25 ชั่วโมง โดยอัตราการปลดปล่อยของยา DOX จะมีค่าสูงกว่าของโปรตีน BSA นั่นคือมีค่าการปลดปล่อยประมาณ 73.95% และ 57.27% ตามลำดับ (รูปที่ 5.8)

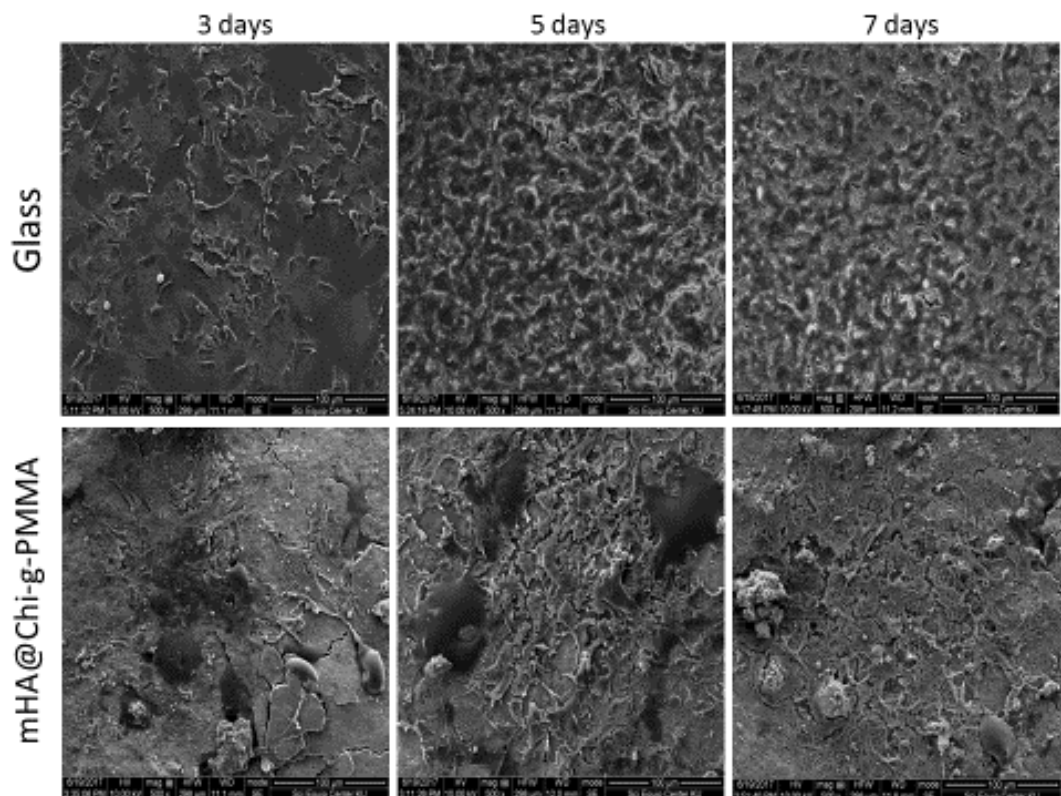


รูปที่ 5.8 แสดงผลการวิเคราะห์การปลดปล่อยสารชีวโมเลกุล DOX และ BSA ของสารตัวอย่าง mHA@Chi-g-PMMA ที่สังเคราะห์ขึ้นในงานวิจัย

จากการศึกษาการสร้างผลึกอะพาไทต์ของสารตัวอย่าง mHA@Chi-g-PMMA ที่สังเคราะห์ขึ้นในงานวิจัยพบว่ามีกระบวนการสร้างอนุภาคอะพาไทต์บนพื้นผิวของชีววัสดุ mHA@Chi-g-PMMA (รูปที่ 5.9) โดยที่จำนวนของอนุภาคมีปริมาณเพิ่มขึ้นหลังจากที่อยู่ในสารละลายเป็นระยะเวลา 3 7 14 และ 28 วันตามลำดับ เมื่อทำการวิเคราะห์องค์ประกอบของธาตุพบว่าประกอบด้วยธาตุ Ca และ P เป็นองค์ประกอบหลัก เมื่อทำการหาอัตราส่วนระหว่าง $Ca/P=1.57$ ซึ่งใกล้เคียงกับอัตราส่วนของไฮดรอกซีอะพาไทต์ของกระดูก เมื่อพิจารณาการเหนี่ยวนำการยึดเกาะของเซลล์กระดูกจะสังเกตเห็นว่าปริมาณเซลล์กระดูกที่เจริญบนชีววัสดุโครงร่าง mHA@Chi-g-PMMA ที่สังเคราะห์ขึ้นในงานวิจัยมีปริมาณเทียบเท่ากับแก้วที่เป็นตัวเปรียบเทียบแต่ลักษณะทางกายภาพของเซลล์ที่เจริญบนสารตัวอย่างจะมีแผ่กระจายเมื่อเทียบกับแก้วที่มีลักษณะก้อนกลม ๆ (รูปที่ 5.10)



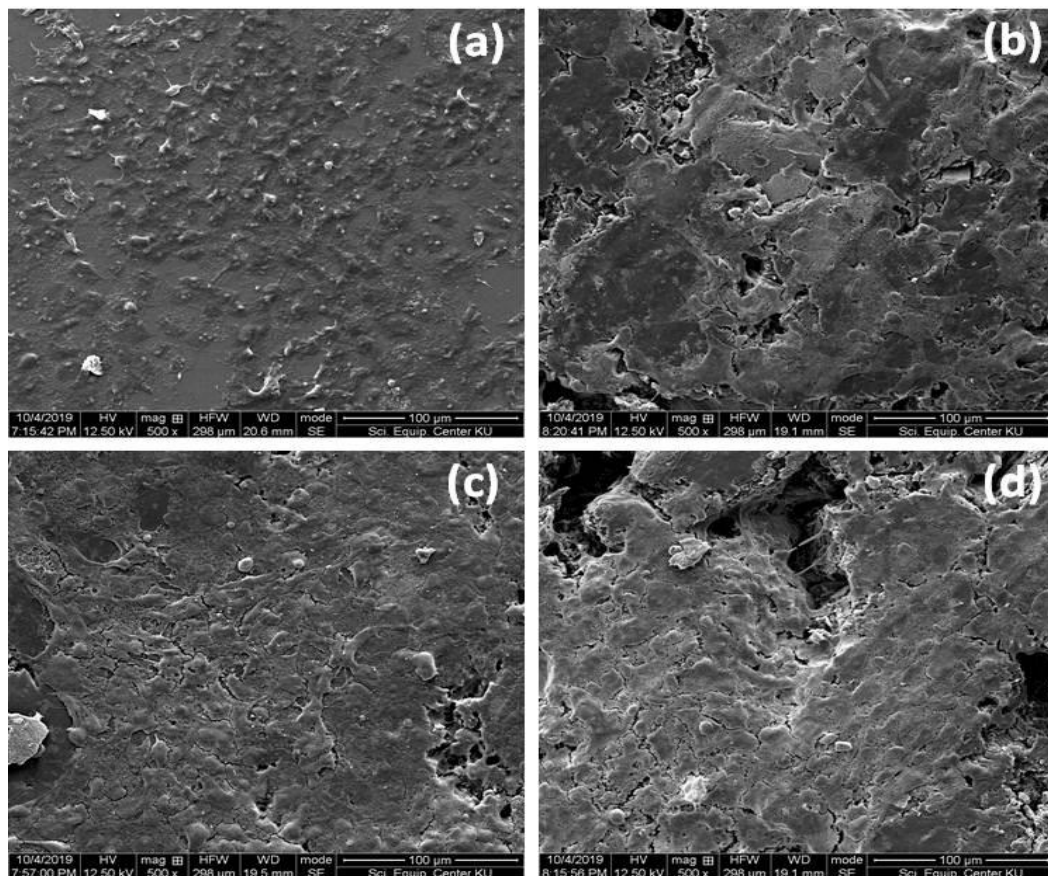
รูปที่ 5.9 แสดงผลการศึกษาการเกิดผลึกอะพาไทต์ของสารตัวอย่าง mHA@Chi-g-PMMA ที่สังเคราะห์ขึ้นในงานวิจัย ในสารละลาย SBF ที่เวลาต่าง ๆ



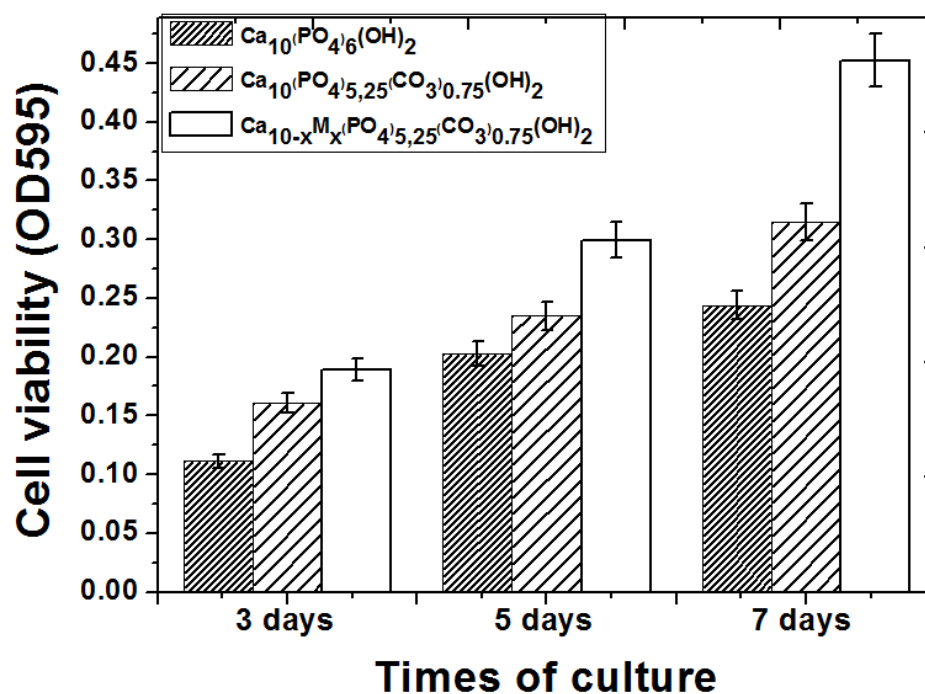
รูปที่ 5.10 แสดงการเจริญเติบโตของเซลล์กระดูกบนชีววัสดุโครงร่าง 3 มิติที่สังเคราะห์เทียบกับแก้ว (ตัวเปรียบเทียบ)

ผลการศึกษาการเหนี่ยวนำเซลล์กระดูก การยึดเกาะของเซลล์กระดูก แคลเซียมฟอสเฟต(calcium phosphate (CaP)) ที่ถูกปรับปรุงคุณสมบัติด้วยการเติมธาตุอาหาร คอปเปอร์ (Cu) ซิงค์ (Zn) แมกนีเซียม (Mg) เหล็ก (Fe) และ คาร์บอนเนต (CO₃)

ผลการศึกษาการยึดเหนี่ยวของเซลล์กระดูกบนผิวของสารชีววัสดุโครงร่าง $\text{Ca}_{10-x}\text{M}_x(\text{PO}_4)_{5.25}(\text{CO}_3)_{0.75}(\text{OH})_2$ ของแคลเซียมฟอสเฟต (calcium phosphate (CaP)) ที่ถูกปรับปรุงคุณสมบัติด้วยการเติมธาตุอาหาร คอปเปอร์ (Cu) ซิงค์ (Zn) แมกนีเซียม (Mg) เหล็ก (Fe) และ คาร์บอนเนต (CO₃) จากการทดสอบกับเซลล์กระดูก osteoblast-like UMR-106 เป็นเวลา 3, 5 และ 7 วัน ที่พบว่ามีจำนวนเซลล์เจริญเติบโตบนชีววัสดุโครงร่าง ที่สังเคราะห์ได้ดีพอ ๆ กับแก้ว (ตัวเปรียบเทียบ) ดังรูปที่ 5.11 เมื่อทำการศึกษา MTT ดังรูปที่ 5.12 เพื่อดูปริมาณของเซลล์กระดูกและการพัฒนาที่จะไปเป็นเซลล์กระดูกพบว่าในช่วง 3 วันแรกปริมาณเซลล์ที่เลี้ยงบนชีววัสดุโครงร่าง มีค่าไม่แตกต่างกันเมื่อทำการเลี้ยงบน แคลเซียมฟอสเฟตของไฮดรอกซีอะพาไทต์ [$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$] คาร์บอนเนตไฮดรอกซีอะพาไทต์ [$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_{5.25}(\text{CO}_3)_{0.75}(\text{OH})_2$] และ แคลเซียมฟอสเฟต (calcium phosphate (CaP)) ที่ถูกปรับปรุงคุณสมบัติด้วยการเติมธาตุอาหาร คอปเปอร์ (Cu) ซิงค์ (Zn) แมกนีเซียม (Mg) เหล็ก (Fe) และ คาร์บอนเนต (CO₃) [$\text{Ca}_{10-x}\text{M}_x(\text{PO}_4)_{5.25}(\text{CO}_3)_{0.75}(\text{OH})_2$] อย่างไรก็ตามปริมาณเซลล์มีค่าแตกต่างกันอย่างเห็นได้อย่างชัดเจนเมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 5 และ 7 วัน สามารถดูมาจากการปลดปล่อยธาตุอาหารของชีววัสดุโครงร่าง ทำให้กระตุ้นการยึดเหนี่ยวและการเจริญเติบโตของเซลล์กระดูก ข้อสังเกตที่เห็นได้ชัดเจนคือจำนวนเซลล์กระดูกที่เจริญบนชีววัสดุที่สังเคราะห์มีค่ามากกว่าเมื่อเลี้ยงบนไฮดรอกซีอะพาไทต์อย่างเห็นได้ชัดเจน จากการศึกษาเบื้องต้นนี้ชี้ให้เห็นว่าชีววัสดุโครงร่าง $\text{Ca}_{10-x}\text{M}_x(\text{PO}_4)_{5.25}(\text{CO}_3)_{0.75}(\text{OH})_2$ มีแนวโน้มที่จะพัฒนาไปเป็นวัสดุทดแทนกระดูกต่อไป



รูปที่ 5.11 แสดงการเจริญเติบโตของเซลล์กระดูกบนแก้ว (ตัวควบคุม) (a) และบนชีววัสดุโครงร่างแคลเซียมฟอสเฟตของไฮดรอกซีอะพาไทต์ [$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$] (b) คาร์บอนเนตไฮดรอกซีอะพาไทต์ [$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_{5.25}(\text{CO}_3)_{0.75}(\text{OH})_2$] (c) และ แคลเซียมฟอสเฟต (calcium phosphate (CaP)) ที่ถูกปรับปรุงคุณสมบัติด้วยการเติมธาตุอาหาร คอปเปอร์ (Cu) ซิงค์ (Zn) แมกนีเซียม (Mg) เหล็ก (Fe) และ คาร์บอนเนต (CO₃) [$\text{Ca}_{10-x}\text{M}_x(\text{PO}_4)_{5.25}(\text{CO}_3)_{0.75}(\text{OH})_2$] (d) ที่สังเคราะห์ขึ้น



รูปที่ 5.12 แสดงจำนวนของเซลล์สร้างกระดูกบนผิวของชีววัสดุโครงร่างที่สังเคราะห์ขึ้นหลังจากเลี้ยงได้นาน 3, 5 และ 7 วัน

สรุปผลงานวิจัยที่ได้ดำเนินการมาแล้ว

จากการศึกษาเบื้องต้นนี้อาจกล่าวได้ว่าในส่วนของการชีววัสดุผสมระหว่างสารอนินทรีย์แคลเซียมฟอสเฟต (calcium phosphate (CaP)) ที่ได้จากเกล็ดปลาและถูกปรับปรุงคุณสมบัติด้วยการเติมธาตุอาหาร ร่วมกับไบโอพอลิเมอร์ไคโตซาน และ poly(lactic acid) และมีอัตราส่วนระหว่างสารอนินทรีย์และสารอินทรีย์ ที่อัตราส่วนเท่ากับ 20 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก มีสภาพความยืดหยุ่นที่ใกล้เคียงกับกระดูกชั้นในและเมื่อพิจารณาถึงองค์ประกอบของธาตุอาหารที่เติมเข้าไปพบว่าปริมาณของธาตุ Ca, P, Mg, Na, K, Cl และ C ประมาณ 32.04, 16.61, 0.03, 0.54, 0.03, 0.73 และ 13.33 โดยน้ำหนักตามลำดับ นอกจากนี้ชีววัสดุโครงร่าง 3 มิติที่สังเคราะห์ขึ้นยังมีคุณสมบัติที่จะกระตุ้นการเหนี่ยวนำเซลล์กระดูกได้ดีพอๆกับแก้วซึ่งเซลล์ชอบที่เจริญเติบโตและให้ค่าที่ไม่มีความแตกต่างกันเมื่อทำการศึกษาด้วยเทคนิค MTT และ ALP จากคุณสมบัติดังที่กล่าวมาชี้ให้เห็นว่าชีววัสดุที่สังเคราะห์มีแนวโน้มที่จะพัฒนาไปเป็นวัสดุทดแทนกระดูกได้ ซึ่งจะได้ศึกษาในสถานะที่จำลองให้เหมือนกับสถานะของการเกิดกระดูกต่อไปเพื่อจะพิจารณาถึงแนวโน้มที่จะสามารถนำไปใช้เป็นวัสดุโครงร่างชีวภาพทดแทนกระดูกในสิ่งมีชีวิตต่อไป

เมื่อพิจารณาสารชีววัสดุโครงร่าง mHA@Chi-g-PMMA จากการศึกษาดังที่กล่าวมาเบื้องต้นสรุปได้ว่า วัสดุมีความพรุนที่เกิดจากการรวมกันของอนุภาคขนาดเล็กของ mHA โดยที่มีธาตุที่เป็นองค์ประกอบคือ Ca, P, Na, Mg, K, Cl และความพรุนของชีววัสดุที่สังเคราะห์มีค่าประมาณ 58.53% เมื่อพิจารณาถึงคุณสมบัติทางกายภาพเช่นสภาพความยืดหยุ่นมีค่าที่ใกล้เคียงกับกระดูกจริงส่วน cancellous bone นั้นคือมีค่าประมาณ 14.01 MPa และเมื่อพิจารณาถึงพฤติกรรมการปลดปล่อยสารชีวโมเลกุล DOX และ BSA พบว่า มีอัตราการปลดปล่อยที่น้อยประมาณ 50-70% และมีกลไกการปลดปล่อยเป็นแบบ Fickian diffusion นอกจากนี้ชีววัสดุโครงร่าง mHA@Chi-g-PMMA ยังทำหน้าที่เป็นชีววัสดุโครงร่างให้เกิดการยึดเหนี่ยวของเซลล์ได้เป็นอย่างดีหลังจากเลี้ยงในห้องปฏิบัติการเป็นเวลาหนึ่งสัปดาห์และเซลล์ยังมีการแผ่กระจายบนสารชีววัสดุโครงร่างได้เป็นอย่างดีชี้ให้เห็นว่าชีววัสดุที่สังเคราะห์มีแนวโน้มที่จะพัฒนาไปเป็นวัสดุทดแทนกระดูกได้

2. ผลงาน

2.1 ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการ

2.1.1 ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ (ที่มี acknowledgement สกสว.) ตลอดระยะโครงการ

- มีผลงานวิจัยและบทความวิชาการที่ได้รับการตอบรับ/ตีพิมพ์แล้ว จำนวน 22 เรื่อง
- มีผลงานวิจัยและบทความวิชาการที่อยู่ในระหว่างดำเนินการ จำนวน 5 เรื่อง

ดังแสดงในตารางด้านล่างนี้

ผลงาน	รายละเอียด	First/Corresponding author ที่อยู่ภายใต้โครงการวิจัย	
		First author	Corresponding author
ผลงานวิจัยและบทความทางวิชาการ 1. Tiyasatkulkovit W, Aksornthong S, Wongdee K, Panupinthu N, Charoenphandhu N. Chronic high-sodium intake elevates blood pressure and reduces bone mass in male Sprague-Dawley rats	☒ อยู่ระหว่างการเรียบเรียง/เขียน (In preparation) ☐ ยื่นเอกสารแล้ว อยู่ระหว่างพิจารณา (Submitted) ☐ อยู่ในระหว่างแก้ไข (Revision) ☐ ได้รับการตอบรับแล้ว อยู่ระหว่างจัดพิมพ์ (Accepted/In press) ☐ จัดพิมพ์แล้ว (Published)	Tiyasatkulkovit W. (หัวหน้าโครงการย่อย 4)	Panupinthu N.
2. Wongdee K, Chanpaisaeng K, Teerapompuntakit J, Charoenphandhu N. Intestinal calcium absorption. Comprehensive Physiology.	☐ อยู่ระหว่างการเรียบเรียง/เขียน (In preparation) ☒ ยื่นเอกสารแล้ว อยู่ระหว่างพิจารณา (Submitted) ☐ อยู่ในระหว่างแก้ไข (Revision) ☐ ได้รับการตอบรับแล้ว อยู่ระหว่างจัดพิมพ์ (Accepted/In press) ☐ จัดพิมพ์แล้ว (Published)	Wongdee K. (ผู้ร่วมโครงการย่อย 1)	Charoenphandhu, N. (หัวหน้าโครงการ)
3. Rittidach T, Tithito T, Suntornsaratoon P, Charoenphandhu N, Thongbunchoo J, Krishnamra N, Tang I-M, Pon-On W. Development of zirconia-mullite	☐ อยู่ระหว่างการเรียบเรียง/เขียน (In preparation) ☒ ยื่นเอกสารแล้ว อยู่ระหว่างพิจารณา (Submitted) ☐ อยู่ในระหว่างแก้ไข		Pon-On W. (หัวหน้าโครงการย่อย 5)

ผลงาน	รายละเอียด	First/Corresponding author ที่อยู่ภายใต้โครงการวิจัย	
		First author	Corresponding author
reinforced biphasic calcium phosphate/biopolymer composite scaffolds for potential bone tissue engineering	(Revision) ☐ ได้รับการตอบรับแล้ว อยู่ระหว่างจัดพิมพ์ (Accepted/In press) ☐ จัดพิมพ์แล้ว (Published)		
4. Lertsuwan, K., Nammultriputtar, K., Nanthawuttiphan, S., Tannop, N. and Charoenphandhu, N. Differential effects of ferric (Fe ³⁺) and ferrous (Fe ²⁺) iron on bone mineralization and active vitamin D ₃ enhanced iron uptake into osteoblast	☐ อยู่ระหว่างการเรียบเรียง/เขียน (In preparation) ☐ ยื่นเอกสารแล้ว อยู่ระหว่างพิจารณา (Submitted) ☒ อยู่ในระหว่างแก้ไข (Revision) ☐ ได้รับการตอบรับแล้ว อยู่ระหว่างจัดพิมพ์ (Accepted/In press) ☐ จัดพิมพ์แล้ว (Published)	Lertsuwan, K. (หัวหน้าโครงการย่อย 3)	Charoenphandhu, N. (หัวหน้าโครงการ)
5. Rodrat M, Jantarajit W, DRS Ng, BSJ Harvey, J Liu, Wilkinson WJ, Charoenphandhu N, DN Sheppard. Ivacaftor relieves cystic fibrosis transmembrane conductance regulator inhibition by the carbon monoxide-releasing molecule CORM-2. American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology	☐ อยู่ระหว่างการเรียบเรียง/เขียน (In preparation) ☐ ยื่นเอกสารแล้ว อยู่ระหว่างพิจารณา (Submitted) ☒ อยู่ในระหว่างแก้ไข (Revision) ☐ ได้รับการตอบรับแล้ว อยู่ระหว่างจัดพิมพ์ (Accepted/In press) ☐ จัดพิมพ์แล้ว (Published)		
6. Srikuea R, Hirunsai M, Charoenphandhu N. Regulation of vitamin D system in skeletal muscle and resident myogenic stem cell during development, maturation, and ageing. Scientific	☐ อยู่ระหว่างการเรียบเรียง/เขียน (In preparation) ☐ ยื่นเอกสารแล้ว อยู่ระหว่างพิจารณา (Submitted) ☐ อยู่ในระหว่างแก้ไข		

ผลงาน	รายละเอียด	First/Corresponding author ที่อยู่ภายใต้โครงการวิจัย	
		First author	Corresponding author
Reports 2020 (in press).	(Revision) ☒ ได้รับการตอบรับแล้ว อยู่ระหว่างจัดพิมพ์ (Accepted/In press) ☐ จัดพิมพ์แล้ว (Published)		
7. Jantarajit W, Wongdee K, Lertsuwan K, Teerapornpantakit J, Aeimlapa R, Thongbunchoo J, Harvey BSJ, Sheppard DN, Charoenphandhu N. Parathyroid hormone increases CFTR expression and function in Caco-2 intestinal epithelial cells. Biochemical and Biophysical Research Communications 2020;523:816-821. doi: 10.1016/j.bbrc.2019.12.106	☐ อยู่ระหว่างการเรียบเรียง/เขียน (In preparation) ☐ ยื่นเอกสารแล้ว อยู่ระหว่างพิจารณา (Submitted) ☐ อยู่ในระหว่างแก้ไข (Revision) ☐ ได้รับการตอบรับแล้ว อยู่ระหว่างจัดพิมพ์ (Accepted/In press) ☒ จัดพิมพ์แล้ว (Published)		Charoenphandhu N. (หัวหน้าโครงการ)
8. Wongdee K, Lertsuwan K, Thonapan N, Teerapornpantakit J, Charoenphandhu N. Differential expression of Sox9 protein and proteoglycan in the epiphyseal cartilage of bromocriptine-treated pregnant and lactating rats. Anat Sci Int 2020;95:277-285. doi: 10.1007/s12565-019-00520-3	☐ อยู่ระหว่างการเรียบเรียง/เขียน (In preparation) ☐ ยื่นเอกสารแล้ว อยู่ระหว่างพิจารณา (Submitted) ☐ อยู่ในระหว่างแก้ไข (Revision) ☐ ได้รับการตอบรับแล้ว อยู่ระหว่างจัดพิมพ์ (Accepted/In press) ☒ จัดพิมพ์แล้ว (Published)	Wongdee K. (ผู้ร่วมโครงการย่อย 1)	Charoenphandhu N. (หัวหน้าโครงการ)
9. Eaimworawuthikul S, Tunapong W, Chunchai T, Suntornsaratoon P, Charoenphandhu N, Thiennimitr P, Chattipakorn N, Chattipakorn SC. Altered gut microbiota ameliorates bone	☐ อยู่ระหว่างการเรียบเรียง/เขียน (In preparation) ☐ ยื่นเอกสารแล้ว อยู่ระหว่างพิจารณา (Submitted) ☐ อยู่ในระหว่างแก้ไข		

ผลงาน	รายละเอียด	First/Corresponding author ที่อยู่ภายใต้โครงการวิจัย	
		First author	Corresponding author
pathology in the mandible of obese–insulin-resistant rats. Eur J Nutr 2020;59:1453-1462. doi: 10.1007/s00394-019-02002-8	(Revision) ☐ ได้รับการตอบรับแล้ว อยู่ระหว่างจัดพิมพ์ (Accepted/In press) ☒ จัดพิมพ์แล้ว (Published)		
10. Charoenphandhu N, Aeimlapa R, Sooksawanwit S, Thongbunchoo J, Teerapornpuntakit J, Svasti S, Wongdee K. Responses of primary osteoblasts and osteoclasts from hemizygous beta-globin knockout thalassemic mice with elevated plasma glucose to 1,25-dihydroxyvitamin D ₃ . Scientific Reports 2019;9(1):13963. doi:10.1038/s41598-019-50414-7	☐ อยู่ระหว่างการเรียบเรียง/เขียน (In preparation) ☐ ยื่นเอกสารแล้ว อยู่ระหว่างพิจารณา (Submitted) ☐ อยู่ระหว่างแก้ไข (Revision) ☐ ได้รับการตอบรับแล้ว อยู่ระหว่างจัดพิมพ์ (Accepted/In press) ☒ จัดพิมพ์แล้ว (Published)	Charoenphandhu N. (หัวหน้าโครงการ)	Wongdee K. (ผู้ร่วมโครงการย่อย 1)
11. Tiyasatkulkovit W, Promruk W, Rojviriya C, Pakawanit P, Chaimongkolnukul K, Kengkoom K, Teerapornpuntakit J, Panupinthu N, Charoenphandhu N. Impairment of bone microstructure and upregulation of osteoclastogenic markers in spontaneously hypertensive rats. Sci Rep 2019;9(1):12293. doi:10.1038/s41598-019-48797-8	☐ อยู่ระหว่างการเรียบเรียง/เขียน (In preparation) ☐ ยื่นเอกสารแล้ว อยู่ระหว่างพิจารณา (Submitted) ☐ อยู่ระหว่างแก้ไข (Revision) ☐ ได้รับการตอบรับแล้ว อยู่ระหว่างจัดพิมพ์ (Accepted/In press) ☒ จัดพิมพ์แล้ว (Published)	Tiyasatkulkovit W. (หัวหน้าโครงการ 4)	Charoenphandhu N. (หัวหน้าโครงการ)
12. Eaimworawuthikul S, Tunapong W, Chunchai T, Yasom S, Wanchai K, Suntornsaratoon P, Charoenphandhu N, Thiennimitr P, Chattipakorn N, Chattipakorn SC. Effects of probiotics,	☐ อยู่ระหว่างการเรียบเรียง/เขียน (In preparation) ☐ ยื่นเอกสารแล้ว อยู่ระหว่างพิจารณา (Submitted) ☐ อยู่ระหว่างแก้ไข		

ผลงาน	รายละเอียด	First/Corresponding author ที่อยู่ภายใต้โครงการวิจัย	
		First author	Corresponding author
prebiotics or synbiotics on jawbone in obese-insulin resistant rats. Eur J Nutr 2019;58(7):2801-2810.	(Revision) ☐ ได้รับการตอบรับแล้ว อยู่ระหว่างจัดพิมพ์ (Accepted/In press) ☒ จัดพิมพ์แล้ว (Published)		
13. Eaimworawuthikul S, Tunapong W, Chunchai T, Suntornsaratoon P, Charoenphandhu N, Thiennimitr P, Chattipakorn N, Chattipakorn SC. <i>Lactobacillus paracasei</i> H1101, xylooligosaccharide and synbiotics improve tibial microarchitecture in obese-insulin resistant rats. Journal of Functional Foods 2019;59:371-379.	☐ อยู่ระหว่างการเรียบเรียง/เขียน (In preparation) ☐ ยื่นเอกสารแล้ว อยู่ระหว่างพิจารณา (Submitted) ☐ อยู่ในระหว่างแก้ไข (Revision) ☐ ได้รับการตอบรับแล้ว อยู่ระหว่างจัดพิมพ์ (Accepted/In press) ☒ จัดพิมพ์แล้ว (Published)		
14. Aeimlapa R, Wongdee K, Tiyasatkulkovit W, Kengkoom K, Krishnamra N, Charoenphandhu N. Anomalous bone changes in ovariectomized Goto-Kakizaki type-2 diabetic rats: an impaired trabecular microstructure with inappropriately low bone turnover in a combined diabetic and estrogen-deficient condition. Am J Physiol Endocrinol Metab 2019;317(4):E646-E657.	☐ อยู่ระหว่างการเรียบเรียง/เขียน (In preparation) ☐ ยื่นเอกสารแล้ว อยู่ระหว่างพิจารณา (Submitted) ☐ อยู่ในระหว่างแก้ไข (Revision) ☐ ได้รับการตอบรับแล้ว อยู่ระหว่างจัดพิมพ์ (Accepted/In press) ☒ จัดพิมพ์แล้ว (Published)		Charoenphandhu N. (หัวหน้าโครงการ)
15. Tithito T, Suntornsaratoon P, Charoenphandhu N, Thongbunchoo J, Krishnamra N, Tang I-M, Pon-On W. Fabrication of biocomposite scaffolds made with modified hydroxyapatite inclusion	☐ อยู่ระหว่างการเรียบเรียง/เขียน (In preparation) ☐ ยื่นเอกสารแล้ว อยู่ระหว่างพิจารณา (Submitted) ☐ อยู่ในระหว่างแก้ไข		Pon-On W (ผู้ร่วมโครงการย่อย 5)

ผลงาน	รายละเอียด	First/Corresponding author ที่อยู่ภายใต้โครงการวิจัย	
		First author	Corresponding author
of chitosan-grafted-poly(methyl methacrylate) for bone tissue engineering application. Biomed Mater 2019;14:025013. doi:10.1088/1748-605X/ab025f	(Revision) ☐ ได้รับการตอบรับแล้ว อยู่ระหว่างจัดพิมพ์ (Accepted/In press) ☒ จัดพิมพ์แล้ว (Published)		
16. Wongdee K, Rodrat M, Teerapornpuntakit J, Krishnamra N, Charoenphandhu N. Factors inhibiting intestinal calcium absorption: hormones and luminal factors that prevent excessive calcium uptake. J Physiol Sci 2019;69(5):683–96.	☐ อยู่ระหว่างการเรียบเรียง/เขียน (In preparation) ☐ ยื่นเอกสารแล้ว อยู่ระหว่างพิจารณา (Submitted) ☐ อยู่ในระหว่างแก้ไข (Revision) ☐ ได้รับการตอบรับแล้ว อยู่ระหว่างจัดพิมพ์ (Accepted/In press) ☒ จัดพิมพ์แล้ว (Published)	Wongdee K. (ผู้ร่วมโครงการย่อย 1)	Charoenphandhu N. (หัวหน้าโครงการ)
17. Khuituan P, K-da S, Bannob K, Hayeeawaema F, Peerakietkhajorn S, Tipbunjong C, Wichienchot S, Charoenphandhu N. Prebiotic oligosaccharides from dragon fruits alter gut motility in mice. Biomed Pharmacother 2019;114:108821. doi: 10.1016/j.biopha.2019.108821.	☐ อยู่ระหว่างการเรียบเรียง/เขียน (In preparation) ☐ ยื่นเอกสารแล้ว อยู่ระหว่างพิจารณา (Submitted) ☐ อยู่ในระหว่างแก้ไข (Revision) ☐ ได้รับการตอบรับแล้ว อยู่ระหว่างจัดพิมพ์ (Accepted/In press) ☒ จัดพิมพ์แล้ว (Published)		
18. Eaimworawuthikul S, Tunapong W, Chunchai T, Suntornsaratoon P, Charoenphandhu N, Thiennimitr P, Chattipakorn N, Chattipakorn SC. <i>Lactobacillus paracasei</i> HII01, xylooligosaccharide and	☐ อยู่ระหว่างการเรียบเรียง/เขียน (In preparation) ☐ ยื่นเอกสารแล้ว อยู่ระหว่างพิจารณา (Submitted) ☐ อยู่ในระหว่างแก้ไข (Revision)		

ผลงาน	รายละเอียด	First/Corresponding author ที่อยู่ภายใต้โครงการวิจัย	
		First author	Corresponding author
synbiotics improve T tibial microarchitecture in obese-insulin resistant rats. 2019;59:371–379.	☐ ได้รับการตอบรับแล้ว อยู่ระหว่างจัดพิมพ์ (Accepted/In press) ☒ จัดพิมพ์แล้ว (Published)		
19. Wongdee K, Rodrat M, Keadsai C, Jantarajit W, Teerapompuntakit J, Thongbunchoo J, Charoenphandhu N. Activation of calcium-sensing receptor by allosteric agonists cinacalcet and AC-265347 abolishes the 1,25(OH) ₂ D ₃ -induced Ca ²⁺ transport: evidence that explains how the intestine prevents excessive Ca ²⁺ absorption. Arch Biochem Biophys 2018;657:15–22.	☐ อยู่ระหว่างการเรียบเรียง/เขียน (In preparation) ☐ ยื่นเอกสารแล้ว อยู่ระหว่างพิจารณา (Submitted) ☐ อยู่ในระหว่างแก้ไข (Revision) ☐ ได้รับการตอบรับแล้ว อยู่ระหว่างจัดพิมพ์ (Accepted/In press) ☒ จัดพิมพ์แล้ว (Published)	Wongdee K. (ผู้ร่วมโครงการย่อย 1)	Charoenphandhu N. (หัวหน้าโครงการ)
20. Lertsuwan, K., Nammultriputtar, K., Nanthawuttiphon, S., Phoabon, S., Lertsuwan, J., Thongbunchoo, J., Wongdee, K. and Charoenphandhu, N. Ferrous and ferric differentially deteriorate proliferation and differentiation of osteoblast-like UMR-106 cells. Biometals 2018;31(5):873–889.	☐ อยู่ระหว่างการเรียบเรียง/เขียน (In preparation) ☐ ยื่นเอกสารแล้ว อยู่ระหว่างพิจารณา (Submitted) ☐ อยู่ในระหว่างแก้ไข (Revision) ☐ ได้รับการตอบรับแล้ว อยู่ระหว่างจัดพิมพ์ (Accepted/In press) ☒ จัดพิมพ์แล้ว (Published)	Lertsuwan K. (ผู้ร่วมโครงการย่อย 3)	Charoenphandhu N. (หัวหน้าโครงการ)
21. Lertsuwan K, Wongdee K, Teerapompuntakit J, Charoenphandhu N. Intestinal calcium transport and its regulation in thalassemia: interaction between calcium and iron metabolism. J Physiol Sci	☐ อยู่ระหว่างการเรียบเรียง/เขียน (In preparation) ☐ ยื่นเอกสารแล้ว อยู่ระหว่างพิจารณา (Submitted) ☐ อยู่ในระหว่างแก้ไข (Revision)	Lertsuwan K. (ผู้ร่วมโครงการย่อย 3)	Charoenphandhu N. (หัวหน้าโครงการ)

ผลงาน	รายละเอียด	First/Corresponding author ที่อยู่ภายใต้โครงการวิจัย	
		First author	Corresponding author
2018;68:221–232.	☐ ได้รับการตอบรับแล้ว อยู่ระหว่างจัดพิมพ์ (Accepted/In press) ☒ จัดพิมพ์แล้ว (Published)		
22. Pon-On W, Suntornsaratoon P, Charoenphandhu N, Thongbunchoo J, Krishnamra N, Tang I-M. Synthesis and investigations of mineral ions-loaded apatite from fish scale and PLA/chitosan composite for bone scaffolds. Materials Letters 2018;221:143–146.	☐ อยู่ระหว่างการเรียบเรียง/เขียน (In preparation) ☐ ยื่นเอกสารแล้ว อยู่ระหว่างพิจารณา (Submitted) ☐ อยู่ในระหว่างแก้ไข (Revision) ☐ ได้รับการตอบรับแล้ว อยู่ระหว่างจัดพิมพ์ (Accepted/In press) ☒ จัดพิมพ์แล้ว (Published)	Pon-On W (ผู้ร่วมโครงการย่อย 5)	Pon-On W (ผู้ร่วมโครงการย่อย 5)
23. Charoenphandhu N, Suntornsaratoon P, Sa-Nguanmoo P, Tanajak P, Teerapornpantakit J, Aeimlapa R, Chattipakorn N, Chattipakorn S. Dipeptidyl peptidase 4 inhibitor vildagliptin improves trabecular bone mineral density and microstructure in obese-insulin-resistant rats. Canadian Journal of Diabetes 2018;17:30282–4.	☐ อยู่ระหว่างการเรียบเรียง/เขียน (In preparation) ☐ ยื่นเอกสารแล้ว อยู่ระหว่างพิจารณา (Submitted) ☐ อยู่ในระหว่างแก้ไข (Revision) ☐ ได้รับการตอบรับแล้ว อยู่ระหว่างจัดพิมพ์ (Accepted/In press) ☒ จัดพิมพ์แล้ว (Published)	Charoenphandhu, N. (หัวหน้าโครงการ)	
24. Rodrat M, Wongdee K, Panupintu N, Thongbunchoo J, Teerapornpantakit J, Krishnamra N, Charoenphandhu N. Prolonged exposure to 1,25(OH) ₂ D ₃ and high ionized calcium induces FGF-23 production in intestinal epithelium-like Caco-2 monolayer: a local negative feedback for preventing	☐ อยู่ระหว่างการเรียบเรียง/เขียน (In preparation) ☐ ยื่นเอกสารแล้ว อยู่ระหว่างพิจารณา (Submitted) ☐ อยู่ในระหว่างแก้ไข (Revision) ☐ ได้รับการตอบรับแล้ว อยู่ระหว่างจัดพิมพ์ (Accepted/In press)		Charoenphandhu N (หัวหน้าโครงการ)

ผลงาน	รายละเอียด	First/Corresponding author ที่อยู่ภายใต้โครงการวิจัย	
		First author	Corresponding author
excessive calcium transport. Archives of Biochemistry and Biophysics 2018;640:10–16.	☒ จัดพิมพ์แล้ว (Published)		
25. Nakkrasae L, Jaisin V, Charoenphandhu N. Osmoregulation of pre- and prometamorphic Chinese edible frogs (<i>Hoplobatrachus rugulosus</i>) raised in brackish water relies on body Na ⁺ and Cl ⁻ concentrations, but not urea production. Aquaculture Research 2018;49:1122–1126.	☐ อยู่ระหว่างการเรียบเรียง/เขียน (In preparation) ☐ ยื่นเอกสารแล้ว อยู่ระหว่างพิจารณา (Submitted) ☐ อยู่ในระหว่างแก้ไข (Revision) ☐ ได้รับการตอบรับแล้ว อยู่ระหว่างจัดพิมพ์ (Accepted/In press) ☒ จัดพิมพ์แล้ว (Published)		
26. Lapmanee S, Charoenphandhu J, Teerapornpuntakit J, Krishnamra N, Charoenphandhu N. Agomelatine, venlafaxine, and running exercise effectively prevent anxiety- and depression-like behaviors and memory impairment in restraint stressed rats. PLoS One 2017;12(11):e0187671. doi: 10.1371/journal.pone.0187671.	☐ อยู่ระหว่างการเรียบเรียง/เขียน (In preparation) ☐ ยื่นเอกสารแล้ว อยู่ระหว่างพิจารณา (Submitted) ☐ อยู่ในระหว่างแก้ไข (Revision) ☐ ได้รับการตอบรับแล้ว อยู่ระหว่างจัดพิมพ์ (Accepted/In press) ☒ จัดพิมพ์แล้ว (Published)		
27. Apaijai N, Charoenphandhu N, Ittichaichareon J, Suntornsaratoon P, Krishnamra N, Aeimlapa R, Chattipakorn SC, Chattipakorn N. Estrogen deprivation aggravates cardiac hypertrophy in nonobese Type 2 diabetic Goto-Kakizaki (GK) rats. Biosci Rep 2017;37(5) pii: BSR20170886. doi: 10.1042/BSR20170886.	☐ อยู่ระหว่างการเรียบเรียง/เขียน (In preparation) ☐ ยื่นเอกสารแล้ว อยู่ระหว่างพิจารณา (Submitted) ☐ อยู่ในระหว่างแก้ไข (Revision) ☐ ได้รับการตอบรับแล้ว อยู่ระหว่างจัดพิมพ์ (Accepted/In press) ☒ จัดพิมพ์แล้ว (Published)		

2.1.2 ผลงานตีพิมพ์ในวารสารระดับชาติ

ผลงาน	รายละเอียด	First/Corresponding author ที่อยู่ภายใต้โครงการวิจัย	
		First author	Corresponding author
ผลงานวิจัยและบทความทางวิชาการ 1. นรัตพล เจริญพันธุ์. ถอดบทเรียนด้านการพัฒนาผลิตภัณฑ์ยาและอาหารเสริมแคลเซียมสำหรับผู้สูงอายุ. วารสารราชบัณฑิตสภา	☐ อยู่ระหว่างการเรียบเรียง/เขียน (In preparation) ☐ ยื่นเอกสารแล้ว อยู่ระหว่างพิจารณา (Submitted) ☒ อยู่ในระหว่างแก้ไข (Revision) ☐ ได้รับการตอบรับแล้ว อยู่ระหว่างจัดพิมพ์ (Accepted/In press) ☐ จัดพิมพ์แล้ว (Published)	นรัตพล เจริญพันธุ์ (หัวหน้าโครงการ)	นรัตพล เจริญพันธุ์ (หัวหน้าโครงการ)

2.2 ความก้าวหน้าในการสร้างทีมวิจัย

โครงการวิจัยนี้มีเป้าหมายที่จะสร้างทีมวิจัยอย่างยั่งยืน โดยสร้างนักวิจัยรุ่นใหม่และพัฒนาศักยภาพของนักวิจัยรุ่นกลาง ให้มีความเชี่ยวชาญด้านเมแทบอลิซึมของแคลเซียมและกระดูก รวมถึงสร้างเครือข่ายวิจัยกับนักวิจัยที่มีความเชี่ยวชาญทั้งในประเทศและต่างประเทศ รายละเอียดการสร้างทีมวิจัย มีดังนี้

2.2.1 การสร้างเครือข่ายวิจัยในประเทศ

รายชื่อนักวิจัย	สังกัด	งานวิจัยที่ศึกษาร่วมกัน
1. ดร.กฤติกัญญา จันทร์ไพแสง	ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (ไบโอเทค) สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.)	การพัฒนาผลิตภัณฑ์เสริมแคลเซียมเพื่อถ่ายทอดสู่ภาคอุตสาหกรรม
2. ดร.จรินทร์ ธีระพรพันธุ์กิจ	ภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนครสวรรค์	ศึกษา Biomarker ที่ใช้ในการบ่งชี้ภาวะของการสะสมแคลเซียมในร่างกาย
3. ดร.สพญ.วัชรภรณ์ ตียะสัตย์กุลโกวิท	ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	งานด้านพยาธิสรีรวิทยาของกระดูก ในภาวะที่ร่างกายได้รับโซเดียมมากเกินไป
4. ดร.กรกมล เลิศสุวรรณ	ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล	ศึกษาความสัมพันธ์ของธาตุเหล็กต่อการดูดซึมแคลเซียม
5. ผศ. ดร.พิเชต ค่อยถ้วน	ภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	ศึกษาความสัมพันธ์ของสารสกัดจากแก้วมังกรต่อการดูดซึมแคลเซียม
6. รศ. ดร.กรรณิการ์ วงศ์ดี	คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา	งานด้านพยาธิสรีรวิทยาของกระดูก เพื่อเข้าใจกลไกการควบคุมสมดุลแคลเซียมในร่างกาย
7. ผศ. ดร.วีรพัฒน์ พลอัน	ภาควิชาฟิสิกส์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	งานทางด้านวัสดุศาสตร์ เพื่อพัฒนาการสร้างกระดูกเทียมสำหรับใช้ในการรักษากระดูกที่แตกหัก
8. ผศ. ดร.ละเอียด นาคกระแสน์	ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น	แคลเซียมเมแทบอลิซึมในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ เช่น การผลิตปลาและเพาะเลี้ยงกบพันธุ์ที่สามารถรับประทานได้
9. ผศ. ดร.จันทริมา เจริญพันธุ์	ภาควิชาสรีรวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์	ศึกษาความสัมพันธ์ของความเครียดกับการสูญเสียมวลกระดูก
10. ดร.ปาหนัน สุนทรสารทูล	ศูนย์นวัตกรรมทางการแพทย์ บริษัท ไทยยูเนี่ยน โฟรเซ่น โปรดักส์ จำกัด (มหาชน)	การได้รับแคลเซียมเสริมในภาวะต่าง ๆ เช่น ภาวะปกติ ตั้งครรภ์/ให้นม กับเสริมสร้างกระดูก
11. ดร. นพ.ณัฐพล ภาณุพันธุ์	ภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล	ศึกษาความสัมพันธ์ของโรคกระดูกต่อการทำงานของเซลล์ออสติโอไซต์

2.2.2 การสร้างเครือข่ายวิจัย

2.2.2.1 การสร้างเครือข่ายวิจัยในประเทศไทย

นอกจากความร่วมมือด้านการวิจัยภายในประเทศแล้ว ทางทีมวิจัยยังสร้างเครือข่ายความร่วมมือกับนักวิจัยในไทยและในต่างประเทศ เพื่อร่วมกันพัฒนางานวิจัยรวมถึงบุคลากรด้านการวิจัย

1. เมื่อวันที่ 15 มกราคม 2563 ศ. ดร. นพ.นรุตพล เจริญพันธุ์ และ ดร.ปาหนัน สุนทรสารทูล (หัวหน้าโครงการย่อยที่ 2) ร่วมต้อนรับคณะนักวิจัยจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) ที่มาเข้าร่วมหารือเกี่ยวกับงานวิจัยเพื่อขยายความร่วมมือการวิจัย



2. เมื่อวันที่ 15 กุมภาพันธ์ 2562 ศ. ดร. นพ.นรุตพล เจริญพันธุ์, รศ. ดร.กรรณิการ์ วงศ์ดี, ดร.ปาหนัน สุนทรสารทูล (หัวหน้าโครงการย่อยที่ 2), ดร. สพญ.วัชรารณ ดิยะสัตย์กุลโกวิท (หัวหน้าโครงการย่อยที่ 4) ร่วมกับ ดร. นพ.ณัฐพล ภาณุพินธุ (นักวิจัยของหน่วยวิจัยด้านแคลเซียมและกระดูก คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล) และนักศึกษาปริญญาโท ได้ประชุมกับนักวิจัยของสถาบันวิจัยแสงซินโครตรอน (องค์การมหาชน) เพื่อขยายความร่วมมือการวิจัย ในด้านการใช้เทคนิคแสงซินโครตรอนในการศึกษาโครงสร้างทางจุลภาคของเนื้อเยื่อกระดูก



3. เมื่อวันที่ 8 ตุลาคม 2561 ดร. สพญ.วัชรารณ ดิยะสัตย์กุลโกวิท (หัวหน้าโครงการย่อยที่ 4) ร่วมกับ ดร. นพ.ณัฐพล ภาณุพินธุ (นักวิจัยของหน่วยวิจัยด้านแคลเซียมและกระดูก คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล) และนักศึกษาปริญญาโท ได้ไปสร้างความร่วมมือด้านงานวิจัยกับสถาบันวิจัยแสงซินโครตรอน (องค์การมหาชน) เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของกระดูก



2.2.2.2 การสร้างเครือข่ายวิจัยในต่างประเทศ

1. เมื่อวันที่ 15 มกราคม 2563 Prof. David N. Sheppard (School of Physiology and Pharmacology, University of Bristol) ได้มาบรรยายพิเศษในหัวข้อ “Cystic Fibrosis: Restoring Function to Faulty Channels with Small Molecules” ที่ภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
2. เมื่อวันที่ 6-15 เมษายน 2562 ศ. ดร. นพ.นรุตพล เจริญพันธุ์ และ รศ. ดร.กรรณิการ์ วงศ์ดี ได้เดินทางไปพบ Prof. David N. Sheppard (School of Physiology and Pharmacology, University of Bristol) ณ University of Bristol ประเทศสหราชอาณาจักร เนื่องจาก น.ส.นิธิภัค ธรรมายน นักศึกษาปริญญาเอกโครงการพัฒนาเครือข่ายวิจัยนานาชาติ ได้รับคัดเลือกให้ได้รับทุนเดินทางไปประเทศอังกฤษ ภายใต้การสนับสนุนโดย Newton Fund-PhD Travel grants for supervisor 2018/19 โดย น.ส.นิธิภัค ได้เดินทางร่วมกับอาจารย์ที่ปรึกษาหลัก เพื่อสร้างความร่วมมือด้านงานวิจัยกับ Prof. Sheppard ให้มีความต่อเนื่อง โดย น.ส.นิธิภัค ได้ศึกษาดูงานที่ University of Bristol เป็นช่วงสั้น ๆ คือวันที่ 1-14 เมษายน 2562 นอกจากนี้ ยังถือเป็นการนิเทศ นักศึกษาปริญญาเอก คปก. คือ นางสาวมยุรี รอดรัตน์ เพื่อติดตามความก้าวหน้าเกี่ยวกับงานวิจัยด้าน electrophysiology ที่ศึกษาร่วมกันกับ Prof. David N. Sheppard
3. เมื่อวันที่ 25 ตุลาคม-4 พฤศจิกายน 2561 ศ. ดร. นพ.นรุตพล เจริญพันธุ์ และ รศ. ดร.กรรณิการ์ วงศ์ดี ได้เดินทางไปเยี่ยมนักศึกษาปริญญาเอก คปก. คือ นางสาวมยุรี รอดรัตน์ และหารือเกี่ยวกับการทำ PhD Double degree ระหว่างมหาวิทยาลัยมหิดล และ University of Bristol รวมถึงหารือความก้าวหน้าเกี่ยวกับงานวิจัยด้าน electrophysiology ที่ศึกษาร่วมกันกับ Prof. David N. Sheppard (School of Physiology and Pharmacology, University of Bristol) ณ University of Bristol ประเทศสหราชอาณาจักร
4. ดร. นพ.ณัฐพล ภาณุพันธุ์ ได้รับคัดเลือกให้เข้าร่วมงานประชุมวิชาการ “IAP for Health Young Physician Leaders programme and the World Health Summit 2018” วันที่ 11-16 ตุลาคม 2561 เมือง Berlin ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี
5. เมื่อวันที่ 16 มกราคม 2561 Prof. David N. Sheppard (School of Physiology and Pharmacology, University of Bristol) ได้มาบรรยายพิเศษในหัวข้อ “Cystic fibrosis: restoring function to defective chloride channels with small molecules” ที่ภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
6. เมื่อวันที่ 24 สิงหาคม-4 กันยายน 2560 ทีมวิจัยได้เดินทางไปเยี่ยมนักศึกษาปริญญาเอก คปก. คือ นางสาววลัยลักษณ์ จันทระจิตร และหารือความก้าวหน้าเกี่ยวกับงานวิจัยด้าน electrophysiology ที่ศึกษาร่วมกันกับ Prof. David N. Sheppard (School of Physiology and Pharmacology, University of Bristol) ณ University of Bristol ประเทศสหราชอาณาจักร

2.2.3 การพัฒนากำลังคนด้านการวิจัยและบัณฑิตศึกษา

2.2.3.1 การส่งเสริมให้อาจารย์ใหม่/นักวิจัยใหม่เข้าร่วมกลุ่มวิจัย

- อาจารย์ ดร. นพ.ณัฐพล ภานุพิสุทธิ์
(อาจารย์ภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล)
- อาจารย์ ดร.จรินทร์ อีระพรพันธุ์กิจ
(อาจารย์ภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร)
- อาจารย์ ดร.พิศเรศ คุ่มถ้วน
(อาจารย์ภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์)
- อาจารย์ ดร.กรกมล เลิศสุวรรณ
(อาจารย์ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล)
- อาจารย์ ดร. สพญ.วัชรภรณ์ ตริยะสัจกุลโกวิท
(อาจารย์ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)

2.2.3.2 การเป็นนักวิจัยที่ปรึกษา (mentor)

ทุนพัฒนาศักยภาพในการทำงานวิจัยของอาจารย์รุ่นใหม่ สกว.

- อาจารย์ ดร.จรินทร์ อีระพรพันธุ์กิจ
(ภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร)
- ผศ. ดร.วิชุดา แสงสว่าง
(ภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล)
- ผศ. ดร.รัชกฤต ศรีเกื้อ
(ภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล)
- ผศ. ดร.พิศเรศ คุ่มถ้วน
(ภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์)
- อาจารย์ ดร. สพญ.วัชรภรณ์ ตริยะสัจกุลโกวิท
(ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)

2.2.3.3 การควบคุมวิทยานิพนธ์ระดับบัณฑิตศึกษา (เฉพาะที่เป็น major advisor)

ที่	ชื่อ-นามสกุล	ระดับการศึกษา / ทุนการศึกษา	หลักสูตร
1.	น.ส.รัชนีวรรณ เอี่ยมลาภะ	ปริญญาเอก (ทุนเรียนดี)	สรีรวิทยา (นานาชาติ)
2.	น.ส.วลัยลักษณ์ จันทระจิตร	ปริญญาเอก (คปก.)	สรีรวิทยา (นานาชาติ)
3.	น.ส.มยุรี รอดรัตน์	ปริญญาเอก (คปก.)	สรีรวิทยา (นานาชาติ)
4.	น.ส.นิธิภัค ธรรมายน	ปริญญาเอก	เวชศาสตร์ระดับโมเลกุล
5.	น.ส.ศุภิตรา นามโฮง	ปริญญาโท	สรีรวิทยาการออกกำลังกาย (นานาชาติ)
6.	น.ส.เกษราภรณ์ นามมูลตรีปัดตา	ปริญญาโท	สรีรวิทยา (นานาชาติ)
7.	น.ส.ศุภกานต์ สุกสุวรรณวิทย์	ปริญญาโท	สรีรวิทยาการออกกำลังกาย (นานาชาติ)

2.2.4 การเป็นวิทยากร/การเข้าร่วมประชุมวิชาการ

2.2.4.1 การเป็นวิทยากร/ผู้ทรงคุณวุฒิ

1. ศ. ดร. นพ.นรุตพล เจริญพันธุ์ เป็นวิทยากรบรรยายหัวข้อเรื่อง “Microstructural bone defects in diabetes mellitus and hypertension: studies in the rodents by bone histomorphometry and synchrotron radiation X-ray tomographic microscopy” ในงานประชุมวิชาการนานาชาติ The 37th International Conference of the Microscopy Society of Thailand (MST37) วันที่ 25–28 กุมภาพันธ์ 2563 จ.นครราชสีมา
2. ศ. ดร. นพ.นรุตพล เจริญพันธุ์ เป็นวิทยากรบรรยายหัวข้อเรื่อง “A journey from lab bench to market: Case study from calcium-fortified product development and commercialization” ในงานประชุมวิชาการนานาชาติ The 7th Burapha University International Conference on Interdisciplinary Research วันที่ 27–29 พฤศจิกายน 2562 จ.ชลบุรี
3. ศ. ดร. นพ.นรุตพล เจริญพันธุ์ เป็นวิทยากรบรรยายหัวข้อเรื่อง “เวชกรรมตรงเหตุจะช่วยให้กระดูกแข็งแรงได้หรือไม่” ในงานประชุมวิชาการ Precision Medicine in Thailand 4.0 เวชกรรมตรงเหตุในประเทศไทยยุค 4.0 วันที่ 6–8 สิงหาคม 2562 กรุงเทพฯ
4. ศ. ดร. นพ.นรุตพล เจริญพันธุ์ เป็นวิทยากรปาฐกถา อวย เกตุสิงห์ หัวข้อเรื่อง “Innovative Products from Physiological Research” ในงานประชุมวิชาการ สรีรวิทยาสมาคม ครั้งที่ 46 วันที่ 19 ธันวาคม 2561 จ.นครราชสีมา
5. ศ. ดร. นพ.นรุตพล เจริญพันธุ์ เป็นวิทยากรบรรยายหัวข้อเรื่อง “Fibroblast growth factor-23 as a novel regulator of calcium and bone metabolism” ในงานประชุมวิชาการนานาชาติ Asia Pacific Paediatric Endocrine Society (APPEs 2018) ครั้งที่ 10 วันที่ 7–10 ธันวาคม 2561 จ.เชียงใหม่
6. ศ. ดร. นพ.นรุตพล เจริญพันธุ์ บรรยายพิเศษหัวข้อเรื่อง “การพัฒนาผลิตภัณฑ์เสริมแคลเซียมสำหรับผู้ให้นมบุตรและผู้สูงอายุ” ต่อที่ประชุมสำนักวิทยาศาสตร์ ราชบัณฑิตสภา วันที่ 3 ตุลาคม 2561 ณ กรุงเทพมหานคร

2.2.4.2 การนำเสนอผลงานวิจัยแบบปากเปล่า/โปสเตอร์

1. Oral presentation in English: Sooksawanwit S, Lertsuwan K, Saovaros Svasti, Panupinthu N, **Charoenphandhu N.** “Effects of mild-intensity exercise on iron overloading status and calcium metabolism in thalassemic mice” at the 47th Physiological Society of Thailand 2019 Annual Meeting, Bangkok, Thailand December 19–21, 2019.
2. Invited speaker in English: **Charoenphandhu N.** “Osteoporosis in hypertension” at The 1st Asia Pacific Workshop and Conference on Molecular Medicine 2019, Denpasar-Bali, Indonesia, July 2–5, 2019.
3. Invited speaker in English: **Wongdee K.** “Diabetes and bone health” at The 1st Asia Pacific Workshop and Conference on Molecular Medicine 2019, Denpasar-Bali, Indonesia, July 2–5, 2019.
4. Poster presentation in English: Jantarajit W, Rodrat M, Ng D, Harvey B, Wilkinson W, Charoenphandhu N, Sheppard D. “Ivacaftor alleviates CFTR inhibition by the

carbon monoxide-releasing small molecule CORM-2". at the 42nd European Cystic Fibrosis Conference (ECFS2019), Liverpool, UK, June 5–8, 2019.

5. Poster presentation in English: **Charoenphandhu N**, Ratchaneewan A, Saovaros S, Wongdee K. "1,25-Dihydroxyvitamin D₃ partially restores the osteoblast and osteoclast functions of hemizygous beta-globin knockout thalassemia mice" at the 46th Annual European Calcified Tissue Society Congress (ECTS 2019), Budapest, Hungary, May 11–14, 2019.
6. Poster presentation in English: **Wongdee K**, Ratchaneewan A, Charoenphandhu N. "Aggravation of trabecular bone defect in ovariectomized Goto-Kakizaki (GK) type-2 diabetic rats" at the 46th Annual European Calcified Tissue Society Congress (ECTS 2019), Budapest, Hungary, May 11–14, 2019.
7. Oral presentation in English: Promruk W, Tiyasatkulkovit W, Chaimongkolnukul K, Kengkoom K, Panupinthu N, Charoenphandhu N. "Male spontaneously hypertensive rats develop poor bone mass and strength" at the 46th Annual European Calcified Tissue Society Congress (ECTS 2019), Budapest, Hungary, May 11–14, 2019.
8. Invited speaker in English: **Charoenphandhu N**. "Diabetic osteopathy and impaired intestinal calcium absorption in diabetes mellitus" at the 9th Congress of the Federation of Asian and Oceanian Physiological Societies (FAOPS), Kobe, Japan, March 28–31, 2019.
9. Invited speaker: in English: **Suntornsaratoon P**, Charoenphandhu N. "The effect of high-fat diet on maternal bone microstructure and the metabolic parameters in rats" at the 9th Congress of the Federation of Asian and Oceanian Physiological Societies (FAOPS), Kobe, Japan, March 28–31, 2019.
10. Poster presentation in English: **Tiyasatkulkovit W**, Promruk W, Sawangsalee A, Intarapanich A, Thongbunchoo J, Chaimongkolnukul K, Kengkoom K, Panupinthu N, Charoenphandhu N. "Upregulation of osteoclastogenic markers and the impaired bone microstructure and bone strength in hypertensive rats" at the 9th Congress of the Federation of Asian and Oceanian Physiological Societies (FAOPS), Kobe, Japan, March 28–31, 2019.
11. Poster presentation in English: Nammultriputtar K, Lertsuwan K, Charoenphandhu N. "Differential effects of Fe²⁺ and Fe³⁺ on the proliferation and differentiation of osteoblasts" at the 9th Congress of the Federation of Asian and Oceanian Physiological Societies (FAOPS), Kobe, Japan, March 28–31, 2019.
12. Poster presentation in English: Khuituan P, K-Da S, Bannob K, Hayeeawaema F, Wichienchot S, Peerakietkhajorn S, Charoenphandhu N. "Dragon fruit oligosaccharide ingestion enhances mouse intestinal motility" at the 9th Congress of the Federation of Asian and Oceanian Physiological Societies (FAOPS), Kobe, Japan, March 28–31, 2019.

13. Poster presentation in English: Nanthawuttiaphan S, Charoenphandhu N, Lertsuwan K. “Comparative effects of ferric and ferrous on osteoblast cell survival and function” at Pure and Applied Chemistry International Conference 2019 (Paccon 2019). Bangkok, Thailand, February 7–8, 2019.
14. Poster presentation in English: **Charoenphandhu N**, Rodrat M, Wongdee K. “Inhibition of $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -enhanced intestinal calcium transport after exposure to high apical calcium is mediated by calcium-sensing receptor and fibroblast growth factor-23” at the 45th Annual European Calcified Tissue Society Congress (ECTS 2018), Valencia, Spain, May 26–29, 2018.
15. Oral presentation: in Thai : Promruk W, Tiyasatkulkovit W, Chaimongkolnukul K, Kengkoom K, Panupinthu N, Charoenphandhu N. “Low bone mass and increased tendency to fracture in spontaneously hypertensive rats” ในงานประชุมวิชาการ สรีรวิทยาสมาคม ครั้งที่ 46 วันที่ 19 ธันวาคม 2561 จ.นครราชสีมา
16. Poster presentation: in English : Suntomsaratoon P, Thammayon N, **Charoenphandhu N**. “Impairment of intestinal calcium absorption, bone mineral density and mechanical property in spontaneous hydronephrotic mice” at the 45th Annual European Calcified Tissue Society Congress (ECTS 2018), Valencia, Spain, May 26–29, 2018.
17. Poster presentation: in English : Wongdee K, Aeimlapa R, **Charoenphandhu N**. “Early insulin treatment partially improves bone mechanical properties of Goto-Kakizaki type-2 diabetic rats” at the 45th Annual European Calcified Tissue Society Congress (ECTS 2018), Valencia, Spain, May 26–29, 2018.
18. Poster presentation: in English : **Charoenphandhu N**, Rodrat M, Wongdee K. “High apical calcium diminishes $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -enhanced calcium transport across the epithelium-like Caco-2 monolayer by activating calcium-sensing receptor” at the 95th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, Takamatsu, Japan, March 28–30, 2018.
19. Poster presentation: in English : Wongdee K, Aeimlapa R, **Charoenphandhu N**. “Effects of early insulin treatment on bone microstructure in Goto-Kakizaki type-2 diabetic rats” at the 95th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, Takamatsu, Japan, March 28–30, 2018.
20. Oral presentation: in English : Rodrat M, Wongdee K, **Charoenphandhu N**. “The $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -induced changes in the short-circuit current and transepithelial resistance across epithelium-like Caco-2 monolayer are inhibited by fibroblast growth factor-23” at the 95th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, Takamatsu, Japan, March 28–30, 2018.
21. Oral presentation: in English : Aeimlapa R, Wongdee K, **Charoenphandhu N**. “Insulin treatment does not restore type 2 diabetes-impaired bone microstructure in Goto-Kakizaki rats” at the 95th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, Takamatsu, Japan, March 28–30, 2018.

2.2.5 การจัดอบรมเชิงปฏิบัติการ/สัมมนาพิเศษ

1. จัดการประชุมวิชาการ The 7th COCAB Conference 2020 ในหัวข้อ “Innovation for bone health” วันที่ 29 มกราคม 2563 โรงแรม เดอะ สุโกศล กรุงเทพฯ
2. จัดการสัมมนาพิเศษ ในหัวข้อ “Cystic Fibrosis: Restoring Function to Faulty Channels with Small Molecules” โดย Prof. David N. Sheppard (School of Physiology and Pharmacology, University of Bristol) วันที่ 15 มกราคม 2563 ณ ภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
3. จัดการประชุมวิชาการ The 6th COCAB Conference 2019 ในหัวข้อ “Advance technology platform for calcium and bone innovation” วันที่ 22 สิงหาคม 2562 โรงแรม เดอะ สุโกศล กรุงเทพฯ
4. จัดการประชุมวิชาการ The 5th COCAB Conference 2018 ในหัวข้อ “COCAB-Moving forward for food and drug translational research” วันที่ 21 สิงหาคม 2561 โรงแรม เดอะ สุโกศล กรุงเทพฯ
5. หน่วยวิจัยด้านแคลเซียมและกระดูก จัดสัมมนาพิเศษและอบรมเชิงปฏิบัติการร่วมกับ บริษัท ยีนพลัส จำกัด เรื่อง “Real-time PCR technology and QuantStudio 3 Real-time PCR system” วันที่ 2 กุมภาพันธ์ 2561 ณ ภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
6. จัดการสัมมนาพิเศษ ในหัวข้อ “Cystic fibrosis: restoring function to defective chloride channels with small molecules” โดย Prof. David N. Sheppard (School of Physiology and Pharmacology, University of Bristol) วันที่ 16 มกราคม 2561 ณ ภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

2.2.6 การรับเป็นสถานที่ฝึกงาน เพื่อเพิ่มพูนประสบการณ์วิจัยให้นักศึกษาระดับปริญญาตรี

นิสิตฝึกงาน จากภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2561
จำนวน 2 คน (ระหว่างวันที่ 3 มิถุนายน–19 กรกฎาคม 2562) ได้แก่

1. นางสาวศลิษา สัจจาพัฒน์ รหัสนิสิต 593 20493 23
2. นายภาคภูมิ อัสโร รหัสนิสิต 593 20406 23

นิสิตฝึกงาน จากภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2560
จำนวน 2 คน (ระหว่างวันที่ 1 มิถุนายน–15 กรกฎาคม 2560) ได้แก่

3. นายสิริวิชญ์ อินทรพานิช รหัสนิสิต 573 21893 23
4. นายอนิวัตร สว่างสาละ รหัสนิสิต 573 22063 23

2.3 การนำผลจากโครงการไปใช้ประโยชน์

ผลงานจากโครงการวิจัยได้เผยแพร่ตามสื่อในรูปแบบต่าง ๆ (รายละเอียดโปรดดูในข้อ 3 ผลงานอื่น ๆ) เช่น

1. รายการทางสื่อสังคมออนไลน์ จำนวน 2 ครั้ง
2. หนังสือพิมพ์ จำนวน 11 ครั้ง
3. นิตยสาร และจดหมายข่าวที่มีการเผยแพร่ในวงกว้าง จำนวน 3 ครั้ง
4. เว็บไซต์ข่าว จำนวน 4 ครั้ง
5. วิทยุกระจายเสียง จำนวน 1 ครั้ง

3. กิจกรรมอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องกับ อาทิ รางวัล และการเลื่อนตำแหน่งทางวิชาการของสมาชิกในทีมวิจัย

3.1 การได้รับรางวัล

3.1.1 การได้รับรางวัลของอาจารย์/นักวิจัย

1. ศ. ดร. นพ.นรุตพล เจริญพันธุ์ ได้รับรางวัล “บุคลากรต้นแบบ” เนื่องในโอกาสครบรอบ 50 ปี วันพระราชทานนาม 131 ปี มหาวิทยาลัยมหิดล ประจำปี พ.ศ. 2562
2. รศ. ดร.กรรณิการ์ วงศ์ดี รางวัลนักวิจัยดีเด่น (รุ่นใหม่) มหาวิทยาลัยบูรพา พ.ศ. 2562 กลุ่มสาขาวิทยาศาสตร์สุขภาพ
3. รางวัลผู้ตีพิมพ์เผยแพร่บทความวิจัย/บทความวิชาการ ระดับนานาชาติสูงสุดอันดับที่ 2 ประจำปี พ.ศ. 2561 โดย มหาวิทยาลัยบูรพา วันที่ 19 กรกฎาคม 2562
4. รศ. ดร.กรรณิการ์ วงศ์ดี ได้รับรางวัลรัตนบูรพา สาขาการบริการวิชาการ 2562 โดยมหาวิทยาลัยบูรพา
5. รศ. ดร.กรรณิการ์ วงศ์ดี ได้รับรางวัลผู้ตีพิมพ์เผยแพร่บทความวิจัย/บทความวิชาการ ระดับชาติและนานาชาติ ประจำปี 2561 สูงสุดอันดับที่ 1 ในวาระครบรอบ 10 ปี คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
6. ผศ. ดร.กรกมล เลิศสุวรรณ ได้รับรางวัลสภานักวิจัยแห่งชาติ : รางวัลวิทยานิพนธ์ระดับดี สาขาวิทยาศาสตร์เคมี และเภสัช ประจำปีงบประมาณ 2562 เรื่อง “การค้นพบโปรตีนฟิลูมินวัน ในฐานะโปรตีนจากเซลล์จากไขกระดูกในชั้นสโตรมาลของมนุษย์ชนิดเอชเอสไฟว์ ที่มีฤทธิ์ในการฆ่าเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก” โดยสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) วันที่ 2 กุมภาพันธ์ 2562 ศูนย์นิทรรศการและการประชุมไบเทค
7. ดร.กรกมล เลิศสุวรรณ ได้รับแต่งตั้งให้ดำรงตำแหน่งทางวิชาการระดับ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สาขาวิชาชีวเคมี
8. ศ. ดร. นพ.นรุตพล เจริญพันธุ์ เข้ารับพระราชทานโล่เกียรตินิยมวิจัยอาวุโส สกว. ประจำปีพุทธศักราช 2560 วันที่ 16 ตุลาคม 2561 ณ อาคารชัยพัฒนา สวนจิตรลดา พระราชวังดุสิต
9. ศ. ดร. นพ.นรุตพล เจริญพันธุ์ ได้รับพระราชทานรางวัลมหาวิทยาลัยมหิดล ประจำปีการศึกษา 2560 (สาขาการประดิษฐ์และนวัตกรรม)
10. ศ. ดร. นพ.นรุตพล เจริญพันธุ์ ได้รับประกาศนียบัตร The Major Advisor's Role in Distinguished Thesis Award 2017 (Master Level in Life Science) โดยบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล
11. รศ. ดร.กรรณิการ์ วงศ์ดี ได้รับรางวัลผู้ตีพิมพ์เผยแพร่บทความวิจัย/บทความวิชาการ ระดับชาติและนานาชาติ ประจำปี 2560 สูงสุดอันดับที่ 2 คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
12. ดร.พิศเรศ คุ่ยต่วน ได้รับแต่งตั้งให้ดำรงตำแหน่งทางวิชาการระดับ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สาขาวิชาสรีรวิทยา
13. ศ. ดร. นพ.นรุตพล เจริญพันธุ์ ได้รับการแต่งตั้งเป็นภาควิชาสมาชิก ราชบัณฑิตสภา ประเภทวิทยาศาสตร์สุขภาพ สาขาวิชาสรีรวิทยา สำนักวิทยาศาสตร์
14. ดร.จรินทร์ ธีระพรพันธุ์กิจ ได้รับรางวัล JALAS International Award 2016 โดย Japanese Association for Laboratory Animal Science (JALAS)
15. ดร.ปาทัน สุนทรศารทูล ได้รับรางวัล JALAS International Award 2011 โดย Japanese Association for Laboratory Animal Science (JALAS) 2011



ภาพบนและล่าง : ศ. ดร. นพ.นรุตพล เจริญพันธุ์ เข้ารับพระราชทานโล่เกียรตินิยม ศาสตราจารย์วิจัยดีเด่น และเมธีวิจัยอาวุโส สกว. ประจำปีพุทธศักราช 2559-2560 วันที่ 16 ตุลาคม 2561 ณ อาคารชัยพัฒนา สวนจิตรลดา พระราชวังดุสิต

3.1.2 การได้รับรางวัลของนักศึกษา

1. นางสาวมยุรี รอดรัตน์ (นักศึกษาปริญญาเอก คปภ.) ได้รับรางวัล Best Poster Award: Cell Biology/Physiology/New Therapies/Clinical Trials ในงานประชุม The 42nd European Cystic Fibrosis Conference (ECFS2019), Liverpool, UK, June 5-8, 2019.
2. นางสาวรัชนิวรรณ เอี่ยมลาภะ (นักศึกษาปริญญาเอก) ได้รับรางวัล JALAS International Award 2018 โดย Japanese Association for Laboratory Animal Science (JALAS) ในงาน The 66th Annual Meeting of the Japanese Association for Laboratory Animal Science (JALAS) วันที่ 15-17 พฤษภาคม 2562 ที่เมือง Fukuoka, Japan
3. นางสาวศุภกานต์ สุขสุวรรณวิทย์ ได้รับทุนวิจัย จากมูลนิธิพระบรมราชานุสรณ์พระบาทสมเด็จพระปกเกล้าเจ้าอยู่หัวและสมเด็จพระนางเจ้ารำไพพรรณี ประจำปี 2561

3.2 การเผยแพร่ผลงานวิจัยในสื่อต่าง ๆ เช่น หนังสือพิมพ์ นิตยสาร เว็บไซต์

3.2.1 การเผยแพร่ทางสื่อสังคมออนไลน์

1. นรุตพล เจริญพันธุ์ “แคลเซียมเม็ดหรือผลิตภัณฑ์เสริมอาหารแคลเซียมมีวิธีรับประทานอย่างไร” รายการจุดประกาย ออกอากาศทาง กรุงเทพมหานคร Facebook Live ตอนที่ 2 วันที่ 20 ตุลาคม 2560
2. นรุตพล เจริญพันธุ์ “แคลเซียมเม็ดหรือผลิตภัณฑ์เสริมอาหารแคลเซียมมีวิธีรับประทานอย่างไร” รายการจุดประกาย ออกอากาศทาง กรุงเทพมหานคร Facebook Live ตอนที่ 1 วันที่ 19 ตุลาคม 2560

3.2.2 การเผยแพร่ทางหนังสือพิมพ์

1. สาธิต เทียงวิทยาพร, นรัตพล เจริญพันธุ์ คอลัมน์ “รายงานพิเศษ แอพฯ รักเช่า กระตุ้นกายภาพ” หนังสือพิมพ์ข่าว สด กรอบข่าย วันที่ 23 พฤษภาคม 2562 ปีที่ 29 ฉบับที่ 10403 หน้า 21 (ล่าง)
2. สาธิต เทียงวิทยาพร, นรัตพล เจริญพันธุ์ คอลัมน์ เช็กอัฟกายใจ: “รักเช่า” ฝึกกายภาพป้องกันข้อเข่าเสื่อม” หนังสือพิมพ์เดลินิวส์ กรอบข่าย วันที่ 22 พฤษภาคม 2562 ฉบับที่ 25423 หน้า 22 (ล่างขวา)
3. สาธิต เทียงวิทยาพร, นรัตพล เจริญพันธุ์ วชิรพยาบาลผดุงครรภ์ “รักเช่า” กระตุ้นผู้ป่วยฝึกกายภาพ หนังสือพิมพ์คม ชัด ลึก วันที่ 17 พฤษภาคม 2562 ปีที่ 18 ฉบับที่ 6325 หน้า 11 (ล่างซ้าย)
4. นรัตพล เจริญพันธุ์ คอลัมน์ ด้วยสมองและสองมือ “ม.มหิดล คิดค้นผลิตภัณฑ์เสริมแคลเซียมแม่ให้นมลูก” หนังสือพิมพ์สยามรัฐ วันที่ 10 มกราคม 2562 ปีที่ 69 ฉบับที่ 23937 หน้า 1 (บนขวา)
5. นรัตพล เจริญพันธุ์ คอลัมน์ เอง โซไซตี้ “วิ่งเพื่อสุขภาพกระดูก (2)” หนังสือพิมพ์โพสต์ทูเดย์ วันที่ 6 มกราคม 2561 ปีที่ 15 ฉบับที่ 5448 หน้า B7 (ซ้าย)
6. นรัตพล เจริญพันธุ์ คอลัมน์ เอง โซไซตี้ “วิ่งเพื่อสุขภาพกระดูก (1)” หนังสือพิมพ์โพสต์ทูเดย์ วันที่ 30 ธันวาคม 2560 ปีที่ 15 ฉบับที่ 5441 หน้า B7 (ซ้าย)
7. นรัตพล เจริญพันธุ์ คอลัมน์ เอง โซไซตี้ “เดินเพื่อสุขภาพ” หนังสือพิมพ์โพสต์ทูเดย์ วันที่ 2 กันยายน 2560 ปีที่ 15 ฉบับที่ 5322 หน้า B7 (บนขวา)
8. นรัตพล เจริญพันธุ์ คอลัมน์ ชีวิตดีจีตอล “แนะกินแคลเซียมให้พอดี” หนังสือพิมพ์ เดลินิวส์ วันที่ 30 สิงหาคม 2560 ฉบับที่ 24793 หน้า 22 (ล่างซ้าย)
9. นรัตพล เจริญพันธุ์ คอลัมน์ เอง โซไซตี้ “บริโภคแคลเซียมที่ถูกต้อง (2)” หนังสือพิมพ์โพสต์ทูเดย์ วันที่ 26 สิงหาคม 2560 ปีที่ 15 ฉบับที่ 5315 หน้า B7 (บนขวา)
10. นรัตพล เจริญพันธุ์ คอลัมน์ เอง โซไซตี้ “บริโภคแคลเซียมที่ถูกต้อง (1)” หนังสือพิมพ์โพสต์ทูเดย์ วันที่ 19 สิงหาคม 2560 ปีที่ 15 ฉบับที่ 5308 หน้า B7 (บนขวา)
11. นรัตพล เจริญพันธุ์ “เกล็ดปลานิล ของเหลือสู่แคลเซียม” หนังสือพิมพ์ กรุงเทพธุรกิจ วันที่ 17 สิงหาคม 2560 ปีที่ 30 ฉบับที่ 10556 หน้า 17 (บนขวา), 24

3.2.3 การเผยแพร่ทางนิตยสาร และจดหมายข่าว

1. ศ. นพ.นรัตพล เจริญพันธุ์ คอลัมน์เรื่องจากปก เรื่อง “ผลิตภัณฑ์และวิธีการเสริมแคลเซียมสำหรับแม่ที่อยู่ในระหว่างให้นมบุตร” มหิตลสาร ปีที่ 43 ฉบับที่ 12 หน้า 24-25
2. ศ. นพ.นรัตพล เจริญพันธุ์ คอลัมน์เรื่องจากปก เรื่อง “ประกาศผลรางวัลมหาวิทยาลัยมหิดล ประจำปีการศึกษา 2560” มหิตลสาร ปีที่ 42 ฉบับที่ 9 หน้า 4-5
3. ศ. ดร.นทีทิพย์ กฤษณามระ คอลัมน์ Research Forum เรื่อง ฮอโมนแห่งการเสียสละของแม่นิตยสารประชาคมวิจัย ปีที่ 24 ฉบับที่ 140 หน้า 24-25
4. ศ. นพ.นรัตพล เจริญพันธุ์ คอลัมน์ Expert’s tip เรื่อง Best Bone Health อัปเดตวิธีดูแลกระดูกทุกช่วงวัย นิตยสารชีวจิต วันที่ 16 ธันวาคม 2560 หน้า 52-54

3.2.4 การเผยแพร่ทางเว็บไซต์

1. นรัตพล เจริญพันธุ์ “มหิดล คิดค้นเสริมแคลเซียมแม่ที่อยู่ระหว่างให้นมบุตร” เว็บไซต์กรุงเทพธุรกิจ วันที่ 14 มกราคม 2562 (<https://www.bangkokbiznews.com>)
2. นรัตพล เจริญพันธุ์ “ม.มหิดล คิดค้นเสริมแคลเซียมสำหรับแม่ให้นมบุตร” เว็บไซต์ Goodlife update.com วันที่ 9 มกราคม 2562 (<https://goodlifeupdate.com>)
3. นรัตพล เจริญพันธุ์ “คิดค้นแคลเซียมสำหรับแม่ที่ให้นมบุตร” เว็บไซต์ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการสร้างเสริมสุขภาพ วันที่ 9 มกราคม 2562 (<https://www.thaihealth.or.th>)

4. นรุตพล เจริญพันธุ์ “ม.มหิดล คิดค้น ผลิตภัณฑ์และเสริมแคลเซียมแม่ที่อยู่ระหว่างให้ทุนบุตร” หนังสือพิมพ์บ้านเมือง วันที่ 8 มกราคม 2562 (<https://www.banmuang.co.th>)
5. นรุตพล เจริญพันธุ์ “สกว. หนุนสร้างความรู้เท่าทันด้านสุขภาพกระดูกและแคลเซียม” เว็บไซต์ The World News วันที่ 23 มีนาคม 2561 (<https://theworldnews.net/th-news>)
6. นรุตพล เจริญพันธุ์ “เมธีวิจัยอาวุโส สกว. จัดเวทีเสวนากลุ่มเพื่อรับฟังความคิดเห็นจากทุกภาคส่วน เพื่อสร้างความรู้เท่าทันด้านสุขภาพกระดูกและการรับประทานแคลเซียมของคนไทย ด้านเอกชนยินดีร่วมเป็นเครือข่ายเผยแพร่ข้อมูลเชิงลึกที่ถูกต้องสู่สาธารณะ” หนังสือพิมพ์ประชาไท วันที่ 23 มีนาคม 2561 (<https://prachatai.com/>)
7. นรุตพล เจริญพันธุ์ “แนะกินแคลเซียมให้พอดี” สำนักสารนิเทศ สำนักงานปลัดกระทรวงสาธารณสุข วันที่ 31 สิงหาคม 2560 (www.pr.moph.go.th)
8. นรุตพล เจริญพันธุ์ “เผยโฉมงานวิจัย แคลเซียมอัดเม็ด จากเกล็ดปลา” หนังสือพิมพ์ผู้จัดการออนไลน์ วันที่ 16 สิงหาคม 2560 (www.manager.co.th)

3.2.5 การเผยแพร่ทางวิทยุกระจายเสียง

1. นรุตพล เจริญพันธุ์ “ม.มหิดล วิจัยผลิตภัณฑ์และวิธีการเสริมแคลเซียมสำหรับแม่ที่อยู่ระหว่างให้ทุนบุตร” Innovation for Life สถานีวิทยุกระจายเสียง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี คลื่นวิทยุ 89.5 MHz

3.3 งานสนับสนุนกิจกรรมของ สกสว.

กิจกรรม สกสว.	ผู้เข้าร่วมกิจกรรม
5 มีนาคม 2563 ผู้ทรงคุณวุฒิเข้าร่วมรับฟังและแลกเปลี่ยนความคิดเห็นในกิจกรรมติดตามความก้าวหน้าของนักวิจัยรุ่นใหม่ผ่าน Multi Mentoring System (MMS) 4-ภาคกลาง จัดที่ มหาวิทยาลัยมหิดล ศาลายา จ.นครปฐม	ศ. ดร. นพ.นรุตพล เจริญพันธุ์
31 มกราคม 2563 ผู้ทรงคุณวุฒิเข้าร่วมรับฟังและแลกเปลี่ยนความคิดเห็นในกิจกรรมติดตามความก้าวหน้าของนักวิจัยรุ่นใหม่ผ่าน Multi Mentoring System (MMS) 7-ภาคใต้ จ.สงขลา	ศ. ดร. นพ.นรุตพล เจริญพันธุ์
27 มกราคม 2563 ผู้ทรงคุณวุฒิเข้าร่วมรับฟังและแลกเปลี่ยนความคิดเห็นในกิจกรรมติดตามความก้าวหน้าของนักวิจัยรุ่นใหม่ผ่าน Multi Mentoring System (MMS) 4-ภาคกลาง จ.กรุงเทพฯ	ศ. ดร. นพ.นรุตพล เจริญพันธุ์
16-25 สิงหาคม 2562 ร่วมแสดงนิทรรศการ ในงานมหกรรมวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ประจำปี 2562 ของสำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (สกสว.) ในหัวข้อ “กินอยู่ รู้จักแคลเซียม” 1. ทานแคลเซียมอย่างไร ? ให้ถูกวิธี 2. การประยุกต์ใช้แคลเซียมจากเกล็ดปลาเพื่อเป็นต้นแบบผลิตภัณฑ์อาหารเสริมแคลเซียมสูงเพื่อสุขภาพกระดูกที่แข็งแรง	ศ. ดร. นพ.นรุตพล เจริญพันธุ์ ศ. ดร.นทีทิพย์ กฤษณมาระ ดร. ปาหนัน สุนทรสารทูล
18 กรกฎาคม 2562 เป็นผู้ทรงคุณวุฒิเพื่อทบทวนร่างแผนด้านวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม 2563-2565 ณ โรงแรมเซ็นจูรี่ พาร์ค ดินแดง กรุงเทพมหานคร	ศ. ดร. นพ.นรุตพล เจริญพันธุ์
10 กรกฎาคม 2562 เลขานุการประชุมเชิงปฏิบัติการเพื่อพัฒนาแผนด้านวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม ใน	ศ. ดร. นพ.นรุตพล เจริญพันธุ์

กิจกรรม สกว.	ผู้เข้าร่วมกิจกรรม
สาขาการแพทย์และสาธารณสุข ณ อาคาร SM Tower สำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (สกสว.)	
9-11 มกราคม 2562 ผู้ดำเนินรายการในการสัมมนาเชิงปฏิบัติการ เรื่อง “เขียนงานวิจัยอย่างไรให้ขายได้” การประชุมนักวิจัยรุ่นใหม่...พบ...เมธีวิจัยอาวุโส สกว. ครั้งที่ 18 ณ โรงแรมเดอะรีเจนท์ ซะอำบีช รีสอร์ท จังหวัดเพชรบุรี	ศ. ดร. นพ.นริศพล เจริญพันธุ์
9-11 มกราคม 2562 บรรณาธิการในคณะทำงานสรุปเนื้อหาการประชุม การประชุมนักวิจัยรุ่นใหม่...พบ...เมธีวิจัยอาวุโส สกว. ครั้งที่ 18 ณ โรงแรมเดอะรีเจนท์ ซะอำบีช รีสอร์ท จังหวัดเพชรบุรี	ศ. ดร. นพ.นริศพล เจริญพันธุ์ รศ. ดร.กรรณิการ์ วงศ์ดี
27 พฤศจิกายน 2561 ผู้ทรงคุณวุฒิเข้าร่วมรับฟังและแลกเปลี่ยนความคิดเห็นในกิจกรรม ติดตามความก้าวหน้าของนักวิจัยรุ่นใหม่ผ่าน Multi Mentoring System (MMS) และกิจกรรมประชุมกลุ่มย่อย (Focus group) ณ โรงแรมเดอะไทด์ รีสอร์ท จ.ชลบุรี	ศ. ดร. นพ.นริศพล เจริญพันธุ์ รศ. ดร.กรรณิการ์ วงศ์ดี
19-21 พฤศจิกายน 2561 ผู้ทรงคุณวุฒิเข้าร่วมรับฟังและแลกเปลี่ยนความคิดเห็นในโครงการ “ติตอาวูให้นักวิจัยรุ่นใหม่ ผ่าน Multi Mentoring System รุ่นที่ 1” ณ มหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาเขตศาลายา	ศ. ดร. นพ.นริศพล เจริญพันธุ์ รศ. ดร.กรรณิการ์ วงศ์ดี
4 สิงหาคม 2561 ผู้ทรงคุณวุฒิเข้าร่วมรับฟังและแลกเปลี่ยนความคิดเห็นในโครงการ “การปรับปรุงและพัฒนาแอปพลิเคชันบนอุปกรณ์เคลื่อนที่ของสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย”	ศ. ดร. นพ.นริศพล เจริญพันธุ์
28 กุมภาพันธ์ 2561 ผู้ทรงคุณวุฒิ ในกิจกรรม “ฝ่ายวิชาการ สกว. สัญจร ครั้งที่ 2” สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย	ศ. ดร. นพ.นริศพล เจริญพันธุ์
10-12 มกราคม 2561 ผู้ดำเนินรายการในการสัมมนาเชิงปฏิบัติการ เรื่อง “การเขียนบทความวิชาการและการเขียนทุนวิจัย” การประชุมนักวิจัยรุ่นใหม่...พบ...เมธีวิจัยอาวุโส สกว. ครั้งที่ 17 ณ โรงแรมเดอะรีเจนท์ ซะอำบีช รีสอร์ท จังหวัดเพชรบุรี	ศ. ดร. นพ.นริศพล เจริญพันธุ์
10-12 มกราคม 2561 บรรณาธิการในคณะทำงานสรุปเนื้อหาการประชุม การประชุมนักวิจัยรุ่นใหม่...พบ...เมธีวิจัยอาวุโส สกว. ครั้งที่ 17 ณ โรงแรมเดอะรีเจนท์ ซะอำบีช รีสอร์ท จังหวัดเพชรบุรี	ศ. ดร. นพ.นริศพล เจริญพันธุ์ รศ. ดร.กรรณิการ์ วงศ์ดี
15 พฤศจิกายน 2560 ผู้ทรงคุณวุฒิเข้าร่วมรับฟังและแลกเปลี่ยนความคิดเห็นเพื่อพัฒนาความร่วมมือในการประชุม สกว. พบประชาคมวิจัย	ศ. ดร. นพ.นริศพล เจริญพันธุ์

4. ความเห็นของผู้วิจัย

การดำเนินงานวิจัยเป็นไปตามแผนงานที่วางไว้

ลงนาม..... นพ.นรุตพล เจริญพันธุ์
(ศาสตราจารย์ ดร. นพ.นรุตพล เจริญพันธุ์)
หัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน



OPEN

Regulation of vitamin D system in skeletal muscle and resident myogenic stem cell during development, maturation, and ageing

Ratchakrit Srikuea¹✉, Muthita Hirunsai² & Narattaphol Charoenphandhu^{1,3,4,5}

Skeletal muscle exhibits enormous plasticity throughout life, however, less is known regarding how the stages of growth regulate its local vitamin D system. Herein, we investigated serum 25(OH)D₃ and Ca²⁺ levels along with the vitamin D system in skeletal muscle and resident myogenic stem cells of male C57BL/6 mice during development, maturation, and ageing. Compared with development, significant increases in vitamin D receptor (VDR) protein expression in mature and aged muscles were associated with increased serum 25(OH)D₃ and centronucleated fibres, respectively. The substantial increase in VDR protein expression in aged muscle was also related to reduced downstream mTOR signalling protein expression which was more pronounced in fast-glycolytic compared to slow-oxidative muscles. Intriguingly, serum Ca²⁺ and vitamin D-metabolising enzyme (CYP27B1 and CYP24A1) levels in skeletal muscle were not different across age. In primary cell culture, nuclear VDR protein was expressed in undifferentiated skeletal muscle stem cells (SMSC) after 1α,25(OH)₂D₃ treatment. Additionally, a diminished response to 1α,25(OH)₂D₃ was observed with age as there was a rapid commitment of SMSC towards differentiation under growth-stimulating conditions. Collectively, understanding the local vitamin D system in skeletal muscle could help develop effective interventions for vitamin D supplementation to improve skeletal muscle mass and function during ageing.

Vitamin D research has primarily focused on the role of Ca²⁺ homeostasis regulation in classical vitamin D target tissues, i.e., bone, intestine, and kidney^{1,2}. However, non-calcemic action of vitamin D has been suggested as expression of vitamin D receptor (VDR) and vitamin D-metabolising enzymes (CYP27B1 and CYP24A1) has been reported in non-classical vitamin D target tissues, i.e., brain and heart³ and skeletal muscle⁴. This emerging evidence has suggested possible novel functions of vitamin D besides calcium homeostasis as well as how the vitamin D system is regulated in these non-classical vitamin D target tissues.

In skeletal muscle, VDR protein has been reported to be expressed in both skeletal muscle cells and tissue, including mouse skeletal muscle cell line (C2C12)^{4–9}, primary skeletal muscle cells^{10,11}, human skeletal muscle cells^{12–14}, rodent skeletal muscle^{4,6,9,10,15–18}, and human skeletal muscle^{12,14,19–21}. In addition, vitamin D system-related proteins (VDR, CYP27B1, and CYP24A1) are expressed in regenerating muscle along with expression of VDR in skeletal muscle stem cells (SMSC) after injury⁴, suggesting a contribution of this resident myogenic stem cell (namely satellite cell) in the local vitamin D system during skeletal muscle regeneration. However, less is known regarding the regulation of the vitamin D system in skeletal muscle in a fibre-type specific manner. Data in the predominantly fast-twitch tibialis anterior revealed alterations in vitamin D system regulation during recovery from injury⁴.

¹Department of Physiology, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok, 10400, Thailand. ²Department of Biopharmacy, Faculty of Pharmacy, Srinakharinwirot University, Nakhon Nayok, 26120, Thailand. ³Center of Calcium and Bone Research (COCAB), Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok, 10400, Thailand. ⁴Institute of Molecular Biosciences, Mahidol University, Nakhon Pathom, 73170, Thailand. ⁵The Academy of Science, The Royal Society of Thailand, Dusit, Bangkok, 10300, Thailand. ✉e-mail: ratchakrit.sri@mahidol.ac.th

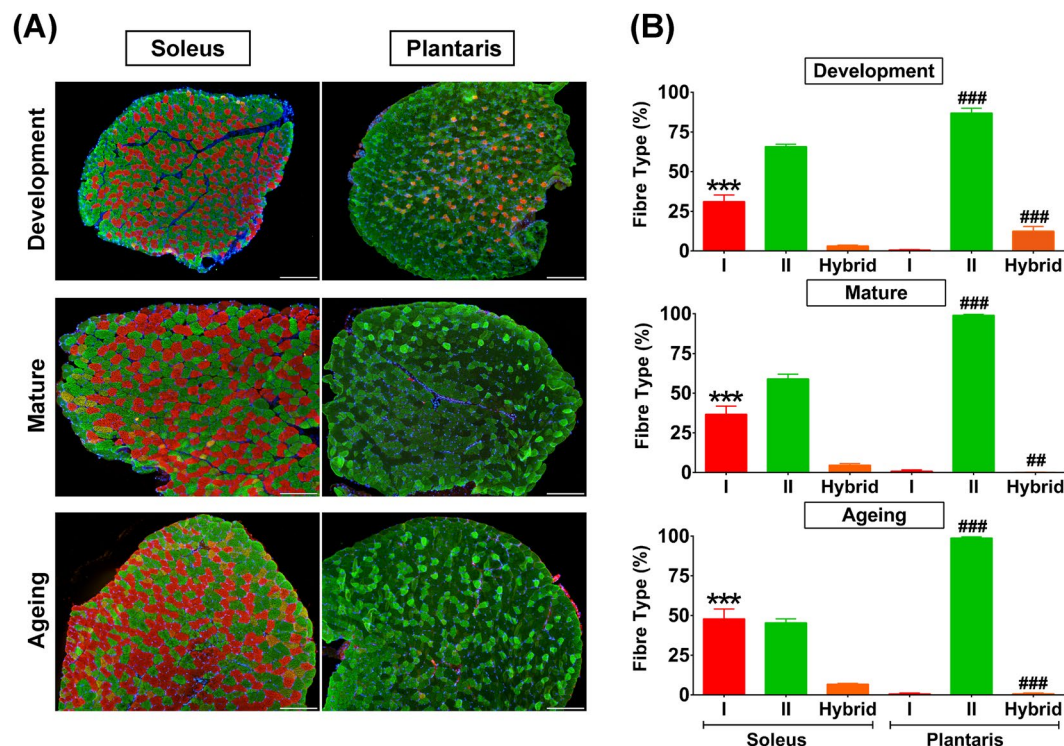


Figure 1. Fibre type composition in developmental, mature, and aged soleus and plantaris muscles. (A) Representative images of fibre type composition in soleus and plantaris muscles at different stages of growth. Type I fibres (red), type II fibres (green), and hybrid fibres (orange). Images were taken at $\times 100$ magnification, scale bars = 200 μm . (B) Quantitative analysis of fibre type composition during development, maturation, and ageing (n = 6 mice/group). *** $p < 0.0001$ compared to type I fibre of plantaris muscle, # $p < 0.001$ and ### $p < 0.0001$ compared to hybrid fibre/type II fibre of soleus muscle.

Skeletal muscle consists of slow-oxidative (type I) and fast-glycolytic (type II) muscle fibres, which are characterized based on the abundant of slow and fast myosin heavy chain (MHC) expression in rodents and humans²². These characteristics of muscle fibre type directly affect skeletal muscle function, i.e., force production, speed of contraction, and fatigue resistance²³. Providing clinical relevance, the vitamin D₃ deficiency (serum 25(OH) D₃ < 20 ng/ml)²⁴ has been associated with muscle weakness in older adults who have a vitamin D deficiency in order to improve skeletal muscle function^{27–30}. However, whether regulation of the vitamin D system in skeletal muscle is differentially regulated among fibre types during ageing is currently unknown.

Additionally, specific expression of the VDR protein in SMSC during muscle regeneration has been demonstrated⁴. This finding suggests a potential connection of non-calcemic action of vitamin D on the regulation of SMSC activity. Skeletal muscle is a post-mitotic tissue and it relies on SMSC function³¹. During development, rapid skeletal muscle growth also represents an active stage for SMSC³². In contrast, SMSC becomes quiescent during maturation but can be activated upon muscle injury³³. Ageing reduces the proliferative potential of SMSC which can decrease the regenerative capacity of aged muscle³⁴. However, the effect of age on vitamin D regulation of SMSC function at distinct stages of muscle growth is an unresolved question. Previously, the active form of vitamin D₃ [1 α ,25(OH)₂D₃] has been shown to regulate the expression of VDR and vitamin D-metabolising enzymes (CYP27B1 and CYP24A1) in primary muscle cells¹⁰. A limitation of that study was that, the primary muscle cells were isolated from 3 week-old developing muscle. Hence, it is difficult to extrapolate these findings to mature and aged SMSCs.

Therefore, the purpose of this study was to investigate the local vitamin D system in slow-oxidative (type I) and fast-glycolytic (type II) muscles and its associations with skeletal muscle plasticity during development, maturation, and ageing. Additionally, we examined the expression of VDR and vitamin D-metabolising enzymes (CYP27B1 and CYP24A1) in SMSCs isolated from developmental, mature, and aged muscles to reveal how age affects the SMSC response to vitamin D₃.

Results

Fibre type composition in slow-oxidative and fast-glycolytic muscles during development, maturation, and ageing. To assess the potential contribution of muscle fibre type on the regulation of the vitamin D system, we studied the slow-oxidative (soleus) and fast-glycolytic (plantaris) muscles at different stages of growth as illustrated in Fig. 1A. The ageing group in this study represents an early stage of ageing to control for age-related comorbid conditions that could confound the interpretation of the results on vitamin D system in skeletal muscle. The quantitative analysis revealed a remarkable significant difference of type I muscle

fibre distribution, which was higher in the soleus than plantaris muscle at development ($31.12 \pm 1.74\%$ vs. $0.65 \pm 0.11\%$, $p < 0.0001$), maturation ($36.64 \pm 2.08\%$ vs. $0.91 \pm 0.31\%$, $p < 0.0001$), and ageing ($47.89 \pm 2.48\%$ vs. $0.58 \pm 0.20\%$, $p < 0.0001$) (Fig. 1B). In contrast, type II muscle fibre frequency was significantly higher in plantaris than soleus muscle in development ($86.90 \pm 1.24\%$ vs. $65.75 \pm 1.52\%$, $p < 0.0001$), maturation ($99.02 \pm 0.31\%$ vs. $58.95 \pm 3.07\%$, $p < 0.0001$), and ageing ($98.76 \pm 0.29\%$ vs. $45.38 \pm 2.47\%$, $p < 0.0001$) (Fig. 1B). Nevertheless, hybrid muscle fibre frequency (co-expressions of fast MHC and slow MHC isoforms) was significantly higher in the plantaris compared to soleus muscle during development ($12.45 \pm 1.21\%$ vs. $3.14 \pm 0.59\%$, $p < 0.0001$). This difference was reversed during advanced age where the plantaris muscle had a significantly lower proportion of hybrid fibres than the soleus muscle during maturation ($0.10 \pm 0.05\%$ vs. $4.67 \pm 0.94\%$, $p < 0.001$) and ageing ($0.66 \pm 0.21\%$ vs. $6.73 \pm 0.53\%$, $p < 0.0001$) (Fig. 1B). Altogether, these difference show distinct skeletal muscle properties between soleus and plantaris muscles at different stages of growth.

Characteristics of slow-oxidative and fast-glycolytic muscles at different stages of growth. Although the different in fibre type composition in slow-oxidative (soleus) and fast-glycolytic (plantaris) muscles was demonstrated, skeletal muscle plasticity during the different stages of growth are comparable. Muscle wet weight was significantly increased in parallel with body weight in soleus ($p < 0.001$) and plantaris ($p < 0.001$) muscles during development to maturation (Fig. 2A). There was no further increase in muscle wet weight during maturation to ageing (Fig. 2A), despite a progressive increase in body weight (Fig. 2B). To support findings in tissue wet weight, histological analysis across ages (Fig. 2C) revealed muscle fibre CSA was significantly increased during maturation ($p < 0.001$) and ageing ($p < 0.001$) compared to development in both muscles (Fig. 2D). Additionally, fibre size, as demonstrated by histogram analysis showed differences between soleus and plantaris muscles during maturation and ageing (Fig. 2E). The frequency distribution of soleus muscle fibre size was concentrated at a median level. This distribution pattern differs from the plantaris, which showed a more widespread fibre size distribution, suggesting higher variation of muscle fibre size. In contrast to the changes of fibre size, the number of fibres in the soleus and plantaris were not significantly different at any age investigated (Fig. 2F).

Serum levels of 25(OH)D₃/D₂, 3-Epi-25(OH)D₃/D₂, and total Ca²⁺ during advanced age. In this study, mice were fed with a standard diet containing 205 IU/100 g vitamin D₃ throughout the study period, however, serum 25(OH)D₃ level (17.7 ± 1.4 ng/ml) during development was lower than the normal range for vitamin D status (~ 30 ng/ml). Serum 25(OH)D₃ level was significantly greater during maturation (29.1 ± 1.2 ng/ml) ($p < 0.05$) and ageing (31.7 ± 4.4 ng/ml) ($p < 0.05$) compared to development (Fig. 3A). In contrast to 25(OH)D₃, 3-Epi-25(OH)D₃ was barely detected in serum samples and no significant differences between growth stages was ascertained (Fig. 3B). Neither 25(OH)D₂ nor 3-Epi-25(OH)D₂ were detected in any samples. Additionally, there was no association between serum 25(OH)D₃ and total Ca²⁺ level at different stages of growth (Fig. 3C).

Associations of serum 25(OH)D₃ level and skeletal muscle plasticity. According to the changes of serum 25(OH)D₃ during different stages of growth, 25(OH)D₃ level had a positive relationship with slow-oxidative (soleus) muscle fibre CSA ($r = 0.75$ $p = 0.0003$) and fast-glycolytic (plantaris) muscle fibre CSA ($r = 0.58$ $p = 0.0113$) (Fig. 3D). Moreover, serum 25(OH)D₃ level positively correlated with the percentage of type II fibres in plantaris muscle ($r = 0.68$ $p = 0.002$) but not type I fibres of soleus muscle ($r = 0.38$ $p = 0.121$) (Fig. 3E).

Vitamin D system in slow-oxidative and fast-glycolytic muscles during advanced age. To clarify whether skeletal muscle plasticity affects the vitamin D system in skeletal muscle, the expression of vitamin D system-related proteins (VDR, CYP27B1, and CYP24A1) in slow-oxidative (soleus) and fast-glycolytic (plantaris) muscles at different stages of growth were investigated. During development, VDR protein was expressed at low level in the soleus muscle but significantly increased during maturation (7.1 ± 2.5 -fold) ($p < 0.01$) and ageing (12.3 ± 3.6 -fold) ($p < 0.001$) (Fig. 4A). However, VDR protein was barely detectable in the plantaris muscle during development but significantly increased during maturation (4.2 ± 1.4 -fold) ($p < 0.05$) and increased at a substantial level during ageing (17.5 ± 6.6 -fold) ($p < 0.001$) (Fig. 4B). These temporal changes in VDR protein expression were coordinated with VDR protein expression in kidney and intestine which are vitamin D-sensitive tissues (Fig. 4C,D). Additionally, VDR protein expression in soleus ($r = 0.68$ $p = 0.002$) and plantaris ($r = 0.65$ $p = 0.004$) muscles positively correlated with serum 25(OH)D₃ level. Contrary to VDR protein expression, vitamin D-metabolising enzyme (CYP27B1 and CYP24A1) protein expression was not significantly different at any age in soleus muscle (Fig. 5A) and plantaris muscle (Fig. 5B).

Expression and localisation of vitamin D system in slow-oxidative and fast-glycolytic muscles. The expression and localisation of vitamin D system-related proteins (VDR, CYP27B1, and CYP24A1) in slow-oxidative (soleus) and fast-glycolytic (plantaris) muscles during development that could impact vitamin D action during advanced age are illustrated in Fig. 6. VDR protein could be detected in centronucleated muscle fibres in soleus muscle (arrows). In contrast, co-localisation of VDR and CYP24A1 protein expression (arrowheads) was observed in plantaris muscle (Fig. 6A). CYP27B1 protein expression in soleus and plantaris muscles tended to localise in the mitochondrial compartment (arrowheads) as indicated by OxPhos staining and was also expressed in the extracellular matrix compartment (arrows) (Fig. 6B).

VDR protein expression in aged muscle associated with increased centronucleated muscle fibres and decreased phosphorylation of downstream mTOR signalling proteins. To elucidate how VDR protein expression was substantially increased in the aged muscle, the percentage of centronucleated muscle fibres (Fig. 7A) that could be observed during ageing was evaluated. The results revealed that the percentage of centronucleated muscle fibres was significantly greater in soleus muscle ($0.38 \pm 0.08\%$ vs. $1.47 \pm 0.26\%$,

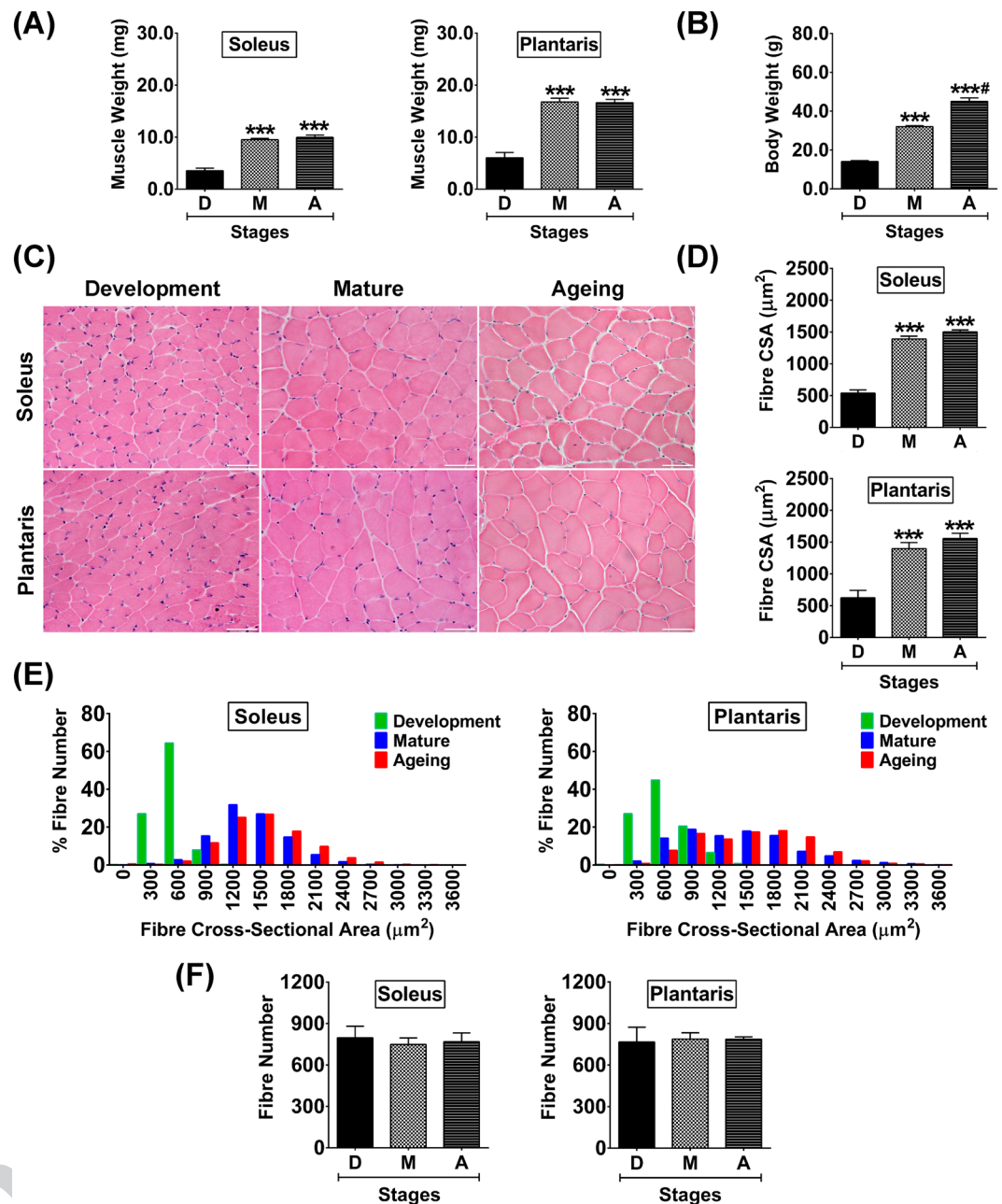


Figure 2. Muscle weight, body weight, and histological characteristics of soleus and plantaris muscles during development, maturation, and ageing. (A) Muscle weight, (B) Body weight, (C) Representative hematoxylin and eosin-stained images of developmental, mature, and aged muscles, (D) Quantitative analysis of fibre cross-sectional area (CSA), (E) Histogram analysis of muscle fibre size distribution, and (F) Quantitative analysis of fibre number. Images were taken at $\times 400$ magnification, scale bars = $50\ \mu\text{m}$. *** $p < 0.001$ compared to developmental stage, # $p < 0.001$ compared to maturation stage ($n = 6$ mice/group).

$p < 0.01$) and plantaris muscle ($0.51 \pm 0.13\%$ vs. $1.73 \pm 0.23\%$, $p < 0.01$) when development and ageing were compared (Fig. 7B). These results suggest an increase in SMSC activity to maintain muscle integrity during ageing that might contribute to an increase in VDR protein expression in the aged muscle. In addition, phosphorylation of downstream mTOR signalling proteins that regulate skeletal muscle protein synthesis³⁵ were different in development and ageing. Phosphorylation of 4E-BP1 was significantly decreased during ageing to a greater degree in the plantaris muscle (1.00 ± 0.02 -fold vs. 0.13 ± 0.04 -fold, $p < 0.001$) as compared to the soleus muscle (1.00 ± 0.08 -fold vs. 0.54 ± 0.12 -fold, $p < 0.01$) (Fig. 7C). Additionally, phosphorylation of p70 S6K1 protein was significantly decreased only in aged plantaris muscle (1.00 ± 0.07 -fold vs. 0.42 ± 0.09 -fold, $p < 0.001$) but not aged soleus muscle (1.00 ± 0.03 -fold vs. 0.68 ± 0.18 -fold, $p > 0.05$) (Fig. 7D). The significantly lower of 4E-BP1 and p70 S6K1 phosphorylation in aged plantaris muscle suggest a decrease in protein synthesis that might augment the substantial elevation of VDR protein expression compared to aged soleus muscle.

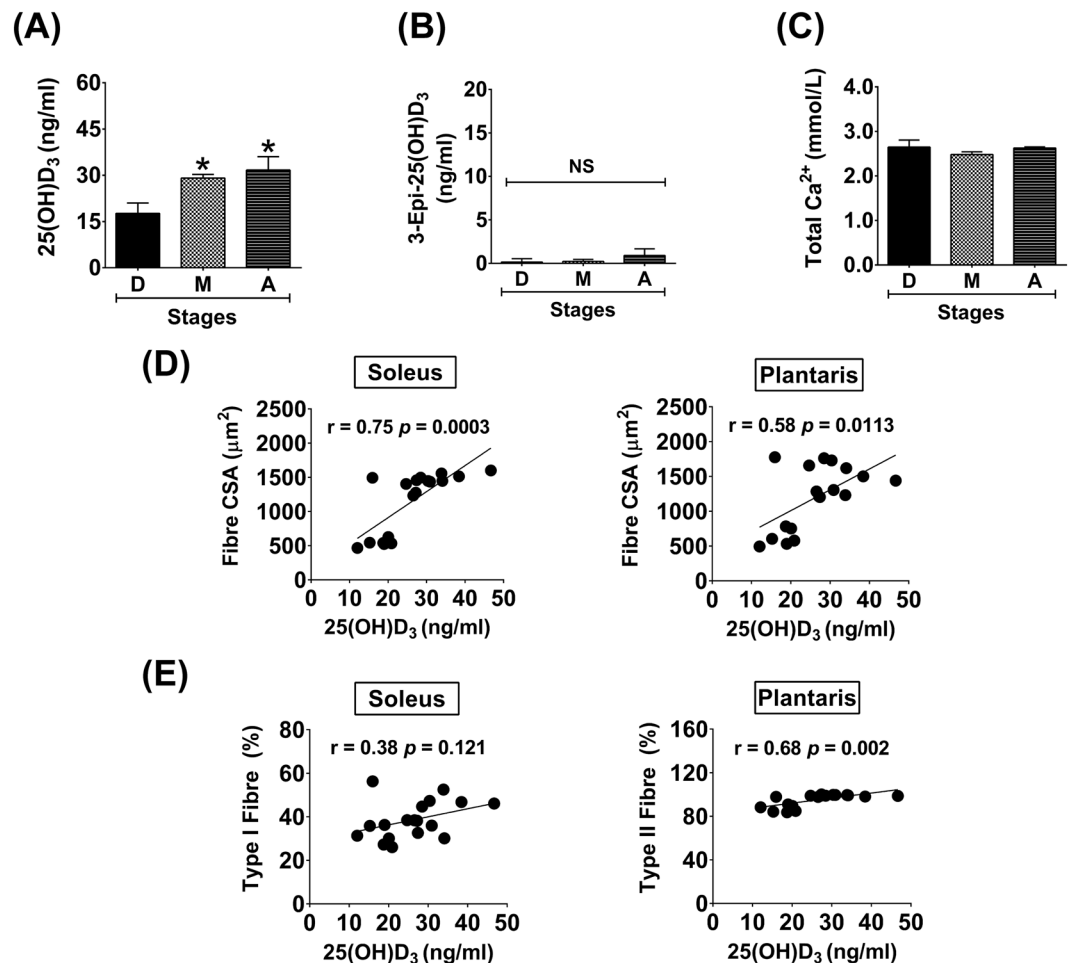


Figure 3. Serum levels of 25(OH)D₃, 3-Epi-25(OH)D₃, and total Ca²⁺ during advanced age and the association of 25(OH)D₃ level and skeletal muscle plasticity. (A) 25(OH)D₃, (B) 3-Epi-25(OH)D₃, (C) Total Ca²⁺, (D) Correlation analysis between 25(OH)D₃ level and fibre CSA, and (E) Correlation analysis between 25(OH)D₃ level and fibre type. * $p < 0.05$ compared to developmental stage ($n = 6$ mice/group). NS indicates not statistically significant.

Expression of vitamin D system-related proteins in SMSC. To further validate a role for the vitamin D system in skeletal muscle tissue, the expression of vitamin D system-related proteins (VDR, CYP27B1, and CYP24A1) were investigated in isolated SMSCs. The purity of SMSC in this study was determined using MyoD staining to evaluate the expression of this myogenic regulatory factor in cultured SMSC (Fig. 8A). The results demonstrated that cultured SMSC (MyoD⁺ cells) derived from different growth stages expressed VDR protein in responses to 1 α ,25(OH)₂D₃ treatment (Fig. 8B). In addition, CYP24A1 protein, responsible for the catabolism of vitamin D in target cells, was expressed and co-localised with VDR protein in developmental, mature, and aged SMSCs treated with 1 α ,25(OH)₂D₃ (Fig. 8B). In contrast, SMSCs expressed CYP27B1 protein mainly in the cytoplasmic compartment (arrows) and no co-localisation with VDR protein after 1 α ,25(OH)₂D₃ treatment was observed (Fig. 8C). These results suggest that SMSC is a source of vitamin D system-related proteins in skeletal muscle and this resident myogenic stem cell could be a direct target of vitamin D₃ during skeletal muscle plasticity changes that occur in advanced age.

Decreased responsiveness of SMSC to 1 α ,25(OH)₂D₃ during advanced age. To evaluate the response of SMSC to vitamin D₃ during advanced age, VDR protein expression in response to 1 α ,25(OH)₂D₃ treatment was examined in SMSCs derived from developmental, mature, and aged muscles (Fig. 9A). The results revealed that VDR protein expression in developmental SMSC was significantly increased after treatment with 1 α ,25(OH)₂D₃ compared to vehicle-treated control (2.0 ± 0.3 -fold) ($p < 0.05$). In contrast, the responses to 1 α ,25(OH)₂D₃ treatment was diminished in mature SMSC (1.1 ± 0.1 -fold) and aged SMSC (1.3 ± 0.2 -fold) as compared with their respective vehicle-treated controls. To support this notion, the expression and localisation of VDR protein in developmental SMSC in response to vehicle treatment or 1 α ,25(OH)₂D₃ treatment conditions are illustrated in Fig. 9B. An increase in nuclear localisation of VDR protein expression was demonstrated after 1 α ,25(OH)₂D₃ treatment (arrows). Taken together, it appears that SMSC is a vitamin D₃-sensitive cell, however, the response of SMSC to the active form of vitamin D₃ declined during advanced age.

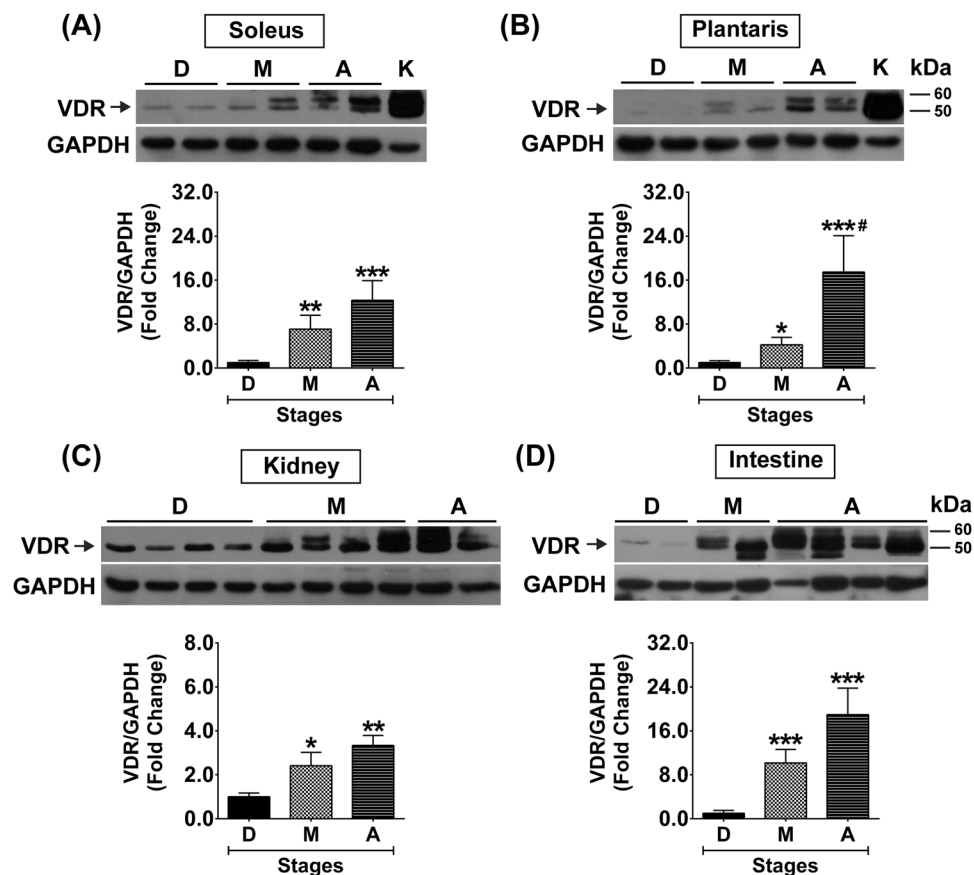


Figure 4. VDR protein expression in soleus and plantaris muscles, kidney, and intestine during development, maturation, and ageing. VDR protein expression (A) soleus muscle and (B) plantaris muscle ($n = 6$ mice/group). K = Kidney samples serve as a positive control for VDR protein expression in soleus and plantaris muscles. (C,D) VDR protein expression in the vitamin D-sensitive tissues including (C) kidney ($n = 6$ mice/group) and (D) intestine ($n = 5-6$ mice/group). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ compared to developmental stage, # $p < 0.05$ compared to maturation stage. The highly sensitive VDR (D-6) antibody was used to detect VDR protein expression and GAPDH served as loading control. VDR protein expression level was normalized with GAPDH protein expression that obtained from the same gel and experiment.

State-specific VDR protein expression in undifferentiated SMSC. Nuclear VDR protein was non-uniformly expressed in SMSCs (MyoD⁺ cells) under growth-stimulating conditions (Fig. 9B), suggesting that the expression of VDR protein in response to $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ treatment could be state-specific. To support this hypothesis, SMSCs strongly expressed VDR protein specifically in the undifferentiated state (Myogenin⁻ cells) as illustrated in Fig. 9C (arrows). This result supports the notion that VDR protein expression is down-regulated in SMSCs undergoing differentiation (Myogenin⁺ cells). Based on this finding, the differentiation characteristics of developmental, mature, and aged SMSCs were investigated to evaluate the diminished response of SMSC under $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ treatment during advanced age. The characteristics of SMSCs (MyoD⁺ cells) derived from the different growth stages under growth-stimulating conditions are illustrated in Fig. 10A. Results reveal that developmental SMSC had a significantly lower number of nascent myotubes (≥ 3 MyoD⁺ nuclei fusion) (Fig. 10B) and fusion index (number of ≥ 3 MyoD⁺ nuclei fusion/total MyoD⁺ nuclei) (Fig. 10C) than mature and aged SMSCs. These results suggest that developmental SMSC can retain an undifferentiated state under growth-stimulating conditions which corresponded with a substantial increase in VDR protein expression after $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ treatment. In contrast, mature and aged SMSCs had a significantly greater number of nascent myotubes ($p < 0.01$ and $p < 0.05$) (Fig. 10B) and a fusion index ($p < 0.05$) (Fig. 10C) compared to developmental SMSC which was associated with a diminished response to $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. However, the rapid commitment of SMSC to differentiation was reduced in aged SMSC compared to mature SMSC ($p < 0.05$) (Fig. 10D) as illustrated by MHC protein expression (Fig. 10E). This result was supported by a lower number of aged SMSC compared to mature SMSC (decreased to $58.0 \pm 11.2\%$) in response to growth-stimulating conditions ($p < 0.05$). Altogether, these findings suggest that state-specific VDR protein expression in SMSC could be a primary factor that influencing vitamin D₃ action in skeletal muscle during advanced age.

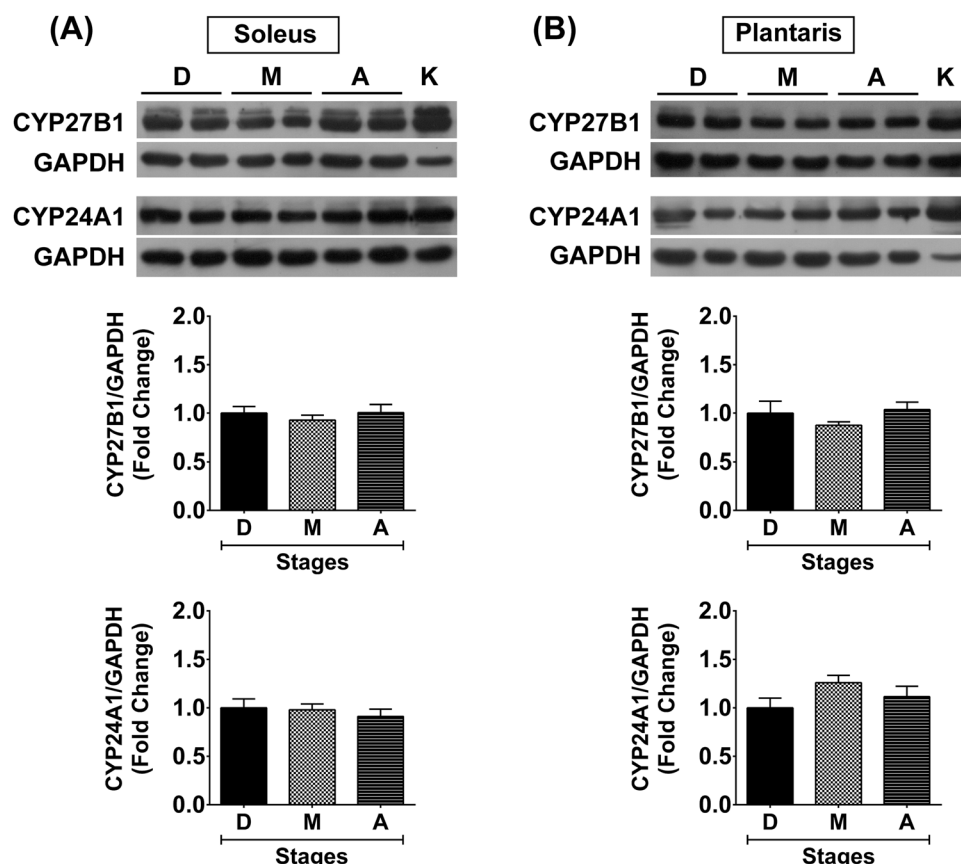


Figure 5. Expression of vitamin D-metabolising enzymes in soleus and plantaris muscles during development, maturation, and ageing. CYP27B1 and CYP24A1 protein expression (A) soleus muscle and (B) plantaris muscle. GAPDH served as loading control (n = 6 mice/group), K = Kidney sample (positive control). CYP27B1 and CYP24A1 protein expression level was normalized with GAPDH protein expression that obtained from the same gel and experiment.

Discussion

This study provides insight about the vitamin D system in skeletal muscle at a tissue and cellular level during advanced age. The primary findings of this work are 1) VDR protein was barely detected in developmental muscle but substantially increased in aged muscle which was more pronounced in fast-glycolytic compared to slow-oxidative muscles; 2) levels of vitamin D-metabolising enzymes (CYP27B1 and CYP24A1) in skeletal muscle were not affected by local VDR protein expression or circulating 25(OH)D₃ level; and 3) SMSC expressed vitamin D system-related proteins, however, there was a diminished response of SMSC to 1 α ,25(OH)₂D₃ during advanced age due to a rapid commitment of SMSC towards differentiation under growth-stimulating conditions.

Currently, the non-calcemic actions of vitamin D on skeletal muscle have been reported, i.e., development, strength, ageing, and repair³⁶. In addition, there is supportive evidence in the beneficial effects of vitamin D on elderly population where muscle mass and function is compromised^{20,30}. However, how vitamin D exerts its action and regulates the vitamin D system in skeletal muscle remains unknown. Previous studies have demonstrated undetectable levels of VDR protein in skeletal muscle tissue^{37,38}. Subsequent investigations reported that VDR protein expression was detected in normal muscle^{10,12,18,21} and substantially increased during skeletal muscle regeneration^{4,6}. The latter findings suggest that skeletal muscle plasticity is associated with SMSC function during repairing process, which could be a primary factor regulating VDR protein expression in skeletal muscle. However, whether vitamin D system-related proteins are differentially regulated in slow-oxidative and fast-glycolytic muscles currently unknown.

In this study, slow-oxidative muscle (soleus) expressed VDR protein at low level during development, which progressively increased during advanced age. In contrast, fast-glycolytic muscle (plantaris) had barely detectable levels of VDR protein expression compared to soleus muscle. However, we observed significant increases in VDR protein expression in plantaris muscle during transition from maturation to ageing. These findings on differential expression of VDR protein between soleus and plantaris muscles during ageing suggest an intrinsic factor related to fibre type composition could contribute to the regulation of VDR protein expression. To support this notion, soleus muscle contains a majority of type I muscle fibres that are associated with a higher number of SMSCs than plantaris muscle^{39,40}. SMSCs are a potential source of VDR in skeletal muscle tissue according to a previous investigation⁴. Therefore, the differences in SMSC content during postnatal development could be responsible for the higher level of VDR protein expression in soleus muscle. However, an increase in SMSC activity in plantaris

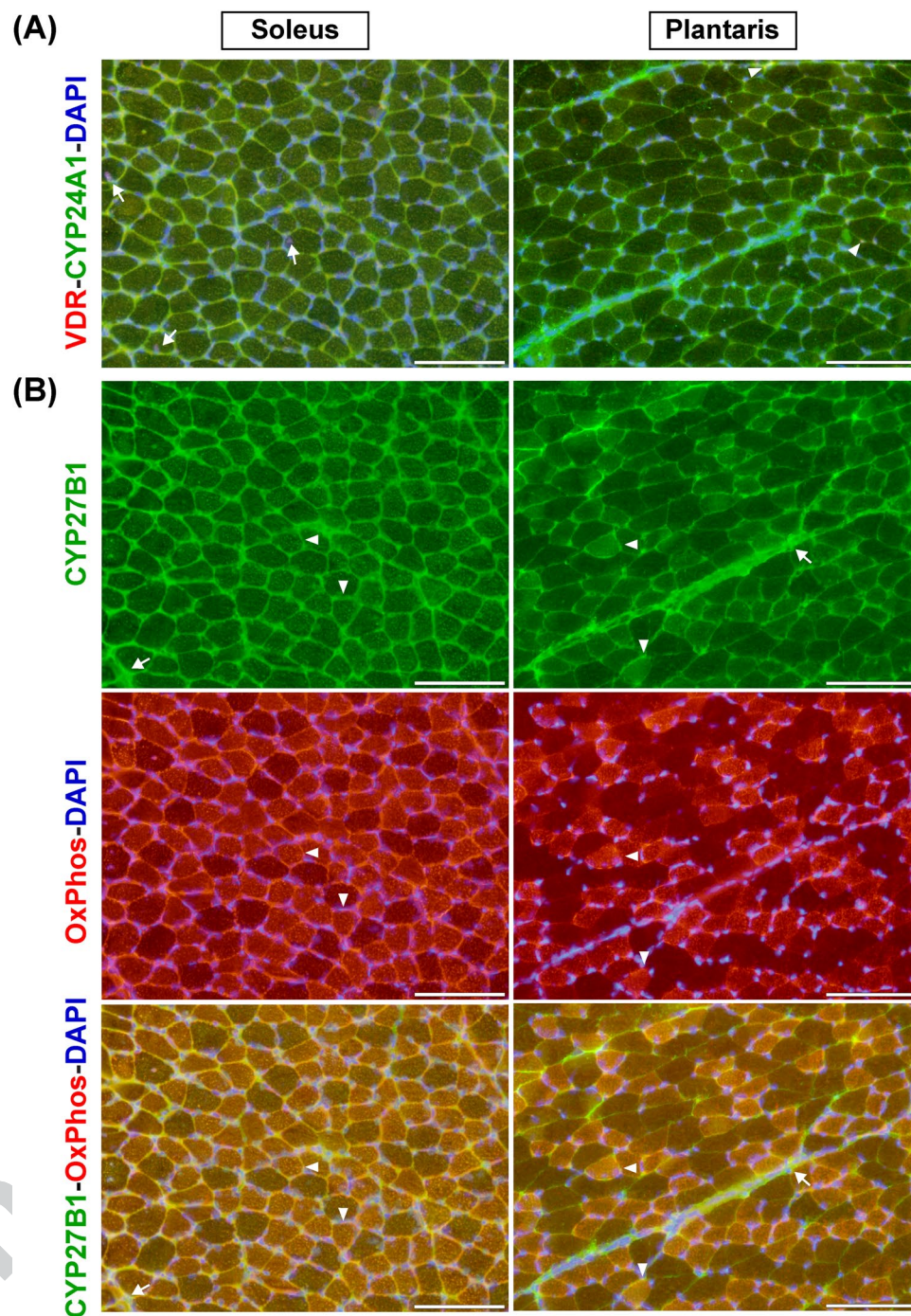


Figure 6. Expression and localisation of vitamin D system-related proteins in soleus and plantaris muscles. **(A)** VDR and CYP24A1 protein expression; VDR protein was expressed in centronucleated muscle fibres of soleus muscle (arrows) while co-localisation of VDR and CYP24A1 protein expression (arrowheads) was observed in plantaris muscle. **(B)** CYP27B1 and OxPhos protein expression; CYP27B1 protein mainly expressed in mitochondrial compartment (arrowheads) as indicated by OxPhos staining and expressed in extracellular matrix (arrows) in soleus and plantaris muscles. The representative images of VDR-CYP24A1-DAPI and CYP27B1-OxPhos-DAPI staining are illustrated using serial-sections. DAPI was used to delineate nuclear localisation of the stained-sections. Images were taken at $\times 200$ magnification, scale bars = $100\mu\text{m}$.

muscle to compensate for type II muscle fibre atrophy during ageing could lead to a substantial increase in VDR protein expression. Since SMSC are required to maintain the myonuclear domain (ratio of cytoplasmic volume to myonuclear number) in atrophic muscle⁴¹. Additionally, a significant reduction of downstream mTOR signalling protein expression (decreased phosphorylations of 4E-BP1 and p70 S6K1 proteins) was more pronounced in plantaris compared to soleus muscle during ageing supporting a decreased in protein synthesis that requires

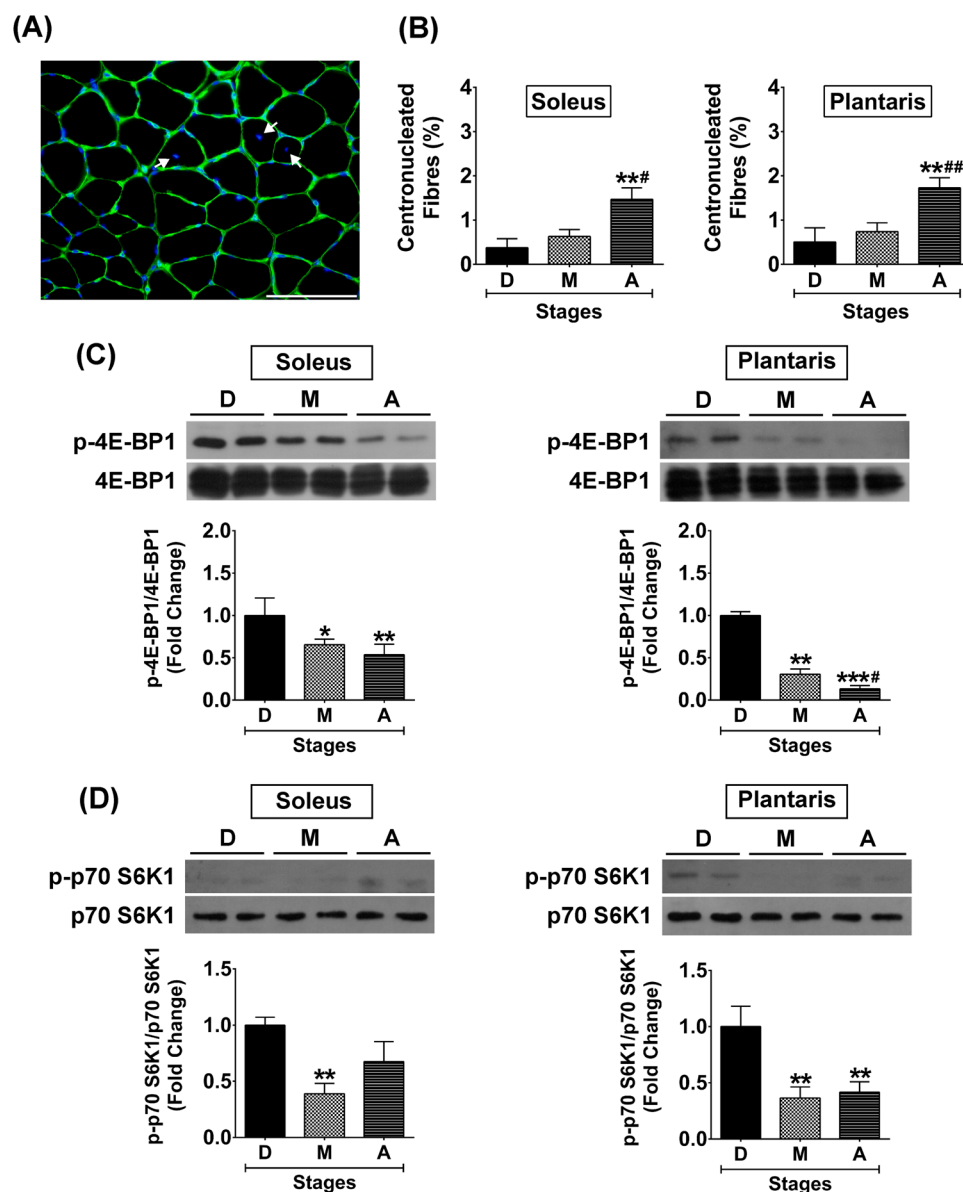


Figure 7. Centronucleated muscle fibres and downstream mTOR signalling protein expression in soleus and plantaris muscles during development, maturation, and ageing. **(A)** Representative image of centronucleated muscle fibres, **(B)** Percentage of centronucleated muscle fibres at different stages of growth, **(C)** Phosphorylation of 4E-BP1/4E-BP1 protein expression level, and **(D)** Phosphorylation of p70 S6K1/p70 S6K1 protein expression level. Image was taken at $\times 400$ magnification, scale bar = 50 μ m. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ compared to developmental stage and * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared to maturation stage ($n = 6$ mice/group).

increased SMSC activity. Altogether, increased SMSC activity could augment VDR protein expression in plantaris compared to soleus muscle during ageing.

Even though our results provide compelling evidence about the up-regulation of VDR protein expression in aged muscle, SMSC as a potential source of VDR expression in skeletal muscle, declined after birth (P0) and underwent quiescence during postnatal development (P21)³². Reductions in SMSC content and activity could lead to decreased VDR protein expression in skeletal muscle during postnatal development compared to neonatal stage as previously reported¹⁰. Intriguingly, the increased VDR protein expression observed in aged muscle compared to developmental muscle is paradoxical. To explain the current findings, an increase in VDR protein expression in aged muscle was associated with increased centronucleated muscle fibres, suggesting an increased number of activated SMSC. SMSC activation in aged muscle might recapitulate SMSC activity during neonatal stages would result in substantially increased VDR protein expression.

To prevent age-related concomitant diseases that could affect an interpretation of the results on vitamin D system in skeletal muscle, the age of mice in this study represents an early stage of ageing without signs of sarcopenia (age-associated loss of muscle mass and function). Therefore, the potential reduction of VDR protein expression during sarcopenia that occurs in very old age should not be excluded. Lower muscle VDR protein expression

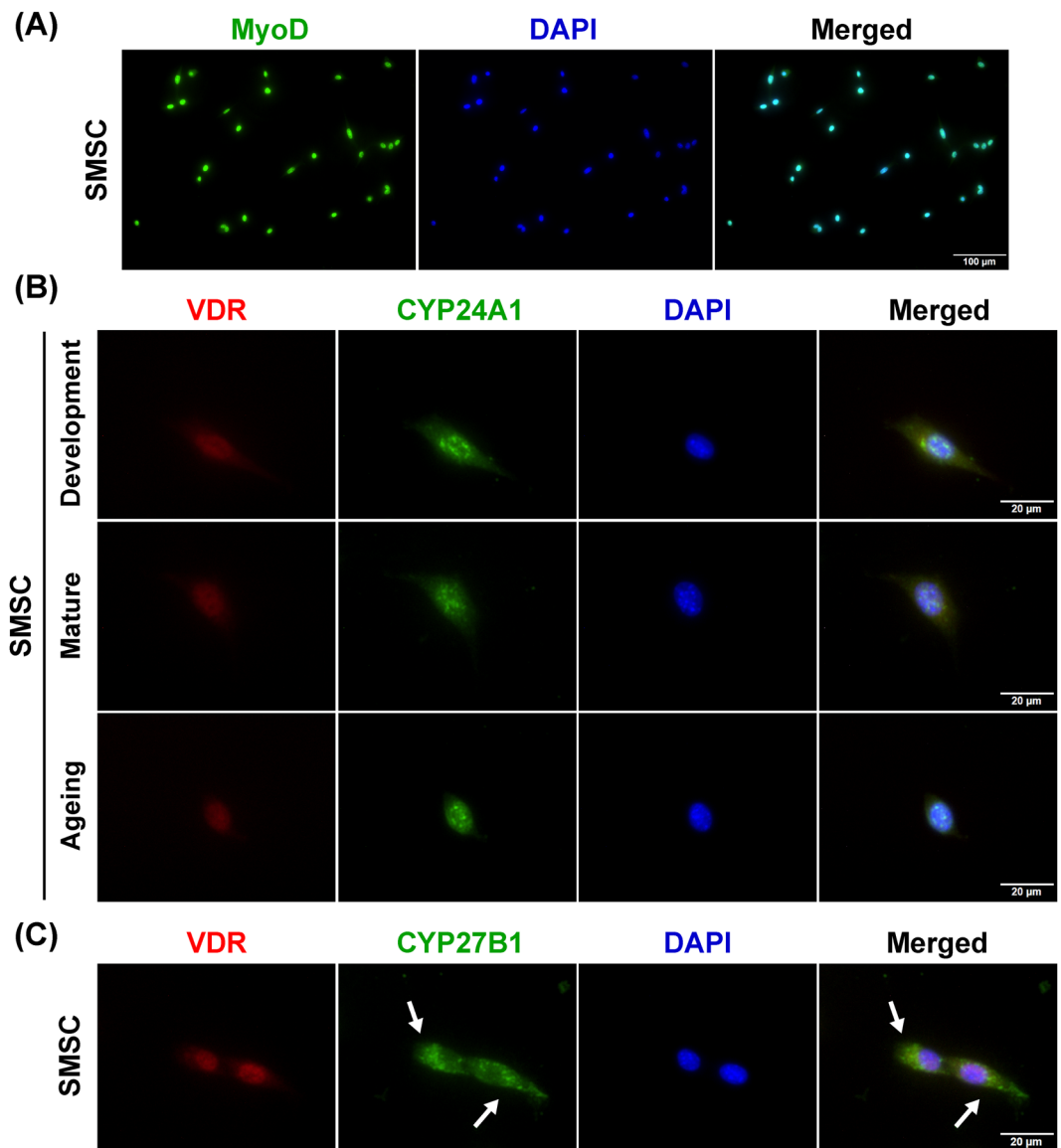


Figure 8. Expression and localisation of vitamin D system-related proteins in SMSC. (A) Representative image of purified SMSCs (MyoD⁺ cells), (B) Representative images of VDR and CYP24A1 protein expression in developmental, mature, and aged SMSCs. Co-localisation of VDR and CYP24A1 protein expression in the nucleus (DAPI-stained) was demonstrated in SMSCs after treated with 100 nM 1α,25(OH)₂D₃ for 24 h. (C) CYP27B1 protein expression was localised in the cytoplasmic compartment of SMSCs (arrows) in response to 100 nM 1α,25(OH)₂D₃-treated for 24 h. Images of A and B-C were taken at ×200 and ×400 magnifications, respectively.

in sarcopenic patients with a significant reduction of lean body mass and grip strength has been reported²¹. Additionally, a reduced SMSC pool in sarcopenic muscle⁴² could be a potential contributing factor to decreased VDR protein expression during sarcopenia.

In the current study, vitamin D deficiency was detected at development as indicated by serum 25(OH)D₃ level <20 ng/ml. The low levels of serum 25(OH)D₃ were associated with low VDR protein expression in developmental muscle and vitamin D-sensitive tissues (kidney and intestine). The temporal expression of VDR protein in skeletal muscle that orchestrates with vitamin D-sensitive tissues suggests an influence of circulating 25(OH)D₃ level on systemic VDR protein expression during development. In contrast, total serum Ca²⁺ level at development was normal suggesting that low levels of 25(OH)D₃ and VDR protein expression are sufficient to maintain Ca²⁺ homeostasis at this stage of postnatal development. These results were supported by a previous investigation demonstrating that serum Ca²⁺ remained normal in severe vitamin D deficient patients if serum 25(OH)D concentration not fall below ~10 nM⁴³. Although serum 25(OH)D₃ was increased toward normal level (~30 ng/ml) during maturation and maintained during ageing, VDR protein expression in aged muscle was increased independent of serum 25(OH)D₃ level. These results suggest that the contribution of intrinsic factors (i.e., SMSC activity), in addition to systemic 25(OH)D₃ level, regulate VDR protein expression in skeletal muscle during ageing.

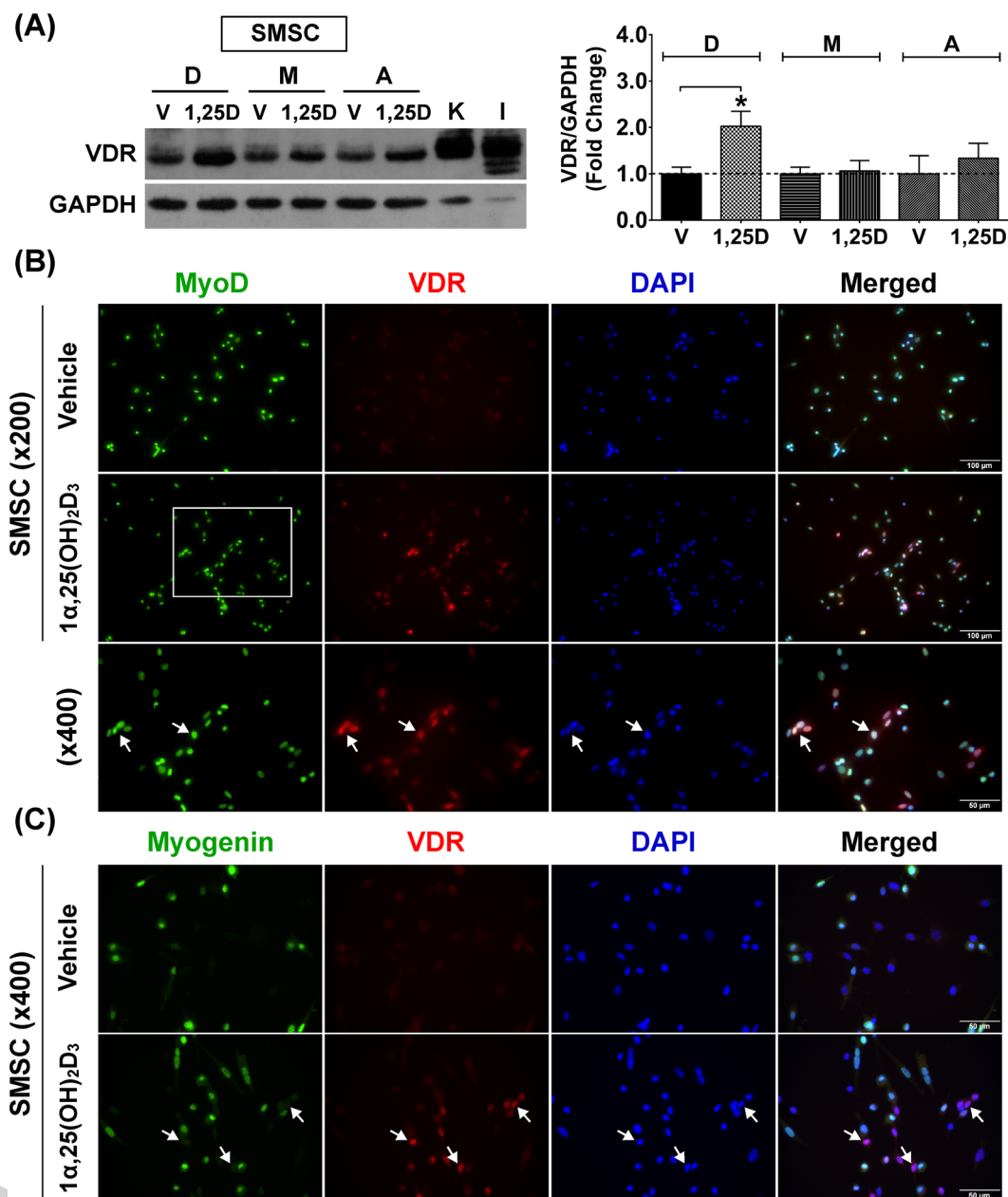


Figure 9. State-specific VDR protein expression of SMSCs in response to $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ treatment. **(A)** Representative immunoblot of VDR protein expression of developmental (D), mature (M), and aged (A) SMSCs after vehicle-treated and 100 nM $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -treated for 48 h (daily-treated). The highly sensitive VDR (D-6) antibody was used to detect VDR protein expression and GAPDH served as loading control. K = Kidney and I = Intestine (positive controls). VDR protein expression level was normalized with GAPDH protein expression that obtained from the same gel and experiment. Data obtained from $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -treated group was normalized with the respective vehicle-treated group to demonstrate the fold change at each growth stage ($n = 3$ SMSCs isolated from different mice/growth stage). * $p < 0.05$ compared to vehicle-treated group (developmental SMSC). **(B)** VDR protein expression (arrows) in developmental SMSC (MyoD⁺ cells) was substantial increased after treated with 100 nM $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ for 48 h (daily-treated). **(C)** VDR protein specifically expressed in undifferentiated SMSC (Myogenin⁻ cells) (arrows) after treated with 100 nM $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ for 48 h (daily-treated). DAPI was used to visualize nuclear localisation. Image (B,C) were taken at $\times 200$ and $\times 400$ magnifications. Rectangular line in (B) represents the area that is illustrated at $\times 400$ magnification.

In contrast to the increased VDR protein expression during advanced age, no significant change in vitamin D-metabolising enzymes (CYP27B1 and CYP24A1) were evident in skeletal muscle at any age. In general, vitamin D-metabolising enzymes in the kidney regulate $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ concentration under influence of parathyroid hormone, fibroblast growth factor 23 (FGF23), and circulating $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ level⁴⁴. However, changes in serum $25(\text{OH})\text{D}_3$ level from development to maturation that could affect systemic $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ concentration

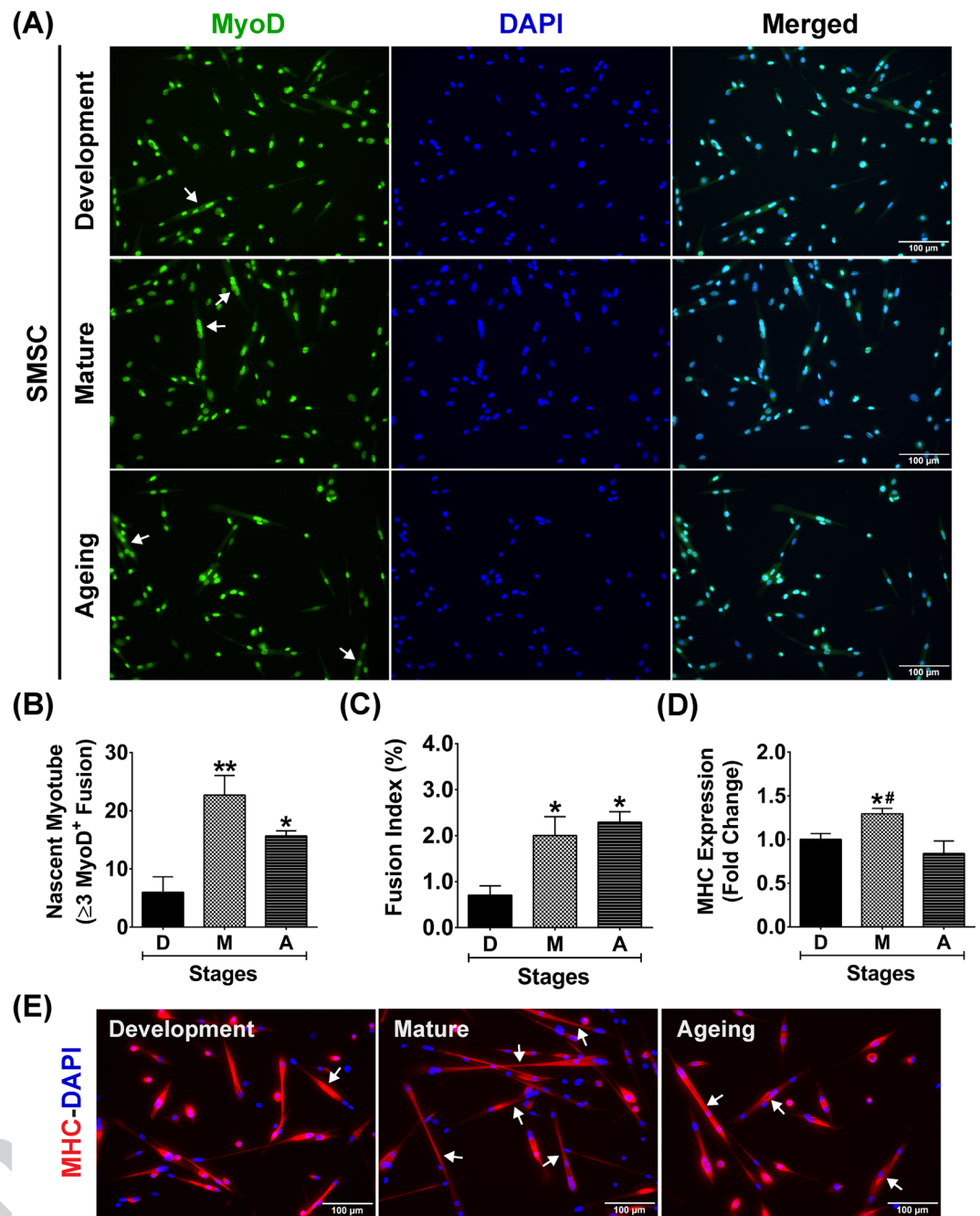


Figure 10. Differentiation characteristics of developmental, mature, and aged SMSCs. (A) Representative images of developmental, mature, and aged SMSCs (MyoD⁺ cells) under growth-stimulating conditions for 48 h. Arrows in (A) indicate fusion of ≥ 3 MyoD⁺ nuclei (nascent myotube formation). (B–D) Quantitative analyses of (B) number of nascent myotubes, (C) fusion index, and (D) MHC protein expression from developmental, mature, and aged SMSCs ($n = 3$ SMSCs isolated from different mice/growth stage). (E) Representative images of MHC staining in developmental, mature, and aged SMSCs under growth-stimulating conditions for 48 h. Arrows in (E) indicate nascent myotubes (MHC⁺) that contains ≥ 3 nuclei fusion. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ compared to developmental stage and # $p < 0.01$ compared to ageing stage. Images were taken at $\times 200$ magnification.

did not alter CYP27B1 and CYP24A1 protein expression in skeletal muscle. These findings suggest that vitamin D-metabolising enzymes in skeletal muscle might be responsible for the local regulation of vitamin D metabolism but not regulate systemic production of $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ or its inactive metabolite (calcitroic acid). Moreover, no associations between VDR and vitamin D-metabolising enzyme expression levels in aged muscle were evident. These results differ from previous investigations showing VDR and CYP24A1 mRNA/protein expression in skeletal muscle cells/tissue are concurrently increased in response to $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ treatment, i.e., studies in primary muscle cell culture^{10,12}, skeletal muscle cell line^{8,45,46}, and regenerating muscle⁴. From this point of view,

an increase in VDR protein expression in aged muscle could be due to local factors in skeletal muscle rather than changes in systemic $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$.

To support the local vitamin D system in skeletal muscle, SMSCs isolated from developmental, mature and aged muscles were shown to express vitamin D system-related proteins (VDR, CYP27B1, and CYP24A1). These findings reveal a potential impact of vitamin D_3 on SMSC, which are major contributors to skeletal muscle plasticity. Up-regulation of VDR protein expression in SMSC (MyoD⁺ cell) after $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ treatment was consistent with previous reports on vitamin D_3 action in rodent and human primary skeletal muscle cells^{10,11,13}. Additionally, cultured SMSC expressed nuclear VDR protein that co-localised with CYP24A1 protein after $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ treatment. This result supports previous work regarding regulation of vitamin D_3 action in SMSC during regeneration through VDR and CYP24A1 activation after intramuscular administration of $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ⁴. However, the decreased response of SMSC to $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ treatment was apparent during advanced age in this study. Alteration of SMSC characteristics during advanced age could influence the effect of vitamin D_3 on the regulation of VDR protein expression. To support this notion, the rapid commitment to differentiation of mature and aged SMSCs under growth-stimulating conditions might diminish the response to $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. VDR protein is highly expressed in undifferentiated SMSCs (Myogenin⁻) after $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ treatment. This novel finding suggests that state-specific regulation of VDR protein expression in SMSC could be a crucial factor affecting the impact vitamin D_3 action on skeletal muscle during advanced age. To substantiate this finding *in vivo*, conditional knockout models using Cre-Lox recombination targeting myogenic regulatory factors (MRF4, Myf5, MyoD, and myogenin) would be a useful tool to study the state-specific response of SMSC to vitamin D_3 supplementation at different stages of skeletal muscle growth.

In conclusion, the present study provides insight into the local vitamin D system in skeletal muscle at different stages of growth. We observed significant elevations in VDR protein expression in skeletal muscle during advanced age. This difference was more pronounced in fast-glycolytic compared to slow-oxidative muscle during the transition from maturation to ageing. The substantial increase in VDR protein expression in aged muscle could be impacted by an increase in SMSC activity. Additionally, SMSC express vitamin D system-related proteins to support the action of vitamin D_3 on the regulation of skeletal muscle plasticity via SMSC. However, the diminished response of SMSC to $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ treatment during advanced age could be due to the rapid commitment of SMSC towards differentiation under growth-stimulating conditions. In addition, we observed no association of vitamin D-metabolising enzyme (CYP27B1 and CYP24A1) protein expression in skeletal muscle with circulating $25(\text{OH})\text{D}_3$ suggesting that skeletal muscle is not the tissue responsible for regulation of systemic $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Taken together, our evidence on vitamin D system in skeletal muscle supports a role for non-calcemic action of vitamin D in this non-classical vitamin D target tissue.

Materials and Methods

Animals. Male C57BL/6 mice were obtained from Nomura Siam International Co, Ltd. (Bangkok, Thailand) and assigned into three groups: development (aged 4-week-old), maturation (aged 24- to 25-week-old), and ageing (aged 72- to 76.5-week-old). The maximum age of mice in each growth stage corresponded approximately to 1-month-old, 6-month-old, and 18-month-old study periods, respectively. In each group, mice were allocated for an investigation of vitamin D system in skeletal muscle tissue (*in vivo* study) and SMSC culture (*in vitro* study). Mice were housed in temperature- and humidity-controlled room with a 12:12 light-dark cycle. In addition, mice were fed with CLEA Rodent Diet CE-2 containing 205 IU/100 g vitamin D_3 (Nomura Siam International Co, Ltd.) and reverse osmosis water ad libitum throughout the study.

Tissue sample collection. Before tissue sample collection, mouse body weight (g) was recorded to determine body weight at different stages of growth. Soleus and plantaris muscles were dissected and muscle wet weight (mg) was measured using a digital weight scale (Model MS204) (Mettler Toledo, Greifensee, Switzerland). For Western blot and histological/immunohistochemical analyses, muscle samples were frozen in liquid nitrogen or covered with Tissue-Tek O.C.T. compound (4583) (Sakura Finetek, CA, USA) before being frozen in 2-methylbutane (Sigma-Aldrich, M32631) pre-cooled with liquid nitrogen. In addition, kidney and intestine (duodenum) were collected and frozen in liquid nitrogen to serve as the positive controls for vitamin D system-related protein expression analysis.

Analyses of serum $25(\text{OH})\text{D}_3/\text{D}_2$, 3-Epi- $25(\text{OH})\text{D}_3/\text{D}_2$, and total Ca^{2+} levels. Serum was obtained from blood placed at room temperature for 30 min followed by centrifugation at 4 °C using refrigerated centrifuge Model 5430 R (Eppendorf, Germany) (3,000 rpm for 15 min). Serum levels of $25(\text{OH})\text{D}_3/\text{D}_2$ and 3-Epi- $25(\text{OH})\text{D}_3/\text{D}_2$ were determined by LC-MS/MS using the MassChrom[®] 25-OH-Vitamin D_3/D_2 in Serum/Plasma kit (Chromsystems Instruments & Chemicals GmbH, Germany). Serum concentration of total Ca^{2+} was analysed using the o-cresolphthalein complexone method.

Histological analysis. Muscle sections at 10 μm thickness were obtained using a cryostat (model CM1850, Leica, Wetzlar, Germany). The sections were stained with Hematoxylin solution modified acc. to Gill II (105175) and Eosin Y (C.I. 45380) (115935) (Merck Millipore, MA, USA) to evaluate the histological structure of muscle fibres, fibre cross-sectional area (CSA), and fibre number. Images were taken at $\times 100$ and $\times 400$ magnifications using an Olympus microscope (BX53) (Olympus, Tokyo, Japan) equipped with a digital camera (DP73) (Olympus, Tokyo, Japan). Fibre CSA and the distribution of fibre size were analysed from 200–300 fibres/individual muscle section. Fibre number was counted from the entire muscle cross-section. The quantitative analyses of fibre CSA and fibre number were performed using ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD) and cellSens Dimension software (Olympus, Tokyo, Japan), respectively.

Immunohistochemistry. Immunostaining protocols were performed following previously described⁴. Briefly, the sections were fixed with 4% paraformaldehyde (PFA) (15713) (Electron Microscopy Science, PA, USA), permeabilized with 0.5% Triton X-100 (X100) (Sigma-Aldrich, MO, USA), blocked with mouse IgG blocking reagent (MKB-2213) (Vector Labs, CA, USA), and with 10% normal goat serum (PCN5000) (Invitrogen, CA, USA). Primary and secondary antibodies were used as follows: mouse monoclonal anti-VDR (D-6) (1:100, sc-13133), rabbit polyclonal anti-CYP24A1 (1:100, sc-66851), and rabbit polyclonal anti-CYP27B1 (1:100, sc-67261) (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA); rabbit polyclonal anti-fast MHC (1:1,000, ab91506) and mouse monoclonal anti-slow MHC (1:2,000, ab11083) (Abcam, Cambridge, UK); rabbit polyclonal anti-laminin antibody (1:400, L9393) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA); mouse monoclonal anti-ATP synthase (complex V) subunit α (OxPhos) (1:200, 459240), goat anti-mouse Alexa Fluor[®] 568 IgG (H + L) (1:500, A-11004), and goat anti-rabbit Alexa Fluor[®] 488 IgG (H + L) (1:500, A-11008) secondary antibodies (Invitrogen, CA, USA). Nuclear localisation was visualized using 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (D1306) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Stained sections were mounted with antifade mounting medium (H-1000) (Vector Labs, CA, USA). Images were taken using an Olympus microscope (BX53) (Olympus) equipped with a digital camera (DP73) (Olympus) using image acquisition software (cellSens Dimension Desktop, Olympus, Japan) at $\times 100$, $\times 200$, and $\times 400$ magnifications.

SMSC isolation and culture. An isolation protocol was performed according to a previously described method⁴⁷. Isolated SMSCs were obtained from developmental, mature, and aged muscles and seeded on 2% gelatin-coated T25 flasks and cultured using DMEM supplemented with 20% fetal bovine serum (FBS) (10270-106) (Invitrogen, CA, USA) and 5 ng/ml of basic fibroblast growth factor (bFGF), human recombinant (GF003) (Merck Millipore, MA, USA) at 37°C and 5% CO₂. The pre-plating technique was performed during passaging to eliminate contaminating fibroblasts during the isolation process. The purity of SMSCs was determined by myoblast determination protein (MyoD) expression. Ten randomized fields of cultured SMSCs from developmental, mature, and ageing stages ($n = 3$ SMSCs isolated from different mice/growth stage) were analysed to evaluate the percentage of MyoD⁺ nuclei [(number of MyoD⁺ nuclei/total nuclei) $\times 100$]. SMSCs at passage 5–6 with $>98\%$ of MyoD⁺ nuclei were used in this study.

Assessment of vitamin D system in SMSC. Developmental, mature, and aged SMSCs were seeded on 2% gelatin-coated 12-well plate and cultured with DMEM + 20% FBS + 5 ng/ml bFGF for 48 h. On the day of treatment, culture media was washed twice with sterile phosphate-buffered saline (10010023) (Gibco, NY, USA) and replaced with DMEM + 20% FBS + 10% horse serum (HS) to represent growth-stimulating conditions. SMSCs were treated daily with vehicle (0.1% ethanol) or $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (100 nM) (final concentrations) to assess the expression of vitamin D system-related proteins (VDR, CYP27B1, and CYP24A1) under growth-stimulating conditions for 24 h and 48 h, respectively.

Assessment of SMSC differentiation. Developmental, mature, and aged SMSCs were seeded on 2% gelatin-coated 12-well plate and cultured with DMEM + 20% FBS + 5 ng/ml bFGF for 48 h. After twice washing with PBS, SMSCs were cultured in growth-stimulating conditions (DMEM + 20% FBS + 10% HS) for 48 h. Thereafter, MyoD and myogenin protein expression was determined to investigate the differentiation characteristics of SMSCs under growth-stimulating conditions. Quantitative analysis was performed using image acquisition software (cellSens Dimension Desktop, Olympus, Japan). MyoD-DAPI stained images (10 randomized images at $\times 200$ magnification) were used to analyse the nascent myotube formation (≥ 3 MyoD⁺ nuclei fusion) and fusion index (number of ≥ 3 MyoD⁺ nuclei fusion/total MyoD⁺ nuclei). Quantification of MHC protein expression and cell number were analysed using MHC-DAPI stained images (15 randomized images at $\times 100$ magnification).

Immunocytochemistry. Cells were fixed with 4% PFA, permeabilized with 0.1% Triton X-100, and blocked for non-specific staining with 5% normal goat serum. The primary and secondary antibodies were used as follows: mouse monoclonal anti-MyoD (G-1) antibody (1:500, sc-377460), mouse monoclonal anti-myogenin (F5D) antibody (1:200, sc-12732), mouse monoclonal anti-VDR (D-6) (1:200, sc-13133), rabbit polyclonal anti-CYP24A1 (1:500, sc-66851), and rabbit polyclonal anti-CYP27B1 (1:500, sc-67261) (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA); mouse monoclonal anti-myosin heavy chain antibody (MHC) (1:500, 05-716) (Upstate, CA, USA); goat anti-mouse Alexa Fluor[®] 488 IgG1 (1:500, A-21121), goat anti-mouse Alexa Fluor[®] 568 IgG2a (1:500, A-21134), goat anti-mouse Alexa Fluor[®] 488 IgG2b (1:500, A-21141), goat anti-mouse Alexa Fluor[®] 568 IgG (H + L) (1:500, A-11004), and goat anti-rabbit Alexa Fluor[®] 488 IgG (H + L) (1:500, A-11008) (Invitrogen, CA, USA). Nuclei were stained with DAPI to delineate nuclear localisation. Representative images were taken at $\times 200$ and $\times 400$ magnifications using an Olympus Inverted Fluorescence Microscope Model IX83 (Olympus, Tokyo, Japan) equipped with ORCA-Flash 2.8 Digital CMOS Camera (C11440) (Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan).

Western blot analysis. Proteins from tissue samples (skeletal muscle, kidney, and intestine) and SMSC samples were extracted using RIPA buffer (50 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, and 1% Triton[®]X-100) supplemented with protease inhibitor (1:100) (P8340) (Sigma, St Louis, MO, USA) and phosphatase inhibitor cocktails (1:100) (524625) (Merck Millipore, MA, USA). Protein concentrations were determined using BCA assay and the optical density was measured using Spark[™] 10 M multimode microplate reader (Tecan Trading AG, Männedorf, Switzerland). After denaturing the protein samples by heating at 60°C for 10 min, 30 μg (tissue samples) or 20 μg (SMSC samples) of protein was loaded into SDS-polyacrylamide gel (4% stacking and 10% separating). Protein samples were transferred to PVDF membrane, blocked with 5% non-fat milk, and probed with primary antibodies as follows: mouse monoclonal anti-VDR (D-6) (1:200, sc-13133), rabbit polyclonal anti-CYP24A1 (1:200, sc-66851), and rabbit polyclonal anti-CYP27B1 (1:200, sc-67261) (Santa Cruz

Biotechnology, CA, USA); rabbit polyclonal anti-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (1:5,000, ABS16) (Merck Millipore, MA, USA); rabbit polyclonal anti-phospho-4E-BP1 (1:1,000, 9451) and rabbit monoclonal anti-4E-BP1 (1:1,000, 9644), mouse monoclonal anti-phospho-p70 S6K1 Thr389 (1:1,000, 9206), rabbit monoclonal anti-p70 S6K1 (1:1,000, 2708) (Cell Signaling, MA, USA). Membranes were incubated with goat anti-rabbit peroxidase-conjugated antibody (1:7,000, AP132P) and goat anti-mouse peroxidase-conjugated antibody (1:7,000, AP124P) (Merck Millipore, MA, USA). Protein bands were visualized using chemiluminescence horseradish peroxidase detection reagent (WBLUR0100) (Merck Millipore, MA, USA) and exposed to UltraCruz Autoradiography Film (sc-201696) (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA). Quantification of the protein expression levels was performed using Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MD).

Statistical analysis. Data are expressed as means and standard errors of the mean (means $\pm$ SEM). Significant differences among groups were determined using One-way ANOVA with Tukey's post-hoc test, independent-samples Kruskal-Wallis test, or independent sample *t*-test. Correlation analysis was evaluated using Pearson correlation coefficient. All statistical tests were performed using SPSS and $p < 0.05$ represents the significant difference between groups.

Ethical approval and informed consent. Experimental procedures in animals were performed in accordance with institutional guidelines for the care and use of laboratory animals. The animal protocol has been approved by the Animal Care and Use Committee of Faculty of Science, Mahidol University (SCMU-ACUC; Protocol ID MUSC59-008-341).

Data availability

The datasets generated during and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Received: 7 November 2019; Accepted: 22 April 2020;

Published: xx xx xxxx

References

- Haussler, M. R. *et al.* Molecular mechanisms of vitamin D action. *Calcif Tissue Int* **92**, 77–98 (2013).
- Veldurthy, V. *et al.* Vitamin D, calcium homeostasis and aging. *Bone Res* **4**, 16041 (2016).
- Jiang, P. *et al.* Dysregulation of vitamin D metabolism in the brain and myocardium of rats following prolonged exposure to dexamethasone. *Psychopharmacology (Berl)* **231**, 3445–3451 (2014).
- Srikuea, R. & Hirunsai, M. Effects of intramuscular administration of $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ during skeletal muscle regeneration on regenerative capacity, muscular fibrosis, and angiogenesis. *J Appl Physiol* (1985) **120**, 1381–1393 (2016).
- Garcia, L. A., King, K. K., Ferrini, M. G., Norris, K. C. & Artaza, J. N. $1,25(\text{OH})_2$ vitamin D_3 stimulates myogenic differentiation by inhibiting cell proliferation and modulating the expression of promyogenic growth factors and myostatin in C_2C_{12} skeletal muscle cells. *Endocrinology* **152**, 2976–2986 (2011).
- Srikuea, R., Zhang, X., Park-Sarge, O. K. & Esser, K. A. VDR and CYP27B1 are expressed in C_2C_{12} cells and regenerating skeletal muscle: potential role in suppression of myoblast proliferation. *Am J Physiol Cell Physiol* **303**, C396–405 (2012).
- Salles, J. *et al.* $1,25(\text{OH})_2$ -vitamin D_3 enhances the stimulating effect of leucine and insulin on protein synthesis rate through Akt/PKB and mTOR mediated pathways in murine C_2C_{12} skeletal myotubes. *Mol Nutr Food Res* **57**, 2137–2146 (2013).
- Girgis, C. M., Clifton-Bligh, R. J., Mokbel, N., Cheng, K. & Gunton, J. E. Vitamin D signaling regulates proliferation, differentiation, and myotube size in C_2C_{12} skeletal muscle cells. *Endocrinology* **155**, 347–357 (2014).
- Camperi, A. *et al.* Vitamin D and VDR in cancer cachexia and muscle regeneration. *Oncotarget* **8**, 21778–21793 (2017).
- Girgis, C. M. *et al.* The vitamin D receptor (VDR) is expressed in skeletal muscle of male mice and modulates 25-hydroxyvitamin D (25OHVD) uptake in myofibers. *Endocrinology* **155**, 3227–3237 (2014).
- Braga, M., Simmons, Z., Norris, K. C., Ferrini, M. G. & Artaza, J. N. Vitamin D induces myogenic differentiation in skeletal muscle derived stem cells. *Endocr Connect* **6**, 139–150 (2017).
- Pojednic, R. M. *et al.* Effects of $1,25$ -dihydroxyvitamin D_3 and vitamin D_3 on the expression of the vitamin d receptor in human skeletal muscle cells. *Calcif Tissue Int* **96**, 256–263 (2015).
- Olsson, K. *et al.* Evidence for vitamin D receptor expression and direct effects of $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in human skeletal muscle precursor cells. *Endocrinology* **157**, 98–111 (2016).
- Ryan, Z. C. *et al.* $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D_3 regulates mitochondrial oxygen consumption and dynamics in human skeletal muscle cells. *J Biol Chem* **291**, 1514–1528 (2016).
- Stratos, I. *et al.* Vitamin D increases cellular turnover and functionally restores the skeletal muscle after crush injury in rats. *Am J Pathol* **182**, 895–904 (2013).
- Makanae, Y. *et al.* Acute bout of resistance exercise increases vitamin D receptor protein expression in rat skeletal muscle. *Exp Physiol* **100**, 1168–1176 (2015).
- Abboud, M. *et al.* $1,25$ -Dihydroxycholecalciferol (calcitriol) modifies uptake and release of 25-hydroxycholecalciferol in skeletal muscle cells in culture. *J Steroid Biochem Mol Biol* **177**, 109–115 (2018).
- Girgis, C. M. *et al.* Mice with myocyte deletion of vitamin D receptor have sarcopenia and impaired muscle function. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*, <https://doi.org/10.1002/jcsm.12460>, (2019).
- Ceglia, L. *et al.* Multi-step immunofluorescent analysis of vitamin D receptor loci and myosin heavy chain isoforms in human skeletal muscle. *J Mol Histol* **41**, 137–142 (2010).
- Ceglia, L. *et al.* A randomized study on the effect of vitamin D_3 supplementation on skeletal muscle morphology and vitamin D receptor concentration in older women. *J Clin Endocrinol Metab* **98**, E1927–1935 (2013).
- Roh, Y. H., Hong, S. W., Chung, S. W. & Lee, Y. S. Altered gene and protein expressions of vitamin D receptor in skeletal muscle in sarcopenic patients who sustained distal radius fractures. *J Bone Miner Metab* **37**, 920–927 (2019).
- Bloemberg, D. & Quadrilatero, J. Rapid determination of myosin heavy chain expression in rat, mouse, and human skeletal muscle using multicolor immunofluorescence analysis. *PLoS one* **7**, e35273 (2012).
- Scott, W., Stevens, J. & Binder-Macleod, S. A. Human skeletal muscle fiber type classifications. *Physical therapy* **81**, 1810–1816 (2001).
- Holick, M. F. *et al.* Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab* **96**, 1911–1930 (2011).

25. Mowe, M., Haug, E. & Bohmer, T. Low serum calcidiol concentration in older adults with reduced muscular function. *J Am Geriatr Soc* **47**, 220–226 (1999).
26. Visser, M., Deeg, D. J. & Lips, P. & Longitudinal Aging Study, A. Low vitamin D and high parathyroid hormone levels as determinants of loss of muscle strength and muscle mass (sarcopenia): the Longitudinal Aging Study Amsterdam. *J Clin Endocrinol Metab* **88**, 5766–5772 (2003).
27. Verhaar, H. J. *et al.* Muscle strength, functional mobility and vitamin D in older women. *Aging (Milano)* **12**, 455–460 (2000).
28. Moreira-Pfrimer, L. D., Pedrosa, M. A., Teixeira, L. & Lazaretti-Castro, M. Treatment of vitamin D deficiency increases lower limb muscle strength in institutionalized older people independently of regular physical activity: a randomized double-blind controlled trial. *Ann Nutr Metab* **54**, 291–300 (2009).
29. Pfeifer, M. *et al.* Effects of a long-term vitamin D and calcium supplementation on falls and parameters of muscle function in community-dwelling older individuals. *Osteoporos Int* **20**, 315–322 (2009).
30. Cangussu, L. M., Nahas-Neto, J., Orsatti, C. L., Bueloni-Dias, F. N. & Nahas, E. A. Effect of vitamin D supplementation alone on muscle function in postmenopausal women: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Osteoporos Int* **26**, 2413–2421 (2015).
31. Anderson, J. E. The satellite cell as a companion in skeletal muscle plasticity: currency, conveyance, clue, connector and colander. *J Exp Biol* **209**, 2276–2292 (2006).
32. White, R. B., Bierinx, A. S., Gnocchi, V. F. & Zammit, P. S. Dynamics of muscle fibre growth during postnatal mouse development. *BMC Dev Biol* **10**, 21 (2010).
33. Hawke, T. J. & Garry, D. J. Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *J Appl Physiol* (1985) **91**, 534–551 (2001).
34. Conboy, I. M., Conboy, M. J., Smythe, G. M. & Rando, T. A. Notch-mediated restoration of regenerative potential to aged muscle. *Science* **302**, 1575–1577 (2003).
35. Wang, X. & Proud, C. G. The mTOR pathway in the control of protein synthesis. *Physiology (Bethesda)* **21**, 362–369 (2006).
36. Girgis, C. M. Vitamin D and skeletal muscle: Emerging roles in development, anabolism and repair. *Calcif Tissue Int*, <https://doi.org/10.1007/s00223-019-00583-4> (2019).
37. Wang, Y. & DeLuca, H. F. Is the vitamin D receptor found in muscle? *Endocrinology* **152**, 354–363 (2011).
38. Wang, Y., Zhu, J. & DeLuca, H. F. Where is the vitamin D receptor? *Arch Biochem Biophys* **523**, 123–133 (2012).
39. Keefe, A. C. *et al.* Muscle stem cells contribute to myofibres in sedentary adult mice. *Nat Commun* **6**, 7087 (2015).
40. Fry, C. S. *et al.* Inducible depletion of satellite cells in adult, sedentary mice impairs muscle regenerative capacity without affecting sarcopenia. *Nat Med* **21**, 76–80 (2015).
41. Brack, A. S., Bildsoe, H. & Hughes, S. M. Evidence that satellite cell decrement contributes to preferential decline in nuclear number from large fibres during murine age-related muscle atrophy. *J Cell Sci* **118**, 4813–4821 (2005).
42. Sousa-Victor, P. & Munoz-Canoves, P. Regenerative decline of stem cells in sarcopenia. *Mol Aspects Med* **50**, 109–117 (2016).
43. Need, A. G. *et al.* Vitamin D metabolites and calcium absorption in severe vitamin D deficiency. *J Bone Miner Res* **23**, 1859–1863 (2008).
44. Bikle, D. D. Vitamin D metabolism, mechanism of action, and clinical applications. *Chem Biol* **21**, 319–329 (2014).
45. Ryan, K. J., Daniel, Z. C., Craggs, L. J., Parr, T. & Brameld, J. M. Dose-dependent effects of vitamin D on transdifferentiation of skeletal muscle cells to adipose cells. *J Endocrinol* **217**, 45–58 (2013).
46. van der Meijden, K. *et al.* Effects of 1,25(OH)₂D₃ and 25(OH)D₃ on C2C12 myoblast proliferation, differentiation, and myotube hypertrophy. *J Cell Physiol* **231**, 2517–2528 (2016).
47. Danoviz, M. E. & Yablonka-Reuveni, Z. Skeletal muscle satellite cells: background and methods for isolation and analysis in a primary culture system. *Methods Mol Biol* **798**, 21–52 (2012).

Acknowledgements

This work was supported by grants (to R.S.) from the Thailand Research Fund (TRF) and Office of the Higher Education Commission (MRG6080090) and the Faculty of Science, Mahidol University. N.C. is a TRF Senior Research Scholar awarded by TRF and a senior investigator of a Mahidol University Multidisciplinary Research Cluster (MU-MRC). The authors gratefully acknowledge Center of Excellence for Shrimp Molecular Biology and Biotechnology and Olympus Bioimaging Center (Center of Nanoimaging, Faculty of Science, Mahidol University) on supporting the cryostat for muscle sample sectioning and image acquisition, respectively. Proofreading of the manuscript by Associate Professor Dr. Christopher Fry is appreciated.

Author contributions

R.S. and N.C. conceived and designed of research; R.S. and M.H. conducted experiments and analysed data; R.S. interpreted results of experiments; R.S. wrote manuscript and prepared figures; R.S., M.H., and N.C. edited and revised manuscript; R.S., M.H., and N.C. approved final version of manuscript.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary information is available for this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-020-65067-0>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to R.S.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2020

Uncorrected proof



Parathyroid hormone increases CFTR expression and function in Caco-2 intestinal epithelial cells

Walailak Jantarajit ^{a, b, f}, Kannikar Wongdee ^{a, c}, Kornkamon Lertsuwan ^{a, d}, Jarinthorn Teerapornpuntakit ^{a, e}, Ratchaneewan Aeimlapa ^{a, b}, Jirawan Thongbunchoo ^a, Bartholomew S.J. Harvey ^f, David N. Sheppard ^f, Narattaphol Charoenphandhu ^{a, b, g, h, *}

^a Center of Calcium and Bone Research (COCAB), Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok, Thailand

^b Department of Physiology, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok, Thailand

^c Faculty of Allied Health Sciences, Burapha University, Chonburi, Thailand

^d Department of Biochemistry, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok, Thailand

^e Department of Physiology, Faculty of Medical Science, Naresuan University, Phitsanulok, Thailand

^f School of Physiology, Pharmacology and Neuroscience, University of Bristol, Bristol, UK

^g Institute of Molecular Biosciences, Mahidol University, Nakhon Pathom, Thailand

^h The Academy of Science, The Royal Society of Thailand, Bangkok, Thailand

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 December 2019

Accepted 31 December 2019

Available online 15 January 2020

Keywords:

Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)

Ion secretion

Parathyroid hormone (PTH)

Patch-clamp technique

Intermediate-conductance Ca^{2+} -activated

K^+ channel (IKCa)

ABSTRACT

Parathyroid hormone (PTH) enhances cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)-mediated anion secretion by the human intestinal epithelial cell line Caco-2. With the patch-clamp and Ussing chamber techniques, we investigated how PTH stimulates CFTR activity in Caco-2 cells. Cell-attached recordings revealed that PTH stimulated the opening of CFTR-like channels, while impedance analysis demonstrated that PTH increased apical membrane capacitance, a measure of membrane surface area. Using ion substitution experiments, the PTH-stimulated increase in short-circuit current (I_{sc}), a measure of transepithelial ion transport, was demonstrated to be Cl^- - and HCO_3^- -dependent. However, the PTH-stimulated increase in I_{sc} was unaffected by the carbonic anhydrase inhibitor acetazolamide, but partially blocked by the intermediate-conductance Ca^{2+} -activated K^+ channel (IKCa) inhibitor clotrimazole. TRAM-34, a related IKCa inhibitor, failed to directly inhibit CFTR Cl^- channels in cell-free membrane patches, excluding its action on CFTR. In conclusion, PTH enhances CFTR-mediated anion secretion by Caco-2 monolayers by increasing the expression and function of CFTR in the apical membrane and IKCa activity in the basolateral membrane.

© 2020 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

The calciotropic hormone parathyroid hormone (PTH) has important roles in the regulation of ion transport in renal epithelia [1,2]. Using intestinal epithelia and Caco-2 monolayers, a widely used model of intestinal ion transport, we previously demonstrated that PTH enhances anion transport by the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) Cl^- channel, a key mediator of epithelial ion transport [3–5]. Based on previous work [6,7], PTH might promote CFTR-mediated anion transport by either

directly enhancing CFTR activity or augmenting CFTR expression at the apical membrane by modulating its delivery to or retrieval from the membrane. However, these hypotheses have not been tested experimentally.

Interestingly, our previous studies demonstrated that PTH stimulates residual electrogenic ion transport by Caco-2 monolayers in the absence of Cl^- and HCO_3^- in the apical and basolateral solutions [4]. Because the driving force for anion secretion across the apical membrane of intestinal epithelia requires the intracellular negative potential created by anion accumulation and/or the efflux of K^+ across the basolateral membrane [8], we hypothesized that carbonic anhydrase (CA) and basolateral membrane K^+ channels might contribute to the CFTR-mediated anion secretion stimulated by PTH. Several basolateral membrane K^+ channels (e.g. intermediate-conductance Ca^{2+} -activated K^+ channel [IKCa] and

* Corresponding author. Department of Physiology, Faculty of Science, Mahidol University, Rama VI Road, Bangkok, 10400, Thailand.

E-mail address: naratt@narattsys.com (N. Charoenphandhu).

voltage-gated K^+ channel subfamily KQT member 1 [KCNQ1]) are regulated by the Ca^{2+} and cAMP signaling pathways [4,9], both of which are known to be stimulated by PTH [10,11].

Therefore, the present study aimed (i) to investigate whether PTH directly enhances CFTR activity or augments CFTR insertion into the apical membrane of Caco-2 cells and (ii) to determine the roles of intracellular HCO_3^- production and basolateral K^+ channels in the action of PTH on Caco-2 monolayers under Cl^-/HCO_3^- -free conditions. For these studies, we applied the patch-clamp and Ussing chamber techniques to Caco-2 monolayers, employing small molecules to identify the contribution of different ion channels. Our results suggest that PTH likely enhances CFTR-mediated anion secretion across Caco-2 monolayers by modulating both CFTR insertion and function and IKCa activity.

2. Materials and methods

2.1. Cells and cell culture

Caco-2 cells (ATCC no. HTB-37) were cultured as previously described by Laohapitakworn et al. [3]. For real-time PCR and patch-clamp experiments, Caco-2 cells were cultured for 7 days before use. For Ussing chamber experiments, 5×10^5 Caco-2 cells (passage nos. 27–35) were seeded on Snapwell filters (12-mm diameter, 0.4- μ m pore size; Corning, NY) and cultured for 14 days to obtain transepithelial resistance (R_t) of ~ 200 – $300 \Omega \cdot cm^2$. In some experiments, mouse mammary epithelial (C127) cells heterologously expressing wild-type human CFTR were cultured and used as previously described [12].

2.2. Quantitative real-time PCR

The PCR method was modified from Laohapitakworn et al. [3]. In brief, total RNA was extracted from Caco-2 cells using TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA). qRT-PCR and melting curve analyses were operated by QuantStudio 3 Real-Time PCR systems (Applied Biosystems) with SsoFast EvaGreen Supermix (Bio-rad). PTHR1 and PTHR2 mRNA levels were normalized to GAPDH expression (for primers, see [Supplementary Table S1](#)).

2.3. Direct-current (DC) analysis of epithelial electrical parameters

The Ussing chamber technique was used to determine trans-epithelial voltage (V_t), equivalent short-circuit current (I_{sc}) and R_t . Caco-2 monolayers were equilibrated for 30 min before exposure to (i) the vehicle [0.1% vol/vol dimethyl sulfoxide (DMSO)] or 10 nmol/L recombinant human PTH fragment 1–34 (PTH 1–34; catalogue no. P3796; Sigma) added to the basolateral side for 30 min, (ii) clotrimazole (30 μ mol/L; catalogue no. C6019; Sigma) added to the basolateral side for 30 min, and (iii) acetazolamide (100 μ mol/L; catalogue no. A6011; Sigma) added to both the apical and basolateral sides for 30 min. Caco-2 monolayers were mounted in Ussing chambers and bathed symmetrically with a HCO_3^-/Cl^- -free solution containing (in mmol/L) 126 sodium gluconate, 4.7 potassium gluconate, 1.1 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 2.5 $CaCl_2$, 10 HEPES sodium salt, 12 D-glucose, 2.5 L-glutamine, and 4.4 $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ (pH 7.4; osmolality, 289–292 mmol/kg H_2O), maintained at 37 °C.

The change in I_{sc} magnitude after PTH treatment (ΔI_{sc}), which represents PTH-stimulated electrogenic ion transport, was recorded continuously with an epithelial voltage-current clamp amplifier (model ECV-4000, World Precision Instruments, Sarasota, FL) and digitized at 2000 Hz with a PowerLab/4SP (ADInstruments, Colorado Springs, CO). During experiments, short current pulses (1; 3 μ A amplitude, 800 ms pulse duration, 0.1 Hz frequency) were applied across Caco-2 monolayers by a pulse generator to create

brief voltage deflections (ΔV_t). Current was clamped and V_t was continuously recorded. The values of I and ΔV_t were used to calculate R_t by using Ohm's law ($R_t = \Delta V_t/I$). Then, I_{sc} was obtained from V_t and R_t ($I_{sc} = V_t/R_t$). Negative V_t values represent the electrogenic movement of anions from the basolateral to apical compartments, the movement of cations in the opposite direction or a combination of both.

2.4. AC impedance analysis

AC impedance analysis was performed to determine membrane capacitance and hence, membrane surface area. Caco-2 monolayers were mounted in modified Ussing chambers and bathed symmetrically in a solution containing (in mmol/L) 118 NaCl, 4.7 KCl, 1.1 $MgCl_2$, 1.25 $CaCl_2$, 23 $NaHCO_3$, 12 D-glucose, 2.5 L-glutamine, and 2 mannitol (pH 7.4; osmolality, 289–292 mmol/kg H_2O), maintained at 37 °C. Impedance analysis was performed using a 1225B frequency response analyzer and a 1287A electrochemical interface (Solartron, Farnborough, UK). Sine-wave AC current (35 μ A/ cm^2 root mean square amplitude, 0.5–10 kHz) was applied across the Caco-2 monolayer at different time points before and after adding 10 nmol/L PTH 1–34. We previously found that the peak response occurred ~ 2 min after exposure to PTH 1–34, after which responses decreased to a new stable baseline 15–30 min later [4]. Thus, the 2-min and 30-min time points were used to represent the PTH-induced ion transport across Caco-2 monolayers in the early and late phases, respectively. To determine the contribution of CFTR trafficking to the apical membrane during PTH stimulation, Caco-2 monolayers were pretreated with the CFTR inhibitor CFTR_{inh}-172 (20 μ mol/L; catalogue no. C2992; Sigma) on the apical side. Using Zplot/Zview software (version 3.0; Scribner, Southern Pines, NC), Nyquist, Bode magnitude and Bode phase diagrams were plotted and fitted with a nonlinear least squares fitting algorithm. The equivalent circuit of Caco-2 monolayer was constructed based on the lumped model with 4 resistors and 2 capacitors ([Supplementary Fig. S1](#)). All parameters in the circuit were calculated according to the method of Jantarajit et al. [4].

2.5. Patch-clamp experiments

CFTR channels were recorded in either cell-attached membrane patches from Caco-2 cells endogenously expressing wild-type human CFTR or excised inside-out membrane patches from C127 cells heterologously expressing wild-type human CFTR, as previously described [12]. For cell-attached recordings, the pipette (extracellular) solution contained (mmol/L): 140 N-methyl-D-glucamine (NMDG), 3 $MgCl_2$, 10 N-tris[hydroxymethyl]methyl-2-aminoethanesulphonic acid (TES) and 1 CsEGTA, adjusted to pH 7.3 with HCl ($[Cl^-]$, 147 mmol/L). The bath solution contained (mmol/L): 137 NaCl, 4 KCl, 3 $MgCl_2$ and 10 TES, adjusted to pH 7.3 with NaOH ($[Cl^-]$, 147 mmol/L), and was maintained at 37 °C; pipette potential was +50 mV. CFTR channels were activated with 100 nmol/L PTH 1–34.

For excised inside-out membrane patch recordings, the pipette (extracellular) solution contained (mmol/L): 140 NMDG, 140 aspartic acid, 5 $CaCl_2$, 2 $MgSO_4$ and 10 TES, adjusted to pH 7.3 with Tris ($[Cl^-]$, 10 mmol/L). The bath (intracellular) solution contained (mmol/L): 140 NMDG, 3 $MgCl_2$, 1 CsEGTA and 10 TES, adjusted to pH 7.3 with HCl ($[Cl^-]$, 147 mmol/L; free $[Ca^{2+}]$, $<10^{-8}$ mol/L) and was maintained at 37 °C; membrane voltage was clamped at –50 mV. Following membrane patch excision, CFTR Cl^- channels were activated promptly with 75 nmol/L protein kinase A [PKA (purified from bovine heart); Calbiochem] and 1 mmol/L ATP (Sigma). The effects of test compounds were evaluated by addition to the bath solution with PKA and ATP continuously present to prevent channel

rundown. In this study, membrane patches contained ≤ 5 active channels determined using the maximum number of simultaneous channel openings as described previously [13]. After recording, filtering and digitizing data [12], single-channel current amplitude (i) and open probability (P_o) were determined as described previously [12,13].

2.6. Statistical analyses

Data recordings and analyses were randomized, but not blinded. Results are expressed as means $\pm$ SEM of n observations. In mRNA expression studies (Fig. 1), n represents the number of cell samples, in Ussing chamber studies (Figs. 2C and 3), n represents the number of independent epithelial monolayers, and in patch-clamp experiments (Fig. 2A and B and 4), n represents the number of individual membrane patches obtained using different cells. All data were tested for normal distribution using a Shapiro-Wilk normality test. To test for differences between two groups of data acquired within the same experiment, we used Student's t -test. To test for differences between multiple groups, we used one-way analysis of variance followed by Dunnett's multiple comparison test when a statistically significant difference was observed. Differences were considered significant when $P < 0.05$, as analyzed by Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, CA).

3. Results

3.1. *Caco-2* cells abundantly express PTH receptors

To test the effects of PTH on CFTR-mediated anion secretion, we examined the expression of PTH receptors (PTHRs) type-1 and -2 in *Caco-2* cells. mRNA analysis demonstrated that *Caco-2* cells strongly express both PTHR1 and PTHR2 (Fig. 1). The level of expression of PTHR1 mRNA was approximately double that of PTHR2 mRNA.

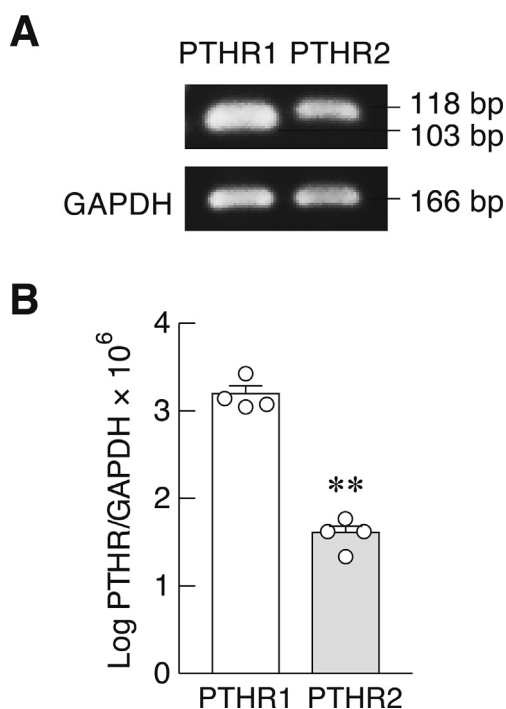


Fig. 1. (A) Representative PCR analysis of PTH receptor (PTHR) isoform 1 and 2 mRNA expression in *Caco-2* cells. (B) The mRNA levels as normalized to GAPDH expression ($n = 4$; ** $P < 0.01$ vs. PTHR1).

3.2. PTH stimulates the opening of CFTR-like channels and the insertion of membrane vesicles into the apical membrane

Our previous work demonstrated that PTH-induced anion secretion by *Caco-2* monolayers is dependent on CFTR activity [3,4,14]. To understand better how PTH stimulates CFTR-mediated anion secretion, we investigated whether PTH enhances the activity of individual CFTR Cl^- channels or increases channel number in the apical membrane. To study the effects of PTH on individual CFTR Cl^- channels, we used the cell-attached configuration of the patch-clamp technique. Because cell-attached recording from the apical membrane of *Caco-2* cells isolated from polarized monolayers was not feasible ($n = 15$ attempts), we used *Caco-2* cells grown on glass coverslips, selecting for study cells within small clumps which were likely to be polarized. Three successful cell-attached recordings were obtained from *Caco-2* cells from 46 attempts. Under basal conditions, no channel activity was observed (Fig. 2A). However, following the addition of 100 nmol/L PTH 1–34 to the solution bathing *Caco-2* cells, channel activity was observed (Fig. 2A and B). Because these channels had small single-channel current amplitude and a time-independent bursting pattern of channel gating characteristic of CFTR [12,13], the data suggest that PTH stimulates CFTR activity in *Caco-2* cells.

To learn whether PTH enhances the apical membrane expression of CFTR, we used AC-based impedance analysis to measure membrane capacitance because membrane capacitance is directly proportional to plasma membrane area [3]. Fig. 2C shows a representative time course of I_{sc} from a *Caco-2* monolayer demonstrating the transient increase in I_{sc} stimulated by PTH, which is followed by a sustained plateau, while Fig. 2D quantifies the corresponding changes in C_a . At both the peak of the transient and during the sustained plateau stimulated by PTH, C_a values were increased 3.48- and 3.86-fold compared to controls, respectively (Fig. 2D). However, treatment of *Caco-2* monolayers with CFTR_{inh}-172 (20 $\mu\text{mol/L}$), a potent inhibitor of CFTR abolished the increase in C_a values (Fig. 2D). These data suggest that PTH stimulation of *Caco-2* monolayers increases the surface area of the apical membrane, presumably by the insertion of CFTR-laden vesicles.

3.3. IKCa inhibition diminishes residual PTH-induced anion secretion by *Caco-2* monolayers under $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -free conditions

In Ussing chamber experiments, CFTR-mediated anion secretion by *Caco-2* monolayers stimulated by PTH is characterized by an early transient increase in I_{sc} , which decays rapidly to a long-lasting plateau [4]. Removal of Cl^- and HCO_3^- from the apical and basolateral solutions reduces the magnitude of the peak and late phases of the I_{sc} response by 0.54- and 0.94-fold, respectively (Fig. 3). Based on the effects of inhibitors when *Caco-2* monolayers were bathed in physiological salt solutions [4], the residual I_{sc} observed in $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -free solutions might be accounted by either IKCa or CA. To test these possibilities, we treated *Caco-2* monolayers bathed in $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -free solutions with the IKCa inhibitor clotrimazole (30 $\mu\text{mol/L}$) and the CA inhibitor acetazolamide (100 $\mu\text{mol/L}$) prior to recording the PTH-induced I_{sc} . Fig. 3 demonstrates that clotrimazole reduced the peak I_{sc} by 0.44-fold, but was without effect on the plateau I_{sc} , whereas acetazolamide was without effect on either the peak or plateau I_{sc} . These results suggested that basolateral K^+ recycling through IKCa contributes to the residual PTH-stimulated I_{sc} in *Caco-2* monolayers.

3.4. The IKCa inhibitor TRAM-34 is without effect on CFTR activity

Since the IKCa inhibitors clotrimazole (Fig. 3) and TRAM-34 [4] suppress the action of PTH on *Caco-2* monolayers, it was important

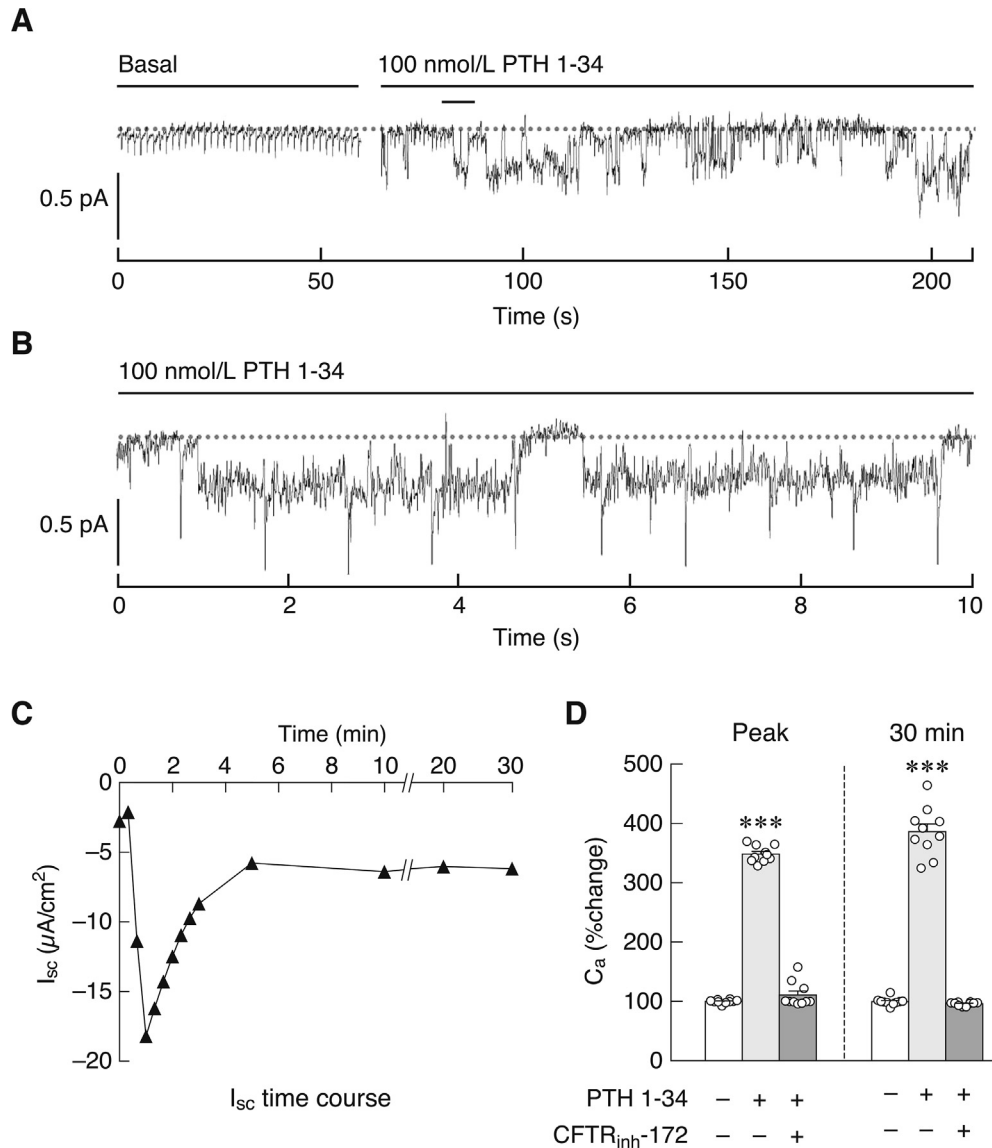


Fig. 2. PTH promotes CFTR opening and trafficking to the apical membrane. (A and B) Cell-attached recordings from a Caco-2 cell in the absence and presence of 100 nmol/L PTH 1–34. The dotted line indicates where channels are closed and downward deflections correspond to channel openings. The 10-s period indicated by a bar is displayed on an expanded time scale in (B) to show the pattern of channel gating. Similar results were observed in two other experiments. (C) I_{sc} timeline diagram showing time points of early and late phases following Caco-2 monolayer stimulation by 10 nmol/L PTH 1–34. (D) Summary data show the change in apical membrane capacitance (C_a) after exposure to vehicle (DMSO 0.1% v/v; white bars), 10 nmol/L PTH 1–34 or 10 nmol/L PTH 1–34 and 20 μ mol/L CFTR_{inh}-172, determined at 2 and 30 min after PTH treatment to represent early and late phases of Caco-2 response, respectively ($n = 10$; *** $P < 0.001$ vs. DMSO).

to exclude the possibility that IKCa inhibitors affect CFTR function. TRAM-34 is a highly lipophilic small molecule that permeates cell membranes [15], while CFTR contains a deep intracellular vestibule that is occluded by organic anions with diverse chemical structures [16]. Using excised inside-out membrane patches from C127 cells heterologously expressing wild-type human CFTR, we investigated whether TRAM-34 inhibits CFTR. Fig. 4 demonstrates that 20 μ mol/L TRAM-34 was without effect on current flow through open CFTR Cl^- channels nor the pattern of channel gating (as measured by P_o) ($P > 0.05$). By contrast, the CFTR potentiator ivacaftor (100 nmol/L VX-770) increased P_o by 53%, after which the CFTR inhibitor CFTR_{inh}-172 (20 μ mol/L) decreased P_o by 96% without altering i (Fig. 4B – D). Thus, the observed effects of TRAM-34 on transepithelial ion transport by Caco-2 monolayers are unlikely to be mediated by CFTR.

4. Discussion

This study investigated how PTH enhances anion secretion by the human intestinal epithelial cell line Caco-2. With the patch-clamp and Ussing chamber techniques, we demonstrated that PTH increased the insertion and function of CFTR in the apical membrane and IKCa activity in the basolateral membrane.

PTH is a key regulator of body Ca^{2+} and HPO_4^{2-} homeostasis [17]. In previous studies using Caco-2 cells and rodent tissue, we identified a new role for PTH, i.e., stimulation of CFTR-mediated intestinal anion secretion [3,14]. Epithelial anion secretion drives salt and water secretion by generating a transepithelial luminal-negative voltage, which facilitates Na^+ and water transport through the paracellular pathway into the lumen [18]. In airway epithelia, anion secretion contributes to the formation of airway surface liquid, which modulates mucus viscosity and promotes

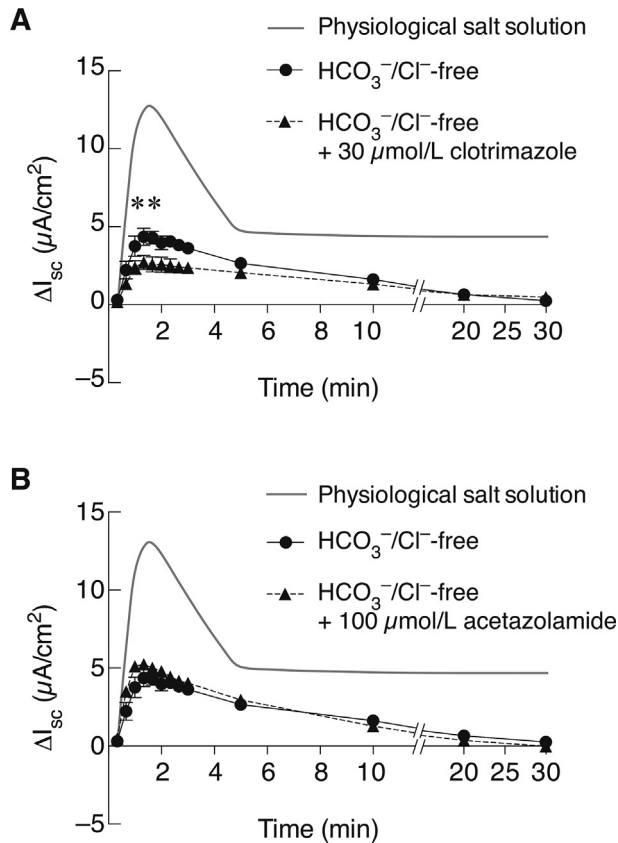


Fig. 3. Inhibition of the intermediate potassium (IK) channel partially suppresses the PTH-induced ΔI_{sc} of Caco-2 monolayers in the absence of Cl^- and HCO_3^- . (A and B) Summary ΔI_{sc} time courses of Caco-2 monolayers exposed to PTH 1–34 (10 nmol/L) after 30-min pre-incubation in symmetrical Cl^- - and HCO_3^- -free solution. The grey lines in (A) and (B) show theoretical ΔI_{sc} time courses for PTH-stimulated Caco-2 monolayers bathed in symmetrical salt solution. In (A) ΔI_{sc} was recorded in the absence and presence of the IK channel inhibitor (30 μ mol/L clotrimazole) in the basolateral solution, whereas in (B) ΔI_{sc} was recorded in the absence and presence of 100 μ mol/L acetazolamide in both sides. Cl^-/HCO_3^- -free (control), $n = 8$; Cl^-/HCO_3^- -free + clotrimazole, $n = 10$; Cl^-/HCO_3^- -free + acetazolamide, $n = 10$; $^{**}P < 0.01$ vs. control at the corresponding time point.

mucociliary clearance. In the intestine, salt and water secretion helps maintain a semiliquid luminal environment that supports the digestion and absorption of nutrients. The PTH action found in the present study would promote intestinal fluid secretion, consistent with the presence of fluid accumulation in ileal loops after intravenous PTH infusion in mice [14]. In addition, PTH-induced HCO_3^- secretion probably plays an important role in pH regulation in the intestinal lumen. It has been hypothesized that alkalinization of luminal fluid is important for the regulation of mineral absorption—e.g., phosphate uptake as reported by Danisi et al. [19], consistent with the hypophosphatemic actions of PTH. Future *in vivo* and *in vitro* experiments should test this hypothesis.

CFTR is the epithelial anion channel regulated by cAMP-dependent phosphorylation [5]. It provides a pathway for Cl^- and HCO_3^- flow across the apical membrane and additionally regulates anion exchangers, which mediate HCO_3^- secretion in the intestine [18,20]. Our previous studies demonstrated that PTH activates the cAMP signaling pathway, leading to stimulation of CFTR-mediated anion secretion by Caco-2 monolayers [3,4]. Building on these data, here we demonstrate that in Caco-2 cells expressing the PTH receptors, PTH opens CFTR-like channels in intact cells and causes a CFTR_{inh}-172-sensitive increase in apical membrane surface area. We interpret these data to suggest that PTH stimulation of CFTR-

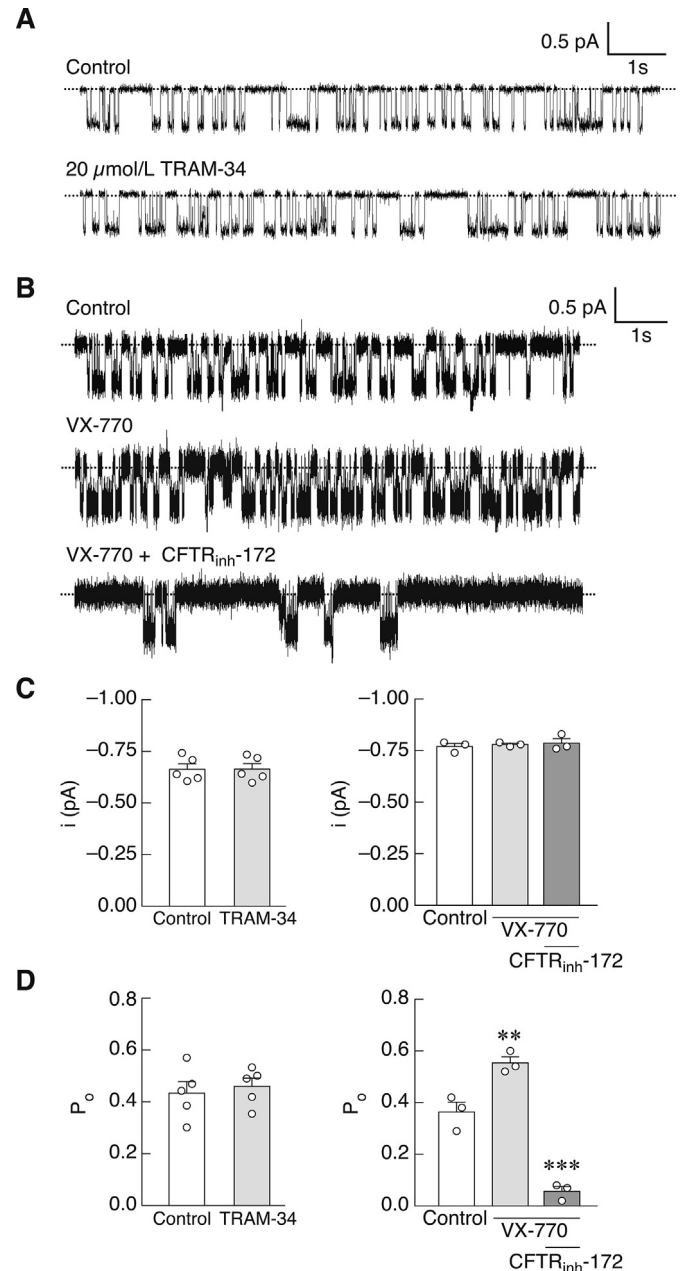


Fig. 4. Lack of effect of the IKCa channel inhibitor TRAM-34 on wild-type CFTR. (A and B) Representative single-channel recordings of wild-type CFTR in excised inside-out membrane patches from C127 cells showing the effects of 20 μ mol/L TRAM-34 and 100 nmol/L ivacaftor (VX-770) and 20 μ mol/L CFTR_{inh}-172 on channel activity. The recordings were acquired at 37 °C with either 1 mmol/L ATP or 0.3 mmol/L ATP (B) and 75 nmol/L PKA continuously present in the intracellular solution. Dotted lines indicate where channels are closed and downward deflections correspond to channel openings. (C and D) Summary data show the effects of small molecules on the single-channel current amplitude (i) and open probability (P_o) of CFTR. TRAM-34 group, $n = 5$; VX-770 and CFTR_{inh}-172, $n = 3$; $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$ vs. control.

mediated anion secretion involves both increased CFTR channel activity and the delivery of CFTR-containing vesicles to the apical membrane, the latter of which is a common mechanism to increase the apical CFTR expression under various conditions, e.g., vasoactive intestinal peptide and forskolin exposure [21].

Even in the absence of Cl^- and HCO_3^- in physiological salt solutions, PTH elicited some electrogenic ion transport by Caco-2 monolayers [4]. This result suggested that Caco-2 cells generate

HCO_3^- or K^+ is transported across the basolateral membrane. To investigate these possibilities, here we tested the effects of the CA inhibitor acetazolamide and the IKCa inhibitor clotrimazole on Caco-2 monolayers using $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -free conditions. Acetazolamide was without strong effect, but clotrimazole and TRAM-34 inhibited the PTH-stimulated increase in electrogenic ion transport [4]. Because TRAM-34 was without effect on the single-channel behavior of CFTR, we interpret these data to suggest that PTH stimulates anion secretion by Caco-2 monolayers, in part, by activating IKCa in the basolateral membrane to enhance the driving force for anion exit across the apical membrane, similar to the previous report that showed contribution of IKCa to CFTR activity [22].

In conclusion, in Caco-2 monolayers, a widely used model of human intestinal ion transport, PTH stimulates CFTR-mediated anion secretion by increasing CFTR expression and function in the apical membrane and IKCa activity in the basolateral membrane. Future studies should use animal models with genetically-silenced epithelial ion channels to understand better the physiological role of PTH in the intestine [23].

Author contributions

Conception and design of the experiments: DNS and NC; performed the research: WJ, RA, JTh and BSJH; analysis and interpretation of data: WJ, KL, KW, JT, BSJH, DNS and NC; drafting the article or revising it critically for important intellectual content: WJ, KL, KW, JT, DNS and NC. All authors approved the final version of the manuscript.

Declaration of competing interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

Acknowledgments

We thank MA Jepson and CR O'Riordan for generous gifts of cells and our Departmental colleagues for valuable discussions and assistance, particularly NV Marrion, H Li and SJ Bose. This study was supported by grants from the Faculty of Science, Mahidol University (CIF and Research Assistant Grants to NC), Mahidol University–Multidisciplinary Research Cluster Grant (to NC), the Thailand Research Fund (TRF) through the TRF Senior Research Scholar Grant (RTA6080007 to NC), TRF International Research Network Program (IRN60W0001 to WJ, KW and NC) and the Cystic Fibrosis Trust (DNS). JT was supported by the TRF–Office of the Higher Education Commission Research Grant for New Scholar (MRG6280198). BSJH was supported by a PhD studentship from the Cystic Fibrosis Trust.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.12.106>.

Transparency document

Transparency document related to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.12.106>.

References

- [1] E. Pastoriza-Munoz, R.M. Harrington, M.L. Graber, Parathyroid hormone decreases HCO_3^- reabsorption in the rat proximal tubule by stimulating phosphatidylinositol metabolism and inhibiting base exit, *J. Clin. Invest.* 89 (1992) 1485–1495.
- [2] A. Azarani, D. Goltzman, J. Orłowski, Parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide inhibit the apical Na^+/H^+ exchanger NHE-3 isoform in renal cells (OK) via a dual signaling cascade involving protein kinase A and C, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 20004–20010.
- [3] S. Laohapitakworn, J. Thongbunchoo, L.I. Nakkrasae, N. Krishnamra, N. Charoenphandhu, Parathyroid hormone (PTH) rapidly enhances CFTR-mediated HCO_3^- secretion in intestinal epithelium-like Caco-2 monolayer: a novel ion regulatory action of PTH, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 301 (2011) C137–C149.
- [4] W. Jantarajit, K. Lertsuwan, J. Teerapornpuntakit, N. Krishnamra, N. Charoenphandhu, CFTR-mediated anion secretion across intestinal epithelium-like Caco-2 monolayer under PTH stimulation is dependent on intermediate conductance K^+ channels, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 313 (2017) C118–C129.
- [5] M.P. Anderson, D.N. Sheppard, H.A. Berger, M.J. Welsh, Chloride channels in the apical membrane of normal and cystic fibrosis airway and intestinal epithelia, *Am. J. Physiol.* 263 (1992) L1–L14.
- [6] J.A. Tabcharani, X.B. Chang, J.R. Riordan, J.W. Hanrahan, Phosphorylation-regulated Cl^- channel in CHO cells stably expressing the cystic fibrosis gene, *Nature* 352 (1991) 628–631.
- [7] N.A. Bradbury, T. Jilling, G. Berta, E.J. Sorscher, R.J. Bridges, K.L. Kirk, Regulation of plasma membrane recycling by CFTR, *Science* 256 (1992) 530–532.
- [8] M. Mall, M. Bleich, M. Schürlein, J. Kühn, H.H. Seydewitz, M. Brandis, R. Greger, K. Kunzelmann, Cholinergic ion secretion in human colon requires coactivation by cAMP, *Am. J. Physiol.* 275 (1998) G1274–G1281.
- [9] D. Heitzmann, R. Warth, Physiology and pathophysiology of potassium channels in gastrointestinal epithelia, *Physiol. Rev.* 88 (2008) 1119–1182.
- [10] S. Nagai, M. Okazaki, H. Segawa, C. Bergwitz, T. Dean, J.T. Potts Jr., M.J. Mahon, T.J. Gardella, H. Jüppner, Acute down-regulation of sodium-dependent phosphate transporter NPT2a involves predominantly the cAMP/PKA pathway as revealed by signaling-selective parathyroid hormone analogs, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 1618–1626.
- [11] C.W. Taylor, S.C. Tovey, From parathyroid hormone to cytosolic Ca^{2+} signals, *Biochem. Soc. Trans.* 40 (2012) 147–152.
- [12] D.N. Sheppard, K.A. Robinson, Mechanism of glibenclamide inhibition of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl^- channels expressed in a murine cell line, *J. Physiol.* 503 (1997) 333–346.
- [13] Z. Cai, A. Taddei, D.N. Sheppard, Differential sensitivity of the cystic fibrosis (CF)-associated mutants G551D and G1349D to potentiators of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) Cl^- channel, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 1970–1977.
- [14] N. Charoenphandhu, S. Laohapitakworn, K. Kraidith, L.I. Nakkrasae, P. Jongwattanapisan, P. Tharabenjasin, N. Krishnamra, Electrogenic $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ co-transporter-1 is essential for the parathyroid hormone-stimulated intestinal HCO_3^- secretion, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 409 (2011) 775–779.
- [15] H. Wulff, M.J. Miller, W. Hänsel, S. Grissmer, M.D. Cahalan, K.G. Chandy, Design of a potent and selective inhibitor of the intermediate-conductance Ca^{2+} -activated K^+ channel, *IKCa1*: a potential immunosuppressant, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97 (2000) 8151–8156.
- [16] H. Li, D.N. Sheppard, Therapeutic potential of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) inhibitors in polycystic kidney disease, *BioDrugs* 23 (2009) 203–216.
- [17] F. Albright, W. Bauer, M. Ropes, J.C. Aub, Studies of calcium and phosphorus metabolism: IV. The effect of the parathyroid hormone, *J. Clin. Invest.* 7 (1929) 139–181.
- [18] R.A. Frizzell, J.W. Hanrahan, Physiology of epithelial chloride and fluid secretion, *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2 (2012) a009563.
- [19] G. Danisi, H. Murer, R.W. Straub, Effect of pH on phosphate transport into intestinal brush-border membrane vesicles, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 246 (1984) G180–G186.
- [20] U. Seidler, I. Blumenstein, A. Kretz, D. Viellard-Baron, H. Rossmann, W.H. Colledge, M. Evans, R. Ratcliff, M. Gregor, A functional CFTR protein is required for mouse intestinal cAMP-, cGMP- and Ca^{2+} -dependent HCO_3^- secretion, *J. Physiol.* 505 (1997) 411–423.
- [21] R.W. Leirich, S.G. Aller, P. Webster, C.R. Marino, J.N. Forrest Jr., Vasoactive intestinal peptide, forskolin, and genistein increase apical CFTR trafficking in the rectal gland of the spiny dogfish, *Squalus acanthias*. Acute regulation of CFTR trafficking in an intact epithelium, *J. Clin. Invest.* 101 (1998) 737–745.
- [22] R. Xie, X. Dong, C. Wong, V. Vallon, B. Tang, J. Sun, S. Yang, H. Dong, Molecular mechanisms of calcium-sensing receptor-mediated calcium signaling in the modulation of epithelial ion transport and bicarbonate secretion, *J. Biol. Chem.* 289 (2014) 34642–34653.
- [23] A.R. Philp, T.T. Riquelme, P. Millar-Büchner, R. González, F.V. Sepúlveda, L.P. Cid, C.A. Flores, *Kcnn4* is a modifier gene of intestinal cystic fibrosis preventing lethality in the *Cfr*-F508del mouse, *Sci. Rep.* 8 (2018) 9320.



Differential expression of Sox9 protein and proteoglycans in the epiphyseal cartilage of bromocriptine-treated pregnant and lactating rats

Kannikar Wongdee^{1,2} · Kornkamon Lertsuwan^{2,3} · Natchayaporn Thonapan^{2,4} · Jarinthorn Teerapornpuntakit^{2,5} · Narattaphol Charoenphandhu^{2,4,6,7}

Received: 11 September 2019 / Accepted: 9 December 2019 / Published online: 21 December 2019
© Japanese Association of Anatomists 2019

Abstract

Several investigations have shown that pregnancy and lactation are able to induce elongation of long bone by altering epiphyseal cartilage function in a prolactin-dependent manner. Since the transcription factor Sox9 is of utmost importance for chondrocyte proliferation and differentiation and since bromocriptine, a dopaminergic D2 agonist widely used to suppress milk production, is known to disrupt the production and release of prolactin, we herein aimed to investigate whether pregnancy and lactation as well as bromocriptine could alter the expression of Sox9. Our immunohistochemical analysis showed that the Sox9 expression levels were markedly upregulated in the tibial proliferative zone of day 21 pregnant rats. In day 8 (early) and day 14 (mid) lactating rats, the Sox9 expression was enhanced only in the proliferative zone, but not in the resting and hypertrophic zones. There was no change in Sox9 expression in day 21 (late) lactating rats. Postweaning rats manifested a decreased Sox9 expression in the hypertrophic zone. Bromocriptine had no effect on Sox9 expression in the proliferative zone of day 21 pregnant rats; however, it completely prevented the Sox9 upregulation in those of early and mid-lactating rats. A differential response was observed in the proliferative and hypertrophic zones of late lactating rats, in which bromocriptine enhanced Sox9 expression. Further investigation of cartilaginous matrix revealed no change in proteoglycans accumulation in lactating rats. In conclusion, the upregulated Sox9 expression predominantly occurred in the proliferative zone during late pregnancy and early and mid-lactation, while the bromocriptine effects depended on the periods and epiphyseal zones.

Keywords Bone · Cartilage · Growth plate · Prolactin · Sox9

Introduction

Endochondral ossification is the process, in which chondrocytes in cartilages are replaced by osteoblasts resulting in bone formation (Mackie et al. 2008). Endochondral bone growth is controlled by both systematic factors and local signals, particularly growth hormone (GH), prolactin, liver-derived insulin-like growth factor-1 (IGF-1), Indian hedgehog (Ihh) and parathyroid hormone-related protein (PTHrP) (Ballock and O’Keefe 2003; Cheng and Genever 2010; Provot and Schipani 2005). This process is also regulated by several chondrogenic transcription factors, particularly SRY (sex-determining region Y)-box9 (Sox9) (Mackie et al. 2008; Provot and Schipani 2005; Chen et al. 2014; Liu et al. 2017). Since prolactin is one of the regulators for chondrocyte proliferation, differentiation and endochondral ossification, longitudinal bone growth is also affected during pregnancy and lactation, the reproductive periods when the

✉ Narattaphol Charoenphandhu
naratt@narattsys.com

- ¹ Faculty of Allied Health Sciences, Burapha University, Chonburi 20131, Thailand
- ² Center of Calcium and Bone Research (COCAB), Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand
- ³ Department of Biochemistry, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand
- ⁴ Department of Physiology, Faculty of Science, Mahidol University, Rama VI Road, Bangkok 10400, Thailand
- ⁵ Department of Physiology, Faculty of Medical Science, Naresuan University, Phitsanulok 65000, Thailand
- ⁶ Institute of Molecular Biosciences, Mahidol University, Nakhon Pathom 73170, Thailand
- ⁷ The Academy of Science, The Royal Society of Thailand, Dusit, Bangkok 10300, Thailand

circulating prolactin levels are markedly elevated up to tenfold (i.e., from ~10 to >100 ng/mL in rodents and humans) (Wongdee et al. 2012).

Our previous studies reported that endochondral bone growth was enhanced in lactating rats, resulting in a significantly increased femoral length in these animals (Suntornsaratoon et al. 2010a; Wongdee et al. 2013). The lactation-induced bone elongation also resulted, in part, from hyperprolactinemia, which could be abolished by the suppression of prolactin secretion by bromocriptine (Suntornsaratoon et al. 2010a, b; Wongdee et al. 2013). Generally, bromocriptine is a versatile drug for a number of symptoms and diseases, such as excess production of breastmilk, prolactinoma, hyperprolactinemia and Parkinson's disease. It is also prescribed to suppress breastmilk production for certain groups of patients, e.g., abortion and HIV infection. Since bromocriptine is a potent dopaminergic D2 receptor agonist that inhibits pituitary prolactin release and diminishes the plasma prolactin to an undetectable level (Lieberman and Goldstein 1985), it was hypothesized to markedly affect the expression of chondroregulatory proteins including Sox9 during lactation with physiological hyperprolactinemia.

As the chondrocyte resident site in long bones, growth plate is a center of endochondral ossification consisting of ordered zones of chondrocytes that secrete an extracellular matrix (ECM) with specific types of collagens and proteoglycans. Growth plate can be divided into 3 zones, i.e., reserve (resting) zone (RZ), proliferative zone (PZ) and hypertrophic zone (HZ) (from proximal metaphysis to diaphysis) (Mackie et al. 2008; Burdan et al. 2009). The 3 morphological zones represent different functional stages of the cells. Along with the growing growth plate, cartilaginous ECM is produced to confer mechanical stability and withstand compression of growing skeleton (Mackie et al. 2011). Specifically, in RZ, quiescent chondroblasts are embedded in extracellular matrix-rich environment (Abad et al. 2002). Once the cells migrate to the PZ, they transform into the highly mitotic cells and organize themselves in paralleled columns. They also overexpress Sox9, which is also one of the activators of the chondrocyte-specific enhancer of the pro-collagen gene. Thereafter, the proliferating chondrocytes differentiate to mature hypertrophic chondrocytes that synthesize a lot of extracellular proteins, such as collagens and proteoglycans in HZ (Mackie et al. 2008; Provot and Schipani 2005; Arnold et al. 2007; van der Eerden et al. 2003). Finally, the hypertrophic chondrocytes undergo apoptosis leaving spaces for the invasion of blood vessels and osteoblasts to initiate bone forming process (Mackie et al. 2008; Provot and Schipani 2005; van der Eerden et al. 2003).

Since bone elongation was enhanced in lactating rats (Suntornsaratoon et al. 2010a), bromocriptine known to diminish the lactation-associated bone elongation was previously investigated to confirm the effects on some

chondroregulatory paracrine factors, such as Ihh and PTHrP (Suntornsaratoon et al. 2010a; Wongdee et al. 2013). Thus, in the present study, Sox9 was of interest because of its important role in bone elongation as one of the major regulators in chondrocyte differentiation and endochondral ossification. Many studies showed that Sox9 is required for the commitment of mesenchymal stem cells to chondroblasts (Provot and Schipani 2005). Sox9 in the proliferative chondrocytes also induces proliferation and the expression ECM proteins, such as collagen type II, IX and XI (Provot and Schipani 2005; Lefebvre and Smits 2005).

Therefore, the present study aimed to elucidate the effects of bromocriptine on Sox9 expression in growth plate of lactating rats as well as the effects of bromocriptine on proteoglycans accumulation in the growth plate during lactation. These data could provide more information about physiological roles of prolactin in lactation-induced endochondral bone growth and the potential side effects of the widely used drug, bromocriptine, on chondrocytes.

Materials and methods

Animals

Eight-week-old primiparous pregnant and nulliparous age-matched (weighing 210–220 g) Sprague–Dawley rats were obtained from the National Laboratory Animal Center, Nakhon Pathom, Thailand. They were housed in standard stainless-steel cages under 12:12-h light–dark cycle (light on at 0600 h; average illuminance of 200 lx) for at least 5 days prior to the experiments. They were fed with standard chow (CP Co., Ltd., Bangkok, Thailand) and reverse osmosis water ad libitum. Room temperature was controlled at 25 ± 2 °C with relative humidity of ~50 to 60%. After delivery (day 0), the litter size was adjusted to eight pups per dam. This study has been approved by the Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) of the Faculty of Science, Mahidol University, Thailand.

Experimental design

The present experimental design and bone specimen collection were based on the previous protocol by Wongdee et al. (2013). Changes in Sox9 protein expression and/or proteoglycans accumulation were investigated in the proximal tibial growth plate of vehicle (normal saline)-treated or bromocriptine-treated rats at various reproductive phases, i.e., late pregnancy (day 21 of pregnancy; P21), early lactation (day 8 of lactation; L8), mid-lactation (day 14 of lactation; L14), and late lactation (day 21 of lactation; L21). In addition, Sox9 expression was also examined in postweaning rats (day 15 of postweaning; PW).

After delivery, rats were acclimatized for 5 days. For lactating rats, the litter size was adjusted to eight pups/dam for all lactating groups. Thereafter, day 14 pregnant and day 1, 7, and 14 lactating rats were subcutaneously injected once a day with 4 mg/kg body weight (BW) bromocriptine (Sigma, St. Louis, MO, USA) or 0.2 mL/kg normal saline (age-matched control) for 7 days. The ages of P21, L8, L14, L21, and PW rats were 11, 12, 13, 14, and 16 weeks old, respectively. The corresponding age-matched control rats were also euthanized on the same designated day. Our bromocriptine administration has been reported to successfully abolish hyperprolactinemia in lactating rats (i.e., serum prolactin level < 10 ng/mL) (Charoenphandhu et al. 2009). The timeline of this experiment is shown in Fig. 1.

Bone preparation for histological study

Tibiae were cleaned of adhering connective tissue and washed with 0.01 M phosphate-buffered saline (PBS) and immediately fixed at 4 °C for 24 h in 0.1 M PBS containing 4% w/v paraformaldehyde. Then, they were washed with cold PBS pH 7.4 and decalcified in 15% w/v ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA; Sigma) at 4 °C for 3 weeks. Decalcifying solution was replaced every 3 days. Thereafter, tibiae were processed for dehydration and clearing by graded ethanol (70%, 80%, 90%, 95% and 100% ethanol) and xylene, respectively (1 h each). After being embedded in paraffin, specimens were longitudinally cut into 5- μ m sections by a microtome (model RM2255; Leica, Nussloch, Germany), followed by dewaxing with xylene and graded ethanol.

Sox9 immunostaining

Bone sections were then incubated at 37 °C for 30 min in antigen retrieval solution (0.01 mg/mL proteinase K, 50 mM Tris-HCl pH 8.0 and 5 mM EDTA). To reduce endogenous peroxidase activity, the sections were then incubated for 15 min with 3% H₂O₂. Non-specific bindings were blocked by 2-h incubation with blocking solution (4% bovine serum albumin, 10% normal goat serum, and 0.1% Tween-20 in PBS) followed by overnight incubation at 4 °C with 1:50

rabbit polyclonal primary antibody against Sox9 (catalog no. sc-20095; Santa Cruz Biotechnology). After being washed with 0.1% Tween-20 in PBS, the sections were incubated at room temperature for 1 h with biotinylated anti-IgG (catalog no. sc-2040; Santa Cruz Biotechnology) followed by 1-h incubation with streptavidin-conjugated horseradish peroxidase (HRP) solution (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) peroxidase substrate (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Regarding the negative controls, the sections were incubated with blocking solution in the absence of primary antibody. All sections were counterstained with Mayer's hematoxylin (Sigma), examined under a light microscope and analyzed with Image Pro Plus 5 (Media Cybernetics, Bethesda, MD, USA). Positive sections appeared reddish brown of AEC end product, whereas negative control sections were stained purplish of Mayer's hematoxylin color (Fig. 2).

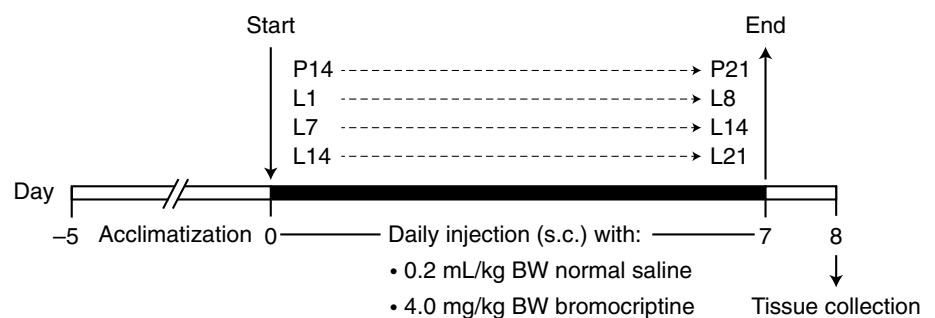
Safranin O staining

After deparaffinization, tibial sections were stained with Mayer's hematoxylin (Bio-Optica; Milan, Italy) for 5 min. After being rinsed with tap water, the sections were stained with 0.02% w/v Fast green to counterstain the tissue background. The color was differentiated by dipping in 1% v/v acetic acid for 30 s. To stain proteoglycans, the sections were stained with Safranin O for 10 min, then dehydrated with graded ethanol, cleared with xylene and examined under a light microscope (Olympus BX51) and NIS-Elements BR Analysis 4.00 (Nikon Instruments Inc., NY, USA).

Quantitation of histochemical signals

Quantitative determination of Sox9 signals in the proximal tibial growth plate was modified from Wongdee et al. (2010) and Lehr et al. (1999). Demarcation of each growth plate zone (i.e., RZ, PZ and HZ) was previously described by Yakar et al. (2002). Selections of AEC-positive signals (reddish color) were performed with Adobe Photoshop (Adobe System, San Jose, CA, USA) by filtering the specific color shade [in red-green-blue (RGB) mode] and color density in the regions of interest (ROI), which covered each zone

Fig. 1 Timelines of the present experiments (please see text for detail)



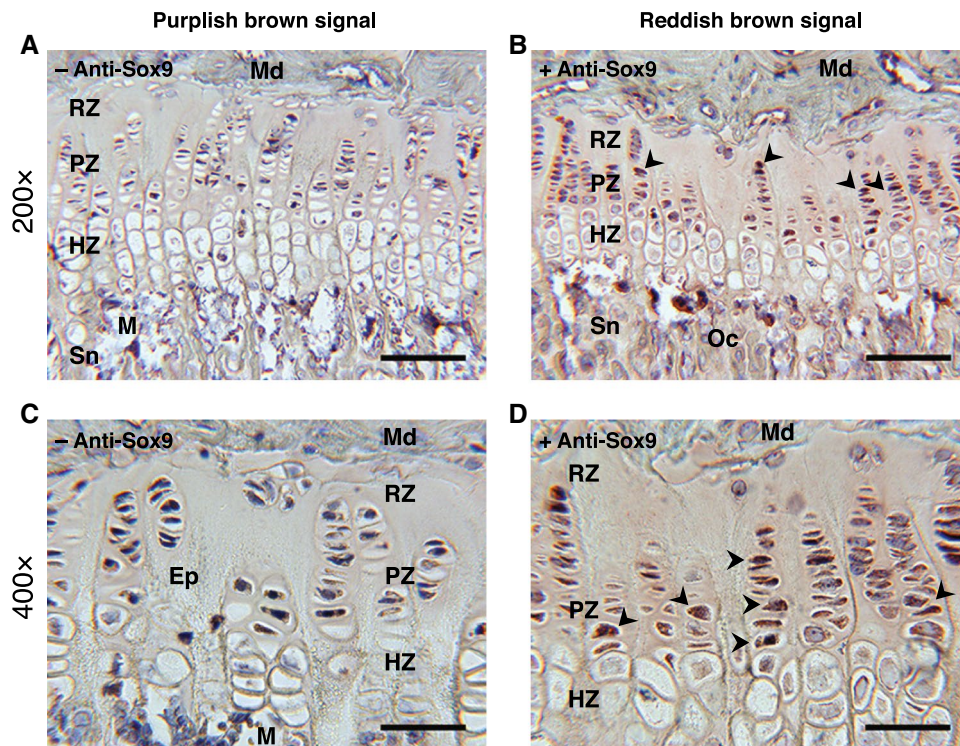


Fig. 2 Diagram shows chemical reaction of color change indicating the expression of Sox9. **a–d** Representative immunohistochemical photomicrographs of Sox9 expression in the proximal tibial growth plate of a lactating rat ($\times 200$ magnification, bars 100 μm ; $\times 400$ magnification, bars 50 μm). The paraffin-embedded decalcified tibial section was incubated with primary antibody against Sox9 (+Anti-Sox9). Positive reddish signals of Sox9 were localized predominantly

in the proliferative zone (PZ) of epiphyseal cartilage rather than the reserve zone (RZ) or hypertrophic zone (HZ). Corresponding negative control section was incubated in an absence of anti-Sox9 antibody (–Anti-Sox9). The negative control image showed brownish color. The arrowheads indicate the expression of Sox9 protein in the chondrocytes. M, marrow; Md, mineralized matrix; Oc, osteoblast cell; Sn, primary spongiosa

of growth plate. Positive pixels on the ROI were automatically highlighted by software, while other pixels outside the defined color range were not included. Pixel counting was performed by the Histogram command, which showed the numbers of the total and positive pixels in the ROI. Relative signal intensity was normalized by the average of negative control signals (i.e., the positive signals from the negative control sections).

For proteoglycans density, selection of safranin O positive signals (reddish color) in whole growth plate was analyzed with NIS-Elements BR Analysis 4.00 (Nikon Instruments Inc.) by filtering the specific color shade [in red–green–blue (RGB) mode] and color density in the ROI. The most intense reddish color was scored 5 and the palest color was scored 1. The numbers of total and positive pixels in the ROI were counted by software. Relative signal density was normalized by the average of negative control signals (i.e., the positive signals from the negative control sections). Relative densities of vehicle-treated lactating rats and bromocriptine-treated lactating rats were normalized by the relative intensity of age-matched control rats, and presented as percent of control value.

Statistical analysis

The results are presented as means $\pm$ standard error (SE). Two sets of data were compared using unpaired Student's *t* test. One-way analysis of variance (ANOVA) with Kruskal–Wallis multiple comparison test was used for multiple sets of data. The significant level for all tests was $P < 0.05$. All data were analyzed by GraphPad Prism 8.0 for Mac OS X (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

Results

The representative photomicrographs of Sox9 expression in the growth plate were depicted in Fig. 2. The negative signals appeared purplish brown, whereas the positive signals were reddish brown. Sox9 expression (reddish color) was abundantly localized in PZ rather than RZ and HZ. Previous results from our group showed that bromocriptine could abolish lactation-induced endochondral bone growth (Suntornsaratoon et al. 2010a; Wongdee et al. 2013). To examine the effects of bromocriptine on Sox9 expression in

growth plates of late pregnant (P21) and different periods of lactating rats (L8, L14, L21) were used in this study. In P21 rats, Sox9 expression increased in PZ, but bromocriptine treatment did not significantly change Sox9 expression compared with P21 group (Fig. 3). In lactation, Sox9 was expressed predominantly in PZ, but not in the RZ and HZ of L8 and L14 rats (Fig. 4a, b). There was no change in Sox9 expression in the growth plate of L21 rats as compared to the age-matched control (Fig. 4c).

Bromocriptine significantly suppressed Sox9 expression in PZ of L8 and L14 rats back to similar level as in the age-matched control (Fig. 4a, b). While bromocriptine slightly reduced Sox9 expression in RZ of L14 lactating rats, it had no effect on Sox9 expression in RZ of L8 rats and HZ of both L8 and L14 rats (Fig. 4a, b). Interestingly, bromocriptine notably increased the expression of Sox9 to as high as ~3-fold in HZ of L21 rats (Fig. 4c). Similar trend could be observed in RZ (~1.5-fold increase) and PZ (~2-fold increase) of L21 rat growth plates (Fig. 4c). On the other hand, Sox9 expression was downregulated in HZ of PW rats (Fig. 5).

To further evaluate the effects of lactation and bromocriptine on endochondral bone growth, proteoglycans accumulation in the growth plates of lactating rats was determined. Our results showed that different lactating periods and bromocriptine treatment did not significantly change proteoglycans accumulation in the growth plate of L8, L14 and L21 rats (Fig. 6).

Discussion

Our previous studies showed that bone elongation was enhanced in lactating rats leading to the increased tibia length in early, mid- and late lactating rats (Wongdee et al.

2013). The underlying mechanism of lactation-induced endochondral ossification was shown to be a result from hyperprolactinemia and could be abolished by pituitary prolactin release inhibitor, bromocriptine (Suntornsaratoon et al. 2010a, b; Wongdee et al. 2013). While prolactin led to the increased endochondral ossification, bromocriptine diminished this effect through the regulation of chondrocyte differentiation and growth plate development. Our previous investigations also showed that bromocriptine treatment led to the upregulated expression of *Ihh* and PTHrP receptor in the growth plate of lactating rats (Wongdee et al. 2013). This could lead to an increase in chondrocyte proliferation and the delayed chondrocyte apoptosis. Furthermore, *Runx*-related transcription factor 2 (*Runx2*) expression was suppressed by bromocriptine in growth plates of lactating rats, which could result in the delayed chondrocyte hypertrophy (Wongdee et al. 2013). Taken together, bromocriptine suppressed the lactation-induced bone elongation, potentially by increasing chondrocyte proliferation but slowing down chondrocyte hypertrophy. This could contribute to the increased total growth plate height in bromocriptine-induced inhibition of endochondral ossification (Suntornsaratoon et al. 2010b). In other words, it illustrated that prolactin governed endochondral bone growth by regulating chondrocyte differentiation during the lactation-induced bone elongation in rodents.

In the present study, the expression of the salient upstream transcription factor, Sox9, was determined during lactation, after weaning, and upon bromocriptine treatment. It was found that Sox9 was expressed predominantly in PZ in growth plates of lactating rats, but its expression was much lower in RZ and HZ (Fig. 4). This data corresponded to previous studies, indicating that Sox9 typically expressed in PZ of the growth plates, and its expression was reduced greatly in RZ and HZ (Provot and Schipani 2005; Akiyama et al. 2002, 2004; Bi et al. 2001). It also correlates with the

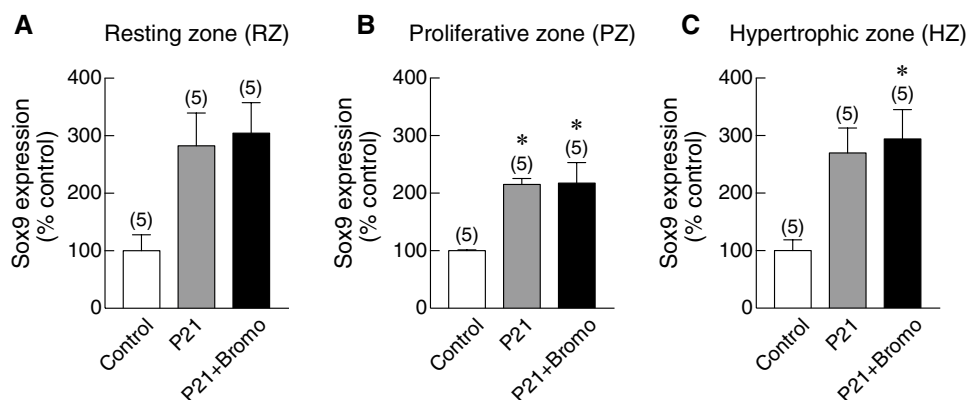


Fig. 3 Relative immunohistochemical signals (arbitrary unit) of Sox9 proteins in the growth plate of P21 rats, age-matched bromocriptine-treated P21 rats (P21+bromo) and age-matched nulliparous rats (control). The signals were derived from the three growth plate

zones, i.e., **a** reserve (resting) zone (RZ), **b** proliferative zone (PZ) and **c** hypertrophic zone (HZ). Numbers in parentheses represent the numbers of animals in each group. * $P < 0.05$ compared with the corresponding control group

Fig. 4 Relative immunohistochemical signals (arbitrary unit) of Sox9 proteins in the growth plate of **a** L8, **b** L14, and **c** L21 rats, age-matched bromocriptine-treated rats (+bromo) and age-matched nulliparous rats (control). The signals were derived from the three growth plate zones, i.e., reserve (resting) zone (RZ), proliferative zone (PZ) and hypertrophic zone (HZ). Numbers in parentheses represent the numbers of animals in each group. * $P < 0.05$ compared with the corresponding control group, † $P < 0.05$ compared with corresponding lactating group

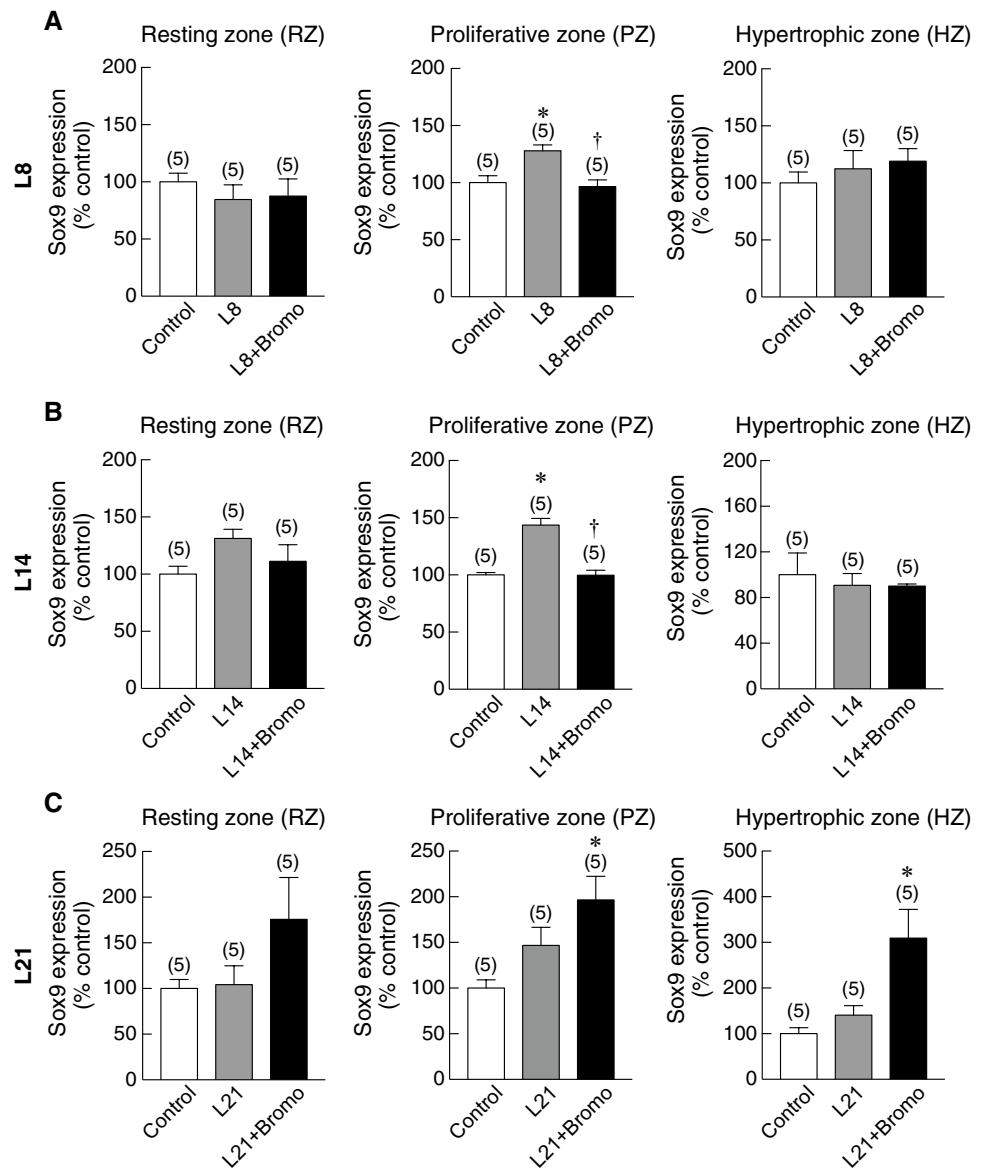


Fig. 5 Relative immunohistochemical signals (arbitrary unit) of Sox9 proteins in the growth plate of post-weaning (PW) and age-matched control (control) rats. The signals were derived from the three growth plate zones, i.e., **a** reserve (resting) zone (RZ), **b** proliferative zone (PZ) and **c** hypertrophic zone (HZ). Numbers in parentheses represent the numbers of animals in each group. * $P < 0.05$ compared with the corresponding control group

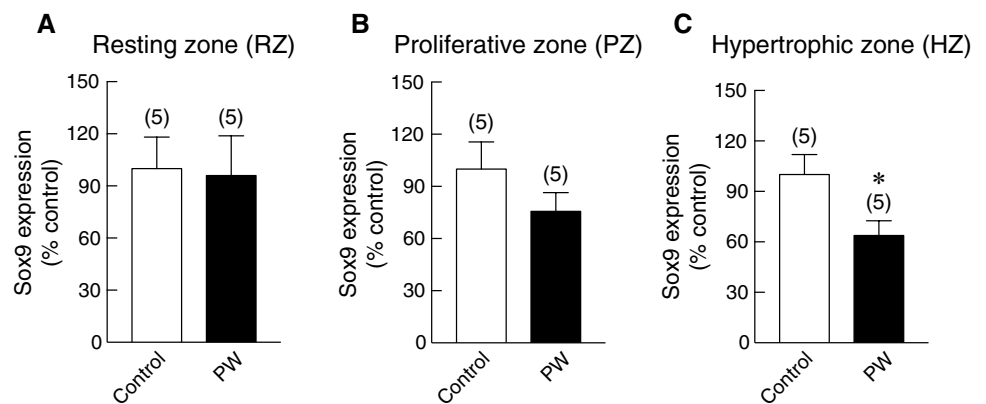
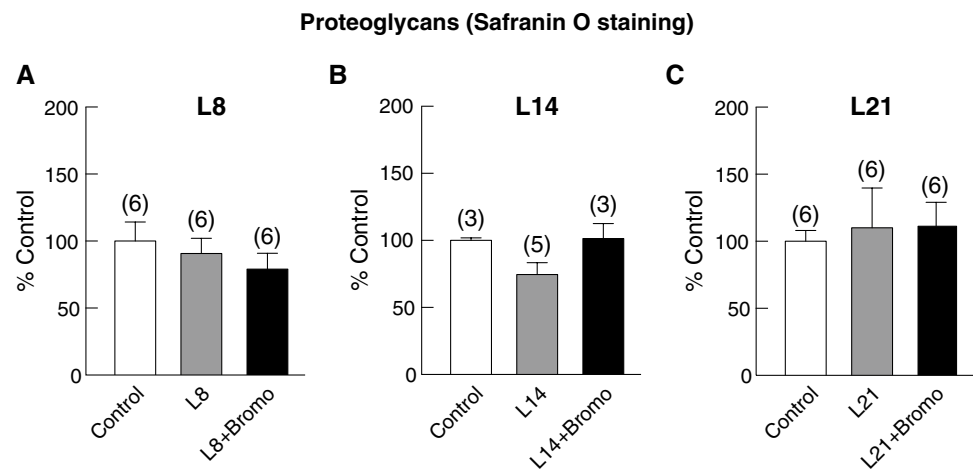


Fig. 6 Relative histochemical signal of proteoglycans (arbitrary unit) accumulation in the whole growth plate of **a** L8, **b** L14, **c** L21 rats, age-matched bromocriptine-treated rats (+bromo), and age-matched nulliparous rats (control). Numbers in parentheses represent the numbers of animals in each group



roles of Sox9 that can induce the chondrocyte proliferation and expression of ECM-related genes, e.g., pro-collagen (Provot and Schipani 2005; Lefebvre and Smits 2005). As endochondral bone growth was enhanced in lactating rats (Suntornsaratoon et al. 2010a, b; Wongdee et al. 2013), Sox9 expression was also induced in PZ of L8 and L14 lactating rats (Fig. 4a, b). The expression pattern indicated the potential roles of Sox9 in the lactation-induced endochondral bone growth to facilitate chondrocyte proliferation in PZ. Interestingly, our results showed that bromocriptine was able to suppress the expression of Sox9 in PZ of L8 and L14 rats, but it enhanced Sox9 expression in all zones of L21 rats, especially in PZ and HZ (Fig. 4c). Thus, the potential side effect of bromocriptine in the suppression of endochondral bone growth could be mediated through the alteration of Sox9 and perhaps Runx2 activities (Wongdee et al. 2013; Suntornsaratoon et al. 2010b).

Even though the downregulation of Sox9 expression back to normal level after bromocriptine treatment might lead to the decreased chondrocyte proliferation, this effect could be surpassed by the increase in PTHrP and Ihh expression after bromocriptine treatment (Wongdee et al. 2013). Therefore, the overall effects could result in excessive chondrocyte proliferation as reported previously (Wongdee et al. 2013; Suntornsaratoon et al. 2010b). Our previous data also revealed that Runx2 was downregulated in bromocriptine-treated lactating rats, which could lead to the delay or inhibition of chondrocyte hypertrophy and subsequently endochondral ossification inhibition (Wongdee et al. 2013). Runx2 is able to induce the maturation of hypertrophic chondrocytes as Sox9 is sometimes absent in these late-stage chondrocytes (Mackie et al. 2008; Akiyama et al. 2004; Bi et al. 2001). Several studies have further showed that Sox9 is a positive regulator for chondrocyte proliferation, but it negatively regulates chondrocyte hypertrophy (Akiyama et al. 2004; Bi et al. 2001). Another study showed that Sox9 also negatively affected cartilage vascularization and bone marrow

formation (Hattori et al. 2010). One of the possible mechanisms that Sox9 enhanced chondrocyte proliferation could be mediated by the inhibition of Runx2. For example, Sox9 could directly interact and inhibit the transcription activity of Runx2 (Cheng and Genever 2010). Thus, the increased level of Sox9 in HZ of late lactating rats could contribute to the further inhibition of Runx2 activity in growth plates of the lactating rats. These data suggested another endochondral ossification suppression mechanism by bromocriptine through Sox9. While our results showed the increased Sox9 expression in pregnant rats, bromocriptine had no effect on Sox9 expression in these rats (Fig. 3). This suggested that the increased femoral length in pregnant rats reported previously could come from different mechanism as compared to lactation-induced endochondral bone growth (Suntornsaratoon et al. 2010a). Taken together, all of these results revealed the potential role of prolactin in lactation-induced endochondral ossification through the regulation of Sox9 expression. Therefore, bromocriptine, as a pituitary prolactin release inhibitor, could suppress lactation-induced endochondral bone growth through the alteration of several chondrogenic transcription factors including Ihh, PTHrP receptor, Runx2 and Sox9.

Although prolactin has been reported to control growth plate chondrocyte maturation (Wongdee et al. 2013), its role on accumulation of proteoglycans, one of ECM content supports growth plate structure, was not pronounced. Specifically, the present results showed that proteoglycans accumulation was not significantly changed in lactating rats, corresponding with bromocriptine administration, which also did not alter proteoglycans accumulation (Fig. 6). Although stimulatory action of prolactin on proteoglycans accumulation in cultured ATDC5 chondrocytes has been reported (Seriwatanachai et al. 2012), prolactin is not the principal hormone for growth plate chondrocytes maturation in rodents, unlike GH, IGF-1 and thyroid hormone (Mackie et al. 2008).

In conclusion, prolactin was elucidated to be an important regulator for chondrogenic transcription factors, particularly Sox9. The upregulation of Sox9 expression predominantly occurred in the PZ during late pregnancy, early and mid-lactation. In addition, bromocriptine actions were dependent on the specific reproductive period and epiphyseal zone. However, both lactation and bromocriptine had no effect on proteoglycans accumulation. Our present data have thus provided the evidence to explain how lactation modulates bone elongation in rodents and how bromocriptine as well as prolactin affect Sox9 expression in the growth plate during lactation.

Acknowledgements The authors thank Jinchutha Duangara, Parinda Jamrus, Chitapha Srisuk, Kittipoj Khamsaen, Kheskanya Kongkadee, Sasitorn Aphinhapanit and Chutiya Keadsai for the excellent technical assistance. This work was supported by grants from the Thailand Research Fund (TRF) through the TRF International Research Network Program (IRN60W0001 to K. Wongdee and N. Charoenphandhu), the Research Grant for New Scholar from TRF and Office of the Higher Education Commission (MRG6280198 to J. Teerapornpuntakit and MRG6180268 to K. Lertsuwan), and the research grants from Mahidol University (to N. Charoenphandhu and K. Lertsuwan). N. Charoenphandhu is the TRF Senior Research Scholar (RTA6080007) awarded by TRF.

Author contributions KW and NC designed the research. JT treated animals. NT collected sample. NT, JT, and KW performed experiments. KW, NC, and KL analyzed and interpreted results and prepared the figures. KW and NC supported experiment with advice and tools, and the manuscript with scientific discussions. KW, KL, JT, NC wrote and edited the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that there are no conflicts of interest.

References

- Abad V, Meyers JL, Weise M, Gafni RI, Barnes KM, Nilsson O, Bacher JD, Baron J (2002) The role of the resting zone in growth plate chondrogenesis. *Endocrinology* 143:1851–1857. <https://doi.org/10.1210/endo.143.5.8776>
- Akiyama H, Chaboissier MC, Martin JF, Schedl A, de Crombrughe B (2002) The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6. *Genes Dev* 16:2813–2828. <https://doi.org/10.1101/gad.1017802>
- Akiyama H, Lyons JP, Mori-Akiyama Y, Yang X, Zhang R, Zhang Z, Deng JM, Taketo MM, Nakamura T, Behringer RR, McCrea PD, de Crombrughe B (2004) Interactions between Sox9 and β -catenin control chondrocyte differentiation. *Genes Dev* 18:1072–1087. <https://doi.org/10.1101/gad.1171104>
- Arnold MA, Kim Y, Czubyrt MP, Phan D, McAnally J, Qi X, Shelton JM, Richardson JA, Bassel-Duby R, Olson EN (2007) MEF2C transcription factor controls chondrocyte hypertrophy and bone development. *Dev Cell* 12:377–389. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2007.02.004>
- Ballock RT, O'Keefe RJ (2003) The biology of the growth plate. *J Bone Jt Surg Am* 85-A:715–726
- Bi W, Huang W, Whitworth DJ, Deng JM, Zhang Z, Behringer RR, de Crombrughe B (2001) Haploinsufficiency of Sox9 results in defective cartilage primordia and premature skeletal mineralization. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:6698–6703. <https://doi.org/10.1073/pnas.111092198>
- Buridan F, Szumilo J, Korobowicz A, Farooquee R, Patel S, Patel A, Dave A, Szumilo M, Solecki M, Klepac R, Dudka J (2009) Morphology and physiology of the epiphyseal growth plate. *Folia Histochem Cytobiol* 47:5–16. <https://doi.org/10.2478/v10042-009-0007-1>
- Charoenphandhu N, Nakkrasae LI, Kraidith K, Teerapornpuntakit J, Thongchote K, Thongon N, Krishnamra N (2009) Two-step stimulation of intestinal Ca^{2+} absorption during lactation by long-term prolactin exposure and suckling-induced prolactin surge. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 297:E609–E619. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00347.2009>
- Chen H, Ghorji-Javed FY, Rashid H, Adhami MD, Serra R, Gutierrez SE, Javed A (2014) Runx2 regulates endochondral ossification through control of chondrocyte proliferation and differentiation. *J Bone Miner Res* 29:2653–2665. <https://doi.org/10.1002/jbmr.2287>
- Cheng A, Genever PG (2010) SOX9 determines RUNX2 transactivity by directing intracellular degradation. *J Bone Miner Res* 25(12):2680–2689. <https://doi.org/10.1002/jbmr.174>
- Hattori T, Müller C, Gebhard S, Bauer E, Pausch F, Schlund B, Bösl MR, Hess A, Surmann-Schmitt C, von der Mark H, de Crombrughe B, von der Mark K (2010) SOX9 is a major negative regulator of cartilage vascularization, bone marrow formation and endochondral ossification. *Development* 137:901–911. <https://doi.org/10.1242/dev.045203>
- Lefebvre V, Smits P (2005) Transcriptional control of chondrocyte fate and differentiation. *Birth Defects Res C Embryo Today* 75:200–212. <https://doi.org/10.1002/bdrc.20048>
- Lehr HA, van der Loos CM, Teeling P, Gown AM (1999) Complete chromogen separation and analysis in double immunohistochemical stains using Photoshop-based image analysis. *J Histochem Cytochem* 47:119–126. <https://doi.org/10.1177/002215549904700113>
- Lieberman AN, Goldstein M (1985) Bromocriptine in Parkinson disease. *Pharmacol Rev* 37:217–227
- Liu CF, Samsa WE, Zhou G, Lefebvre V (2017) Transcriptional control of chondrocyte specification and differentiation. *Semin Cell Dev Biol* 62:34–49. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2016.10.004>
- Mackie EJ, Ahmed YA, Tatarczuch L, Chen KS, Mirams M (2008) Endochondral ossification: how cartilage is converted into bone in the developing skeleton. *Int J Biochem Cell Biol* 40:46–62. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2007.06.009>
- Mackie EJ, Tatarczuch L, Mirams M (2011) The skeleton: a multifunctional complex organ: the growth plate chondrocyte and endochondral ossification. *J Endocrinol* 211:109–121. <https://doi.org/10.1530/JOE-11-0048>
- Provot S, Schipani E (2005) Molecular mechanisms of endochondral bone development. *Biochem Biophys Res Commun* 328:658–665. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.11.068>
- Seriwatanachai D, Krishnamra N, Charoenphandhu N (2012) Chondroregulatory action of prolactin on proliferation and differentiation of mouse chondrogenic ATDC5 cells in 3-dimensional micro-mass cultures. *Biochem Biophys Res Commun* 420:108–113. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.02.123>
- Suntornsaratoon P, Wongdee K, Goswami S, Krishnamra N, Charoenphandhu N (2010a) Bone modeling in bromocriptine-treated pregnant and lactating rats: possible osteoregulatory role of prolactin

- in lactation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 299:E426–E436. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00134.2010>
- Suntornsaratoon P, Wongdee K, Krishnamra N, Charoenphandhu N (2010b) Possible chondroregulatory role of prolactin on the tibial growth plate of lactating rats. *Histochem Cell Biol* 134:483–491. <https://doi.org/10.1007/s00418-010-0745-3>
- van der Eerden BC, Karperien M, Wit JM (2003) Systemic and local regulation of the growth plate. *Endocr Rev* 24:782–801. <https://doi.org/10.1210/er.2002-0033>
- Wongdee K, Riengrojpitak S, Krishnamra N, Charoenphandhu N (2010) Claudin expression in the bone-lining cells of female rats exposed to long-standing acidemia. *Exp Mol Pathol* 88:305–310. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2009.12.005>
- Wongdee K, Krishnamra N, Charoenphandhu N (2012) Endochondral bone growth, bone calcium accretion, and bone mineral density: how are they related? *J Physiol Sci* 62:299–307. <https://doi.org/10.1007/s12576-012-0212-0>
- Wongdee K, Thonapan N, Saengamart W, Krishnamra N, Charoenphandhu N (2013) Bromocriptine modulates the expression of PTHrP receptor, Indian hedgehog, and Runx2 proteins in the growth plate of lactating rats. *Mol Cell Biochem* 381:191–199. <https://doi.org/10.1007/s11010-013-1702-y>
- Yakar S, Rosen CJ, Beamer WG, Ackert-Bicknell CL, Wu Y, Liu JL, Ooi GT, Setser J, Frystyk J, Boisclair YR, LeRoith D (2002) Circulating levels of IGF-1 directly regulate bone growth and density. *J Clin Invest* 110:771–781. <https://doi.org/10.1172/JCI15463>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Altered gut microbiota ameliorates bone pathology in the mandible of obese–insulin-resistant rats

Sathima Eaimworawuthikul^{1,2,3} · Wannipa Tunapong³ · Titikorn Chunchai³ · Panan Suntornsaratoon^{5,6} · Narattaphol Charoenphandhu^{5,6,7,8} · Parameth Thiennimitr⁴ · Nipon Chattipakorn³ · Siriporn C. Chattipakorn^{2,3} 

Received: 7 December 2018 / Accepted: 16 May 2019 / Published online: 23 May 2019
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2019

Abstract

Purpose The chronic consumption of a high-fat diet (HFD) induces obese–insulin resistance and impairs jawbone health via gut dysbiosis-stimulated inflammatory process. Our previous studies demonstrated that the probiotic *Lactobacillus paracasei* HII01, prebiotic xylooligosaccharide (XOS), and synbiotics improved several vital organ functions by reducing gut dysbiosis in HFD-induced obese rats. However, the impacts on the cellular level of jawbone microarchitecture have not been examined. Here, we hypothesized that the supplementation of *L. paracasei* HII01, XOS, and synbiotics ameliorated the bone microarchitectural pathology in HFD-fed rats by reducing systemic inflammation and other metabolic parameters.

Methods The dietary regimes (normal or high-fat diet) were provided to 48 male Wistar rats throughout 24-week experiment. After week 12, rats were given either a vehicle, pro-, pre-, or synbiotic for an additional 12 weeks before being killed. Then, blood analyses and bone histomorphometry of the jawbones were performed.

Results The HFD-fed rats developed obese–insulin resistance with significantly elevated systemic inflammation. Bone histomorphometry of these rats showed a decrease in trabecular thickness with increased osteoclasts and active erosion surfaces. Mineral apposition and bone-formation rates were also remarkably diminished. The treatment with pro-, pre-, and synbiotics equally improved metabolic disturbance, reduced systemic inflammation, increased trabecular thickness, decreased osteoclasts and active erosion surfaces and restored mineral apposition and bone-formation rates.

Conclusion The probiotic *L. paracasei* HII01, prebiotic XOS, and the synbiotics had similarly beneficial effects to improve jawbone microarchitecture in HFD-fed rats by possibly ameliorating osteoclast-related bone resorption and potentiating bone-formation activities.

Keywords Jawbone · *Lactobacillus paracasei* HII01 · Obesity · Synbiotics · Xylooligosaccharide

✉ Siriporn C. Chattipakorn
scchattipakorn@gmail.com; siriporn.c@cmu.ac.th

¹ Department of Orthodontics and Pediatric Dentistry, Faculty of Dentistry, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

² Department of Oral Biology and Diagnostic Sciences, Faculty of Dentistry, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

³ Neurophysiology Unit, Center of Excellence in Cardiac Electrophysiology Research and Training Center, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

⁴ Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

⁵ Center of Calcium and Bone Research (COCAB), Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand

⁶ Department of Physiology, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand

⁷ Institute of Molecular Biosciences, Mahidol University, Nakhon Pathom 73170, Thailand

⁸ The Academy of Science, The Royal Society of Thailand, Dusit, Bangkok 10300, Thailand

Introduction

The medical burden due to obesity has been dramatically rising worldwide [1], since obesity enhances the risk of metabolic syndrome, type 2 diabetes, cardiovascular diseases, and musculoskeletal disorders [2]. The continuous consumption of a high-fat diet (HFD) for a long time is considered to be the major cause of obese–insulin resistance and has detrimental effects on bone health [3]. Our previous studies demonstrated that an HFD also induces osteoporosis of the jawbone [4, 5]. However, there have been few studies elucidating the impact of HFD on jawbone microarchitecture at a cellular level.

The current mechanism, which proposed to link HFD-induced obese–insulin resistance with bone health, is that involved in the inflammatory process. Consumption of an HFD is known to trigger chronic systemic inflammation which is a result of increasing levels of pro-inflammatory cytokines such as IL-6, IL-1 β , and tumor necrosis factor (TNF)- α [6]. These cytokines dysregulate bone-marrow niches resulting in the downregulation of osteoblastogenesis [7] along with the upregulation of osteoclastogenesis [8]. In addition, the increased osteoblastic apoptosis with impaired osteoblastic insulin signaling and subsequently reduced jawbone-formation rates has been reported in HFD-given rats for 12 weeks [5]. These findings suggest that HFD could alter the balance in bone metabolism, resulting in jawbone loss by increasing bone resorption and causing a decline in bone formation.

Recently, gut microbiota (GM), a community of trillions microbial organisms which live in the host digestive tract, have been studied with regard to their crucial role in obese–insulin resistance and bone metabolism [9, 10]. The alteration of GM composition after HFD consumption, termed “gut dysbiosis”, was considered as being one of the initial factors in the stimulation of both gut and systemic inflammation [11, 12], leading to deterioration of the bone [13]. Targeting the enhancement of GM using probiotics, living beneficial microbes, prebiotics, a special form of dietary fibers which induce the growth of proper GM, or synbiotics, a therapy for HFD-induced pathological conditions, including alveolar bone loss, has been a recent focus [14]. Various types of probiotics, especially *Lactobacillus* spp. and *Bifidobacterium* spp., have been reported to change the composition of GM and elicit the positive effects on bone in both healthy and unhealthy condition [15–17]. Accordingly, various types of bioactive foods and prebiotics also beneficially affected bone [18]. The evidence pointed that a short-chain fatty acid, which was a product after fermentation of prebiotics by either GM or probiotic bacteria, appeared to be a key metabolite in this gut–bone axis, since it enhanced intestinal barrier capacity, increased mineral absorption, and interestingly provided the anti-inflammatory effects [15–18].

However, most of those studies have put an attraction on the growing individuals and hormonal-related osteoporosis. Therefore, the evidence about the biotic supplementation, focusing on the metabolic-related bone pathology, should be further investigated.

Our previous reports have published the beneficial effects of the probiotic *Lactobacillus paracasei* HII01, the prebiotic xylooligosaccharide (XOS), and a combination of the two on the gut [19], cardiac activity [20], cognitive [21], and renal [22, 23] functions in HFD-induced obese–insulin-resistant rats. Nevertheless, the impacts of these pro-, pre-, or synbiotics on jawbone microarchitectures in obese–insulin-resistant rats have not been examined. In this study, our hypothesis was that the long-term supplementation of *L. paracasei* HII01, XOS, and the two, as synbiotics was able to decrease systemic inflammation, reduce the metabolic disturbance, and improve jawbone microarchitecture in HFD-fed rats.

Materials and methods

Experimental protocols

Forty-eight male Wistar rats (6 weeks, 200–250 g) from the National Laboratory Animal Center (NLAC), Salaya Campus, Mahidol University, Nakhon Pathom, Thailand, were used in this study. All experiments were approved (approval no. 28/2559 on September 16, 2016) and performed following the applicable guidelines of the Faculty of Medicine, Chiang Mai University Institutional Animal Care and Use Committee, which was in accordance with the ARRIVE guidelines [24]. The rats were housed individually in standard cages and maintained under a 12/12 light/dark cycle room with controlled temperature (25 °C). After 1 week of environmental adaptation, all rats were randomly set into two groups to be fed on a normal diet (ND) or a high-fat diet (HFD) for 24 weeks. The energy from fat for ND is 19.77% while markedly higher to 59.28% in HFD [5]. At week 13, each dietary group was randomly separated into four subgroups for the specific treatment. Rats in each subgroup ($n=6$ /subgroup) were fed orally via gavage tube with either a vehicle (PBS; 1 ml/day), the probiotic (*L. paracasei* HII01 1×10^8 CFU/ml/day; 1 ml/day), prebiotic (10% XOS; 1 ml/day), or a synbiotic (the combination of the same probiotic and prebiotic 1:1; 2 ml/day) for another 12 weeks [21]. Blood samples were collected at weeks 0, 12, and 24. Calcein solution (10 mg/kg, Sigma-Aldrich, Missouri, USA) was injected to each rat twice (i.e., 6-day intervals) before euthanasia at the end of the experiment. Mandibles were collected and analyzed by bone histomorphometry (see diagram of the experimental protocol in Fig. 1).

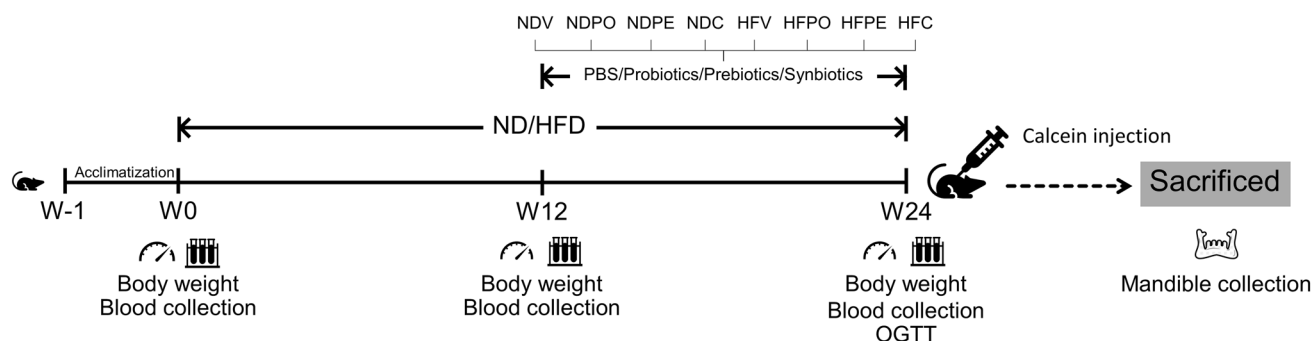


Fig. 1 Diagram showing the experimental design; $n=6$ for each group; *ND* normal diet, *HF* high-fat diet, *V* vehicle, *PO* probiotics, *PE* prebiotics, *C* synbiotics

Probiotics, prebiotics, and synbiotics

Lactobacillus paracasei HII01, provided by the Health Innovation Institute (HII), Department of Pharmaceutical Sciences, Faculty of Pharmacy, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand, was used as the probiotic [25]. In brief, *L. paracasei* was cultured in de Man, Rogosa, and Sharpe (MRS) broth under 37 °C incubation and was multiplied to an estimated cell concentration of 10^8 CFU/ml. XOS (Shandong Longlive Biotechnology, China) was used as the prebiotic, a 10% (w/v) mixture being formulated in sterile PBS [19]. The synbiotic solution was prepared by mixing the probiotic *L. paracasei* HII01 with the prebiotic XOS in the proportion 1:1.

Determination of metabolic parameters and systemic inflammation

The metabolic parameters, which consist of body weights, visceral fat weights, plasma lipid profiles, plasma glucose,

$$\frac{[\text{Fasting plasma insulin } (\mu\text{U/ml})] \times [\text{Fasting plasma glucose (mmol/l)}]}{22.5}.$$

and plasma insulin levels, were recorded at baseline, week 12, and week 24. At each timepoint, the rats were starved for at least 5 h before collecting the blood from the tail vein. The preservative NaF and EDTA were added for serum and plasma tubes individually. The centrifugation at 3000 rpm for serum and 6000 rpm for plasma at 4 °C for 10 min was performed, and then, all blood tubes were kept at − 80 °C until investigation.

The colorimetric assay with economically accessible kits (Biotech&Scientific, Bangkok, Thailand) was used

to determine plasma glucose, triglyceride, and cholesterol levels. Plasma insulin was estimated by Sandwich ELISA technique using a commercial kit (LINCO Research, St. Charles, MO, USA). For insulin sensitivity, an oral glucose tolerance test (OGTT) was performed on the first day of week 24 of the study. The rats were fasted for 12 h. Blood was gathered before orally feeding with glucose by gavage tube (2 g/kg BW) and promptly at 0, 15, 30, 60, and 120 min after glucose feeding for glucose analysis as mentioned above.

The serum lipopolysaccharide (LPS) levels were quantified, to indicate metabolic endotoxemia or systemic inflammation, by LAL testing kit (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA).

Assessment of insulin resistance

Insulin resistance was determined by Homeostasis Model Assessment (HOMA). The HOMA index was computed by the following equation [26]:

A higher HOMA index indicates a higher level of insulin resistance.

Microarchitectural analysis by bone histomorphometry

Bone histomorphometric analysis was adapted from Charoenphandhu et al. [27]. The right hemi-mandibles without adhering connective tissues were kept in the series of ethanol, 70, 95, and 100% v/v for 3 days each. Then, dehydrated bone samples were installed in methyl methacrylate resin.

The resin-embedded bones were cut using a rotary microtome equipped with a tungsten carbide blade (model RM2255; Leica, Nussloch, Germany) at 7- μ m and 12- μ m thickness for static and dynamic studies, respectively. The bone sections were then mounted and processed for microscope visualization. The specific regions of interest for the mandibles were from the frontal sections of the second molar area as previously reported [5, 28]. The measurement was calculated under a light/fluorescent microscope (model BX51TRF; Olympus, Tokyo, Japan), using the computer-assisted Osteomeasure system with software version 4.1 (Osteometric, Atlanta, GA), according to the international standard of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee [29].

For the static histomorphometric assessment, 7- μ m sections were processed for Goldner's trichrome staining and viewed under a light microscope in the interradicular area of the earlier specified lower second molars (Fig. 2). The parameters obtained were trabecular bone volume normalized by tissue volume (bone volume fraction; BV/TV, %), trabecular thickness (Tb.Th, μ m), trabecular number (Tb.N, mm^{-1}), trabecular separation (Tb.Sp, μ m), osteoblast surface normalized by bone surface (Ob.S/BS, %), osteoclast surface (Oc.S/BS, %), and active erosion surface (aES/BS, %).

For dynamic histomorphometric technique, 12- μ m unstained sections were used to observe the double lines of calcein labeling under a light/fluorescent microscope. The obtained parameters included mineral apposition rate (MAR, $\mu\text{m/day}$) and bone-formation rate (BFR, $\mu\text{m}^3 \mu\text{m}^{-2} \text{day}^{-1}$).

Data analysis

The sample size of each group was calculated under 80% statistical power and 0.05 significance level using the following formula:

$$\text{Sample size/group} = \frac{2(Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})^2 \sigma^2}{(\mu_1 - \mu_2)^2}.$$

Table 1 The metabolic parameters and LPS levels at baseline and after 12 weeks of normal or high fat diet consumption

Metabolic parameters	Baseline Week 0	At week 12 of diet consumption	
		ND	HF
Body weight (g)	232 $\pm$ 2	467 $\pm$ 6	560 $\pm$ 8*
Plasma triglyceride (mg/dl)	90 $\pm$ 9	113 $\pm$ 5	114 $\pm$ 10
Plasma total cholesterol (mg/dl)	77 $\pm$ 3	73 $\pm$ 3	89 $\pm$ 4*
Plasma HDL (mg/dl)	25 $\pm$ 1	27 $\pm$ 1	28 $\pm$ 1
Plasma LDL (mg/dl)	21 $\pm$ 3	17 $\pm$ 3	29 $\pm$ 3*
Plasma glucose (mg/dl)	136 $\pm$ 7	144 $\pm$ 4	154 $\pm$ 6
Plasma insulin (ng/ml)	2.3 $\pm$ 0.3	4.4 $\pm$ 0.4	6.1 $\pm$ 0.5*
HOMA index	21 $\pm$ 4	36 $\pm$ 4	67 $\pm$ 7*
Serum LPS (EU/ml)	0.5 $\pm$ 0.01	0.67 $\pm$ 0.2	5.9 $\pm$ 1.6*

Data are presented as mean $\pm$ SEM

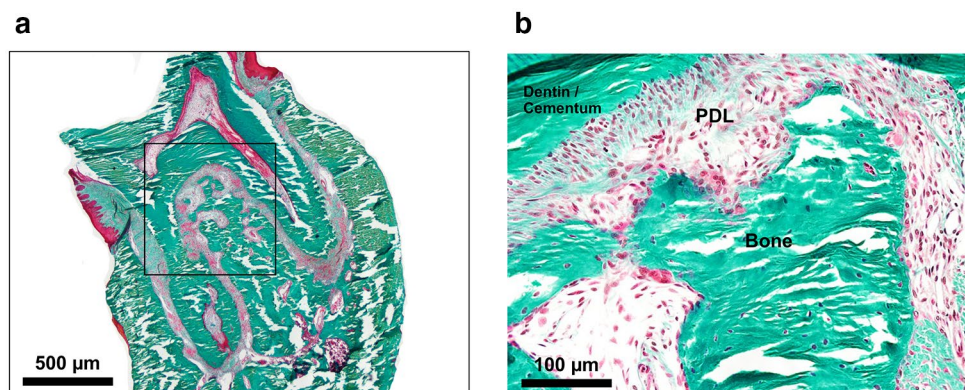
ND normal diet, HF high-fat diet, HDL high-density lipoprotein, LDL low-density lipoprotein, HOMA Homeostatic Model Assessment, LPS lipopolysaccharide

* $p < 0.05$ vs ND

$Z_{\alpha/2}$, Z_{β} , σ , and $\mu_1 - \mu_2$ are Z value of the type I error, Z value of the type II error, standard deviation, and mean difference, respectively. Based on the data from our previous study in molecular bone effects [4], the values of $Z_{\alpha/2}$, Z_{β} , σ , and $\mu_1 - \mu_2$ were 1.960, 0.842, 2.142, and 3.626, respectively. Thus, we obtained a sample size of 6 per group to reveal bone change after biotic treatment.

All data are stated as mean and SEM. The comparison of two dietary groups was determined by a Student's *t* test for the pretreatment data. The differences among the groups, as the post-treatment data were analyzed by a two-way ANOVA followed by a post hoc Tukey's test. The statistical significance was considered when $p < 0.05$. All reports are in accordance with the ARRIVE guidelines [24].

Fig. 2 Representative photomicrographs showing the interradicular area of lower second molars in HFD-fed rats. Bone sections were processed for Goldner's trichrome staining. Mineralized tissues are stained green, while cells are stained red. **a** $\times 40$ magnification; **b** $\times 200$ magnification; PDL periodontal ligament



Results

Probiotic *L. paracasei* HII01, prebiotic XOS, and synbiotic treatment alleviated obese–insulin resistance and systemic inflammation

HFD-fed rats became obese–insulin resistant after 12 weeks of dietary challenge, as indicated by elevated body weight and plasma lipid profiles. The increased plasma insulin was observed without any significant difference in the plasma glucose levels (Table 1). The “metabolic endotoxemia” in HFD group was observed as evaluated by the elevated serum LPS levels. Metabolic endotoxemia is the term summarizing the existence of important circulating markers present in obesity which contribute to systemic inflammation [6].

At week 24, the vehicle-treated HFD group continued to be obese–insulin resistant as well as showing evidence of metabolic endotoxemia. When compared to those of vehicle-treated HFD (HFV) group, the rats 12 weeks treated with the probiotic *L. paracasei* HII01, prebiotic XOS and the two as a synbiotic essentially diminished body weight, visceral fats, plasma cholesterol, plasma insulin levels, HOMA index, and area under the curve of the OGTT (Table 2). These findings suggested that all biotic treatment similarly reduced obese–insulin resistance and systemic inflammation.

Pro-, pre-, and synbiotics enhanced trabecular thickness of the jawbones

From static bone histomorphometry, we found that HFD feeding for 24 weeks prompted a decrease in trabecular

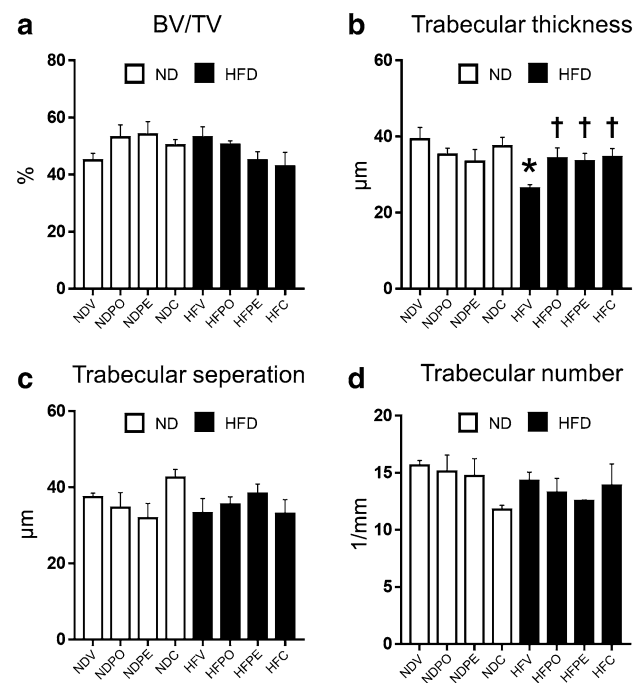


Fig. 3 Effects of pro-, pre-, and synbiotic on jawbone microarchitecture after 12 weeks of interventions in ND and HFD-fed rats. **a** Bone volume normalized by tissue volume (BV/TV, also known as bone volume fraction). **b** Trabecular thickness (Tb.Th). **c** Trabecular separation (Tb.Sp). **d** Trabecular number (Tb.N). All data were obtained from Goldner’s trichrome-stained sections by bone histomorphometry. The trabecular thickness of HFD-fed rats was reduced but restored by the biotic treatments. The data are expressed as mean and SEM; $n=6$ for each group. * $p<0.05$ vs NDV group. † $p<0.05$ vs HFV group. ND normal diet, HF or HFD high-fat diet, V vehicle, PO probiotic, PE prebiotic, C synbiotic

Table 2 The metabolic parameters and LPS levels after 12 weeks of vehicle, probiotic, prebiotic or synbiotic administration in ND and HFD rats

Metabolic parameters	ND				HF			
	NDV	NDPO	NDPE	NDC	HFV	HFPO	HFPE	HFC
Body weight (g)	511 ± 10	531 ± 12	500 ± 9	522 ± 11	732 ± 21*	658 ± 22*†	651 ± 16*†	644 ± 20*†
Visceral fat (g)	28 ± 2	27 ± 1	25 ± 1	33 ± 1	65 ± 2*	56 ± 3*†	55 ± 3*†	52 ± 3*†
Plasma triglyceride (mg/dl)	102 ± 17	74 ± 9	100 ± 16	94 ± 9	103 ± 12	78 ± 4	79 ± 7	98 ± 23
Plasma total cholesterol (mg/dl)	69 ± 4	66 ± 6	68 ± 4	59 ± 6	109 ± 9*	80 ± 5†	78 ± 5†	78 ± 6†
Plasma HDL (mg/dl)	28 ± 2	28 ± 3	29 ± 1	27 ± 1	27 ± 1	27 ± 2	26 ± 1	24 ± 1
Plasma LDL (mg/dl)	21 ± 4	24 ± 6	23 ± 2	19 ± 8	71 ± 9*	38 ± 5†	35 ± 5†	34 ± 9†
Plasma glucose (mg/dl)	130 ± 7	131 ± 7	139 ± 8	138 ± 9	143 ± 10	143 ± 7	141 ± 6	140 ± 13
Plasma insulin (ng/ml)	3.3 ± 0.4	5.0 ± 0.8	5.1 ± 1.2	4.1 ± 1.3	8.6 ± 0.3*	3.9 ± 0.9†	4.8 ± 0.6†	4.4 ± 0.3†
HOMA index	44 ± 12	54 ± 14	42 ± 14	56 ± 15	122 ± 20*	50 ± 8†	49 ± 6†	43 ± 4†
Plasma glucose AUC (mg/dl × min × 10 ⁴)	2.2 ± 0.1	2.5 ± 0.2	2.1 ± 0.2	2.3 ± 0.1	3.3 ± 0.2*	2.5 ± 0.2†	2.2 ± 0.2†	2.0 ± 0.2†
Serum LPS (EU/ml)	0.9 ± 0.2	1.0 ± 0.2	0.8 ± 0.2	0.9 ± 0.3	6.3 ± 1.4*	0.7 ± 0.2†	1.0 ± 0.3†	0.7 ± 0.1†

Data are presented as mean ± SEM

ND normal diet, HF high-fat diet, V vehicle, PO probiotics, PE prebiotics, C synbiotics, HDL high-density lipoprotein, LDL low-density lipoprotein, HOMA Homeostatic Model Assessment, AUC area under the curve, LPS lipopolysaccharide

* $p<0.05$ vs NDV † $p<0.05$ vs HFV

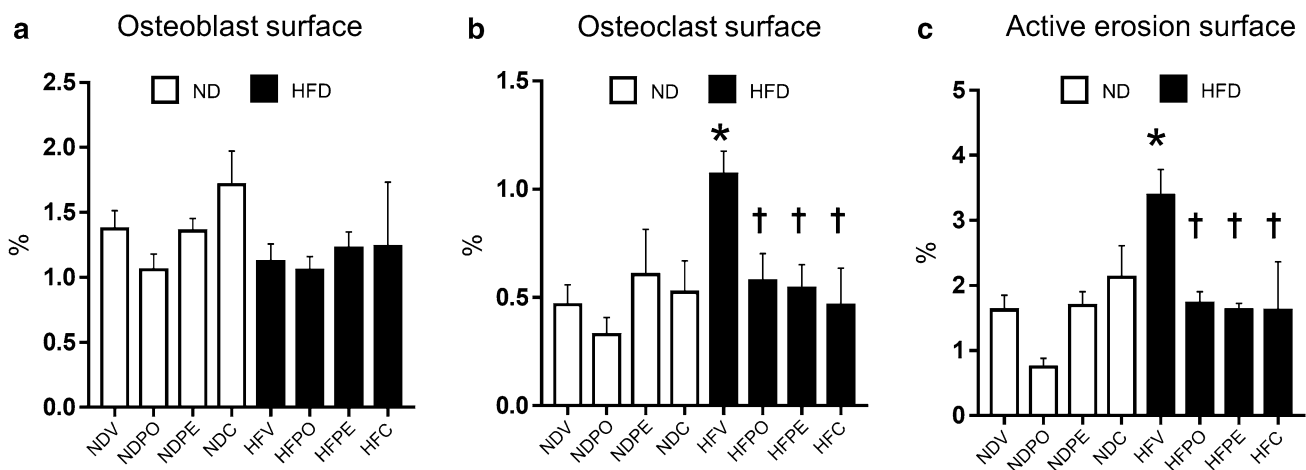


Fig. 4 Effects of pro-, pre-, and synbiotics after 12 weeks of interventions in ND and HFD-fed rats on: **a** Osteoblast surface normalized by bone surface (Ob.S/BS). **b** Osteoclast surface normalized by bone surface (Oc.S/BS). **c** Active erosion surface normalized by bone surface (aES/BS). All data were obtained from Goldner's trichrome-stained sections examined by bone histomorphometry. The osteoclast

surface and active erosion surface of HFD-fed rats were increased but restored by the biotic treatments. The data are expressed as mean and SEM; $n=6$ for each group. * $p<0.05$ vs NDV group. † $p<0.05$ vs HFV group. ND normal diet, HF or HFD high-fat diet, V vehicle, PO probiotics, PE prebiotics, C synbiotics

thickness of the jawbone without a significant change in bone volume fraction, trabecular separation, or trabecular number (Fig. 3a–d). All biotic supplementation restored the trabecular thickness in the HFD-fed rats.

Osteoclast-mediated bone resorption was reduced after pro-, pre-, and synbiotic supplementation

Next, we additionally explored the bone metabolism-related parameters at a cellular level in the jawbone. Regarding bone-formation-mediated parameters, there were no significant differences in osteoblast surface between the two dietary groups following 24 weeks (Fig. 4a). However, the osteoclast surface of HFV group was significantly increased, compared with that of ND-fed rats (Fig. 4b). A consistent active erosion surface, which represents the proteolytic activity of the osteoclast [30], was also expanded in the jawbones of HFD-fed rats (Fig. 4c). The treatment with the pro-, pre-, and synbiotic displayed a lower osteoclast and active erosion surface compared to vehicle-treated HFD-fed rats (Fig. 4b, c). These findings proposed that all treatments equally reduced osteoclast-mediated bone resorption of the jawbones in HFD-fed rats with no significant impacts on osteoblast-related static bone histomorphometry.

Pro-, pre-, and synbiotics restored mineral apposition and bone-formation rates in HFD-fed rats

Despite there being no significant difference in osteoblast surface (a static parameter), we attempted to determine the

effects on bone formation from the quantitative dynamic histomorphometric analysis in the unstained samples. The double green fluorescent lines labeled with calcein, representing newly mineralized areas (Fig. 5a), demonstrated that HFD consumption for 24 weeks significantly decreased the mineral apposition rate and the bone-formation rate normalized by bone surface in the jawbones, indicating that HFD indeed impaired bone formation despite no change in osteoblast surface. Interestingly, all treatments significantly increased both dynamic parameters in HFD-fed group (Fig. 5b, c).

Discussion

This study demonstrates the impact of the probiotic *L. paracasei* HII01, prebiotic XOS, and their combination, a synbiotic, on the microarchitecture of jawbones by bone histomorphometric analysis along with metabolic and inflammatory conditions in HFD-induced obese–insulin-resistant rats. The major findings of our study are: (1) chronic daily intake of HFD led to metabolic derangements including obesity and dyslipidemia, insulin resistance, and systemic inflammation; (2) a long-term HFD consumption had detrimental effects on jawbone microarchitectures by: (a) reducing trabecular thickness; (b) increasing osteoclast-mediated bone resorption; and (c) decreasing mineral apposition and bone-formation rates; (3) the treatment with pro-, pre-, and synbiotics for 12 weeks led to equal attenuation of obese–insulin resistance and systemic inflammation; and (4) the negative impacts on jawbone

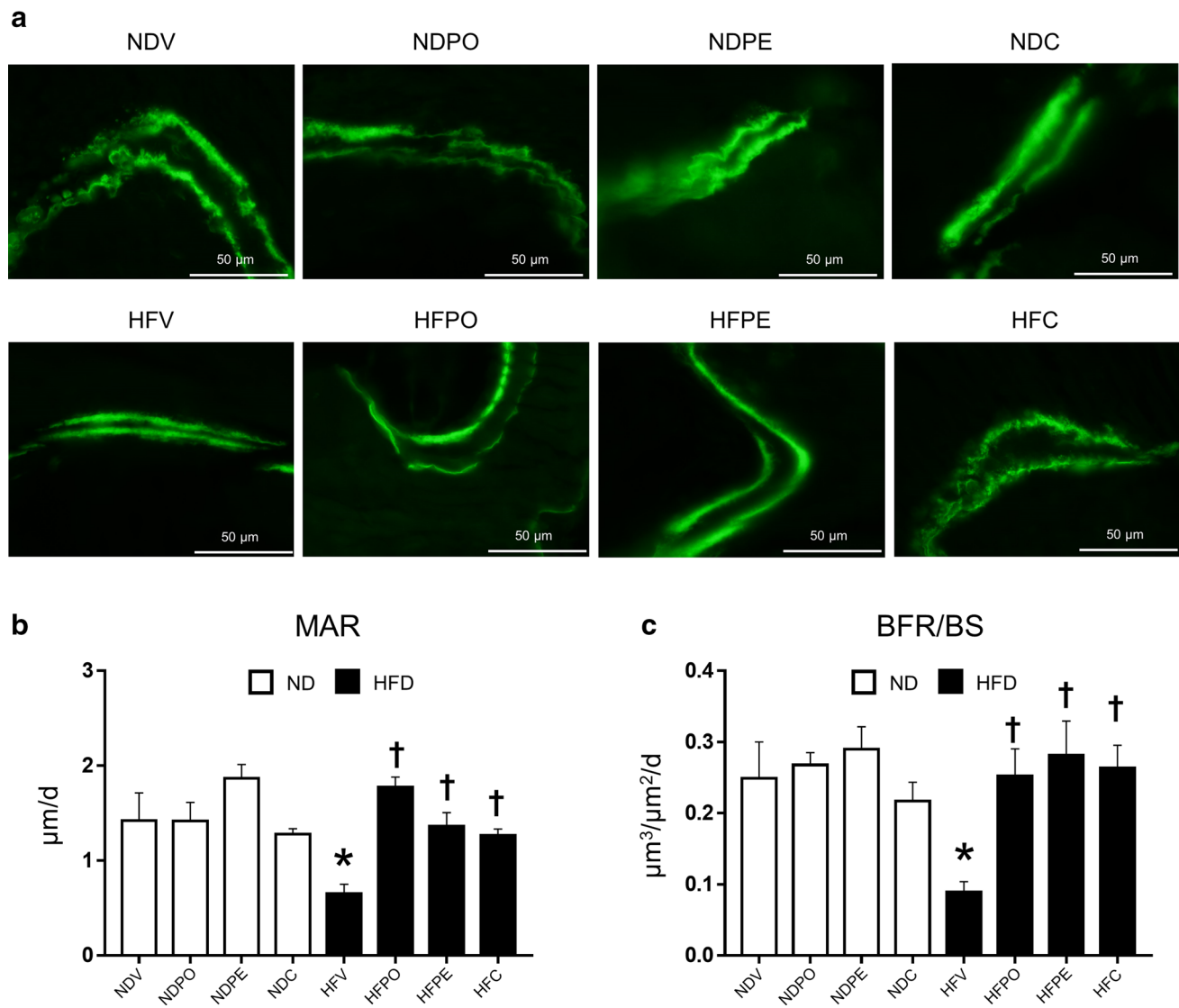


Fig. 5 Effects of pro-, pre- and synbiotics on dynamic bone histomorphometry after 12 weeks of interventions in ND and HFD-fed rats. **a** Representative images of calcein labeling in each group at $\times 400$ magnification. **b** Mineral apposition rate (MAR). **c** Bone-formation rate normalized by bone surface (BFR/BS). All data were obtained from unstained sections examined under a fluorescent microscope.

The MAR and BFR/BS of the HFD-fed rats were decreased, but restored by biotic treatments. The data are expressed as mean and SEM; $n=6$ for each group. * $p<0.05$ vs NDV group. † $p<0.05$ vs HFV group. ND normal diet, HF or HFD, high-fat diet, V vehicle, PO probiotic, PE prebiotic, C synbiotics

microarchitectures were improved by the supplementation of biotic treatment in HFD-fed rats.

The previous studies have established the unfavorable effects of HFD on the properties of bone. The known structures include both alveolar and long bones [5, 27, 31, 32]. The current proposed mechanism which links osteoporosis and HFD-induced obese–insulin-resistant condition is through the inflammatory process [32] and the GM is known to be a pivotal part in this relationship [14]. The alteration of GM after HFD consumption enhanced the growth of LPS-containing *Enterobacteriaceae* levels [19]. The bacterial LPS then entered the blood stream,

circulating the body leading to metabolic endotoxemia or systemic inflammation [6]. Furthermore, the pro-inflammatory cytokines also became elevated in the bone marrow, where the osteogenic stem-cell differentiation occurs, and contributed to an increase in osteoclastogenesis but a decline in osteoblastogenesis, bringing about a progressive bone loss [8]. Consistently, we found that HFD intake for 24 weeks initiated obese–insulin resistance and systemic inflammation, as demonstrated by increasing serum LPS levels. The jawbone microarchitecture of HFD-induced obese–insulin-resistant rats was weakened with elevated osteoclast-mediated bone resorption (as shown by the

increased Oc.S and aES), and decreased bone formation (as shown by the decreased MAR and BFR) (Figs. 3, 4, 5).

The positive impacts of supplementation of the probiotic *L. paracasei* HII01, prebiotic XOS, and the two as a synbiotic on metabolic and inflammatory conditions of HFD-induced rats have been reported and shown a correlation with the improvement of several vital organ functions including the gut [19], brain [21], heart [20], and kidney [22, 23]. Furthermore, our recent study found that consumption of these pro-, pre-, or synbiotics attenuated IL-6 mRNA expression in bone marrow of HFD-fed rats. Nevertheless, these additives did not ameliorate jawbone mechanical properties at a macroscopic level [4]. Thus, the present study further determined the effectiveness of the biotic supplementation on the cellular bone level in HFD-fed rats using the static and dynamic bone histomorphometry. Interestingly, the pro-, pre-, and synbiotic treatments improved jawbone microarchitecture especially as regards trabecular thickness. All of them also reduced osteoclast-mediated bone resorption and enhanced mineral apposition and bone-formation rate in HFD-fed rats. The reduction of gut dysbiosis, gut inflammation, and metabolic endotoxemia following the probiotic *L. paracasei* HII01, prebiotic XOS, and the synbiotic therapies in HFD-fed rats [19] may be the underlying mechanisms, resulting in the alleviation of osteoclast-dependent bone resorption along with the elevation of bone-formation activity, as shown in the present study. Collectively, these findings suggested that *L. paracasei* HII01, XOS, and their combination had the potential effects to improve jawbone properties of HFD-induced obese–insulin-resistant rats if the appropriate dose and duration were used.

Consistent with the findings of our study, several recent studies have revealed the attenuating impacts of the use of various types of probiotic and prebiotics on jawbone pathologies, including periodontitis-related and metabolic-related bone loss [33–36]. Although we expected to find the additive effects of the synbiotic, we did not observe any differences when the results were compared to those from the monotherapies. The possible key factors might be the particularity of the combination of synbiotics. The sort of fibers as prebiotic should conform the certain strain of probiotics used. A more favorable prebiotic for *Lactobacillus* provision could be an inulin [37]. On the other hand, XOS could be matched with *Bifidobacteria* due to its bifidogenic effect [38].

The previous articles have reviewed that despite the specificity of type, dose, and duration of pro- and prebiotics used, different effects of pro- and prebiotics on bone may be dependent upon different host factors, including sex, age, and hormonal status [16, 18]. Thus, the optimal administrative dose and duration of the specific type of pro-, pre-, and synbiotics need to be considered in further animal and clinical investigations as well as the effects of sex, age, and hormonal status to maximize the findings from this study. In

addition, other mechanistic aspects in gut–bone axis such as mineral absorption ability should be determined.

In conclusion, the chronic consumption of HFD aggravates obese–insulin resistance and systemic inflammation. HFD-induced obese–insulin resistance also weakened jawbone microarchitecture by increasing osteoclast-mediated bone resorption and alleviating mineral apposition and bone-formation rates. Daily oral consumption of the probiotic *L. paracasei* HII01, prebiotic XOS or the two as a synbiotic for 12 weeks had equal impact on the attenuation of obese–insulin resistance, and the reduction of systemic inflammation, and had similarly potential positive effects on improving jawbone microarchitecture in HFD-fed rats by possibly ameliorating osteoclast-related bone resorption and potentiating osteoblast-mediated bone formation.

Acknowledgements This work was supported by Thailand Research Fund (TRF) Grants: TRF-Senior Research Scholar RTA6080003 (to SCC), RTA6080007 (to N. Charoenphandhu), IRN60W0001 (to N. Charoenphandhu) and MRG6180187 (to PT); Mahidol University (to N. Charoenphandhu); a CMU 50th Anniversary Grant by Chiang Mai University (PHD/014/2557 SE&SCC); a NSTDA Research Chair Grant from the National Science and Technology Development Agency Thailand (N. Chattipakorn) and a Chiang Mai University Center of Excellence Award (N. Chattipakorn).

Author contributions The authors' responsibilities were as follows—SE, PT, and NC and SCC: designed the research; SE, WT, and TC: conducted the research; PS, NC, and PT: provided essential materials; SE, NC, and SCC: analyzed the data; SE, NC, NC, and SCC: wrote the manuscript; SCC: had primary responsibility for the final content; and all authors: read and approved the final manuscript.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that there are no conflicts of interest.

References

- Williams EP, Mesidor M, Winters K, Dubbert PM, Wyatt SB (2015) Overweight and obesity: prevalence, consequences, and causes of a growing public health problem. *Curr Obes Rep* 4(3):363–370
- Eckel RH, Kahn SE, Ferrannini E, Goldfine AB, Nathan DM, Schwartz MW, Smith RJ, Smith SR (2011) Obesity and type 2 diabetes: what can be unified and what needs to be individualized? *J Clin Endocrin Metab* 96(6):1654–1663
- Cao JJ (2011) Effects of obesity on bone metabolism. *J Orthop Surg Res* 6(30):78. <https://doi.org/10.1186/1749-799x-6-30>
- Eaimworawuthikul S, Tunapong W, Chunchai T, Yasom S, Wanchai K, Suntornsaratoon P, Charoenphandhu N, Thiennimitr P, Chattipakorn N, Chattipakorn SC (2018) Effects of probiotics, prebiotics or synbiotics on jawbone in obese-insulin resistant rats. *Eur J Nutr*. <https://doi.org/10.1007/s00394-018-1829-4>
- Pramojanee SN, Phimpilai M, Kumphune S, Chattipakorn N, Chattipakorn SC (2013) Decreased jaw bone density and osteoblastic insulin signaling in a model of obesity. *J Dent Res* 92(6):560–565

6. Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, Bastelica D, Neyrinck AM, Fava F, Tuohy KM, Chabo C, Waget A, Delmee E, Cousin B, Sulpice T, Chamontin B, Ferrieres J, Tanti JF, Gibson GR, Casteilla L, Delzenne NM, Alessi MC, Burcelin R (2007) Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes* 56(7):1761–1772
7. da Silva SV, Renovato-Martins M, Ribeiro-Pereira C, Citelli M, Barja-Fidalgo C (2016) Obesity modifies bone marrow microenvironment and directs bone marrow mesenchymal cells to adipogenesis. *Obesity (Silver Spring, Md)* 24(12):2522–2532
8. Luo Y, Chen GL, Hannemann N, Ipseiz N, Kronke G, Bauerle T, Munos L, Wirtz S, Schett G, Bozec A (2015) Microbiota from obese mice regulate hematopoietic stem cell differentiation by altering the bone niche. *Cell Metab* 22(5):886–894
9. He M, Shi B (2017) Gut microbiota as a potential target of metabolic syndrome: the role of probiotics and prebiotics. *Cell Biosci* 7:54
10. Hsu E, Pacifici R (2017) From osteoimmunology to osteomicrobiology: how the microbiota and the immune system regulate bone. *Calcif Tissue Int*. <https://doi.org/10.1007/s00223-017-0321-0>
11. de La Serre CB, Ellis CL, Lee J, Hartman AL, Rutledge JC, Raybould HE (2010) Propensity to high-fat diet-induced obesity in rats is associated with changes in the gut microbiota and gut inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 299(2):G440–G448
12. Kim KA, Gu W, Lee IA, Joh EH, Kim DH (2012) High fat diet-induced gut microbiota exacerbates inflammation and obesity in mice via the TLR4 signaling pathway. *PLoS One* 7(10):e47713
13. Ejtahed HS, Soroush AR, Angoorani P, Larijani B, Hasani-Ranjbar S (2016) Gut microbiota as a target in the pathogenesis of metabolic disorders: a new approach to novel therapeutic agents. *Horm Metab Res* 48(06):349–358
14. Eaimworawuthikul S, Thiennimitr P, Chattipakorn N, Chattipakorn SC (2017) Diet-induced obesity, gut microbiota and bone, including alveolar bone loss. *Arch Oral Biol* 78:65–81
15. Collins FL, Kim SM, McCabe LR, Weaver CM (2017) Intestinal microbiota and bone health: the role of prebiotics, probiotics, and diet. In: Smith SY, Varela A, Samadfar R (eds) *Bone toxicology*. Springer International Publishing, Cham, pp 417–443
16. Schepper JD, Irwin R, Kang J, Dagenais K, Lemon T, Shinouskis A, Parameswaran N, McCabe LR (2017) Probiotics in gut–bone signaling. *Adv Exp Med Biol* 1033:225–247
17. McCabe L, Britton RA, Parameswaran N (2015) Prebiotic and probiotic regulation of bone health: role of the intestine and its microbiome. *Curr Osteoporos Rep* 13(6):363–371
18. Whisner CM, Castillo LF (2018) Prebiotics, bone and mineral metabolism. *Calcif Tissue Int* 102(4):443–479
19. Thiennimitr P, Yasom S, Tunapong W, Chunchai T, Wanchai K, Pongchaidecha A, Lungkaphin A, Sirilun S, Chaayasut C, Chattipakorn N, Chattipakorn SC (2018) *Lactobacillus paracasei* HII01, xylooligosaccharides, and synbiotics reduce gut disturbance in obese rats. *Nutrition* 54:40–47
20. Tunapong W, Apaijai N, Yasom S, Tanajak P, Wanchai K, Chunchai T, Kerdphoo S, Eaimworawuthikul S, Thiennimitr P, Pongchaidecha A, Lungkaphin A, Pratchayasakul W, Chattipakorn SC, Chattipakorn N (2017) Chronic treatment with prebiotics, probiotics and synbiotics attenuated cardiac dysfunction by improving cardiac mitochondrial dysfunction in male obese insulin-resistant rats. *Eur J Nutr*. <https://doi.org/10.1007/s00394-017-1482-3>
21. Chunchai T, Thunapong W, Yasom S, Wanchai K, Eaimworawuthikul S, Metzler G, Lungkaphin A, Pongchaidecha A, Sirilun S, Chaayasut C, Pratchayasakul W, Thiennimitr P, Chattipakorn N, Chattipakorn SC (2018) Decreased microglial activation through gut–brain axis by prebiotics, probiotics, or synbiotics effectively restored cognitive function in obese–insulin resistant rats. *J Neuroinflamm* 15(1):11
22. Wanchai K, Yasom S, Tunapong W, Chunchai T, Eaimworawuthikul S, Thiennimitr P, Chaayasut C, Pongchaidecha A, Chatsudthipong V, Chattipakorn S, Chattipakorn N, Lungkaphin A (2018) Probiotic *Lactobacillus paracasei* HII01 protects rats against obese–insulin resistance-induced kidney injury and impaired renal organic anion transporter 3 function. *Clin Sci (Lond)* 132(14):1545–1563
23. Wanchai K, Yasom S, Tunapong W, Chunchai T, Thiennimitr P, Chaayasut C, Pongchaidecha A, Chatsudthipong V, Chattipakorn S, Chattipakorn N, Lungkaphin A (2018) Prebiotic prevents impaired kidney and renal Oat3 functions in obese rats. *J Endocrinol* 237(1):29–42
24. Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG (2010) Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol* 8(6):e1000412
25. Peerajan S, Chaayasut C, Sirilun S, Chaayasut K, Kesika P, Sivamaruthi BS (2016) Enrichment of nutritional value of *Phyllanthus emblica* fruit juice using the probiotic bacterium, *Lactobacillus paracasei* HII01 mediated fermentation. *Food Sci Technol* 36:116–123
26. Haffner SM, Miettinen H, Stern MP (1997) The homeostasis model in the San Antonio Heart Study. *Diabetes Care* 20(7):1087–1092
27. Charoenphandhu N, Suntornsaratoon P, Sa-Nguanmoo P, Tanajak P, Teerapornpuntakit J, Aeimlapa R, Chattipakorn N, Chattipakorn S (2018) Dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, vildagliptin, improves trabecular bone mineral density and microstructure in obese, insulin-resistant, pre-diabetic rats. *Can J Diabetes* 42:545–552
28. Abbassy MA, Watari I, Soma K (2010) The effect of diabetes mellitus on rat mandibular bone formation and microarchitecture. *Eur J Oral Sci* 118(4):364–369
29. Dempster DW, Compston JE, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, Ott SM, Recker RR, Parfitt AM (2013) Standardized nomenclature, symbols, and units for bone histomorphometry: a 2012 update of the report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res* 28(1):2–17
30. Charoenphandhu N, Suntornsaratoon P, Jongwattapanapisan P, Wongdee K, Krishnamra N (2012) Enhanced trabecular bone resorption and microstructural bone changes in rats after removal of the cecum. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 303(8):E1069–E1075
31. Damanaki A, Memmert S, Nokhbehsaim M, Sanyal A, Gnad T, Pfeifer A, Deschner J (2018) Impact of obesity and aging on crestal alveolar bone height in mice. *Ann Anat* 218:227–235
32. Montalvany-Antonucci CC, Zicker MC, Ferreira AVM, Macari S, Ramos-Junior ES, Gomez RS, Pereira TSF, Madeira MFM, Fukada SY, Andrade I Jr, Silva TA (2018) High-fat diet disrupts bone remodeling by inducing local and systemic alterations. *J Nutr Biochem* 59:93–103
33. de Silva V, Lobato RV, Andrade EF, Orlando DR, Borges BDB, Zangeronimo MG, de Sousa RV, Pereira LJ (2017) Effects of beta-glucans ingestion on alveolar bone loss, intestinal morphology, systemic inflammatory profile, and pancreatic beta-cell function in rats with periodontitis and diabetes. *Nutrients* 9(9):1016
34. Gatej SM, Marino V, Bright R, Fitzsimmons TR, Gully N, Zilm P, Gibson RJ, Edwards S, Bartold PM (2018) Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG prevents alveolar bone loss in a mouse model of experimental periodontitis. *J Clin Periodontol* 45(2):204–212
35. Jia X, Jia L, Mo L, Yuan S, Zheng X, He J, Chen V, Guo Q, Zheng L, Yuan Q, Xu X, Zhou X (2018) Berberine ameliorates periodontal bone loss by regulating gut microbiota. *J Dent Res*. <https://doi.org/10.1177/0022034518797275>
36. Ricoldi MST, Furlaneto FAC, Oliveira LFF, Teixeira GC, Pischiotini JP, Moreira ALG, Ervolino E, de Oliveira MN, Bogsan CSB,

- Salvador SL, Messoria MR (2017) Effects of the probiotic *Bifidobacterium animalis* subsp. lactis on the non-surgical treatment of periodontitis. A histomorphometric, microtomographic and immunohistochemical study in rats. PLoS One 12(6):e0179946
37. Nagpal R, Kaur A (2011) Synbiotic effect of various prebiotics on in vitro activities of probiotic lactobacilli. Ecol Food Nutr 50(1):63–68
38. Li Z, Summanen PH, Komoriya T, Finegold SM (2015) In vitro study of the prebiotic xylooligosaccharide (XOS) on the growth of *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus* spp. Int J Food Sci Nutr 66(8):919–922