รายงานการวิจัย

เรื่อง

การศึกษาภาวะสมดุลแคลเซียมและพฤติกรรมการเรียนรู้ของหนูขาว ที่ได้รับการเสริมแคลเซียม

Effects of calcium supplement on calcium homeostasis and learning-related behaviors in rats

โดย

อาจารย์ ดร.ศราวุธ ลาภมณีย์

คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสยาม

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยสยาม

การศึกษาภาวะสมดุลแคลเซียมและพฤติกรรมการเรียนรู้ของหนูขาว ที่ได้รับการเสริมแคลเซียม

Effects of calcium supplement on calcium homeostasis and learning-related behaviors in rats

โดย

อาจารย์ ดร.ศราวุธ ลาภมณีย์

คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสยาม

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยสยาม

ชื่อโครงการ

การศึกษาภาวะสมดุลแคลเซียมและพฤติกรรมการเรียนรู้ของหนูขาวที่ได้รับการเสริมแคลเซียม

ผู้วิจัย

1. อาจารย์ ดร.ศราวุธ ลาภมณีย์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสยาม
2. อาจารย์ ดร.ศักรินทร์ ภูผานิล คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสยาม
3. นางสาวสิริวรรณ ศรีวงค์ ศูนย์สัตว์ทดลอง มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
4. ผศ. ดร.ประพิมพรรณ วงศ์จิตรัตน์อาจารย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล
5. ดร.ปาหนัน สุนทรศารทูล ภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
6. ศ. ดร. นพ. นรัตถพล เจริญพันธุ์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

บทคัดย่อ

การเสริมแคลเซียมเป็นที่ศึกษากันอย่างแพร่หลายและสามารถลดความเสี่ยงต่อความผิดปกติของระบบกระดูก เช่น ภาวะกระดูกบางและกระดูกพรุน แต่ยังไม่มีข้อสรุปว่ามีผลต่อประสาทพฤติกรรมและความจำ งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของการเสริมแคลเซียมต่อพฤติกรรมการเรียนรู้และความจำ การสร้างเซลล์ประสาทในสมองส่วนฮิปโปแคมปัส และแคลเซียมเมตาลิซึม หนูแรทสายพันธุ์ Wistar เพศผู้ อายุ 8 สัปดาห์ แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับการเสริมแคลเซียม (12 ตัวต่อกลุ่ม) โดยให้ดื่มน้ำที่มีส่วนผสมของแคลเซียมคลอไรด์ โซเดียม กลูโคส และกาแล็กโทส เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ แล้วทำการทดสอบพฤติกรรมการเรียนรู้และความจำด้วย Morris Water Maze (MWM) และ novel objective recognition (NOR) รวมทั้งปริมาณโปรตีน doublecortin (DCX) ซึ่งบ่งชี้การสร้างเซลล์ประสาทในสมองส่วนฮิโปแคมปัสด้วยวิธี Western blot การศึกษาการแสดงออกของยีนขนส่งแคลเซียมในลำไส้เล็กส่วนต้นด้วยวิธี qRT-PCR โครงสร้างและความแข็งแรงของกระดูกด้วยวิธี histomorphometry และการดัดงอ 3 จุด ตามลำดับ ผลการศึกษา พบว่า การเสริมแคลเซียมทำให้หนูแสดงพฤติกรรมการเรียนรู้ใน MWM และ NOR รวมทั้งเพิ่มปริมาณโปรตีน DCX ในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสและปริมาณยีนขนส่งแคลเซียม (TRPV6 และ PMCb1) ในลำไส้เล็กส่วนต้น ทั้งนี้การเสริมแคลเซียมทำให้เพิ่มความแข็งแรงของกระดูกและลดพื้นผิวกระดูกเหลือจากการกร่อน ดังนั้นการเสริมแคลเซียมสูตรนี้จึงเป็นวิธีการป้องกันการสูญเสียมวลกระดูกและส่งเสริมให้เกิดการเรียนรู้และความจำ ซึ่งอาจแนะนำแก่ผู้ที่มีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคกระดูกพรุนและความจำบกพร่อง

คำสำคัญ การเสริมแคลเซียม, การเรียนรู้, ความจำ, การสร้างเซลล์ประสาทใหม่

Research title EFFECTS OF CALCIUM SUPPLEMENT ON CALCIUM HOMEOSTASIS AND LEARNING-RELATED BEHAVIORS IN RATS

Researcher

1. Dr. Sarawut Lapmanee, Faculty of Medicine, Siam University
2. Dr. Sakkarin Bhubhanil, Faculty of Medicine, Siam University
3. Miss Siriwan Sriwong, Labortary Animal Center, Thammasat University
4. Asst.Prof. Dr. Prapimpun Wongchitrat, Center for Research and Innovation, Faculty of Medical Technology, Mahidol University,
5. Dr. Panan Suntornsaratoon, Department of Physiology, Faculty of Science, Mahidol University
6. Distinguished Professor Dr. Narattaphol Charoenphandhu, Department of Physiology, Faculty of Science, Mahidol University

ABSTRACT

It has been well established that calcium supplementation potentially reduces risk of skeletal abnormalities, i.e., osteopenia and osteoporosis. However, it remains unclear whether calcium supplementation affects neurobehavior and memory. The present study aimed to investigate the effect of calcium supplementation on memory-related behaviors, hippocampal neurogenesis and calcium metabolism. Eight-week-old male Wistar rats were randomly divided into two groups, control and calcium supplement (12 rats/group). Rats were administrated drinking water *ad libitum* supplemented with calcium chloride, sodium, glucose, and galactose for 4 weeks. The learning and memory were evaluated by Morris Water Maze (MWM) novel objective recognition (NOR). Hippocampus was determined the expression of doublecortin (DCX) protein as a reliable marker of adult neurogenesis by Western blot analysis. Duodenal expression of the epithelial calcium transporter genes was determined by qRT-PCR. Femurs and tibias were evaluated microstructural and mechanical properties by histomorphometry and 3-point bending, respectively. The results showed that the calcium-supplemented rats learned to reach the platform in MWM and had an increase in the discrimination index in NOR test. Furthermore, an increase in DCX protein was observed in the calcium-supplemented rats. However, the calcium supplementation did not change total serum calcium but increased duodenal calcium transporter mRNA expression (i.e., TRPV6 and PMCAb1). In addition, bone stiffness was increased but eroded surface decreased indicated an increased bone strength. Therefore, this formulation of calcium supplement could prevent bone loss and enhance learning and memory, suggesting to recommend for osteoporotic and memory impairment individuals.

Keywords: Calcium supplementation, Learning, Memory, Neurogenesis

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยสำเร็จลุล่วงได้ตามความมุ่งหมาย ผู้วิจัยขอขอบพระคุณศาสตราจารย์อาวุโส ดร. นพ. นรัตถพล เจริญพันธุ์ และ ดร.ปาหนัน สุนทรศารทูล คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ให้คำปรึกษา ความรู้และคำแนะนำซึ่งเป็นประโยชน์ในการทำวิจัยอย่างยิ่ง

อีกทั้งขอขอบพระคุณอนุกรรมการจรรยาบรรณการวิจัยในสัตว์ และคณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงและใช้สัตว์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ในการพิจารณาจรรยาบรรณและอนุมัติให้ดำเนินงานวิจัย

ผู้วิจัยขอขอบคุณผู้ร่วมวิจัย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ประพิมพรรณ วงศ์จิตรัตน์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล อาจารย์ ดร.ศักรินทร์ ภูผานิล คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสยาม และนางสาวสิริวรรณ ศรีวงค์ ศูนย์สัตว์ทดลอง มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ในการสนับสนุนและดำเนินงานวิจัยนี้ให้ประสบความสำเร็จ

นอกจากนี้ผู้วิจัยขอขอบคุณทุนอุดหนุนการวิจัย สำนักส่งเสริมและพัฒนางานวิจัย และทุนสมทบการวิจัยเพิ่มเติม คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสยามในการส่งเสริมและสนับสนุนโครงการวิจัยครั้งนี้

อาจารย์ ดร.ศราวุธ ลาภมณีย์

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญภาพ	ช
บทที่ 1 บทนำ	
หลักการและเหตุผล	1
วัตถุประสงค์การวิจัย	3
กรอบแนวคิดการวิจัย	3
สมมติฐานการวิจัย	3
ขอบเขตของการวิจัย	4
นิยามศัพท์เฉพาะ	4
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	5
บทที่ 2 วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
สมดุลแคลเซียม	6
การเสริมแคลเซียม	8
พฤติกรรมการเรียนรู้และการสร้างความจำ	9
การสร้างเซลล์ประสาทใหม่	12
บทที่ 3 การดำเนินการวิจัย	
สัตว์ทดลอง	14
การเสริมแคลเซียม	15
การทดสอบพฤติกรรมเรียนรู้และความจำ	15
การสลบหนูและการเก็บอวัยวะตัวอย่าง	16
การศึกษาปริมาณแร่ธาตุและสารชีวเคมีควบคุมแคลเซียมในเลือด	16
การศึกษาปริมาณยีนขนส่งแคลเซียมเยื่อบุลำไส้เล็กส่วนต้น	17
การศึกษาความแข็งแรงของกระดูก	18

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

การศึกษาโครงสร้างกระดูกระดับจุลภาค 18

การศึกษาปริมาณของโปรตีนบ่งชี้การสร้างประสาทในสมอง 18

สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล 19

บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

การศึกษาสมดุลและเมตาบอลิซึมของแคลเซียม 20

การศึกษาพฤติกรรมการเรียนรู้และความจำ 25

การศึกษาการสร้างเซลล์ประสาทใหม่ในสมอง 26

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย 28

อภิปรายผล 29

ข้อเสนอแนะ 32

บรรณานุกรม 33

ภาคผนวก

ก หนังสืออนุมัติการพิจารณาจรรยาบรรณการใช้สัตว์ทดลอง 39

ประวัติผู้วิจัย 41

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 3.1 ไพรเมอร์ของยีนขนส่งแคลเซียมและควบคุมภายใน 17
ตารางที่ 3.2 แอนติบอดี้ที่ใช้ในศึกษาโปรตีนการสร้างเซลล์ประสาทใหม่ 19

มหาวิทยาลัยสยาม SIAM UNIVERSITY

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 1.1 แผนผังตัวแปรต้นและตัวแปรตามของงานวิจัย 3
ภาพที่ 2.1 การควบคุมสมดุลแคลเซียมในร่างกาย 7
ภาพที่ 2.2 ขบวนการสร้างความจำในสมอง 10
ภาพที่ 2.3 การสร้างเซลล์ประสาทใหม่ในสมอง 13
ภาพที่ 3.1 ระเบียบวิจัยและการดำเนินการกับสัตว์ทดลอง 14
ภาพที่ 4.1 น้ำหนักร่างกาย การกิน และการขับถ่าย 20
ภาพที่ 4.2 สารชีวเคมีในเลือดที่บ่งชี้สภาวะการทำงานของไต 21
ภาพที่ 4.3 ปริมาณแคลเซียม ฟอสเฟต และสารชีวเคมีควบคุมแคลเซียมในเลือด 22
ภาพที่ 4.4 การแสดงออกของยีนขนส่งแคลเซียมในลำไส้เล็กส่วนต้น 23
ภาพที่ 4.5 ความแข็งแรงของกระดูก 24
ภาพที่ 4.6 โครงสร้างกระดูกระดับจุลภาค 25
ภาพที่ 4.7 พฤติกรรมเรียนรู้ ความจำ และดัชนีการแยกแยะวัตถุ 26
ภาพที่ 4.8 การแสดงออกของโปรตีนการสร้างเซลล์ประสาทใหม่ 27

บทที่ 1
บทนำ

1.1 หลักการและเหตุผล

แคลเซียมเป็นแร่ธาตุหลักที่เป็นส่วนประกอบของกระดูกและฟัน แม้ร่างกายจะต้องการแคลเซียมเพียงเล็กน้อยแต่ก็เป็นแร่ธาตุที่มีความสำคัญต่อกระบวนการทางชีวเคมีที่สำคัญในเซลล์ร่างกายทุกระบบ (Niki, et al, 1996) เนื่องจากร่างกายสังเคราะห์แคลเซียมไม่ได้จึงต้องรับมาจากอาหารผ่านการกระบวนการย่อยและดูดซึม โดยแคลเซียมถูกดูดซึมจากโพรงลำไส้เล็กเข้าสู่กระแสเลือด แล้วนำไปสู่อวัยวะต่างๆ ดังนั้นร่างกายจึงผลิตฮอร์โมนหลายชนิดทำหน้าที่ควบคุมสมดุลแคลเซียมให้มีระดับในเลือดที่พอเหมาะ ได้แก่ พาราไทรอยด์ฮอร์โมน แคลซิโทนิน และแคลซิเฟอรอล (Song, 2017:28)

องค์การอนามัยโลกรายงานปัญหาด้านสุขภาพกับการเจริญเติบโตของร่างกายในเด็กเป็นผลมาจากการบริโภคอาหารที่มีแคลเซียมน้อยและไม่ถึงปริมาณที่แนะนำในแต่ละวัน (World Health Organization, 2004:59) ยิ่งไปกว่านั้นสตรีวัยหมดประจำเดือนมีการสูญเสียแคลเซียมอย่างรวดเร็วอาจนำไปสู่ภาวะกระดูกบาง โรคกระดูกพรุน และเสี่ยงต่อการเกิดกระดูกหัก ปัจจัยที่ทำให้ผู้สูงวัยกระดูกพรุนนั้นเป็นผลมาจากอายุที่มากขึ้น การลดลงของฮอร์โมนเพศ ขาดการออกกำลังกาย และการเป็นโรคความดันโลหิตสูง เบาหวาน ไขมันสูงในเลือด และโรคเมตาบอลิซึม เป็นต้น (Paula & Rosen, 2010) ดังนั้นการรับประทานอาหารและยาเสริมแคลเซียมจึงเป็นทางเลือกสำหรับผู้ที่มีความเสี่ยงและ/หรือขาดแคลเซียม

แม้ว่ามีการศึกษาผลกระทบของการบริโภคอาหารและผลิตภัณฑ์ที่มีแคลเซียมสูงต่อการทำงานของร่างกายกันอย่างแพร่หลาย แต่ยังไม่มีข้อสรุปเป็นที่แน่ชัด จากผลงานวิจัยเกี่ยวกับการเสริมแคลเซียมของหน่วยวิจัยแคลเซียมและกระดูก ภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ทำให้ทราบว่า การบริโภคแคลเซียมเสริมที่ผสมโซเดียมและน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว ได้แก่ กลูโคสและกาแล็กโทส เป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ สามารถป้องกันการเกิดภาวะกระดูกบาง โดยแคลเซียมเสริมสูตรนี้ช่วยเพิ่มการขนส่งแคลเซียมผ่านเยื่อบุลำไส้เล็กมากขึ้น ทำให้เพิ่มปริมาณแคลเซียมในเลือดและน้ำนม รวมทั้งความแข็งแรงของกระดูกในหนูระยะให้นม (Suntornsaratoon, et al, 2014)

อย่างไรก็ตามหากบริโภคอาหารหรือผลิตภัณฑ์ที่มีแคลเซียมสูงเกิดความต้องการร่างกายจะขับถ่ายแคลเซียมส่วนเกินในอุจจาระและปัสสาวะ แต่ถ้าได้รับแคลเซียมมากเกินไปก็อาจเสี่ยงต่อการเกิดแคลเซียมสะสมในเนื้อเยื่อ การเกิดหินปูนในผนังหลอดหัวใจ สมอง และการเกิดนิ่วในไตและทางเดินปัสสาวะ เป็นต้น (Payne, et al, 2014; Sorensen, 2014:237; Tankeu, et al, 2017) มากไปกว่านั้นยังมีการศึกษาผลของการบริโภคอาหารและผลิตภัณฑ์ที่มีแคลเซียมสูงต่อการเปลี่ยนแปลงทางอารมณ์และจิตใจทั้งในคนและสัตว์ทดลอง ทำให้ทราบว่าผู้ป่วยโรคซึมเศร้าที่มีอาการกระวนกระวายและอารมณ์แปรปรวนอย่างเฉียบพลันมีปริมาณแคลเซียมและฟอสเฟตในเลือดเพิ่มขึ้น (Carman & Wyatt, 1977) เช่นเดียวกันกับผู้ป่วยที่มีฮอร์โมนพาราไทรอยด์น้อยเกินไปซึ่งมีอาการหวาดระแหวงมากขึ้นหลังจากการฉีดยาแคลเซียมแลคเตท (Snowdon, et al, 1976) ขณะที่การศึกษาในสัตว์ทดลอง พบว่า การเพิ่มปริมาณแคลเซียมมีผลให้ลดปริมาณอนุพันธ์ของสารสื่อประสาทเซโรโทนินและแสดงพฤติกรรมวิตกกังวลและซึมเศร้าในหนูกลุ่มที่ได้แคลเซียมเสริม โดยหนูกลุ่มที่ได้แคลเซียมเสริมมีการสำรวจและการเคลื่อนไหวในพื้นที่โล่งกว้างมากขึ้น (Trulson, et al, 1986; Godinho, et al, 2002) ฉะนั้นจึงกล่าวได้ว่า การเพิ่มปริมาณแคลเซียมในเลือดสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดความผิดปกติทางอารมณ์และพฤติกรรม

จากที่ได้กล่าวมาแล้วในข้างต้นยังไม่มีการศึกษาผลของการได้รับแคลเซียมเสริมสูงต่อการเปลี่ยนแปลงของพฤติกรรมการเรียนรู้ ความจำ และการสร้างเซลล์ประสาทใหม่ในสมอง ทั้งนี้การเพิ่มปริมาณแคลเซียมในเลือดมีผลทำให้เพิ่มปริมาณแคลเซียมในน้ำหล่อเลี้ยงสมองและไขสันหลัง (Veale & Myers, 1971) ซึ่งเกิดการสะสมแคลเซียมเนื้อเยื่อสมองบริเวณต่างๆ ทำให้มีเปลี่ยนแปลงการทำงานของระบบประสาทส่วนกลางและส่งผลต่อการสร้างเซลล์ประสาทใหม่ในสมองได้ สมองส่วนฮิปโปแคมปัส ทำหน้าที่สร้างการเรียนรู้และความจำมีการสร้างเซลล์ประสาทใหม่อย่างต่อเนื่อง ปัจจัยที่มีผลกระทบต่อการสร้างเซลล์ประสาทใหม่ในสมอง เช่น วัยชราภาพ ฮอร์โมน สารสื่อประสาท และสารส่งเสริมการสร้างเซลล์ประสาท เป็นต้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งการปริมาณสารอาหารที่ร่างกายได้รับจะส่งผลต่อการสร้างเซลล์ประสาทอีกด้วย (Stangl & Thuret, 2009) ดังนั้นการศึกษาผลของการได้รับการเสริมแคลเซียมที่ผสมโซเดียม กลูโคสและกาแล็กโทสต่อการแสดงออกของพฤติกรรมการเรียนรู้ ความจำ และปริมาณของการสร้างเซลล์ประสาทใหม่ในสมองจึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจ เพื่อนำไปสู่ความเข้าใจกลไกของพฤติกรรมการเรียนรู้และการสร้างความจำ อีกทั้งเป็นแนวทางการพัฒนาผลิตภัณฑ์เสริมแคลเซียม

1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาสมดุลแคลเซียมและแคลเซียมเมตาลิซึมของหนูขาวที่ได้รับการเสริมแคลเซียม

1.2.2 เพื่อศึกษาพฤติกรรมการเรียนรู้และความจำของหนูที่ได้รับการเสริมแคลเซียม

1.2.3 เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของการสร้างเซลล์ประสาทในสมองส่วนฮิปโป-แคมปัสของหนูขาวที่ได้รับการเสริมแคลเซียม

1.3 กรอบแนวคิดการวิจัย

ตัวแปรต้น		**ตัวแปรตาม**
1.3.1 สมดุลและเมตาลิซึมแคลเซียมของหนูขาวที่ได้รับการเสริมแคลเซียม 1.3.2 พฤติกรรมการเรียนรู้และความจำของหนูขาวที่ได้รับการเสริมแคลเซียม 1.3.3 การสร้างเซลล์ประสาทในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสของหนูขาวที่ได้รับการเสริมแคลเซียม	⇨	1.3.1 ระดับแคลเซียม ฮอร์โมนควบคุมสมดุลแคลเซียม สารบ่งชี้การสร้างและสลายกระดูก ยีนขนส่งแคลเซียมในลำไส้ โครงสร้างและความแข็งแรงของกระดูก 1.3.2 ระดับการเรียนรู้และความจำ ในการทดสอบด้วยวิธี Morris water maze และ novel object recognition 1.3.3 ปริมาณของโปรตีนบ่งชี้การเซลล์ประสาทในสมองส่วนฮิปโปแคมปัส

ภาพที่ 1.1 แผนผังตัวแปรต้นและตัวแปรตามของงานวิจัย

1.4 สมมติฐานการวิจัย

การเสริมแคลเซียมสามารถเพิ่มการดูดซึมแคลเซียมและความแข็งแรงของกระดูก รวมทั้งส่งเสริมพฤติกรรมการเรียนรู้และความจำด้วยการสร้างเซลล์ประสาทในสมองส่วนฮิปโป-แคมปัสเพิ่มขึ้น

1.5 ขอบเขตของการวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการวิจัยเชิงทดลองโดยทำการศึกษาในสัตว์ทดลองด้วยการเสริมแคลเซียมเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ ซึ่งดำเนินการเลี้ยงสัตว์ทดลองที่ศูนย์สัตว์ทดลอง มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ อวัยวะตัวอย่างและสิ่งส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการถูกนำมาวิเคราะห์ที่ภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล และคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสยาม โดยดำเนินงานตามวัตถุประสงค์ของงานวิจัยดังนี้

1.5.1 การศึกษาสมดุลแคลเซียมและเมตาบอลิซึมแคลเซียมของหนูขาวที่ได้รับการเสริมแคลเซียม ได้แก่ ปริมาณของแคลเซียมและฟอสเฟต ฮอร์โมนควบคุมระดับแคลเซียม และสารชีวเคมีบ่งชี้การสร้างและสลายกระดูกในเลือด ปริมาณการแสดงออกของยีนขนส่งแคลเซียมภายในเยื่อบุลำไส้เล็กส่วนต้น การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและความแข็งแรงของกระดูก

1.5.2 การศึกษาพฤติกรรมการเรียนรู้และความจำของหนูขาวที่ได้รับการเสริมแคลเซียม

1.5.3 การศึกษาปริมาณโปรตีนบ่งชี้การสร้างเซลล์ประสาทในสมองส่วนฮิปโป-แคมปัสของหนูขาวที่ได้รับการเสริมแคลเซียม

1.6 นิยามศัพท์เฉพาะ

1.6.1 พฤติกรรม (Behavior) หมายความถึง การแสดงออกและท่าทางของสิ่งมีชีวิตที่ตอบสนองกับสิ่งเร้าและการเปลี่ยนแปลงสิ่งแวดล้อม

1.6.2 แคลเซียม (Calcium) เป็นธาตุโลหะหนักประเภทอะคาไล ซึ่งพบในผลิตภัณฑ์ประเภทนมและถั่วเหลือง ผักใบเขียว ปลาตัวเล็ก และผลิตภัณฑ์เสริมแคลเซียม

1.6.3 การเรียนรู้ (Learning) คือ การได้รับความรู้ พฤติกรรม ทักษะ หรือความพึงใจเกิดจากการทำงานของระบบประสาทและอาศัยประสบการณ์ที่ผ่านมา

1.6.4 การสร้างเซลล์ประสาท (Neurogenesis) เป็นการกำเนิดเซลล์ประสาทใหม่จากนิวรอนสเต็มเซลล์

1.7 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.7.1 ความรู้พื้นฐานทางด้านวิทยาศาสตร์การแพทย์เกี่ยวกับกลไกและความสัมพันธ์ระหว่างพฤติกรรมการเรียนรู้ ความจำและการสร้างเซลล์ประสาทในสมองจากการเสริมแคลเซียม

1.7.2 วิธีการเสริมแคลเซียมสำหรับผู้ที่มีความเสี่ยงหรือขาดแคลเซียม เช่น ผู้สูงอายุ สตรีวัยหมดประจำเดือน และผู้ป่วยโรคกระดูกพรุน

1.7.3 แนวทางการพัฒนายาหรือผลิตภัณฑ์เสริมแคลเซียมให้การดูดซึมและลดผลข้างเคียงอย่างมีประสิทธิภาพ

มหาวิทยาลัยสยาม SIAM UNIVERSITY

บทที่ 2
วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 สมดุลแคลเซียม

ร่างกายได้รับแคลเซียมจากการรับประทานอาหารและจะดูดซึมเข้าไปผ่านโพรงลำไส้เล็ก โดยเฉพาะอย่างยิ่งส่วนของดูโอดีนัมเป็นบริเวณที่มีการดูดซึมแคลเซียมสูงสุด แคลเซียมที่ถูกดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือดและนำไปใช้เพื่อการทำงานของอวัยวะต่างๆของร่างกาย รวมทั้งนำไปสะสมที่กระดูกและฟัน ซึ่งสามารถปล่อยแคลเซียมออกมาเมื่อร่างกายความต้องการ แคลเซียมช่วยการทำงานของระบบประสาทและสมอง การหดตัวของกล้ามเนื้อ และการควบคุมการแข็งตัวของเลือด การทำงานของเยื่อหุ้มเซลล์ การหลั่งเอนไซม์และฮอร์โมนอีกทั้งยังช่วยให้จังหวะการเต้นของหัวใจ แคลเซียมเป็นตัวกระตุ้นที่ช่วยในเกิดปฏิกิริยาทางเคมีที่สำคัญ ขณะที่แคลเซียมส่วนที่เกินความต้องการของร่างกายถูกกำจัดและขับถ่ายออกมากับอุจจาระและปัสสาวะ (Boron, et al, 2012)

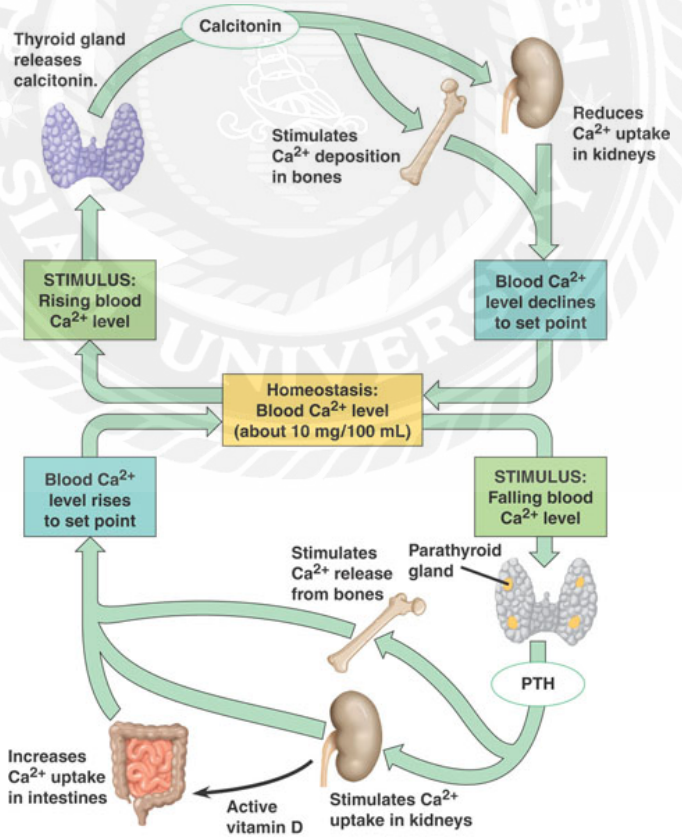
กระดูกจึงเป็นแหล่งสะสมแคลเซียมและฟอสฟอรัส ภายในกระดูกประกอบด้วยเซลล์สร้างกระดูก (osteoblast) ทำหน้าที่เพิ่มมวลและความหนาแน่นของกระดูก ในขณะที่เซลล์สลายกระดูก (osteoclast) ทำหน้าที่กร่อนเนื้อกระดูกด้วยการสลายคอลลาเจนและผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์ ในภาวะปกติของร่างกายเซลล์ทั้งสองชนิดนี้จะทำงานอย่างสมดุล หากเซลล์สร้างกระดูกทำงานได้น้อยลงหรือเซลล์สลายกระดูกทำงานมากขึ้น มวลกระดูกก็จะลดลงจนเกิดกระดูกบางและกระดูกพรุน (Raggatt & Partridge, 2010)

การดูดซึมและการขนส่งแคลเซียมของร่างกายส่วนใหญ่พบที่บริเวณลำไส้เล็กส่วนต้น ซึ่งเป็นบริเวณสามารถดูดซึมแคลเซียมและมีการตอบสนองต่อฮอร์โมนที่มาควบคุมสมดุลแคลเซียมในร่างกายมากที่สุด การขนส่งแคลเซียมในลำไส้เล็กส่วนต้นมี 2 วิธี (Charoenphandhu, et al, 2010) คือ

การขนส่งแคลเซียมผ่านช่องระหว่างเซลล์ (paracellular passive transport) ซึ่งไม่อาศัยพลังงานในการขนส่งแต่ใช้ความแตกต่างระหว่างความเข้มข้นแคลเซียมในลำไส้และในเลือด การขนส่งแคลเซียมถูกควบคุมโดยการเปลี่ยนแปลงช่องว่างระหว่างเซลล์และความสามารถในการคัดแยกชนิดของประจุขณะที่ผ่านช่องระหว่างเซลล์ ซึ่งทำหน้าที่โดย tight junction protein ได้แก่ claudin-2, claudin-12 และ claudin-15 เป็นต้น

การขนส่งแคลเซียมแบบวิธีแอกทีฟปฐมภูมิ ซึ่งอาศัยโปรตีนแคลเซียมแชนแนล เช่น TRPV5 และ TRPV6 (transcellular active transport) หรือขนส่งแคลเซียมที่ละลายอยู่ในนี้ก็จะไหลตามน้ำพร้อมกับโซเดียมและกลูโคส (solvent drag-induced transport) นอกจากนี้การเปลี่ยนแปลงของระดับของแคลเซียมในกระแสเลือดมีผลให้มีการขนส่งแคลเซียมเข้าสู่เซลล์ได้ด้วยศักย์ไฟฟ้าที่เป็นลบในโพรงลำไส้เล็ก (voltage-dependent transport)

การควบคุมระดับแคลเซียมในเลือดอาศัยการทำงานของฮอร์โมนต่างๆ ในกรณีแคลเซียมในเลือดต่ำ ฮอร์โมนพาราไทรอยด์หลั่งผ่านการรับรู้ของตัวรับแคลเซียม calcium sensing receptor (CaSR) ที่ต่อมพาราไทรอยด์ มีผลให้เพิ่มการดูดซึมแคลเซียมที่ลำไส้ ดูดกลับแคลเซียมที่ไต และกระตุ้นให้เซลล์สลายกระดูกให้กร่อนเนื้อกระดูก เพื่อปล่อยแคลเซียมเข้าสู่กระแสเลือด และวิตามินดีช่วยให้ดูดซึมแคลเซียมในลำไส้เพิ่มขึ้นอีกด้วย หากร่างกายมีระดับแคลเซียมในเลือดสูง ฮอร์โมนแคลซิโทนินจากต่อมไทรอยด์ ลดการดูดกลับแคลเซียมที่ไตและเพิ่มการสะสมแคลเซียมในกระดูก (ภาพที่ 2.1)



ภาพที่ 2.1 การควบคุมสมดุลแคลเซียมในร่างกาย (Boron, et al, 2012)

2.2 การเสริมแคลเซียม

เมื่อร่างกายขาดแคลเซียมสามารถก่อให้เกิดผลเสียต่อร่างกาย เช่น การเป็นตะคริว อาการชาตามแขนขา ความดันโลหิตสูง โรคข้ออักเสบ เล็บเปราะ การย่อยอาหารบกพร่อง กระดูกบาง ฟันผุ กระดูกพรุน การเกิดนิ่วในถุงน้ำดีและไต เป็นต้น (Hatfield, et al, 2014) รูปแบบของแคลเซียมที่นิยมใช้เสริม คือ แคลเซียมคาร์บอเนต และแคลเซียมซิเตรท ซึ่งผลข้างเคียงของการเสริมแคลเซียมทั้ง 2 รูปแบบนี้ทำให้รบกวนการทำงานของระบบทางเดินอาหารและการดูดซึมสารอาหารบางประเภท เช่น เหล็ก สังกะสี และแมกนีเซียม เป็นต้น ดังนั้นการเสริมแคลเซียมจำเป็นต้องรับประทานควบคู่ไปกับมื้ออาหารปกติ (Straub, 2007:287) ฉะนั้นการเสริมแคลเซียมในปริมาณที่เหมาะสมจึงเป็นวิธีการรักษาและป้องกันสำหรับบุคคลทั่วไปและผู้ป่วยที่ขาดแคลเซียม โดยเฉพาะอย่างยิ่ง วัยเด็กที่กำลังเจริญเติบโต สตรีตั้งครรภ์ สตรีวัยหมดประจำเดือน และผู้ป่วยโรคกระดูกพรุน (Sunyecz, et al, 2008) การบริโภคแคลเซียมเสริมที่ผสมน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว ได้แก่ กลูโคสและกาแล็กโทส เป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ สามารถป้องกันการเกิดภาวะกระดูกบางในหนูระยะให้นม โดยแคลเซียมเสริมสูตรนี้ช่วยเพิ่มการขนส่งแคลเซียมผ่านเยื่อบุลำไส้เล็กมากขึ้น ทำให้เพิ่มปริมาณแคลเซียมในเลือดและน้ำนม รวมทั้งความแข็งแรงของกระดูก (Suntornsaratoon, et al, 2014) อย่างไรก็ตามการได้รับการเสริมแคลเซียมสูงที่มากเกินไป อาจส่งผลกระทบต่อระบบการทำงานของร่างกาย เช่น การสะสมและพอกพูนหินปูนที่ผนังหลอดเลือดหัวใจและสมอง และการเกิดนิ่วในไต เป็นต้น (Goodman, et al, 2000; Ross, et al, 2011; Payne, et al, 2014; Sorensen, 2014:237; Tankeu, et al, 2017) มากไปกว่านั้น การบริโภคแคลเซียมเกิน 2,000 มิลลิกรัมต่อวัน และการเสริมแคลเซียมมากกว่า 900 มิลลิกรัม ทำให้มีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคมะเร็งต่อมลูกหมาก (Giovannucci, et al, 2006)

นอกจากนี้การเปลี่ยนแปลงของแคลเซียมที่สูงขึ้นมีผลต่อสุขภาพจิตใจและอารมณ์อีกด้วย ผลการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า การความผิดปกติทางเมตาบอลิซึมของแคลเซียม เป็นสาเหตุหนึ่งของการเกิดโรคซึมเศร้า (Faragalla & Flach, 1970) และการมีระดับแคลเซียมในเลือดสูงทำให้ผู้ป่วยโรคซึมเศร้าแสดงอาการกระวนกระวายอย่างเฉียบพลันและอารมณ์แปรปรวน (Carman & Wyatt, 1977) ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาในผู้ป่วย hypoparathyroidism ที่ได้รับการฉีดยาแคลเซียมแลคเตทมีการแสดงอาการหวาดระแหวงมากขึ้น เนื่องจากมีระดับแคลเซียมในเลือดสูง (Snowdon, et al, 1976; Cogan, et al, 1978) อีกทั้งผู้ป่วยโรคจิตเภทที่แสดงอาการหดหู่และซึมเศร้ามีปริมาณแคลเซียมในน้ำหล่อเลี้ยงสมองและไขสันหลังสูง (Jimerson, et al, 1979)

การศึกษาในคนมีความสอดคล้องกับผลการศึกษาในสัตว์ทดลอง ซึ่งพบว่า การเพิ่มปริมาณแคลเซียมมีผลให้ลดปริมาณอนุพันธ์ของสารสื่อประสาทเซโรโทนินและแสดงพฤติกรรมหดหู่ในหนูกลุ่มที่ได้แคลเซียมเสริม (Trulson, et al, 1986) และหนูกลุ่มนี้ยังมีพฤติกรรมสำรวจและการเคลื่อนไหวในพื้นที่โล่งกว้างมากขึ้น (Godinho, et al, 2002) จึงกล่าวได้ว่า การเพิ่มปริมาณแคลเซียมในเลือดสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดความผิดปกติทางอารมณ์และพฤติกรรม อย่างไรก็ตามยังไม่มีการศึกษาใดที่กล่าวถึงผลของการเสริมแคลเซียมสูงต่อการเรียนรู้ ความจำและการสร้างเซลล์ประสาทใหม่ในสมอง จึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจ เพื่อให้ทราบถึงข้างเคียงต่อการทำงานของสมองที่ทำหน้าที่ควบคุมพฤติกรรมการเรียนรู้และการจดจำ ดังนั้นการให้การรับประทานอาหารและยาแคลเซียมเสริมจึงต้องตระหนักถึงผลข้างในการรักษาและการแนะนำให้บริโภคได้อย่างถูกต้องและปลอดภัย

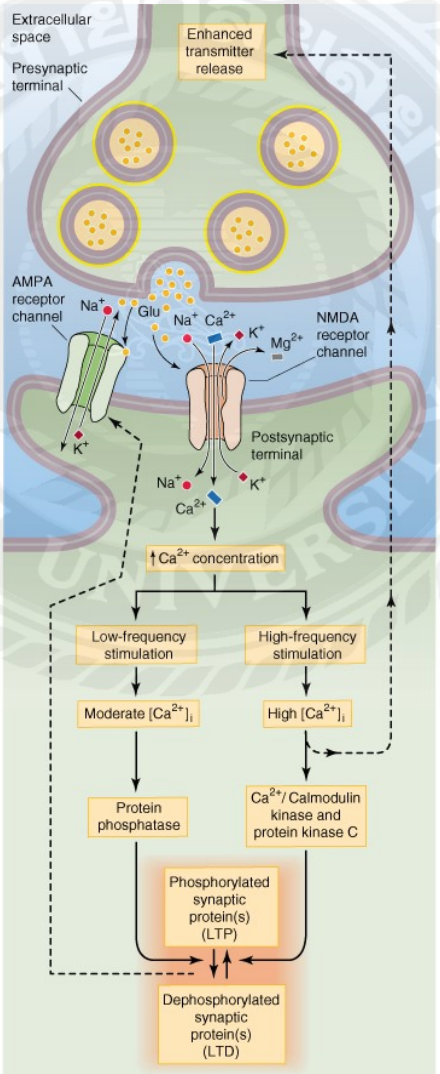
2.3 พฤติกรรมการเรียนรู้และการสร้างความจำ

การเรียนรู้เกิดจากการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมจนเป็นทักษะหรือความรู้ ซึ่งอาศัยการทำงานของระบบประสาทและประสบการณ์ที่ผ่านมา พฤติกรรมการเรียนรู้สามารถศึกษาจากการแสดงออกของพฤติกรรมในสัตว์ที่จะต้องมีความสามารถในการจำ ฉะนั้นสัตว์ที่มีการพัฒนาของระบบประสาทสูงก็จะมีความสามารถในการจำมากขึ้น ความจำ เป็นเป็นกระบวนการประมวลข้อมูลจากการกระตุ้นเร้าทั้งทางเชิงเคมีหรือเชิงกายภาพ ผ่านการเข้ารหัส การบันทึก และการค้นคืน ทั้งนี้กระบวนการประมวลข้อมูล มีระยะ 3 ระยะในการสร้างและค้นคืนความจำ ดังนี้

การเข้ารหัส (encoding) เป็นการรับ การแปลผล และการรวบรวมข้อมูลที่ได้รับ เช่น สัญลักษณ์ต่างๆ จาการมองเห็น เสียงจาการได้ยิน เป็นต้น การเก็บ (storage) เป็นการบันทึกข้อมูลที่ได้เข้ารหัสแล้วอย่างถาวร และการค้นคืน (retrieval หรือ recollection) หรือ การระลึกถึง

ความจำแบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ ความจำระยะสั้น (short-term memory) เป็นความจำที่ช่วยให้ระลึกข้อมูลได้เป็นเวลาหลายวินาทีจนถึงนาทีหนึ่งโดยไม่ต้องท่องซ้ำ ๆ อาศัยการทำงานของเปลือกสมองส่วนหน้า (prefrontal cortex) ขณะที่ความจำระยะยาว (long-term memory) ซึ่งอาศัยการเปลี่ยนแปลงที่มีเสถียรภาพและถาวร โดยมีการเชื่อมโยงการทำงานของเซลล์ประสาทที่ในสมองส่วนฮิปโปแคมปัส ซึ่งเป็นบริเวณแปลงความจำระยะสั้นให้กลายเป็นความจำระยะยาว (consolidation)

กระบวนการเสริมกำลังการส่งสัญญาณในระยะยาว (long-term potentiation) เป็นการสื่อสารระหว่างเซลล์ประสาทโดยกระตุ้นเซลล์ประสาทให้ทำงานพร้อมกัน อีกทั้งยังเกี่ยวข้องกับความเป็นพลาสติกของไซแนปส์ (synaptic plasticity) ซึ่งกระบวนการเสริมกำลังการส่งสัญญาณในระยะยาวมีการเชื่อมต่อกันของไซแนปส์แบบเคมี มีการเข้ารหัสโดยการเปลี่ยนระดับการเชื่อมต่อกันของไซแนปส์ ดังนั้นกระบวนการเสริมกำลังการส่งสัญญาณในระยะยาวนี้จึงเป็นหนึ่งในกลไกสำคัญในระดับเซลล์ของการเรียนรู้และความจำ การศึกษาโปรตีนไซแนปส์ เช่น synaptophysin และ postsynaptic density 95 โดยอัตราส่วนของปริมาณโปรตีนดังกล่าวแสดงถึงปริมาณโปรตีนไซแนปส์ระหว่างเซลล์ประสาท (Gimbel, et al, 2010)



ภาพที่ 2.2 ขบวนการสร้างความจำในสมอง (Boron, et al, 2012)

จากภาพที่ 2.2 แสดงกลไกในระดับเซลล์ของเสริมกำลังการส่งสัญญาณในระยะยาว การเพิ่มความเข้มข้นของแคลเซียมในเซลล์ประสาทหลังจากการหลั่งสารสื่อประสาทกลูตาเมต มีผลกระตุ้นการหลั่งของสารสื่อประสาทและการทำงานของ protein kinase A, protein kinase C, calcium/calmodulin-dependent protein kinase II และ phospholipase C ทำให้เกิดการเติมหมู่ฟอสเฟต เพื่อใช้ในการทำงานระดับเซลล์ เมื่อมีการลดลงของระดับแคลเซียมส่งผลให้เกิดลดการส่งสัญญาณ (long-term depression)

การศึกษาพฤติกรรมการเรียนรู้และความจำในสัตว์ทดลองจึงทำให้ทราบถึงการเปลี่ยนแปลงทางด้านสรีรวิทยาและเข้าใจถึงกลไกระดับเซลล์ของสมองเกี่ยวกับการเรียนรู้และความจำ ซึ่งผลการศึกษาสามารถสะท้อนผลการทำงานของสมองมนุษย์ ดังนั้นโมเดลศึกษาของการทดสอบด้วยเครื่องมือ Morris water maze และทดสอบความสามารถในการแยกแยะวัตถุใหม่ (novel object recognition) จึงนำมาใช้ในโครงการวิจัยครั้งนี้

2.3.1 การทดสอบการเรียนรู้และความจำ Morris water maze (MWM)

โมเดลทดสอบ MWM นิยมนำมาใช้ประเมินความจำเกี่ยวกับทิศทางและการทำงานของสมองส่วนฮิปโปแคมปัสในหนูทดลอง การเรียนรู้ทิศทางเกิดขึ้นโดยการจำสิ่งที่อ้างอิงที่ปรากฏอยู่ในสิ่งแวดล้อมรอบข้าง การทดสอบนี้ใช้สระว่ายน้ำที่ผสมสารที่ทำให้น้ำขุ่น และติดป้ายสัญญาลักษณ์ ตามทิศต่างๆของห้องทดสอบพฤติกรรม จากนั้นให้หนูปล่อยว่ายน้ำไปยังแท่นพยุงตัว เพื่อการเรียนรู้ทิศและตำแหน่งของแท่นพยุงตัว แล้วทำการย้ายแท่นพยุงออกไปจากสระว่ายน้ำ เพื่อทดสอบว่าหนูมีความจำทิศและตำแหน่งของแท่นพยุงตัว ถ้าหนูที่ใช้ระยะเวลาในการหาแท่นพยุงตัวนาน แสดงว่าหนูตัวนั้นมีการเรียนรู้และความจำบกพร่อง (Morris, et al, 1981, 1984)

2.3.2 การทดสอบการแยกแยะวัตถุใหม่ [Novel objective recognition (NOR)]

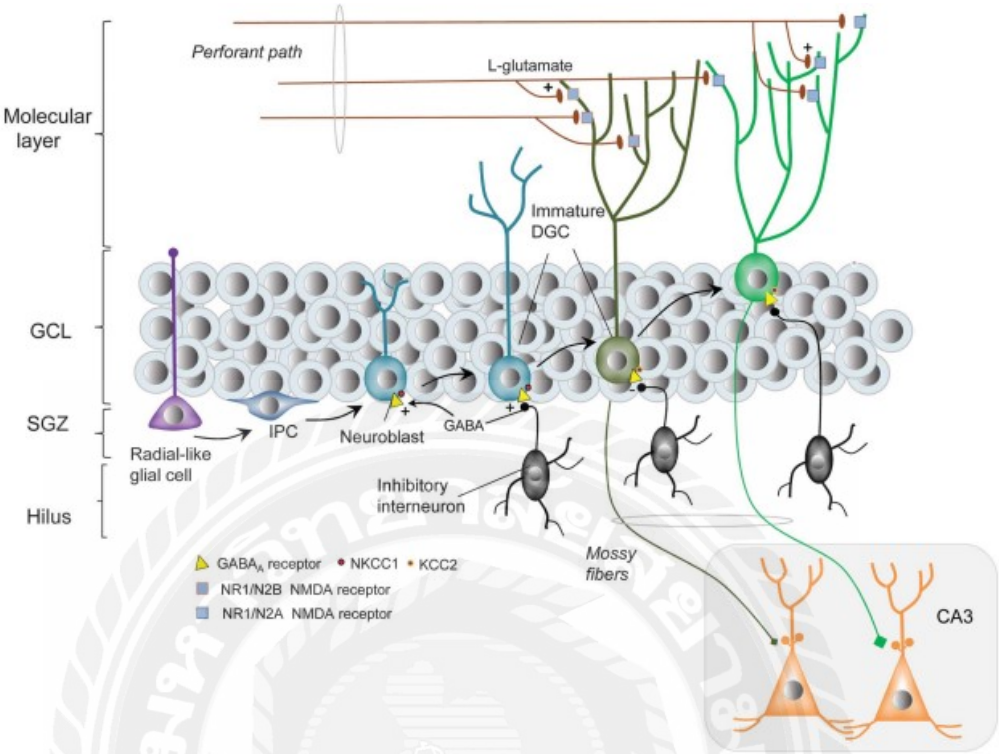
โมเดลทดสอบ NOR คิดค้นโดย Ennaceur และ Delacour ในปี ค.ศ. 1988 ใช้ทดสอบการเรียนรู้และความการจดจำ รวมถึงการทำงานของสมองส่วนฮิปโปแคมปัสและเปลือกสมองส่วนหน้า การทดสอบนี้ประเมินการจดจำวัตถุ โดยให้หนูคุ้นเคยกับกล่องเปล่าที่ใช้ในการทดสอบ และให้จดจำวัตถุที่มีลักษณะเหมือนกัน จากนั้นนำวัตถุใหม่เข้ามาแทนที่และบันทึกพฤติกรรมการแยกแยะวัตถุที่คุ้นเคยกับวัตถุใหม่ ดัชนีการแยกแยะวัตถุ (discrimination index) ทำให้ทราบถึงระดับของความจำของสัตว์ทดลอง

2.4. การสร้างเซลล์ประสาทใหม่

Benarroch และคณะ ปี ค.ศ. 2013 ได้ทำการทบทวนวรรณกรรมเกี่ยวกับการสร้างเซลล์ประสาทใหม่เกิดขึ้นตลอดอายุขัย (ภาพที่ 2.3) ซึ่งเกิดขึ้นตามบริเวณ subventricular zone ของโพรงสมองที่บรรจุน้ำเลี้ยงสมองและไขสันหลัง ส่วน anterior lateral ventricles ที่เป็นแหล่งให้กำเนิดเซลล์ประสาทของปมประสามการดมกลิ่น (olfactory bulb) และบริเวณ subgranular zone (SGZ) ในส่วนเดนเตตไจรัสของสมองส่วนฮิปโปแคมปัส ซึ่งเป็นศูนย์กลางด้านความจำและการเรียนรู้ของสมอง เซลล์ประสาทที่สร้างใหม่ถูกกระตุ้นให้เกิดการเจริญเติบโตด้วยสาร proliferative precursors (IPCs) ที่สร้างมาจากเซลล์เกลียทรงแฉก เปลี่ยนเป็น excitatory dentate gyrus cells (DGCs) และเซลล์ประสาทที่สมบรูณ์โดยวางตัวอยู่ในชั้น granule cell layer (GCL) การพัฒนาของเซลล์ประสาทแอกซอนและเดนไดรต์ เดนไดรติกสไปน์ (dendritic spine) มากขึ้นทำให้ไซแนปส์แข็งแรงยิ่งขึ้น ซึ่งเกิดขึ้นพร้อมกับการเพิ่มขึ้นของจำนวนจุดซีนแนปส์ขาเข้า สารสื่อประสาทกาบากระตุ้นให้ DGCs ให้โตเต็มวัยและสารสื่อประสาทกลูตาเมตกระตุ้นให้ส่งแขนงใยประสาท

การเติบโตของเซลล์ประสาทใหม่สามารถทำการศึกษาผ่านการแสดงออกของโปรตีนบ่งชี้ ได่แก่ Polysialylated-neural cell adhesion molecule (PSA-NCAM) นิวรอนสเต็มเซลล์ 5-bromodeoxyuridine Ki67 และ doublecortin (DCX) แสดงระยะการเติบโตและการเพิ่มจำนวนของเซลล์ประสาทใหม่ (proliferation) และ Calbindin และ neuronal nuclei บ่งชี้เซลล์ประสาทที่โตเต็มวัย (Kempermann, et al, 2004)

อย่างไรก็ตามปัจจัยที่มีผลกระทบต่อการสร้างเซลล์ประสาทใหม่ในสมอง เช่น วัยชราภาพ ฮอร์โมน สารสื่อประสาทโมโนเอมีน การออกกำลังกาย และโปรตีนส่งเสริมการสร้างเซลล์ประสาท brain-derived neurotrophic factor และ vascular endothelial growth factor เป็นต้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งการปริมาณสารอาหารต่างๆ ที่ร่างกายได้รับก็ส่งผลกระทบในการสร้างเซลล์ประสาทใหม่อีกด้วย (Stangl & Thuret, 2009)



ภาพที่ 2.3 การสร้างเซลล์ประสาทใหม่ในสมอง (Benarroch, et al, 2013)

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 สัตว์ทดลอง

หนูแรทสายพันธุ์ Wistar เพศผู้ อายุ 8 สัปดาห์ น้ำหนักประมาณ 180–200 กรัม จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล หนูแต่ละตัวเลี้ยงในกรงซึ่งอยู่ในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 ± 1°C และ ความชื้น 55 ± 5% ด้วยแสงสว่างตามวงจรเวลากลางวันกลางคืนรอบละ 12 ชั่วโมง หนูทุกตัวได้รับอาหารและน้ำที่มาตรฐาน น้ำหนักของหนูและปริมาณอาหารที่กินจะทำการบันทึกทุกวัน เมื่อครบระยะเวลากักกั้นสัตว์ทดลองเป็นระยะเวลา 7 วัน การเสริมแคลเซียมดำเนินการเป็นระยะเวลา 28 วัน แล้วทำการทดสอบพฤติกรรมการเรียนรู้และการจดจำ ดังที่แสดงการทดลองที่ดำเนินการกับสัตว์แสดงในรูปที่ 3.1 โครงการวิจัยนี้ใช้จำนวนสัตว์ทดลองและกระทำการทรมานต่อสัตว์อย่างน้อยที่สุด การดำเนินงานทุกขั้นตอนได้รับอนุญาตจากคณะกรรมการกำกับการดูแลและการใช้สัตว์ของมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์เลขที่ 010/2561 (ภาคผนวก ก.) โครงการวิจัยนี้ใช้หนูจำนวน 24 ตัวแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มๆ ละ 12 ตัว ได้แก่ กลุ่มควบคุม (control) และกลุ่มที่ได้รับแคลเซียมเสริม (calcium supplement) โดยจำนวนหนูที่ใช้ในโครงการวิจัยคำนวณจากสมการ

$N = 2\sigma^2 (Z\alpha+Z\beta)^2 / (\mu_1 - \mu_2)^2$ เท่ากับ 11.98 ~ 12 ตัว

กำหนดให้ N = sample size of each group in experiment

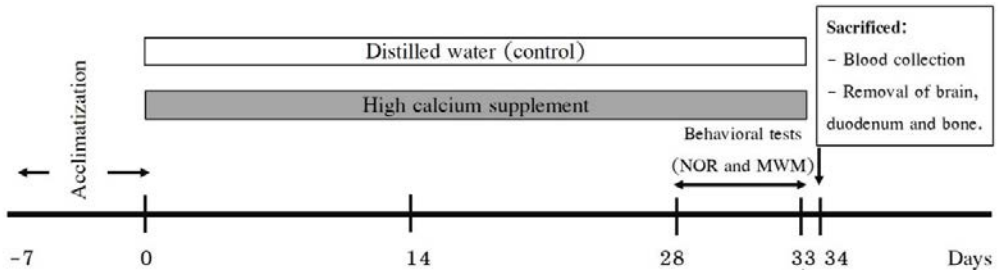
σ = standard deviation is 1.12

μ_1 = mean of NOR1 test in previous experiment = 3.16)

μ_2 = mean of NOR2 test in previous experiment = 1.73)

α = the level of significance is 5% ($Z\alpha$ = 1.96)

β = the risk (probability) of erroneously is 5 % ($Z\beta$=1.65)



ภาพที่ 3.1 ระเบียบวิจัยและการดำเนินการกับสัตว์ทดลอง

3.2 การเสริมแคลเซียม

หนูทุกตัวได้รับการบันทึกการกินน้ำต่อวันก่อนทำการเสริมแคลเซียมลงในน้ำดื่ม โดยผสม 15 mM แคลเซียมคลอไรด์ 46.5 mM โซเดียมคลอไรด์ และ12 mM น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว ได้แก่ กลูโคสและกาแล็กโทส เป็นระยะเวลาติดต่อกัน 4 สัปดาห์ ซึ่งอ้างอิงความเข้มข้นของแคลเซียมเสริมจากผลการศึกษาของ Suntornsaratoon และคณะ ปี ค.ศ. 2014

3.3 การทดสอบพฤติกรรมเรียนรู้และความจำ

โครงการวิจัยนี้ทำการศึกษาการแสดงออกของพฤติกรรมเรียนรู้และความจำในสัตว์ทดลอง ซึ่งอาจมีความคลาดเคลื่อนของผลการศึกษา ดังนั้นจึงจำเป็นต้องทดสอบพฤติกรรมด้วยเครื่องมือวัดพฤติกรรมเรียนรู้ที่หลากหลาย เพื่อยืนยันผลการศึกษาและลดความคลาดเคลื่อน

3.3.1 การเรียนรู้และความจำ Maris water maze (MWM)

เครื่องมือและวิธีการทดสอบพฤติกรรมการเรียนรู้และความจำทิศทางอ้างอิงจากการศึกษาของ Lapmanee และคณะ ปี ค.ศ. 2017 เครื่องมือ Morris water maze เป็นสระว่ายน้ำที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 150 ซม. สูง 60 ซม. บรรจุน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 °C และผสมด้วยนม 200 มิลลิลิตร ลึกประมาณ 31 ซม. พื้นที่ของเครื่องมือ Morris water maze แบ่งออกเป็น 4 ส่วน (ทิศตะวันออก ทิศตะวันตก ทิศเหนือ และทิศใต้) ผนังของห้องทดสอบพฤติกรรมติดป้ายสัญลักษณ์ต่างๆ เช่น เครื่องหมายวงกลม ตัวเลข และรูปภาพ เพื่อเป็นตัวบ่งชี้ตำแหน่งและระบุทิศทางของแท่นพยุงตัว

ก่อนการทดสอบการเรียนรู้จะฝึกให้หนูคุ้นชินกับสิ่งแวดล้อมและวิธีดำเนินการทดสอบพฤติกรรม โดยวางหนูแท่นพยุงตัวขนาดผ่านศูนย์กลาง 10 ซม. สูง 30 ซม. ที่วางไว้อยู่ทางทิศใต้ของสระว่ายน้ำนาน 10 วินาที ทำซ้ำ 3 ครั้ง จากนั้นเริ่มการทดสอบการเรียนรู้ด้วยการปล่อยหนูลงสระว่ายน้ำทางทิศตะวันออก ทิศตะวันตก และทิศเหนือ ตามลำดับ แล้วบันทึกเวลาของการว่ายน้ำไปยังแท่นพยุงตัวที่อยู่ทางทิศใต้ของสระว่ายน้ำ (escape latency) หนูแต่ละตัวจะถูกทดสอบเป็นเวลา 3 วัน รวมจำนวนครั้งของการทดสอบการเรียนรู้ จำนวน 20 ครั้ง (วันที่ 1 ทดสอบจำนวน 8 ครั้ง วันที่ 2 ทดสอบจำนวน 8 ครั้ง และวันที่ 3 จำนวน 4 ครั้ง) ทั้งนี้หนูแต่ละตัวถูกทำการเช็ดและเป่าขนให้แห้งระหว่างการทดสอบแต่ละครั้ง

หลังจากการทดสอบการเรียนรู้ในวันที่ 3 ประมาณ 1 ชั่วโมง หนูจะนำมาทดสอบความจดจำทิศทาง โดยนำแท่นทุนพยุงตัวออกจากสระว่ายน้ำและปล่อยหนูลงไปในสระว่ายน้ำทางทิศตะวันออกเฉียงเหนือ แล้วทำการบันทึกเวลาที่หนูว่ายน้ำไปยังพื้นที่ของสระว่ายน้ำที่เคยมีแท่นพยุงตัวอยู่ (Probe test)

3.3.2 การแยกแยะวัตถุใหม่ (Novel-objective recognition, NOR)

เครื่องมือและวิธีการทดสอบพฤติกรรมการเรียนรู้และการจดจำวัตถุใหม่อ้างอิงจากการศึกษาของ Lapmanee และคณะ ปี ค.ศ. 2017 เครื่องมือทดสอบ novel-objective recognition เป็นกล่องพลาสติกสีดำขนาดกว้าง 63 ซม. ยาว 63 ซม. และสูง 45 ซม. โดยก่อนทำการทดสอบ หนูจะนำมาปล่อยในกล่องเปล่า เพื่อให้คุ้นชินกับสภาพสิ่งแวดล้อมเป็นเวลา 10 นาที จำนวน 2 รอบต่อวัน แล้วทำการทดสอบการแยกแยะและการจดจำวัตถุโดยปล่อยหนูลงในกล่องที่มีอุปกรณ์ทับกระดาษทำมาจากเซรามิกและมีรูปทรงเหมือนกัน (ขนาด 3 ซม. ยาว 3 ซม. และสูง 7 ซม.) จำนวน 2 ชิ้น วางห่างกันประมาณ 10 ซม. นาน 3 นาที บันทึกพฤติกรรมการสำรวจวัตถุ จากนั้น 1 ชม. ต่อมา ทำการเปลี่ยนอุปกรณ์ทับกระดาษเป็นแจกัน (ขนาด 5 ซม. ยาว 5 ซม. และสูง 12 ซม.) จำนวน 1 ชิ้น แล้วปล่อยหนูลงในกล่องเพื่อทดสอบการแยกแยะและจดจำวัตถุเป็นเวลา 3 นาที หนูที่มีความจำบกพร่องจะใช้เวลาในสำรวจกับวัตถุที่คุ้นชินมากกว่าวัตถุใหม่ ดัชนีบ่งชี้ความบกพร่องของความจำสามารถคำนวณได้จากสมการดังนี้

$$\text{ดัชนีการแยกแยะวัตถุ} = \frac{[\text{เวลาที่สำรวจวัตถุใหม่} - \text{เวลาที่สำรวจวัตถุที่คุ้นชิน}]}{\text{เวลาทั้งหมดที่ใช้ในการสำรวจวัตถุ}}$$

3.4 การสลบหนูและการเก็บอวัยวะตัวอย่าง

เมื่อสิ้นสุดการศึกษา หนูแต่ละตัวถูกทำให้สลบด้วย 5% isoflurane และทำการเก็บเลือดจากหัวใจ จากนั้นเก็บกระดูก ลำไส้เล็กส่วนต้น และสมอง เพื่อทำการศึกษาระดับแคลเซียม ฮอร์โมนและสารชีวเคมีบ่งชี้แคลเซียมเมตาบอลิซึม โครงสร้างและความแข็งแรงของกระดูก การแสดงออกของปริมาณยีนขนส่งแคลเซียมในลำไส้เล็กส่วนต้น และปริมาณโปรตีนของเซลล์ประสาทในสมอง ตามลำดับ

3.5 การศึกษาปริมาณแร่ธาตุและสารชีวเคมีควบคุมแคลเซียมในเลือด

เลือดนำส่งศูนย์พยาธิวิทยารามาธิบดี โรงพยาบาลรามาธิบดี กรุงเทพมหานคร เพื่อวิเคราะห์ปริมาณแคลเซียม ฟอสเฟต และปริมาณสารชีวเคมีบ่งชี้การทำงานของไตและการสร้างและสลายกระดูก ได้แก่ ไนโตรเจนในสารยูเรีย ครีเอตินิน ฮอร์โมนออสติโอแคลซิน (osteocalcin) เอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส (alkaline phosphatase) และฮอร์โมนควบคุมระดับแคลเซียมในเลือด ได้แก่ พาราไทรอยด์ฮอร์โมน แคลซิโทนิน ด้วยชุดทดสอบ

3.6 การศึกษาปริมาณยีนขนส่งแคลเซียมเยื่อบุลำไส้เล็กส่วนต้น

ลำไส้เล็กส่วนต้นนำมาแยก messenger RNA (mRNA) ด้วยชุดสกัดสำเร็จรูปตามวิธีการที่ผู้ผลิตกำหนด DNA extraction kit (Fermentas, Thermo Scientific) จากนั้นวัดความเข้มข้นของ total RNA ด้วยเครื่อง NanoDrop2000 spectrophotometer ศึกษาการแสดงออกของ mRNA ด้วยวิธี Real-time PCR ตามวิธีการศึกษาของ Charoenphandhu และคณะ ปี ค.ศ. 2012 แล้วศึกษาการแสดงออกของยีนที่สนใจ ได้แก่ transient receptor potential vanilloid family Ca^{2+} channel-6 (TRPV6), cytoplasmic calcium transport, calbindin-D9k plasma membrane Ca^{2+}-ATPase-1b (PMCA1b) และ Na^{+}/Ca^{2+} exchanger-1 (NCX1) โดยยีน beta actin เป็นตัวควบคุมภายในถูกนำมาเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงของยีนที่ทำการศึกษา (ตารางที่ 3.1)

ตารางที่ 3.1 ไพรเมอร์ของยีนขนส่งแคลเซียมและควบคุมภายใน

Gene name	Primer (forward/reverse)	Size (bp)
Apical calcium channel Transient receptor potential vanilloid family Ca2+ channel-6 (TRPV6)	5'-CTTACGGGTTGAACACCACCA-3' 5'-TTGCAGAACCACAGAGCCTCTA-3'	80
Cytoplasmic calcium transport Calbindin-D9k	5'-CCCGAAGAAATGAAGAGCATTTT-3' 5'-TTCTCCATCACCGTTCTTATCCA-3'	174
Basolateral calcium extrusion Plasma membrane Ca2+-ATPase-1b (PMCA1b) Na+/Ca2+ exchanger-1 (NCX1)	5'-CGCCATCTTCTGCACAATT-3' 5'-CAGCCATTGTTCTATTGAAAGTTC-3' 5'-GTTGTGTTCGCTTGGGTTGC-3' 5'-CGTGGGAGTTGACTACTTTC-3'	109 163
Housekeeping gene Beta actin	5'-CCAGGTCATCACTATTGGCA-3' 5'-ACCACCAGACAGCACTGTGTT-3'	172

3.7 การศึกษาความแข็งแรงของกระดูก

กระดูกขาท่อนบนถูกเลาะขนและกล้ามเนื้อปกคุมกระดูก แล้วทำความสะอาดด้วยน้ำเกลือสะอาด จากนั้นนำมาศึกษาคุณสมบัติเชิงกลของกระดูกด้วยเครื่องดัดงอแบบ 3 จุด (three-pointed bending) ตามวิธีการศึกษาของ Tiyasatkulkovit และ คณะปี ค.ศ. 2019 โดยวางกระดูกในแนวระนาบเดียวกันกับแท่นดัดงอว่างห่างกัน 20 มิลลิเมตร เคลื่อนที่ด้วยความเร็ว 2 มิลลิเมตรต่อนาที และศึกษาตัวแปรที่บ่งชี้ความแข็งแรงได้แก่ ค่าแรงรับที่ได้สูงสุดในการยืดกระดูก (Maximum load) ค่ามอดูลัสของยัง (Young's modulus) และค่าระดับความแข็ง (stiffness) ตามลำดับ โดยคำนวณด้วยซอฟแวร์ Instron 5900 (Norwood, MA, USA)

3.8 การศึกษาโครงสร้างกระดูกระดับจุลภาค

กระดูกขาท่อนล่างนำมาทำความสะอาดเลาะเนื้อเยื่อและเตรียมกระดูกลงในสารกำซาบสารเรซิน แล้วนำกระดูกมาตัดด้วยเครื่องไมโครโทม (model RM2255; Leica, Nussloch, Germany) และย้อมสีเนื้อเยื่อกระดูกด้วย Goldner's Trichrome ทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างกระดูกระดับจุลภาค ได้แก่ จำนวนเซลล์ออสติโอบลาสต์ต่อพื้นที่ของกระดูก (N.Ob/T.Ar, mm-2) และเปอร์เซ็นต์พื้นผิวกระดูกเหลือจากการกร่อน (ES/BS, %) ด้วยกล้องจุลทรรศน์ (model BX51TRF; Olympus, Tokyo, Japan) ตามวิธีการศึกษาของ Tiyasatkulkovit และคณะปี ค.ศ. 2019

3.9 การศึกษาปริมาณของโปรตีนบ่งชี้การสร้างประสาทในสมอง

สมองหนูนำมาแยกสมองส่วนฮิปโปแคมปัส ตามวิธีการของ Heffner และคณะปี ค.ศ. 1980 และเตรียมโปรตีนตามวิธีการศึกษาของ Lapmanee และคณะ ปี ค.ศ. 2017 ด้วยวิธี Western blot โดยใช้หลักการของ gel electrophoresis นำของเหลวใสที่ได้จากการสกัดเนื้อสมองไปต้มที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 5 นาที แล้วปั่นให้ตกตะกอน แล้วนำ supernatant ที่ได้ลงใน polyacrylamide gel ซึ่งประกอบด้วย และ 4% stacking gel และ 10% resolving gel กระแสไฟฟ้าที่ใช้สำหรับ electrophoresis คือ 60-80โวลต์ ใช้เวลา 2 ชั่งโมง 30 นาที ต่อมาย้ายโปรตีนทั้งหมดจาก polyacrylamide gel ไปยัง PVDF membrane ที่แช่ด้วย methanol แล้วล้างให้สะอาด จากนั้นนำแผ่นฟองน้ำประกบกับอุปกรณ์ขนส่งโปรตีนใน Tris buffer saline แล้วปล่อยกระแสไฟฟ้า 80-100 โวลต์ เป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง ทำให้โปรตีนมาเกาะบน PVDF membrane

ถัดมานำแผ่นโปรตีนแช่ใน blocking solution ด้วย 5% skim milk เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วตามด้วย primary antibody ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ซึ่งใช้ความเข้มข้นที่ระบุไว้ในตารางที่ 3.2 ในวันถัดมานำแผ่นโปรตีนมาล้างด้วยสารละลาย Tris buffer saline+0.01% Tween 20 (TBST) จำนวน 3 ครั้งๆละ 10 นาที จากนั้นแล้วตามด้วย secondary antibody เป็นเวลา 1 ชั่งโมง แล้วล้างด้วย TBST 3 ครั้งๆละ 10 นาที วัดปริมาณโปรตีนได้จากการถ่ายภาพของแถบโปรตีนที่ได้จากขั้นตอน immunodetection ด้วยการประกบกับฟิล์มเอกซเรย์ แล้วทำการสแกนแผ่นฟิล์มและวิเคราะห์แถบโปรตีนด้วยโปรแกรม ImageJ (National Institutes of Health) ประเทศสหรัฐอเมริกา

ตารางที่ 3.2 แอนติบอดี้ที่ใช้ในศึกษาโปรตีนการสร้างเซลล์ประสาท

Antibody	Manufacturer	Dilution	Reference
Rabit anti-doublecortin (DCX)	Abcam	1:500	Kremer et al., 2013
Mouse anti-β-actin	Santa Cruz Biotechnology	1:2,000	Lapmanee et al., 2017
Goat anti-mouse IgG HRP	Abcam	1:2,000	Lapmanee et al., 2017
Goat anti-rabbit IgG HRP	Abcam	1:2,000	Lapmanee et al., 2017

3.10 สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

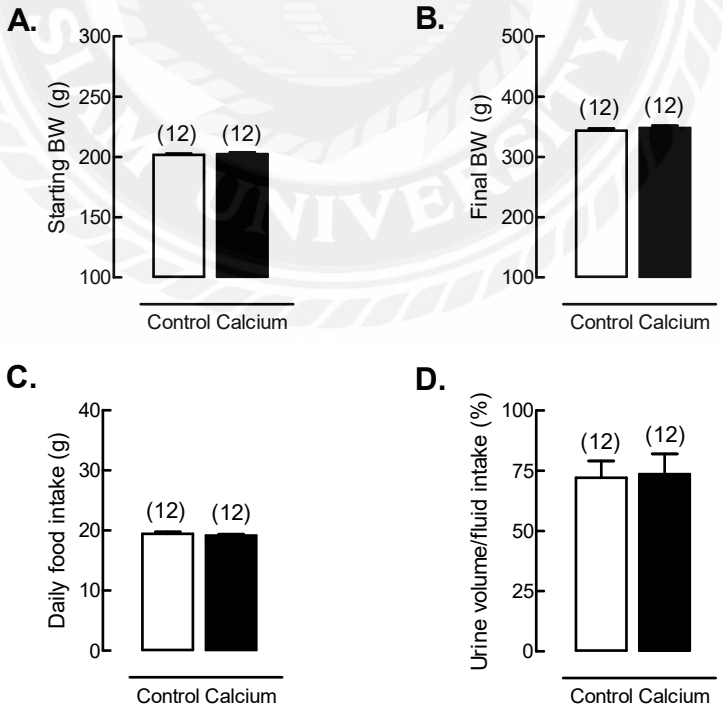
ผลของการศึกษาแสดงในรูปค่าเฉลี่ยและค่าความคลาดเลื่อนมาตรฐาน (Mean ± SE.) สำหรับการเปรียบเทียบระหว่าง 2 ข้อมูลด้วย unpaired student's t-test และตามด้วย Newman-Keuls post-test โดยที่ระบุค่า *t* และ degree of freedom (df) กำหนดให้ค่านัยสำคัญทางสถิติน้อยกว่า 0.05 ($P<0.05$) การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติทั้งหมดใช้โปรแกรม GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA)

บทที่ 4
ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

4.1 การศึกษาสมดุลและเมตาบอลิซึมของแคลเซียมของหนูขาวที่ได้รับการเสริมแคลเซียม

4.1.1 น้ำหนักร่างกาย การกิน และการขับถ่าย

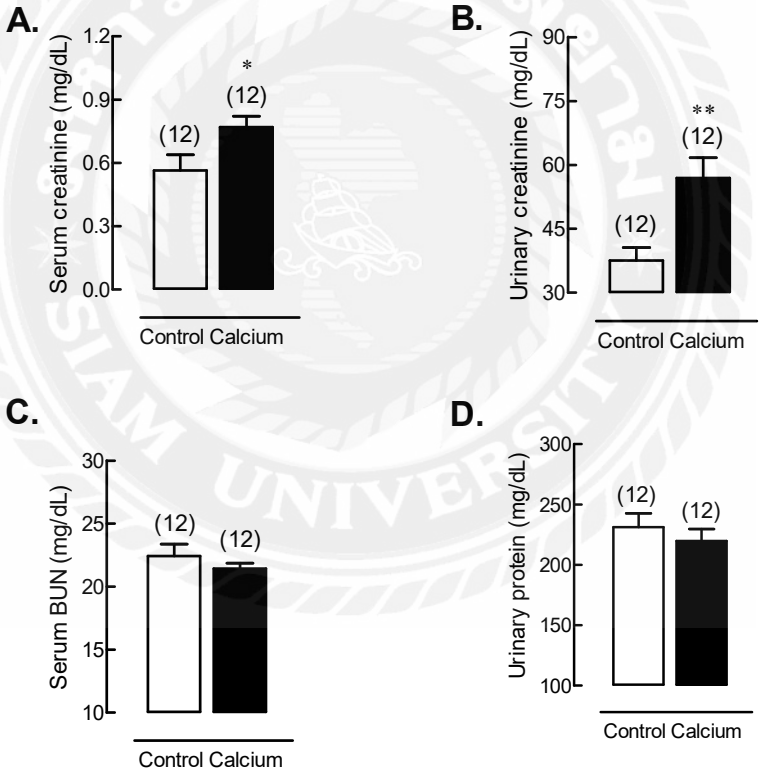
หลังจากกักกันสัตว์ทดลองหนูทั้ง 2 กลุ่มมีน้ำหนักร่างกายไม่แตกต่างกัน ($t(22) = 0.5131$; $p = 0.307$) และมีการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตลอดระยะการศึกษา 4 สัปดาห์ โดยไม่พบความแตกต่างของน้ำหนักในช่วงท้ายของการศึกษา ($t(22) = 0.8605$; $p = 0.199$) (ภาพที่ 4.1A-B) รวมทั้งปริมาณการกินอาหาร ($t(22) = 1.232$; $p = 0.115$) และร้อยละการขับถ่ายปัสสาวะต่อการกินน้ำ ($t(22) = 0.135$; $p = 0.447$) โดยประเมินด้วยกรง metabolic cage เป็นระยะเวลา 1 วัน และทำการประเมิน 1 ครั้งต่อสัปดาห์ ผลการศึกษาพบว่า หนูกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับการเสริมแคลเซียมมีปริมาณของการกินอาหารและน้ำ รวมทั้งร้อยละการขับถ่ายปัสสาวะต่อการกินน้ำไม่แตกต่างกันระหว่างกลุ่ม (ภาพที่ 4.1C-D)



ภาพที่ 4.1 น้ำหนักร่างกาย การกิน และการขับถ่าย

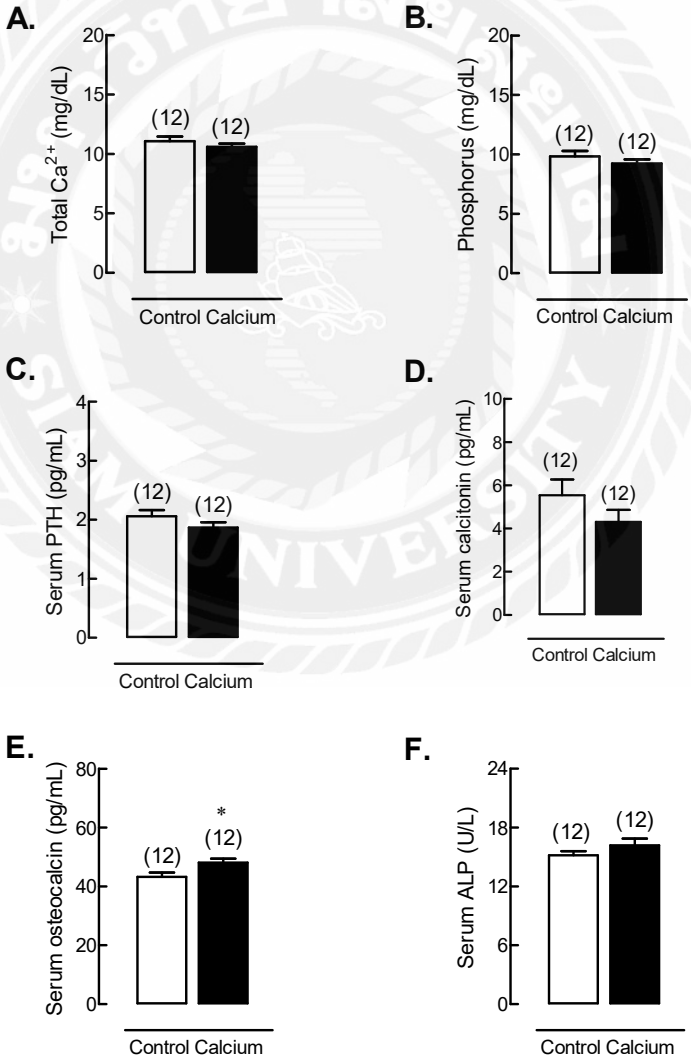
4.1.2 สารชีวเคมีในเลือดและปัสสาวะ

การเปลี่ยนแปลงสารชีวเคมีในเลือดและปัสสาวะที่บ่งชี้สภาวะการทำงานของไตและความปลอดภัยของการเสริมแคลเซียม ปกติครีเอตินินทั้งหมดต้องถูกกรองผ่านไตและขับไปกับปัสสาวะ ปริมาณของครีเอตินินที่เหลืออยู่ในเลือดจึงเป็นตัวชี้วัดการทำงานของไต ผลการศึกษาพบว่า หนูกลุ่มที่ได้รับการเสริมแคลเซียมมีปริมาณครีอะตินีนในเลือด ($t(22) = 2.268$; $p = 0.017$) และปัสสาวะ ($t(22) = 3.438$; $p = 0.001$) เพิ่มขึ้น (ภาพที่ 4.2A-B) อย่างไรก็ตามไม่พบความแตกต่างของการคั่งของเสียประเภทยูเรียไนโตรเจนอย่างมีนัยสำคัญ ($t(22)$ = t=0.951; $p = 0.176$) และปริมาณโปรตีนปัสสาวะในหนูกลุ่มที่ได้รับการเสริมแคลเซียม ($t(22) = 0.7687$; $p = 0.225$) (ภาพที่ 4.2B-C) ดังนั้นการเสริมแคลเซียมสูตรนี้เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ไม่ทำให้ไตทำงานมากขึ้นและภาวะขาดน้ำ



ภาพที่ 4.2 สารชีวเคมีในเลือดที่บ่งชี้สภาวะการทำงานของไต

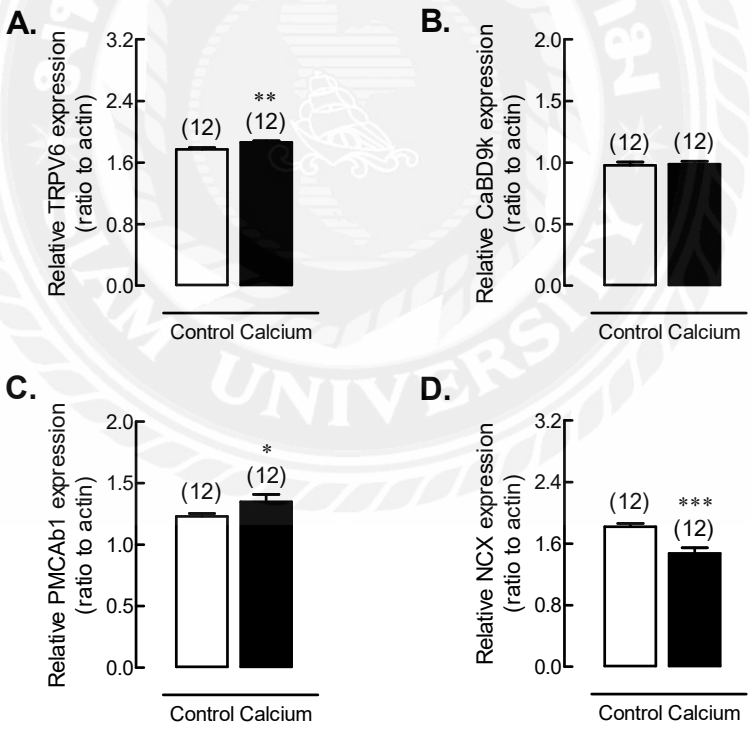
การศึกษาปริมาณแคลเซียม ฟอสเฟต และฮอร์โมนควบคุมสมดุลแคลเซียมในเลือด ไม่พบความแตกต่างกันของปริมาณแคลเซียม ($t(22) = 1.027$; $p = 0.158$) ฟอสเฟต ($t(22) = 1.035$; $p = 0.156$) ฮอร์โมนพาราไทรอยด์ฮอร์โมน (parathyroid hormone; PTH) ($t(22) = 1.400$; $p = 0.087$) และฮอร์โมนแคลซิโทนินในเลือด ($t(22) = 1.334$; $p = 0.098$) ระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับการเสริมแคลเซียม (ภาพที่ 4.3A-D) อย่างไรก็ตามมีการเปลี่ยนแปลงของสารชีวเคมีบ่งชี้การสร้างกระดูก คือ ฮอร์โมนออสติโอแคลซิน (osteocalcin) เพิ่มขึ้นมากกว่าหนูกลุ่มควบคุม ($t(22) = 2.457$; $p = 0.011$) โดยไม่พบความแตกต่างของสารชีวเคมีบ่งชี้การสลายกระดูก คือ เอนไซม์อัลคาไลน์-ฟอสฟาเตส (alkaline phosphatase, ALP) ($t(22) = 1.216$; $p = 0.119$) (ภาพที่ 4.3E-F)



ภาพที่ 4.3 ปริมาณแคลเซียม ฟอสเฟต และสารชีวเคมีควบคุมแคลเซียมในเลือด

4.1.3 การแสดงออกของยีนขนส่งแคลเซียมในลำไส้เล็กส่วนต้น

ลำไส้เล็กส่วนต้นเป็นอวัยวะที่มีการดูดซึมแคลเซียมมากที่สุดในร่างกายนำมาทำการศึกษาการแสดงออกของยีนขนส่งแคลเซียมที่ผนังด้านโพรงลำไส้ (apical/luminal side) คือ transient receptor potential vanilloid family Ca2+ channel-6 (TRPV6) และผนังลำไส้ด้านที่ติดกับหลอดเลือด คือ plasma membrane Ca2+-ATPase-1b (PMCA1b) และ Na+/Ca2+ exchanger-1 (NCX1) รวมทั้งยีนขนส่งแคลเซียมภายในเซลล์ คือ cytoplasmic calcium transport (calbindin-D9k) โดยยีน beta actin เป็นตัวควบคุมภายในถูกนำมาเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงของยีนที่ทำการศึกษา ผลการศึกษาพบว่า ลำไส้เล็กส่วนต้นของหนูที่ได้รับการเสริมแคลเซียมมีปริมาณยีน TRPV6 ($t(22) = 1.779$; $p = 0.045$) และ PMCAb1 ($t(22) = 1.779$; $p = 0.045$) เพิ่มขึ้นมากกว่าหนูกลุ่มควบคุม โดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงของยีนขนส่งแคลเซียมภายในเซลล์ calbindin-D9k ($t(22) = 0.240$; $p = 0.406$) ขณะที่ปริมาณการแสดงออกของที่ยีน NCX ลดลงในลำไส้หนูกลุ่มที่ได้รับการเสริมแคลเซียม ($t(22) = 4.006$; $p < 0.001$) (ภาพที่ 4.4)

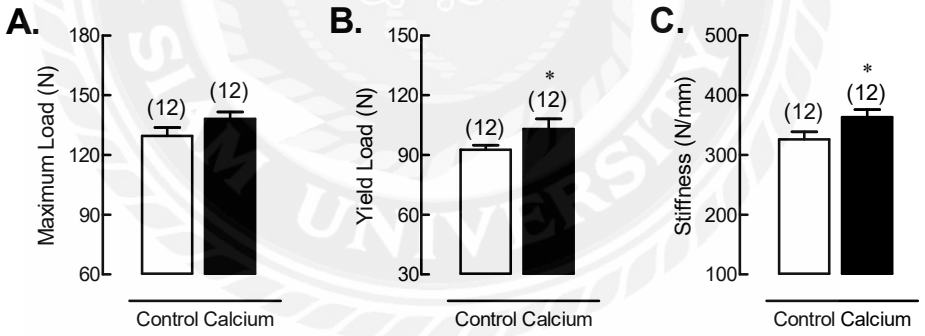


ภาพที่ 4.4 การแสดงออกของยีนขนส่งแคลเซียมในลำไส้เล็กส่วนต้น

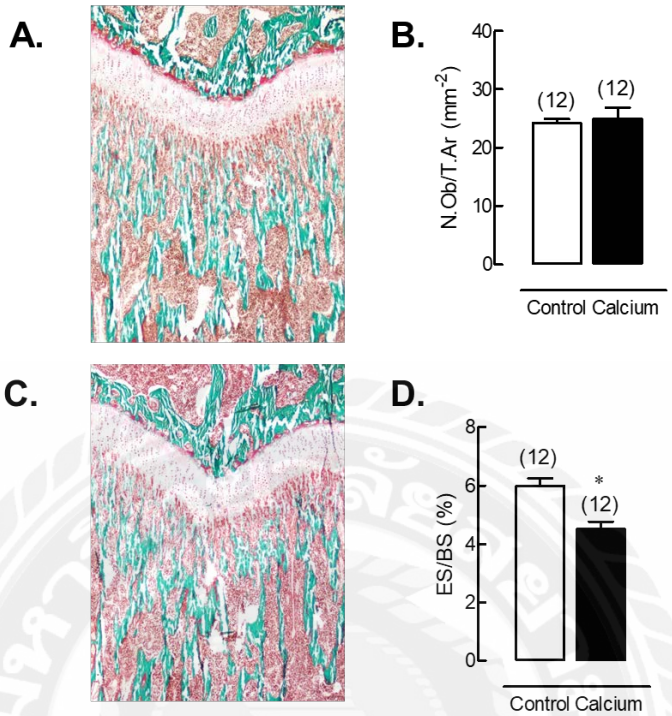
4.1.4 ความแข็งแรงและโครงสร้างของกระดูก

กระดูกขาท่อนบนนำมาศึกษาคุณสมบัติเชิงกลของกระดูกด้วยเครื่องดัดงอแบบ 3 จุด (three-pointed bending) โดยศึกษาตัวแปรที่บ่งชี้ความแข็งแรง ได้แก่ ค่าแรงรับที่ได้สูงสุดในการยืดกระดูก (Maximum load) ค่ามอดูลัสของยัง (Young's modulus) หรือ โมดูลัสยืดหยุ่น (modulus of elasticity หรือ elastic modulus) และค่าระดับความแข็ง (stiffness) ตามลำดับ ผลการศึกษาพบว่ากระดูกของหนูที่ได้รับการเสริมแคลเซียมแสดงคุณสมบัติเชิงกลที่มีความแข็งแรงเพิ่มขึ้น ซึ่งค่าแรงรับที่ได้สูงสุด ($t(22) = 1.556$; $p = 0.067$) ค่ามอดูลัสของยัง ($t(22) = 1.882$; $p = 0.036$) และค่าระดับความแข็งมากกว่ากระดูกของหนูกลุ่มควบคุม ($t(22) = 2.099$; $p = 0.024$) (ภาพที่ 4.5B-C)

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างกระดูกระดับจุลภาค กระดูกขาท่อนล่างนำมาตัดและย้อมสีเนื้อเยื่อด้วย Goldner's Trichrome เพื่อศึกษาจำนวนเซลล์ออสติโอบลาสต์ต่อพื้นที่ของกระดูก (N.Ob/T.Ar, mm^{-2}) และเปอร์เซ็นต์พื้นผิวกระดูกเหลือจากการกร่อน (ES/BS, %) ผลการศึกษา พบว่า หนูควบคุมและหนูที่ได้รับการเสริมแคลเซียมไม่มีความแตกต่างของจำนวนเซลล์ออสติโอบลาสต์ต่อพื้นที่ ($t(22) = 0.419$; $p = 0.340$) แต่หนูที่ได้รับการเสริมแคลเซียมมีพื้นผิวกระดูกเหลือจากการกร่อนต่ำกว่าหนูกลุ่มควบคุม ($t(22) = 4.083$; $p < 0.001$) (ภาพที่ 4.6B และ D)



ภาพที่ 4.5 ความแข็งแรงของกระดูก



ภาพที่ 4.6 โครงสร้างกระดูกระดับจุลภาค

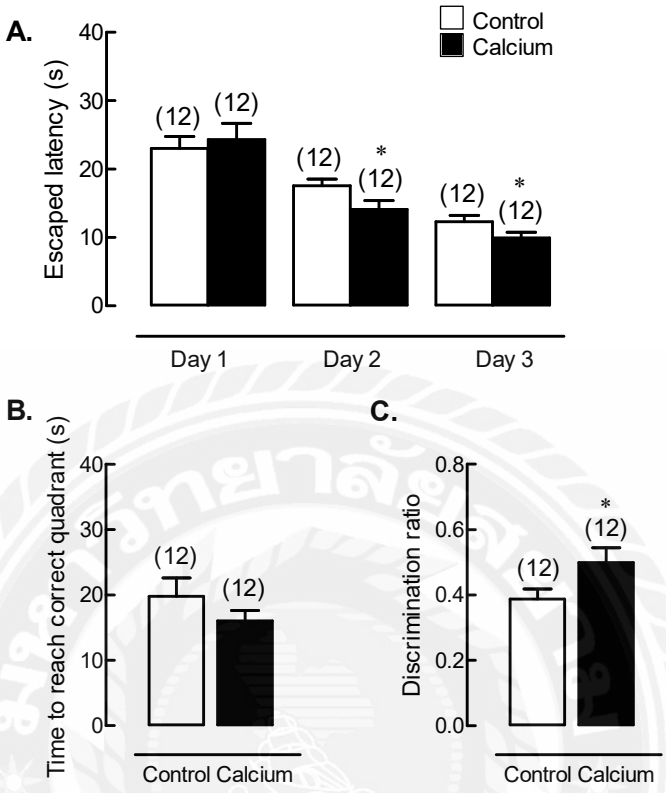
4.2 การศึกษาพฤติกรรมการเรียนรู้และความจำของหนูขาวที่ได้รับการเสริมแคลเซียม

4.2.1 การเรียนรู้และความจำ Maris water maze (MWM)

หนูกลุ่มควบคุมและหนูกลุ่มที่ได้รับการเสริมแคลเซียมมีความสามารถในการเรียนรู้ตำแหน่งของแท่นพยุงตัวในสระว่ายน้ำ MWM หลังจากการทดสอบการเรียนรู้จำนวน 3 วัน โดยหนูที่ได้รับการเสริมแคลเซียมมีระยะเวลาของการเรียนรู้น้อยกว่ากลุ่มควบคุมในวันที่ 2 และ วันที่ 3 ตามลำดับ (วันที่ 1 $t(22) = 0.451$; $p = 0.328$; วันที่ 2 $t(22) = 2.171$; $p = 0.021$; วันที่ 3 $t(22) = 1.873$; $p = 0.037$) และหนูที่ได้รับการเสริมแคลเซียมมีความสามารถในการจดจำด้วยวิธีทดสอบ probe ไม่พบความแตกต่างกันระหว่างทั้ง 2 กลุ่ม ($t(22) = 1.161$; $p = 0.129$) (ภาพที่ 4.7A-B)

4.2.2 การแยกแยะวัตถุใหม่ (Novel-objective recognition, NOR)

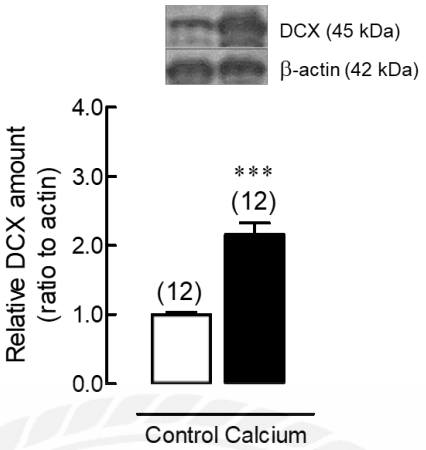
อย่างไรก็ตามหนูกลุ่มที่ได้รับการเสริมแคลเซียมมีความสามารถในการแยกแยะวัตถุใหม่ ซึ่งมีดัชนีการแยกแยะวัตถุมากกว่าหนูกลุ่มควบคุม ($t(22) = 2.065$; $p = 0.026$) (ภาพที่ 4.7C) ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า การเสริมแคลเซียมสามารถส่งเสริมการเรียนรู้และความจำของหนูขาว



ภาพที่ 4.7 พฤติกรรมเรียนรู้ ความจำ และดัชนีการแยกแยะวัตถุ

4.3 การศึกษาการสร้างเซลล์ประสาทในสมองของหนูขาวที่ได้รับการเสริมแคลเซียม

สมองส่วนฮิปโปแคมปัสถูกนำมาศึกษาการแสดงออกของโปรตีนบ่งชี้การสร้างเซลล์ประสาท doublecortin (DCX) ด้วยวิธี Western blotting พบว่า หนูที่ได้รับการเสริมแคลเซียมมีปริมาณการแสดงออกของโปรตีนการเซลล์ประสาท DCX มากกว่าหนูกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($t(22) = 6.834$; $p < 0.001$) ซึ่งผลการศึกษานี้อาจเป็นปัจจัยสนับสนุนให้หนูที่ได้รับการเสริมแคลเซียมมีการเรียนเรียนรู้และแยกแยะวัตถุใหม่ได้ดีกว่ากลุ่มควบคุม (ภาพที่ 4.8)



ภาพที่ 4.8 การแสดงออกของโปรตีนบ่งชี้การสร้างเซลล์ประสาท

บทที่ 5
สรุปผล อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยเชิงทดลองในหนูแรทสายพันธุ์ Wistar เพศผู้ อายุ 8 สัปดาห์ ที่ได้รับการเสริมแคลเซียมเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ และทำการศึกษาสมดุลและเมตาลิซึมของแคลเซียม พฤติกรรมการเรียนรู้และความจำ และการสร้างเซลล์ประสาทในสมองส่วนฮิปโป-แคมปัส ผลการศึกษาของงานวิจัยนี้มีความสอดคล้องกับสมมติฐาน กล่าวคือ การเสริมแคลเซียมช่วยส่งเสริมการดูดซึมแคลเซียมด้วยการเพิ่มปริมาณการแสดงออกของยีนขนส่งแคลเซียมในลำไส้ ทำให้กระดูกมีความแข็งแรง อีกทั้งการเสริมแคลเซียมทำให้พฤติกรรมการเรียนรู้และความจำและการสร้างเซลล์ประสาทในสมองเพิ่มขึ้น งานวิจัยได้ดำเนินงานวิจัยบรรลุวัตถุประสงค์ที่ได้กำหนดไว้และสรุปผลการศึกษาโดยสังเขปดังนี้

5.1.1 หนูที่ได้รับการเสริมแคลเซียมเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ สามารถเติบโตอย่างปกติ โดยมีการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักร่างกาย ปริมาณการกินอาหาร น้ำ และการขับถ่าย ไม่แตกต่างกับหนูกลุ่มควบคุม

5.1.2 การเสริมแคลเซียมอย่างต่อเนื่องนานระยะเวลา 4 สัปดาห์ ทำให้ปริมาณครีอะ-ตินีนในเลือดและปัสสาวะเพิ่มขึ้น ซึ่งอาจบ่งชี้ความผิดปกติของไตแต่ยังไม่ทำให้เกิดความเสียหายของไตอย่างรุนแรง ซึ่งไตสามารถกรองโปรตีนได้อย่างปกติ

5.1.3 หนูที่ได้รับการเสริมแคลเซียมมีการแสดงออกของยีนขนส่งแคลเซียมในลำไส้เล็กส่วนต้นที่โพรงลำไส้ ได้แก่ TRPV6 และ PMCAb1 รวมทั้งฮอร์โมนออสติโอแคลซินเพิ่มสูงขึ้น ซึ่งอาจส่งผลมีการสร้างกระดูกและลดเปอร์เซ็นต์พื้นผิวกระดูกเหลือจากการกร่อน และทำให้กระดูกมีความแข็งแรงเพิ่มขึ้น

5.1.4 หนูที่ได้รับการเสริมแคลเซียมมีพฤติกรรมการเรียนรู้และการแยกแยะวัตถุใหม่ดีกว่าหนูกลุ่มควบคุม โดยอาจเป็นผลมาจากการเพิ่มปริมาณการแสดงออกของโปรตีนการสร้างเซลล์ประสาท doublecortin ในสมองฮิปโปแคมปัส ซึ่งทำหน้าที่ศูนย์ควบคุมการเรียนรู้และการแสดงออกแสดงออกด้านพฤติกรรมของอารมณ์

5.2. อภิปรายผล

5.2.1 รูปแบบและผลกระทบของการเสริมแคลเซียม

แคลเซียมเป็นแร่ธาตุหลักที่เป็นส่วนประกอบของกระดูกและฟัน และยังเป็นสารที่จำเป็นต่อกระบวนการทางชีวเคมีที่สำคัญในเซลล์ (Niki, et al, 1996) แม้ร่างกายจะต้องการแคลเซียมเพียงเล็กน้อยแต่ก็เป็นแร่ธาตุที่มีความสำคัญต่อร่างกายทุกระบบ เนื่องจากร่างกายไม่สามารถสร้างแคลเซียมได้เอง จึงจำเป็นต้องได้รับจากอาหารอย่างที่มีแคลเซียมอย่างเพียงพอ สถาบันทางการแพทย์ ประเทศสหรัฐอเมริกา แนะนำปริมาณแคลเซียมที่ควรได้รับประจำวัน 1,000 มิลลิกรัม สำหรับผู้ใหญ่ (เพศชาย อายุ 19-70 ปี และเพศหญิง อายุ 19-50 ปี) และผู้สูงอายุควรบริโภคแคลเซียม 1,200 มิลลิกรัม (Ross, et al, 2011) และคนไทยควรได้รับแคลเซียมประจำวัน 1,000 มิลลิกรัม (สำนักโภชนาการ กรมอนามัย กระทรวงสาธารณสุข, 2546:149) หากได้รับแคลเซียมจากอาหารไม่เพียงพออาจเลือกเสริมแคลเซียมจากผลิตภัณฑ์เสริมแคลเซียม ร้อยละ 35 ของประชากรประเทศสหรัฐอเมริกาได้รับการเสริมแคลเซียม (Kantor, et al, 2016) ปัจจุบันมีการเสริมแคลเซียมหลากหลายรูปแบบ ผลการศึกษาครั้งนี้พบว่า การเสริมแคลเซียมเสริมที่ผสมน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว ได้แก่ กลูโคสและกาแล็กโทส เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ ทำให้การทำงานของไตเกิดความผิดปกติแต่ยังไม่เกิดความเสียหายของไตอย่างรุนแรง Ramos และคณะ ปี ค.ศ. 2014 ศึกษาผลของการเสริมอาหารที่มีแคลเซียมต่อการเกิดนิ่วในทางเดินปัสสาวะ พบว่า การเสริมแคลเซียมไม่มีผลต่อปริมาณแคลเซียมในเลือดและครีอาตินีนขับออกมาจากไต ขณะที่การศึกษาของ Letavernier และคณะ ปี ค.ศ. 2016 รายงานผลของการเสริมแคลเซียมและวิตามินดีเป็นระยะเวลา 6 เดือน ทำให้เกิดการขับแคลเซียมในปัสสาวะมากขึ้นและการเกิดนิ่วในไตในหนูแรท โดยที่การเสริมแคลเซียมเพียงอย่างเดียวไม่ได้ก่อให้เกิดผลดังกล่าว ดังนั้นการเสริมแคลเซียมเสริมที่ผสมน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวนี้อาจมีความปลอดภัยจากการเกิดนิ่วในไตและทางเดินปัสสาวะ

อย่างไรก็ตามการเสริมแคลเซียมอย่างต่อเนื่องอาจส่งผลผลกระทบต่อการทำงานของระบบต่างๆในร่างกาย เช่น การเกิดหินปูนในผนังหลอดที่เลี้ยงหัวใจและสมอง การเกิดนิ่วในไต โรคมะเร็งต่อมลูกหมาก ความผิดปกติทางอารมณ์และพฤติกรรม (Trulson, et al, 1986; Godinho, et al, 2002; Giovannucci, et al, 2006; Payne, et al, 2014; Sorensen, 2014:234; Tankeu, et al, 2017) เป็นต้น ฉะนั้นการเสริมแคลเซียมควรได้รับคำแนะนำจากแพทย์หรือผู้เชี่ยวชาญ โดยอาจกินอาหารที่มีแคลเซียมสูงออกกำลังกายกลางแจ้งรับวิตามินจากแสงแดดสม่ำเสมอร่วมกับการเสริมแคลเซียมเสริมที่ผสมน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว

5.2.2 การเปลี่ยนแปลงสมดุลและเมตาบอลิซึมของแคลเซียมจากการเสริมแคลเซียม

เป็นที่ทราบกันดีว่า แคลเซียม เป็นธาตุที่พบมากที่สุดในทุกส่วนของร่างกาย แคลเซียมเป็นตัวกระตุ้นที่ช่วยในเกิดปฏิกิริยาทางเคมีที่สำคัญ ร่างกายได้รับแคลเซียมจากการรับประทานอาหารและดูดซึมเข้าไปผ่านโพรงลำไส้เล็กส่วนต้นซึ่งเป็นอวัยวะที่มีการดูดซึมแคลเซียมสูงสุด แคลเซียมที่ถูกดูดซึมผ่านโปรตีนแคลเซียมแชนแนลที่โพรงลำไส้ ได้แก่ TRPV5 และ TRPV6 การขนส่งแคลเซียมที่ละลายอยู่ในนี้ไหลตามน้ำพร้อมกับโซเดียมและกลูโคส งานวิจัยจึงได้เลือกใช้เครื่องดื่มเสริมแคลเซียมร่วมกับโซเดียมและน้ำตาลโมเลกุลเดียวของ Suntornsaratoon และคณะ ปี ค.ศ. 2014) จากนั้นแคลเซียมจับกับโปรตีนนำพาที่อยู่ภายในเซลล์ Calbindin-D9k และเข้าสู่กระแสเลือดผ่านโปรตีนขนส่ง plasma membrane Ca^{2+}-ATPase-1b (PMCA1b) และ Na^{+}/Ca^{2+} exchanger-1 (NCX1) เพื่อนำแคลเซียมไปใช้ในการทำงานของอวัยวะต่างๆของร่างกาย รวมทั้งนำไปสะสมที่กระดูกและฟัน ขณะที่แคลเซียมส่วนที่เกินความต้องการของร่างกายถูกกำจัดและขับถ่ายออกมากับอุจจาระและปัสสาวะ (Raggatt & Partridge, 2010; Ross, et al, 2011) ระดับแคลเซียมในเลือดถูกควบให้อยู่ระดับปกติโดยอาศัยการทำงานของฮอร์โมนต่างๆ หากระดับแคลเซียมในเลือดต่ำฮอร์โมนพาราไทรอยด์จากต่อมพาราไทรอยด์มีผลให้เพิ่มการดูดซึมแคลเซียมที่ลำไส้และดูดกลับแคลเซียมที่ท่อไต และกระตุ้นการทำงานเซลล์ออสติโอคลาสต์ย่อยสลายกระดูกด้วยเอนไซม์อัล-คาไลน์ฟอสฟาเตส เพื่อปล่อยแคลเซียมเข้าสู่กระแสเลือด และวิตามินดีช่วยเสริมให้ดูดซึมแคลเซียมในลำไส้เพิ่มขึ้นอีกด้วย หากร่างกายมีระดับแคลเซียมในเลือดสูง ฮอร์โมนแคลซิโทนินจากต่อมไทรอยด์ลดการดูดกลับแคลเซียมที่ท่อไตและเพิ่มการสะสมแคลเซียมในกระดูกเพิ่มขึ้น ทำให้มวลและความแข็งแรงของกระดูกเพิ่มมากขึ้น (Charoenphandhu, et al, 2010; Boron, et al, 2012)

ผลของการเสริมแคลเซียมในการศึกษาครั้งนี้ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของระดับแคลเซียมและฟอสเฟตในเลือด แต่มีการเพิ่มขึ้นของฮอร์โมนออสติโอแคลซีน ซึ่งทำหน้าที่ส่งเสริมการทำงานเซลล์สร้างกระดูกออสติโอบลาสต์และสะสมคลอลาเจนเพื่อเพิ่มความแข็งแรงต่อโครงสร้างกระดูก (Rammelt, et al., 2005) การเสริมแคลเซียมเพิ่มปริมาณการแสดงออกของยีนขนส่งแคลเซียมในลำไส้ส่วนต้น TRPV6 และ PMCAb1 โดยลดปริมาณยีน NCX1 เพื่อป้องกันไม่ให้แคลเซียมภายในเลือดมากเกินไป นอกจากนี้กระดูกหนูที่ได้รับการเสริมแคลเซียม มีคุณสมบัติเชิงกลที่มีความแข็งเพิ่มขึ้นและมีพื้นผิวกระดูกเหลือจากการกร่อนลดลงอีกด้วย ซึ่งสอดคล้องกับผลงานวิจัยของ Suntornsaratoon และคณะ ปี ค.ศ. 2014 โดยการเสริมแคลเซียมสูตรนี้สามารถป้องกันการเกิดภาวะกระดูกบางในหนูระยะให้นมด้วยเพิ่มการขนส่งแคลเซียมผ่านเยื่อบุลำไส้เล็กและยีนขนส่งแคลเซียม TRPV6 มากขึ้น ทำให้เพิ่มปริมาณแคลเซียมในเลือด น้ำนม มวลกระดูกและพื้นผิวกระดูกเหลือจากการกร่อนลดลง

ดังนั้นการเสริมแคลเซียมที่ผสมโซเดียม น้ำตาลกลูโคสและกาแล็กโทส เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ ทำให้เพิ่มการดูดซึมแคลเซียมและการแสดงออกของยีนขนส่งแคลเซียมในลำไส้ ทำให้กระดูกมีความแข็งแรงมากขึ้น ซึ่งสามารถแนะนำการเสริมแคลเซียมนี้เพื่อลดความเสี่ยงของการเกิดภาวะกระดูกบางและ/หรือกระดูกพรุน การเสริมแคลเซียมอย่างน้อย 1,200 มิลลิกรัมต่อวัน สามารถลดความเสี่ยงการเกิดภาวะกระดูกพรุนและกระดูกหักในผู้สูงอายุได้ (Tang, et al, 2007)

5.2.3 การเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมประสาทและความจำของการเสริมแคลเซียม

ในปี ค.ศ. 1979 Hanahisa และ Yamaguchi รายงานผลการศึกษาของการเสริมแคลเซียม 500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ทำให้เพิ่มความเข้มข้นของแคลเซียมในเลือดและเนื้อเยื่อสมองได้ ซึ่งอาจส่งผลกระทบการทำงานของเซลล์ประสาทและการคงอยู่ของเซลล์ประสาทในสมอง (McGinnis, et al, 1999) การเปลี่ยนแปลงของแคลเซียมที่สูงขึ้นมีผลต่อสุขภาพจิตใจและอารมณ์ การความผิดปกติทางเมตาบอลิซึมของแคลเซียมเป็นสาเหตุหนึ่งของการเกิดโรคซึมเศร้า (Faragalla & Flach, 1970) และการมีระดับแคลเซียมในเลือดสูงทำให้ผู้ป่วยโรคซึมเศร้าแสดงอาการกระวนกระวายอย่างเฉียบพลันและอารมณ์แปรปรวน (Carman & Wyatt, 1977) สอดคล้องกับผลการศึกษาในผู้ป่วย hypoparathyroidism ที่ได้รับการฉีดยาแคลเซียมแลคเตทและมีระดับแคลเซียมในเลือดสูง ผู้ป่วยแสดงอาการหวาดระแหวงมากขึ้น (Snowdon, et al, 1976; Cogan, et al, 1978) อีกทั้งผู้ป่วยโรคจิตเภทที่แสดงอาการหดหู่และซึมเศร้ามีปริมาณแคลเซียมในน้ำหล่อเลี้ยงสมองและไขสันหลังสูงอีกด้วย (Jimerson, et al, 1979) อย่างไรก็ตามการเสริมแคลเซียมในงานวิจัยนี้ไม่มีการเพิ่มขึ้นของระดับแคลเซียมในเลือดจึงไม่ก่อให้เกิดความผิดปกติทางอารมณ์ ผลการศึกษาพบว่า หนูที่ได้รับการเสริมแคลเซียมมีพฤติกรรมการเรียนรู้ด้วย Morris water maze และการแยกแยะวัตถุใหม่เพิ่มขึ้น และมีเพิ่มปริมาณโปรตีนการสร้างเซลล์ประสาทใหม่สมองฮิปโปแคมปัส ผลการศึกษาดังกล่าวขัดแย้งกับผลการศึกษาของ Hasegawa ค.ศ. 2018 โดยหนูเมาส์ที่ได้รับอาการเสริมแคลเซียมคาร์บอเนตเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ มีพฤติกรรมการเรียนรู้และความจำบกพร่องจากการทดสอบด้วยแยกแยะวัตถุใหม่และเครื่องมือ memory Y-maze และ Barnes maze และปริมาณการแสดงออกของโปรตีน cAMP responseelement-binding protein (CREB) ซึ่งบ่งชี้ความสามารถของสมองในการเปลี่ยนแปลงตลอดอายุไข (neuronal plasticity) (Hasegawa, et al, 2018)

จากผลการศึกษาที่กล่าวมาในขั้นต้นทำให้ทราบว่า การเสริมแคลเซียมที่มีส่วนผสมของแคลเซียมคลอไรด์ โซเดียมคลอไรด์ กลูโคส และกาแล็กโทส สามารถช่วยส่งเสริมการเรียนรู้และความจำด้วยการเพิ่มปริมาณเซลล์ประสาทในสมองส่วนที่ควบคุมการเรียนรู้ พฤติกรรม และอารมณ์

5.3 ข้อเสนอแนะ

5.3.1 ทำการประเมินช่วงระยะเวลาในการเสริมแคลเซียมต่อการเกิดความผิดปกติของไต (ระหว่าง 1 ถึง 4 สัปดาห์) และศึกษาการเปลี่ยนแปลงพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อไตและสมอง เพื่อยืนยันความปลอดภัยจากการเสริมแคลเซียม

5.3.2 ทำการศึกษาต่อยอดในสัตว์ทดลองที่ร่างกายมีความต้องการแคลเซียมสูงหรือภาวะกระดูกพรุน เช่น หนูอายุ 3-8 สัปดาห์ การตัดรังไข่ในหนูเพศเมีย ร่วมกับการเสริมวิตามินดีหรือฮอร์โมนควบคุมสมดุลแคลเซียม เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์เสริมแคลเซียม

บทที่ 6
บรรณานุกรม

Benarroch, E.E. (2013). Adult neurogenesis in the dentate gyrus: general concepts and potential implications. *Neurology*, 81(2013), 1443–1452.

Boron, W.F. and Emile L.B. (2012). *Medical Physiology: A Cellular and Molecular Approach*. 2nd ed.,International ed. Philadelphia: Saunders/Elsevier.

Carman, J.S., and Wyatt, R.J. (1977). Alterations in Cerebrospinal Fluid and Serum Total Calcium with Changes in Psychiatric State. In E. Usdin; D.A. Hamburg; J. Barchas (editors). *Neuroregulators and Psychiatric Disorders*. New York: Oxford University Press.

Charoenphandhu, N., et al. (2012). Duodenal calcium transporter mRNA expression in stressed male rat streated with diazepam, fluoxetine, reboxetine, or venlafaxine. *Mol. Cell. Biochem*, 369(2012), 87–94.

Charoenphandhu, N., Wongdee, K. and Krishnamra, N. (2010). Is prolactin the cardinal calciotropic maternal hormone? *Trends. Endocrinol. Metab*, 21(2010), 395–401.

Cogan, M.G., et al. (1978). Central nervous system manifestations of hyperparathyroidism. *Am. J. Med*, 65(1978), 963–970.

Ennaceur, A. and Delacour, J. (1988). A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats.1: Behavioral data. *Behav. Brain. Res*, 31(1988), 47–59.

Faragalla, F.F. and Flach, F. F. (1970). Studies of mineral metabolism in mental depression. I. The effects of imipramine and electric convulsive therapy on calcium balance and kinetics. *J. Nerv. Ment. Dis*, 151(1970):120–129.

Gimbel, D.A., et al. (2010). Memory impairment in transgenic Alzheimer mice requires cellular prion protein. J. *Neurosci*, 30(2010), 6367–6374.

Giovannucci, E., et al. (2006). A prospective study of calcium intake and incident and fatal prostate cancer. Cancer. *Epidemiol. Biomarkers. Prev*, 15(2006), 203–210.

Godinho, A.F., Trombini, T.V. and Oliveira, E.C. (2002). Effects of elevated calcium on motor and exploratory activities of rats. *Braz. J. Med. Biol. Res*. 35(2002), 451–457.

Goodman, W.G., et al. (2000). Coronary-artery calcification in young adults with end-stage renal disease who are undergoing dialysis. *N. Engl. J. Med*, 342(2000), 1478–1483.

Hanahisa, Y., and Yamaguchi, M. (1979). Characterization of calcium accumulation in the brain of rats administered orally calcium: The significance of energy-dependent mechanism. *Mol. Cell. Biochem*, 158(1979), 1–7.

Hasegawa, Y.; Inoue, T.; and Fuji, T. (2018). Calcium carbonate supplementation causes memory impairment in mice. *Asian. Pac. J. Trop. Med*, 11(2018), 576–582.

Hatfield, D.P., et al. (2014). Critical assessment of high-circulation print newspaper coverage of the institute of medicine report dietary reference intakes for calcium and vitamin D. *Public. Health. Nutr*, 17(2014),1868–1876.

Heffner, T.G.; Harman, J.A.; and Seiden, L.S. (1980). A rapid method for the regional dissection of the rat brain. *Pharmacol. Biochem. Behav*, 13(1980), 453–456.

Jimerson, D.C., et al. (1979). CSF calcium: clinical correlates in affective illness and schizophrenia. *Biol. Psychiatry*, 14(1979), 37–51.

Kantor, E.D., et al. (2016). Trends in dietary supplement use among US adults from 1999-2012. *JAMA*, 216(2016), 1464.

Kempermann, G., et al. (2004). Milestones of neuronal development in the adult hippocampus. *Trends. Neurosci*, 27(2004), 447–452.

Lapmanee, S., et al. (2017), Agomelatine, venlafaxine, and running exercise effectively prevent anxiety and depression-like behaviors and memory impairment in restraint stressed rats. *PLoS One*, 12(2017), e0187671.

Letavernier, E., et al. (2016). Calcium and vitamin D have a synergistic role in a rat model of kidney stone disease. *Kidney Int*, 90(2016), 809–817.

McGinnis, K.M.; Wang, K.K.W; and Gnegy, M.E. (1999). Alterations of extracellular Ca2+ elicit selective modes of cell death and protease activation in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *J. Neurochem*, 72(1999),1853–1863.

Morris, R. (1984). Developments of a water-maze procedure for studying spatial-learning in the rat. *J. Neurosci. Meth*, 11(1984), 47–60.

Morris, R. (1981). Spatial localization does not require the presence of local cues. *Learn. Motiv*, 12(1981), 239–260.

Niki, I., et al. (1996). Ca2+ signaling and intracellular Ca2+ binding proteins. *J. Biochem*, 120(1996), 685–698.

Paula, F.J., and Rosen, C.J. (2010). Obesity, diabetes mellitus and last but not least, osteoporosis. *Arq. Bras. Endocrinol. Metabol*, 54(2010),150–157.

Payne, M.E., et al. (2014). Elevated brain lesion volumes in older adults who use calcium supplements: A cross-sectional clinical observational study. *Br. J. Nutr*, 112(2014), 220–227.

Raggatt, L.J., and Partridge, N.C. (2010). Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling. *J. Biol. Chem*, 285(2010), 25103–25108.

Rammelt, S., et al. (2005). Osteocalcin enhances bone remodeling around hydroxyapatite/collagen composites. *J. Biomed. Mater. Res*, 73(2005), 284–294.

Ramos, M.F., et al. (2014). Effect of vitamin D3 overdose and calcium supplementation in experimental nephrolithiasis model. *J. Bras. Nefrol*, 36(2014),132–138.

Ross, A.C., et al. (2011). The 2011 report on dietary reference intakes for calcium and vitamin d from the institute of medicine: what clinicians need to know. *J. Clin. Endocrinol. Metab*, 96(2011), 53–58.

Snowdon, J.A., Macfie, A.C. and Pearce, J.B. (1976). Hypocalcaemic myopathy with paranoid psychosis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, 39(1976), 48–52.

Song, L. (2017). Calcium and Bone Metabolism Indices. Adv. *Clin. Chem*. 82(2017), 1–46.

Sorensen, M.D. (2014). Calcium intake and urinary stone disease. *Transl. Androl. Urol*, 3(2014), 235–240.

Stangl, D., and Thuret, S. (2009). Impact of diet on adult hippocampal neurogenesis. *Genes. Nutr,* 4(2009), 271–82.

Straub, D.A. (2007). Calcium supplementation in clinical practice: a review of forms, doses, and indications. *Nutr. Clin. Pract*, 22(2007), 286–296.

Suntornsaratoon, P., et al. (2014). Pre-suckling calcium supplementation effectively prevents lactationinduced osteopenia in rats. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab*, 306(2014), E177–E188.

Sunyecz, J.A. (2008). The use of calcium and vitamin D in the management of osteoporosis. *Ther. Clin.Risk. Manag*, 4(2008), 827–836.

Tang, B.M., et al. (2007). Use of calcium or calcium in combination with vitamin D supplementation to prevent fractures and bone loss in people aged 50 years and older: a meta-analysis. *Lancet*, 370(2007), 657–666.

Tankeu, A.T., Ndip, A.V. and Noubiap, J.J. (2017). Calcium supplementation and cardiovascular risk: A rising concern. *J. Clin. Hypertens. (Greenwich),* 19(2017), 640–646.

Tiyasatkulkovit, W., et al. (2019). Impairment of bone microstructure and upregulation of osteoclastogenic markers in spontaneously hypertensive rats. *Sci Rep*, 9(2019), 12293.

Trulson, M.E., Arasteh, K. and Ray, D.W. (1986). Effects of elevated calcium on learned helplessness and brain serotonin metabolism in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav*, 24(1986), 445–448.

Veale, W.L., and Myers, R.D. (1971). Emotional behavior, arousal and sleep produced by sodium and calcium ions perfused within the hypothalamus of the cat. *Physiol. Behav*, 7(1971), 601–607.

World Health Organization. (2004). Calcium: Vitamin and mineral requirements in human nutrition. In *Report of a joint FAO/WHO expert consultation on human vitamin and mineral requirements*, Bangkok, Thailand, 21–30 September 1998. 2nd ed., pp. 59–93. Geneva: World Health Organization.

กองโภชนาการ กรมอนามัย กระทรวงสาธารณสุข. (2549). *รายงานภาวะอาหารและโภชนาการของประเทศไทย ครั้งที่ 5 ปี พ.ศ. 2546*. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์องค์การรับส่งสินค้าและพัสดุภัณฑ์.

.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

หนังสืออนุมัติการพิจารณาจรรยาบรรณการใช้สัตว์ทดลอง
คณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงและใช้สัตว์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

ANIMAL USE PROTOCOL APPROVAL

Protocol Number 010/2561

Animal Protocol Title

(Thai) การศึกษาภาวะสมดุลแคลเซียมและพฤติกรรมประสาทของหนูขาวที่ได้รับการเสริมแคลเซียมและวิตามินดี

(English) Effects of calcium and vitamin D supplement on calcium homeostasis and neurobehavior in rats

Main Project/Proposal Title (If available)

(Thai) 1.การศึกษาภาวะสมดุลแคลเซียมและพฤติกรรมการเรียนรู้ของหนูขาวที่ได้รับการเสริมแคลเซียมสูง

2.การเปลี่ยนแปลงระดับโมเลกุลของวิตามินดีเมตาบอลิซึมและพฤติกรรมประสาทในหนูขาวเพศผู้ที่ได้รับการเสริมวิตามินดี

(English) 1.Effects of high calcium supplement on calcium homeostasis and learning-related behaviors in rats

2.The molecular changes of vitamin D metabolism and neurobehavioral responses in different vitamin D doses-supplemented rats

Principal Investigator

Name-Surname (Thai) อาจารย์ ดร.ศราวุธ ลาภมณีย์

Name-Surname (English) Dr.Sarawut Lapmanee

Location of Animal Housing Laboratory Animal Center, Thammasat University

Location of Animal Experiments Laboratory Animal Center, Thammasat University

This Animal Protocol Established under Ethical Principles and Guidelines for the Use of Animals, National Research Council of Thailand and Approved by Animal Care and Use Committee of Thammasat University.

(Thunyatorn Yimsoo, DVM)
Chair of Animal Ethical and Post Approval Monitoring Subcommittee
Thammasat University

(Prof.Dr.Siriwan Suebnukarn, D.D.S., Ph.D.)
Vice Rector for Research and Innovation
Chair of Animal Care and Use Committee
Thammasat University

Expiration Date
15 August, 2019

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ	อาจารย์ ดร.ศราวุธ ลาภมณีย์
วัน เดือน ปีเกิด	7 มิถุนายน 2528
สถานที่เกิด	นครศรีธรรมราช
ตำแหน่ง	ผู้ช่วยคณบดีฝ่ายวิจัยและวิเทศสัมพันธ์
สถานที่ทำงาน	คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสยาม
	แขวงบางหว้า เขตภาษีเจริญ กรุงเทพมหานคร
ประวัติการศึกษา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (กายภาพบำบัด)
	มหาวิทยาลัยมหิดล พ.ศ. 2551
	วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (สรีรวิทยาการออกกำลังกาย)
	มหาวิทยาลัยมหิดล พ.ศ. 2554
	ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต (สรีรวิทยา-ประสาทวิทยาศาสตร์)
	มหาวิทยาลัยมหิดล-มหาวิทยาลัยสตารส์บูร์ก พ.ศ. 2560