



รายงานผลการวิจัย
ทุนวิจัยรัชกาลที่๕เฉลิมโกษา

๔
๒๕๖๓

การศึกษาอกร่างกายถึงกลไกการขนส่งฟลูออไรด์
ผ่านชั้นเซลล์ผนังลำไส้เล็กของสุนัข

โดย

จิรศักดิ์ นพกุล
सानต์ เตชากิจประณีต
สิริพร โชติไพบูลย์พันธ์

QP
165
.๖
2534

เลขที่ ๐๐๑๖๒๘

๐๐๑๖๒๘

เลขทะเบียน ๐๐๑๖๒๘

เลขหมู่ AP165.๑, X34, 21

วันที่ 15 เดือน ๑ ปี ๒๕๓๔



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

๐๐๑๖๒๘

๐๐๑๖๒๘

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้ทำการวิจัย ขอแสดงความขอบคุณต่อคณะกรรมการเงินทุนวิจัย
รัชดาภิเษกสมโภช และฝ่ายวิจัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้กรุณาพิจารณาให้เงิน
สนับสนุนโครงการวิจัย ด้วยเงินทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช ประจำปีงบประมาณ 2533
(ครั้งที่ 1)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อโครงการวิจัย "การศึกษาอนุกร่างกายถึงกลไกการขนส่งฟลูออไรด์ผ่าน
ชั้นเซลล์ผนังลำไส้เล็กของสุนัข"

ชื่อผู้วิจัย รองศาสตราจารย์ทันตแพทย์ ดร. จีรศักดิ์ นพคุณ
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ทันตแพทย์หญิง ศานติ เตชาภิประณี
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ทันตแพทย์หญิง ศิริพร โชติไพบุลย์พันธ์

เดือนและปีที่ทำวิจัยเสร็จ มกราคม 2534

บทคัดย่อ

การดูดซึมฟลูออไรด์เกิดได้ทั้งในกระเพาะอาหาร และลำไส้เล็ก แต่กลไก
การขนส่งฟลูออไรด์ผ่านชั้นเซลล์ผนังลำไส้เล็กของสุนัข ยังไม่มีข้อสรุปที่ชัดเจน ได้ทำ
การทดลองแสดงถึงอิทธิพลของการเปลี่ยนแปลงสภาวะกรดค้างของสารละลาย และการ
เปลี่ยนแปลงปริมาณโซเดียม และคลอไรด์ไอออนที่อยู่ในสารละลายด้านผิวดูดซึมต่อ
การขนส่งฟลูออไรด์ผ่านชั้นเซลล์ผนังลำไส้เล็กของสุนัข โดยชั้นเซลล์ดูดซึมจะได้รับการ
แยกจากส่วนที่เป็นชั้นกล้ามเนื้อ และนำมาใส่ในเครื่องมือศึกษาการดูดซึมภายนอก
ร่างกาย สารละลายที่สัมผัสกับผิวเซลล์ดูดซึมจะได้รับการปรับสภาวะกรดค้างที่ 6.0
7.0 และ 8.0 ส่วนสารละลายที่สัมผัสด้านหลอดเลือดจะคงสภาวะกรดค้างที่ 7.5
ฟลูออไรด์จะถูกเติมลงไปโดยสารละลายด้านเซลล์ดูดซึม เพื่อให้ได้ความเข้มข้น 0.25 0.5
และ 1.0 มิลลิโมลาร์ หลังจากนั้น 30 นาทีจะนำสารละลายด้านหลอดเลือดไปหา
ปริมาณฟลูออไรด์

ผลการทดลองพบว่า การเปลี่ยนแปลงสภาวะกรดค้างระหว่าง 6.0-8.0 ไม่มี
ผลต่อการขนส่งของฟลูออไรด์ผ่านเซลล์ผนังลำไส้เล็ก การลดลงในความเข้มข้นของ
โซเดียมไอออน จะมีผลให้การดูดซึมฟลูออไรด์ลดลง แต่การขนส่งฟลูออไรด์เพิ่มขึ้นเมื่อ
คลอไรด์ไอออนลดลง ผลการทดลองไม่มีข้อมูลสนับสนุนสมมุติฐานที่มีผู้เสนอว่าการดูดซึม
ฟลูออไรด์ในลำไส้เล็กเกิดขึ้นในรูปการแพร่กระจายของไฮโดรเจนฟลูออไรด์ แต่ข้อมูลที่ได้
จากการทดลองชี้ให้เห็นว่าการดูดซึมของฟลูออไรด์จากลำไส้เล็ก น่าจะเกิดจากการ
แพร่กระจายของฟลูออไรด์ไอออน

Project Title	Mechanism of fluoride transfer across intestinal epithelium of dogs in vitro
Name of the Investigators	Jeerasak Nopakun Santee Taycharpipranai Siripron Chotipaibulpun
Year	January, 1991

Abstract

Fluoride absorption occurs from the stomach and continues throughout the small intestine. The mechanism of fluoride absorption in the small intestine is not well understood. The effect of pH on intestinal fluoride absorption and the possibility that fluoride transfer across intestinal mucosa occurs as the ionic form rather than the hydrogen fluoride (HF) were investigated in vitro using isolated segments of dog jejunum in a 2-chamber system. The pH of the mucosal buffer was varied (6.0-8.0) but the serosal buffer was held constant at 7.5. Fluoride was added to the mucosal buffer and the serosal fluoride concentration was measured after 30 minutes incubation.

No significant effect of pH within this physiological range was observed on fluoride across the intestinal segment. The reduction of Na^+ concentration and the inhibition of active transport by ouabain reduced fluoride transfer. Reduction of Cl^- concentration in the mucosal buffer increased fluoride transfer.

The absence of a pH effect and the positive response to changes in Na^+ transport lead to the conclusion that intestinal fluoride absorption occurs as the ion, not as HF, presumably via the paracellular channels.



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	iii
Abstract	iv
รายการตารางประกอบ	vii
รายการภาพประกอบ	viii
บทนำ	1
วิธีการวิจัย	5
ผลของการวิจัย	11
การอภิปรายผล	24
ข้อสรุป	29
ส่วนอ้างอิง	30

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการตารางประกอบ

ตารางที่		หน้า
1	ปริมาณความเข้มข้นของฟลูออไรด์ในสารละลายด้านหลอดเลือดในเวลา 30 นาที เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของฟลูออไรด์ในสารละลายด้านผิวดูคซิมที่ 0.25, 0.5 และ 1.0 มิลลิโมลาร์ ที่ค่าความเป็นกรดต่างของสารละลาย 7.5	12
2	ผลของการเปลี่ยนแปลงระดับความเข้มข้นของฟลูออไรด์และสภาวะความเป็นกรดต่างในสารละลายด้านดูคซิมต่ออัตราการดูคซิมฟลูออไรด์ผ่านชั้นเซลล์ผนังลำไส้เล็ก	17
3	ผลของการเปลี่ยนแปลงระดับความเข้มข้นของโซเดียมไอออนและคลอไรด์ไอออน ในสารละลายด้านดูคซิม และผลของการเติมวาเบนในสารละลายด้านหลอดเลือดต่ออัตราการดูคซิมฟลูออไรด์ผ่านชั้นเซลล์ผนังลำไส้เล็ก	20

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการภาพประกอบ

รูปที่		หน้า
1	ลักษณะการจัดชั้นเซลล์ผนังลำไส้ใน Diffusion Chamber	10
2	การเปรียบเทียบการดูดซึมฟลูออไรด์ผ่านชั้นเซลล์ผนังลำไส้เล็กในเวลา 30 นาที เมื่อปริมาณความเข้มข้นของฟลูออไรด์ ในสารละลายที่สัมผัสด้านเซลล์ดูดซึมเป็น 0.25, 0.5 และ 1.0 มิลลิโมลาร์ ที่ค่าความเป็นกรดต่างของสารละลาย 7.5	13
3	การเปรียบเทียบอัตราการขนส่งของฟลูออไรด์ ที่เติมลงไป ในสารละลายด้านเซลล์ดูดซึม ในเวลา 30 นาที ระหว่างชั้นเซลล์ผนังลำไส้ที่ตัดออกมา จากบริเวณลำไส้เจจุน้ำกับลำไส้อิลีียม	14
4	แสดงการศึกษาเปรียบเทียบระหว่างปริมาณฟลูออไรด์ที่ถูกขนส่งผ่านชั้นเซลล์ผนังลำไส้เข้าไปสะสมอยู่ในสารละลายด้านหลอดเลือด กับปริมาณฟลูออไรด์ที่ตกค้างอยู่ในชั้นเซลล์ผนังลำไส้	15
5	ผลของการเปลี่ยนแปลงระดับความเข้มข้นของฟลูออไรด์ และสภาวะความเป็นกรดต่างในสารละลายด้านดูดซึม ต่ออัตราการดูดซึมฟลูออไรด์ผ่านชั้นเซลล์ผนังลำไส้เล็ก	18
6	ความสัมพันธ์ระหว่างการขนส่งของฟลูออไรด์ผ่านชั้นเซลล์ผนังลำไส้เล็ก กับการเปลี่ยนแปลงระดับความเข้มข้นของโซเดียมไอออน ในสารละลายด้านดูดซึม	21

รูปที่		หน้า
7	ความสัมพันธ์ระหว่างการขนส่งของฟลูออไรด์ผ่านชั้นเซลล์ผนังลำไส้เล็ก กับการเปลี่ยนแปลงระดับความเข้มข้นของคลอไรด์ไอออน ในสารละลายด้านคูคซิม	22
8	ความสัมพันธ์ระหว่างการขนส่งของฟลูออไรด์ผ่านชั้นเซลล์ผนังลำไส้เล็ก กับการปรับระดับความเข้มข้นของวาเบน ในสารละลายด้านหลอดเลือด	23

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทนำ

ฟลูออไรด์ (fluoride) เป็นไอออนของธาตุฟลูออรีน (fluorine) ซึ่งมีความสามารถที่จะเข้าร่วมเป็นส่วนประกอบของผิวเคลือบฟัน ทำให้เกิดเป็นโครงสร้างที่สามารถทนทานต่อภาวะละลายของกรดที่เกิดจากเชื้อจุลินทรีย์ได้ดีขึ้น ฟลูออไรด์จึงถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวางในการลดอัตราการเกิดโรคฟันผุ โดยเฉพาะในประเทศสหรัฐอเมริกา และหลายๆ ประเทศในยุโรป สำหรับการนำฟลูออไรด์ในประเทศไทย ได้เริ่มต้นขึ้นมาเรื่อยๆ ในระยะ 10 ปีที่ผ่านมา ในปัจจุบันได้มีการเสนอให้มีการปรับระดับฟลูออไรด์ในน้ำประปาในกรุงเทพมหานคร ให้มีปริมาณที่เหมาะสมที่จะสามารถลดอัตราการเกิดโรคฟันผุลงได้

ฟลูออไรด์ เมื่ออยู่ในสารละลายจะอยู่ในรูปของฟลูออไรด์ไอออน (fluoride ion : F⁻) และในรูปของไฮโดรเจนฟลูออไรด์ (hydrogen fluoride : HF) ตามสมการ $HF \rightleftharpoons H^+ + F^-$ ซึ่งจะขึ้นอยู่กับค่าความเป็นกรดต่าง (pH) ของสารละลาย ซึ่งในสภาวะที่เป็นกรดจะพบมี ไฮโดรเจนฟลูออไรด์ สูงกว่าฟลูออไรด์ไอออน ซึ่งความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของ ไฮโดรเจนฟลูออไรด์กับฟลูออไรด์ไอออน ในระดับความเป็นกรดต่างๆ สามารถคำนวณได้จากสมการของ Henderson-Hasselbatch (1)

ฟลูออไรด์ในน้ำดื่ม หรือที่ปะปนอยู่ในอาหารจะถูกดูดซึมในกระเพาะอาหาร และในลำไส้เล็ก โดยขบวนการดูดซึมชนิดที่ไม่อาศัยพลังงาน (passive transport) (2) ถึงแม้จะมีผู้ศึกษาเกี่ยวกับการดูดซึมฟลูออไรด์ในทางเดินอาหารของสัตว์ทดลองมาแล้ว แต่การทดลองในส่วนใหญ่จะทำการศึกษาที่กระเพาะอาหารมากกว่าลำไส้เล็ก รายงานผลการทดลองในลำไส้เล็ก เช่นที่รายงานโดย Stookey และคณะ(2) เป็นการทดลองโดยใช้ลำไส้เล็กทั้งหมดของหนูขาวในเวลาเดียวกัน กับยังมีได้ให้ความสำคัญ

ของสภาวะการแตกตัวของฟลูออไรด์ เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดต่างของ สารละลาย

การศึกษากลไกการขนส่งฟลูออไรด์ในระยะแรกๆ เป็นการศึกษาการขนส่งผ่าน ผิวเยื่อเซลล์ โดยใช้เซลล์ของสัตว์ และเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์ (3-5) ในการศึกษา ผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์โดยฟลูออไรด์(4) และความเป็นพิษต่อ เซลล์ของสัตว์ของฟลูออไรด์(3,5) ได้พบว่าฟลูออไรด์จะมีความเป็นพิษต่อเซลล์มากขึ้น ในสภาวะที่สารละลายมีความเป็นกรดมากขึ้น ซึ่งในสภาวะที่เป็นกรดนี้จะพบมี ไฮโดรเจนฟลูออไรด์ สูงกว่าฟลูออไรด์ไอออน จากรายงานผลการศึกษากการเปลี่ยนแปลงสภาวะความเป็นกรดต่าง ต่อระดับความเป็นพิษต่อเซลล์ของฟลูออไรด์(3) ได้สรุป ผลการวิจัยว่าไฮโดรเจนฟลูออไรด์ มีความสามารถในการแพร่กระจาย

ผ่านผิวเยื่อเซลล์ (cell membrane) เข้าสู่ภายในเซลล์ได้ดีกว่า ฟลูออไรด์ไอออน

แนวความคิดดังกล่าวข้างต้นได้รับการสนับสนุนจากผู้วิจัยหลายกลุ่ม

Whitford และคณะได้ทำการศึกษากการขนส่งฟลูออไรด์ผ่านชั้นเซลล์ชนิดต่างๆในสัตว์ ทดลอง พบว่าการดูดซึมกลับ (reabsorption) ของฟลูออไรด์ที่บริเวณหลอดไต(6) น่าจะเกิดในรูปของไฮโดรเจนฟลูออไรด์ คณะผู้วิจัยชุดนี้ยังพบว่าไฮโดรเจนฟลูออไรด์ สามารถแพร่กระจายผ่านผนังกระเพาะปัสสาวะ(7) และกระเพาะอาหารหนู(8) ได้ดีกว่าฟลูออไรด์ไอออน เป็นที่น่าสังเกตประการหนึ่งว่า แม้คณะผู้วิจัยชุดนี้จะทำการ ศึกษาการขนส่งฟลูออไรด์ติดต่อกันเป็นเวลานาน แต่คณะผู้วิจัยชุดนี้ไม่เคยเสนอรายงาน ผลการศึกษาการขนส่งฟลูออไรด์ในลำไส้เล็ก นอกจากนี้ผลการศึกษาเกี่ยวกับการดูดซึม ฟลูออไรด์จากกระเพาะปัสสาวะของหนูขาว(7) แม้จะแสดงผลอย่างชัดเจนว่าการดูดซึม ฟลูออไรด์จะเกิดขึ้นในรูปแบบของไฮโดรเจนฟลูออไรด์ เมื่อค่าความเป็นกรดต่างอยู่ ระหว่าง 1.85 ถึง 5.5 แต่เมื่อค่าความเป็นกรดต่างอยู่ระหว่าง 5.5 ถึง 8.0 ผู้วิจัยไม่ พบว่าการดูดซึมเกิดขึ้นในรูปแบบของไฮโดรเจนฟลูออไรด์

จากการศึกษาของ Bawden และคณะ(9,10) ซึ่งทดสอบการขนส่งฟลูออไรด์ เข้าสู่ผิวเคลือบฟัน (enamel) ในฟันกรามหนูที่อยู่ในระยะกำลังเจริญเป็นรูปร่าง พบว่าฟลูออไรด์ไอออนมีความสามารถแพร่กระจายผ่านชั้นเซลล์ที่ปกคลุมฟันที่กำลัง

เจริญเติบโต ได้ศึกษาไฮโดรเจนฟลูออไรด์ และเชื่อว่าช่องทางของการแพร่กระจายของฟลูออไรด์ไอออน เข้าไปนั้นไม่ได้ผ่านเซลล์โดยตรง แต่จะผ่านเข้าไปทางช่องว่างระหว่างเซลล์ (paracellular channels)

การดูดซึมฟลูออไรด์ในลำไส้เล็กจะเกิดขึ้นได้อย่างรวดเร็ว ถึงแม้จะมีสภาวะความเป็นกรดต่างที่ค่อนข้างเป็นกลาง (2,11,12) ซึ่งหากคำนวณตามสมการ Henderson-Hasselbalch แล้ว จะพบว่าความเข้มข้นของไฮโดรเจนฟลูออไรด์จะมีค่ามาก แต่จะมีปริมาณฟลูออไรด์ไอออนสูง ถึงแม้จะมีการศึกษาการดูดซึมฟลูออไรด์จากทางเดินอาหารมาแล้ว แต่กลไกพื้นฐานของการขนส่งฟลูออไรด์ผ่านชั้นเซลล์ผนังลำไส้เล็กยังคงไม่ชัดเจน ในการทดลองที่ผ่านมาผู้วิจัยไม่ได้ให้ความสำคัญของสภาวะความเป็นกรดต่างของสารละลายที่ใช้ในการทดลอง จึงไม่ได้คำนึงถึงปริมาณของไฮโดรเจนฟลูออไรด์ และฟลูออไรด์ไอออน ดังนั้นกลไกการขนส่งฟลูออไรด์ผ่านชั้นเซลล์ผนังลำไส้เล็ก จึงยังไม่มีผู้ใดเสนอแนวความคิดในรายละเอียด โดยเฉพาะอย่างยิ่งในส่วนที่เกี่ยวกับความสามารถที่ศึกษากันในการแพร่กระจาย (permeability) ผ่านชั้นเซลล์ผนังลำไส้เล็ก ระหว่างไฮโดรเจนฟลูออไรด์ และฟลูออไรด์ไอออน


โดยเหตุที่การศึกษาการดูดซึมฟลูออไรด์ในลำไส้เล็กมักจะมีการปรับสภาวะความเป็นกรดต่างที่ระดับต่างๆ ซึ่งอาจจะส่งผลก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางจุลกาย-วิภาคศาสตร์ของชั้นเซลล์ผนังลำไส้เล็ก Lee (13) ได้ทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของวิลลี (villi) ของเซลล์ผนังลำไส้เล็กของสุนัข เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงสภาวะความเป็นกรดต่างระหว่าง 6.4-8.2 ผลการศึกษาพบว่ารูปร่างและขนาดของวิลลีไม่มีการเปลี่ยนแปลงแต่อย่างใด ประกอบกับวิธีการวิจัยที่ใช้ในรายงานนี้เป็นวิธีมาตรฐานที่ได้ใช้ในงานวิจัยที่เคยพิมพ์เผยแพร่ไปแล้ว(14) ดังนั้นการวิจัยครั้งนี้จึงไม่ได้ทำการตรวจวิเคราะห์ทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของชั้นเซลล์ผนังลำไส้เล็ก

โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์

1. ศึกษากลไกขั้นพื้นฐานของการขนส่งฟลูออไรด์ผ่านชั้นเซลล์ผนังลำไส้เล็กของสุนัข สมมุติฐานหลักของการทดลองนี้คือ การขนส่งฟลูออไรด์ผ่านชั้นเซลล์ผนังลำไส้เล็ก

ของสุนัข เป็นการขนส่งในลักษณะการแพร่กระจายของไฮโดรเจนฟลูออไรด์มากกว่าฟลูออไรด์ไอออน

2. โดยทั่วไปสารประเภทกรด หรือค่างอย่างอ่อน (weak electrolyte) ซึ่งสามารถแตกตัวในสารละลายได้ การขนส่งของสารเหล่านี้ผ่านชั้นเซลล์ผนังลำไส้เล็ก อาจจะได้ทั้งในรูปแบบของไอออน (dissociated forms) และในรูปของสารที่ไม่แตกตัว (undissociated forms) แต่การขนส่งในรูปของสารที่ไม่แตกตัวจะเกิดขึ้นได้ดีกว่า (15) ดังนั้นหากการทดลองในชุดแรกไม่เป็นจริงตามสมมุติฐานหลัก แสดงว่าการขนส่งฟลูออไรด์อาจเกิดขึ้นในรูปแบบของไอออนมากกว่าในรูปของไฮโดรเจนฟลูออไรด์ ซึ่งจะได้ทำการทดลองเพื่อสนับสนุนว่าการขนส่งฟลูออไรด์เกิดขึ้นในรูปของฟลูออไรด์ไอออน



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีการวิจัย

1. สัตว์ทดลอง

ทำการทดลองในสุนัข เพศผู้ น้ำหนัก 10-14 กิโลกรัม ซึ่งเลี้ยงไว้ที่ห้องสัตว์ทดลองของภาควิชาก่อนการทดลองเป็นเวลา 3-5 วัน ทำการอดอาหาร 18-24 ชั่วโมงก่อนการทดลอง แต่ให้น้ำดื่มตามปกติ สัตว์ทดลองจะได้รับการฉีดยาสลบเข้าหลอดเลือด (pentobarbital sodium, 30 มิลลิกรัม ต่อ กิโลกรัม) ระหว่างทำการทดลองจะทำการให้น้ำเกลือ (0.9%, sodium chloride) ทางหลอดเลือดดำที่ขาหลัง

2. การเตรียมชิ้นเซลล์ผนังลำไส้

การแยกชิ้นเซลล์ผนังลำไส้ออกจากชั้นกล้ามเนื้อ (16) และการจัดชิ้นเซลล์ผนังลำไส้ใน Diffusion chamber เป็นไปตามวิธีการมาตรฐาน ซึ่งได้ใช้ในการทดลองเบื้องต้นที่เคยเสนอรายงานไปแล้ว (14) (รูปที่ 1.)

ชั้นของเซลล์ผนังลำไส้เล็ก ซึ่งประกอบด้วย ชั้นเซลล์คูดซิม (mucosal cell) ชั้นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันใต้ชั้นเซลล์คูดซิม (lamina propria) และชั้นกล้ามเนื้อ (muscularis mucosae) จะถูกแยกออกมาจากส่วนที่เป็นกล้ามเนื้อวงแหวนและกล้ามเนื้อตามแนวขวางของลำไส้เล็ก การทดลองจะเริ่มจากส่วนต้นของลำไส้เล็กส่วนเจจูนัม (jejunum) โดยจะตัดลำไส้เล็กออกมาครั้งละประมาณ 5-7 เซนติเมตร และในสุนัขแต่ละตัวจะทำการตัดลำไส้เล็กออกมาทำการทดลองประมาณ 15-20 ชิ้น ชิ้นเซลล์ผนังลำไส้เล็กที่ตัดออกมาแล้ว จะถูกล้างเบาๆ ด้วยน้ำเกลืออุ่น (0.9%, 37°C) ให้หมดสิ่งสกปรกและเลือด แล้วจะนำไปผูกที่ปลายท่อพลาสติก ซึ่งมีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1.5 เซนติเมตร โดยให้ด้านเซลล์คูดซิมอยู่ทางด้านนอก ซึ่งจะได้พื้นที่ของการคูดซิมประมาณ 2 ตารางเซนติเมตร ที่ด้านในท่อพลาสติกจะใส่สารละลายมาตรฐาน

3 มิลลิลิตร หลังจากนั้นจะนำท่อพลาสติกที่มีชั้นเซลล์ผนังลำไส้ผูกอยู่ที่ปลาย ไปจุ่มลงไปในกระบอกพลาสติกที่มีสารละลายมาตรฐานจำนวน 100 มิลลิลิตร ซึ่งจัดไว้ในอ่างน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส สารละลายทั้งหมดจะได้รับกาชออกซิเจนบริสุทธิ์ตลอดเวลาที่ทำการทดลอง (รูปที่ 1.)

3. สารละลายมาตรฐาน

สารละลายมาตรฐานที่ใช้ในการทดลองคือน้ำยา Krebs Ringer ที่ดัดแปลงให้เหมาะสมกับการทดลองในเรื่องนี้ สารละลายนี้ประกอบไปด้วยธาตุต่างๆ ในอัตราส่วนเป็นมิลลิโมลต่อลิตร (millimole/liter) ดังนี้ โซเดียม 131.1; คลอไรด์ 110.1; โพแทสเซียม 6.0; แคลเซียม 1.0; แมกนีเซียม 1.2; ฟอสเฟต 1.2; ซัลเฟต 1.2; ไบคาร์บอเนต 2.5; HEPES (N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid) 25.2 และ กลูโคส 21.6 (17,18)

การทดลองส่วนมากจะปรับสภาพความเป็นกรดต่างของสารละลายด้านเซลล์ดูคซิม (mucosal side) และสารละลายด้านหลังหลอดเลือด (serosal side) เท่ากับ 7.5 โดยการใช้ สารละลาย HEPES (17,19) สำหรับการศึกษาค่าผลของการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดต่างต่อการดูคซิมของฟลูออไรด์จะทำการปรับค่าความเป็นกรดต่าง ของสารละลายด้านเซลล์ดูคซิมให้มีค่า 6.0 7.0 และ 8.0

การปรับระดับความเข้มข้นของฟลูออไรด์ด้านเซลล์ดูคซิม ทำโดยการเติมสารละลายฟลูออไรด์มาตรฐาน (standard sodium fluoride solution) ความเข้มข้น 105.2 มิลลิโมลาร์ (2000 ส่วนในล้านส่วน) ลงไปในสารละลายด้านผิวดูคซิม เมื่อเริ่มการทดลอง เพื่อให้ความเข้มข้นของฟลูออไรด์ในสารละลายด้านผิวดูคซิม มีค่าเท่ากับ 0.25, 0.5 และ 1.0 มิลลิโมลาร์ การทดลองใช้เวลา 30 นาที

4. การวิเคราะห์หาปริมาณฟลูออไรด์

เมื่อสิ้นสุดระยะเวลา 30 นาทีของการทดลอง จะทำการเก็บตัวอย่างสารละลาย จากคานเซนต์คูคิมและคานหลอดเลือก สารละลายตัวอย่างเหล่านี้จะได้รับการปรับสภาพให้เหมาะสมต่อการวัดปริมาณฟลูออไรด์ โดยการเติมสารละลาย TISAB (total ionic strength adjustment buffer, Orion Research Inc., Cambridge, MA) ก่อนนำไปวิเคราะห์หาปริมาณฟลูออไรด์ (20) นอกจากนี้จะทำการเก็บตัวอย่างของชิ้นเนื้อชิ้นเซนต์ผนังลำไส้ที่ผ่านการทดลองมาแล้วเพื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณฟลูออไรด์ที่ตกค้างอยู่ในชิ้นเซนต์ผนังลำไส้เล็ก (21)

การวิเคราะห์หาปริมาณฟลูออไรด์ จะทำโดยการวัดด้วยฟลูออไรด์ อิเล็กโตรดกับเครื่องวัดไอออน (Orion Research Inc., Cambridge, MA) ฟลูออไรด์ อิเล็กโตรด มีความเที่ยงตรงในการวัดปริมาณฟลูออไรด์ในสารละลายที่ความเข้มข้นของฟลูออไรด์ระหว่าง 10^{-1} ถึง 5×10^{-6} โมลาร์ (1990 ถึง 0.019 ส่วนในล้านส่วน) ซึ่งสารละลายตัวอย่างที่ได้จากการทดลองนี้ จะมีปริมาณฟลูออไรด์สูงเพียงพอที่สามารถวัดด้วยฟลูออไรด์ อิเล็กโตรด ได้อย่างถูกต้อง

5. การวิเคราะห์ทางสถิติ

การวิเคราะห์ข้อมูลจะประกอบไปด้วย การใช้ t-test เพื่อเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่ม และจะมีการวิเคราะห์ด้วยวิธี two-way analysis of variance และ linear regression ด้วย (22) ซึ่งวิธีการวิเคราะห์ข้อมูลจะใช้เครื่องไมโครคอมพิวเตอร์ (Apple Macintosh) และซอฟต์แวร์ทางสถิติ (Stat View 512+)

6. ขอบเขตของการวิจัย

6.1 การศึกษาพื้นฐาน

เป็นการทดลองเพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการขนส่งของฟลูออไรด์ กับ ปริมาณฟลูออไรด์ขนาดต่างๆ (0.25, 0.50 และ 1.0 มิลลิโมลาร์) ที่เติมลงไป ใน สารละลายด้านเซลล์ดูคซิม ในเวลา 30 นาที การทดลองชุดนี้จะใช้ชั้นเซลล์ผนังลำไส้ ประมาณ 12 ชั้น

การทดลองอื่นๆ เพื่อหาอัตราการขนส่งของฟลูออไรด์ ที่เติมลงไป ใน สารละลายด้านเซลล์ดูคซิม ในเวลา 30 นาที โดยทำการเปรียบเทียบระหว่างชั้นเซลล์ ผนังลำไส้ที่ตัดออกมาจากบริเวณลำไส้เจจุนัม กับลำไส้อิลีียม (ileum) นอกจากนี้ยังทำการศึกษาเปรียบเทียบระหว่างปริมาณฟลูออไรด์ที่ถูกขนส่งผ่านชั้นเซลล์ผนังลำไส้เข้าไป สะสมอยู่ในสารละลายด้านหลอดเลือด กับปริมาณฟลูออไรด์ที่ตกค้างอยู่ในชั้นเซลล์ผนัง ลำไส้

6.2 การศึกษาผลของการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดต่างต่อการดูคซิม ของฟลูออไรด์

ในการทดลองชุดนี้ ค่าความเป็นกรดต่าง ของสารละลายที่สัมผัสกับผิว ดูคซิมของลำไส้เล็ก จะถูกปรับให้อยู่ที่ 6.0 7.0 และ 8.0 และจะมีการปรับระดับของ ฟลูออไรด์ในสารละลายด้านผิวดูคซิมให้มีปริมาณ 0.25 0.5 และ 1.0 มิลลิโมลาร์ ซึ่ง ผลรวมของการปรับระดับปริมาณฟลูออไรด์ และการเปลี่ยนค่าความเป็นกรดต่างนี้ จะทำให้เกิดความแตกต่างของปริมาณไฮโดรเจนฟลูออไรด์ ประมาณ 400 เท่า (ระหว่าง 7.1 ถึง 2818.4 นาโนโมลาร์) ในสารละลายด้านผิวดูคซิม ส่วนในสารละลายด้านหลอดเลือดจะมีค่าความเป็นกรดต่างคงที่ ที่ 7.4 การทดลองชุดนี้จะใช้ชั้นเซลล์ผนังลำไส้ จำนวน 21 ชั้น

6.3 การศึกษาผลของการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของโซเดียมไอออน และ คลอไรด์ไอออนต่อการขนส่งของฟลูออไรด์

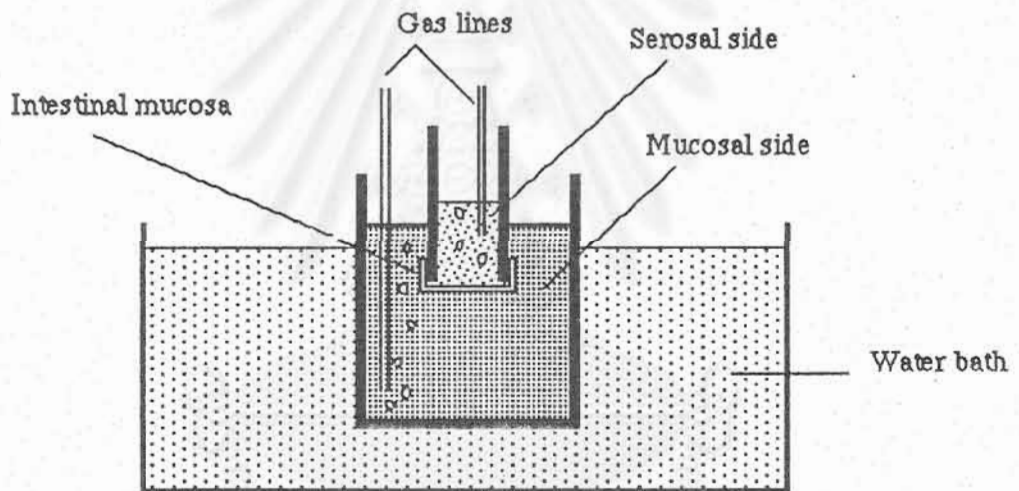
การทดลองชุดแรกจะปรับระดับเฉพาะความเข้มข้นของโซเดียมไอออนให้เท่ากับ 28,79 และ 131 มิลลิโมลาร์ โดยใช้ choline chloride แทนที่โซเดียมคลอไรด์ การทดลองชุดที่สองปรับระดับเฉพาะความเข้มข้นของคลอไรด์ไอออนให้เท่ากับ 7,55 และ 110 มิลลิโมลาร์ โดยใช้ sodium isethionate แทนที่โซเดียมคลอไรด์ ในสารละลายด้านผิวคูดซิม และศึกษาผลที่มีต่ออัตราการขนส่งของฟลูออไรด์ ซึ่งการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นจะชี้ให้เห็นถึงลักษณะการขนส่งของฟลูออไรด์ว่าจะอยู่ในรูปของไอออนหรือไม่ การทดลองชุดนี้จะใช้ชั้นเซลล์ผนังลำไส้ประมาณ 30 ชั้น

6.4 การศึกษาผลของวาเบน (ouabain) ต่อการขนส่งของฟลูออไรด์

สารละลายวาเบนจะถูกเติมลงไปในการละลายด้านหลอดเลือด 15 นาที ก่อนเริ่มการทดลองเพื่อให้ได้ความเข้มข้น 0.2 และ 1.0 มิลลิโมลาร์ และศึกษาผลที่มีต่ออัตราการขนส่งของฟลูออไรด์ โดยเหตุที่วาเบนให้ผลยับยั้งการขนส่งโซเดียมไอออน การทดลองชุดนี้อาจชี้ให้เห็นถึงความสัมพันธ์ระหว่างการขนส่งโซเดียมไอออน และการขนส่งฟลูออไรด์ไอออน การทดลองชุดนี้จะใช้ชั้นเซลล์ผนังลำไส้ประมาณ 10 ชั้น

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 1. ลักษณะการจัดชั้นเซลล์ผนังลำไส้ใน Diffusion chamber



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลของการวิจัย

1. การศึกษาเพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างการขนส่งฟลูออไรด์กับความเข้มข้นของฟลูออไรด์ในสารละลายด้านผิวคูดซิม

การทดลองชุดนี้ใช้ชั้นเซลล์ผนังลำไส้เล็กของสุนัขจำนวน 12 ชั้น ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของฟลูออไรด์ในสารละลายด้านหลอดเลือดแปรเปลี่ยนโดยตรงกับปริมาณความเข้มข้นของฟลูออไรด์ในสารละลายด้านผิวคูดซิม ($r=0.8$ $p < 0.0005$) (ตารางที่ 1 รูปที่ 2)

จากการทดลองชุดนี้ทำให้ได้ข้อสรุปสำหรับการทดลองต่อไปที่จะใช้ระยะเวลาการทดลอง 30 นาที และใช้ความเข้มข้นของฟลูออไรด์ในสารละลายด้านผิวคูดซิมเท่ากับ 0.5 มิลลิโมลาร์ซึ่งจะทำให้ได้ปริมาณฟลูออไรด์ในสารละลายด้านหลอดเลือดซึ่งพอที่จะทำให้การวิเคราะห์หาปริมาณฟลูออไรด์เป็นไปโดยสะดวก และเที่ยงตรง

อัตราการขนส่งของฟลูออไรด์ ที่เติมลงไปในสารละลายด้านเซลล์คูดซิม ในเวลา 30 นาที ระหว่างชั้นเซลล์ผนังลำไส้ที่ตัดออกมาจากบริเวณลำไส้เจจุน้ำม กับลำไส้ฮิลเลียมจากการทดลองโดยใช้ชั้นเซลล์ผนังลำไส้เพียง 6 ชั้นปรากฏว่าไม่พบความแตกต่างอย่างชัดเจนในอัตราการขนส่งของฟลูออไรด์ผ่านชั้นเซลล์ผนังลำไส้ (รูปที่ 3)

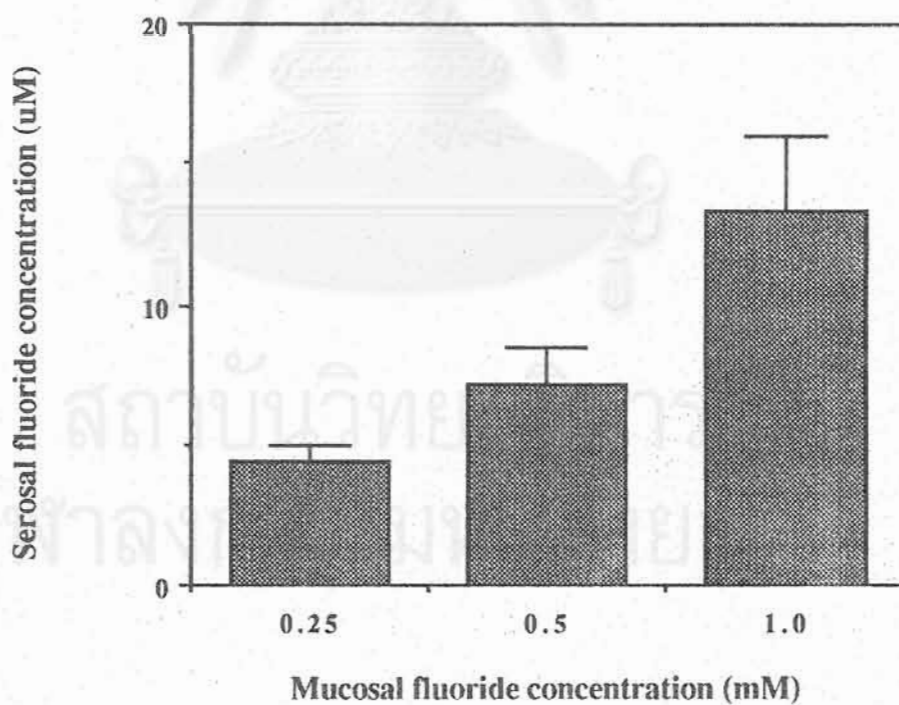
ผลการศึกษาเปรียบเทียบระหว่างปริมาณฟลูออไรด์ที่ถูกขนส่งผ่านชั้นเซลล์ผนังลำไส้เข้าไปสะสมอยู่ในสารละลายด้านหลอดเลือด กับปริมาณฟลูออไรด์ที่ตกค้างอยู่ในชั้นเซลล์ผนังลำไส้ พบว่าปริมาณฟลูออไรด์ที่ตกค้างอยู่ในชั้นเซลล์ผนังลำไส้ มีปริมาณสูงกว่า ปริมาณฟลูออไรด์ที่ถูกขนส่งผ่านชั้นเซลล์ผนังลำไส้เข้าไปอยู่ในสารละลายด้านหลอดเลือด (รูปที่ 4) ฟลูออไรด์ที่ตกค้างอยู่นี้อาจอยู่ในระหว่างการขนส่งเข้าสู่หลอดเลือด ซึ่งหากสามารถหาวิธีตรวจสอบได้ว่าฟลูออไรด์เหล่านี้สะสมอยู่ภายในหรือภายนอกเซลล์ ก็อาจจะใช้เป็นเครื่องบอกว่าการขนส่งฟลูออไรด์นั้นเกิดขึ้นผ่านเข้าไปในเซลล์หรือผ่านไปช่องทางระหว่างเซลล์

ตารางที่ 1. ปริมาณความเข้มข้นของฟลูออไรด์ในสารละลายค้ำหลอดเลือด ในเวลา 30 นาที เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของฟลูออไรด์ในสารละลายค้ำผิวคูดซิมที่ 0.25, 0.5 และ 1.0 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ ที่ค่าความเป็นกรดต่างของสารละลาย 7.5

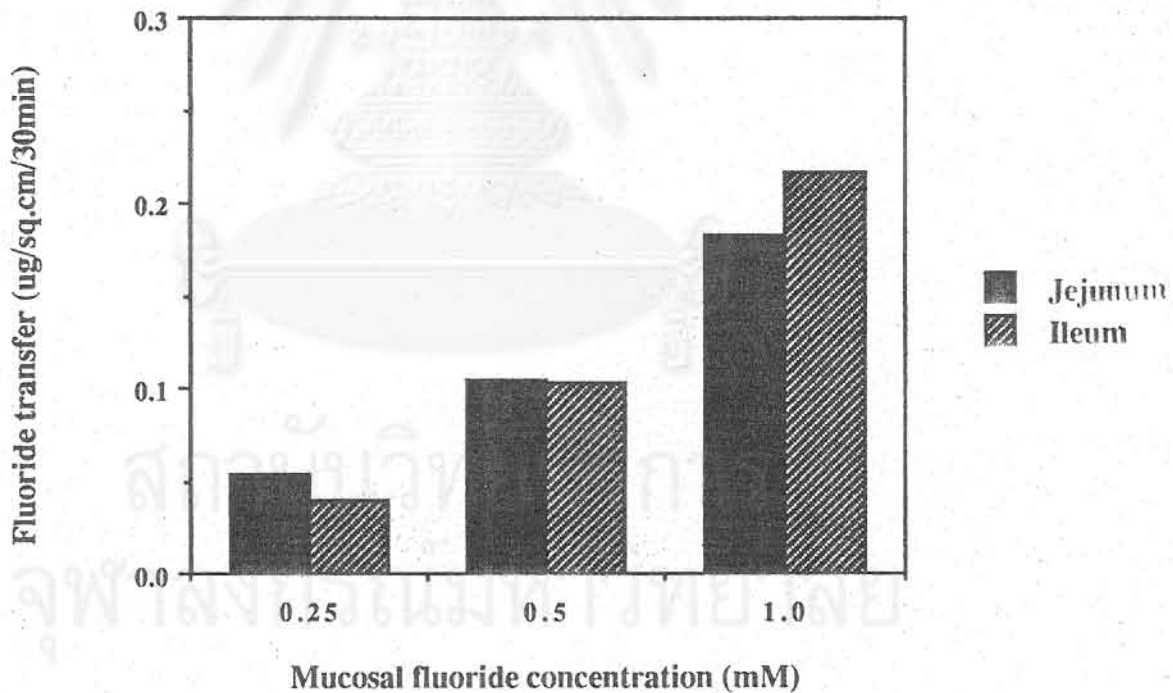
Mucosal fluoride concentration (mM)	Serosal fluoride concentration (uM)				mean \pm SE
	exp. 1	exp. 2	exp. 3	exp. 4	
0.25	2.81	5.46	4.32	5.15	4.43 \pm 0.59
0.50	4.06	10.14	6.40	8.23	7.21 \pm 1.30
1.00	12.48	13.26	11.18	16.28	13.30 \pm 1.08

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

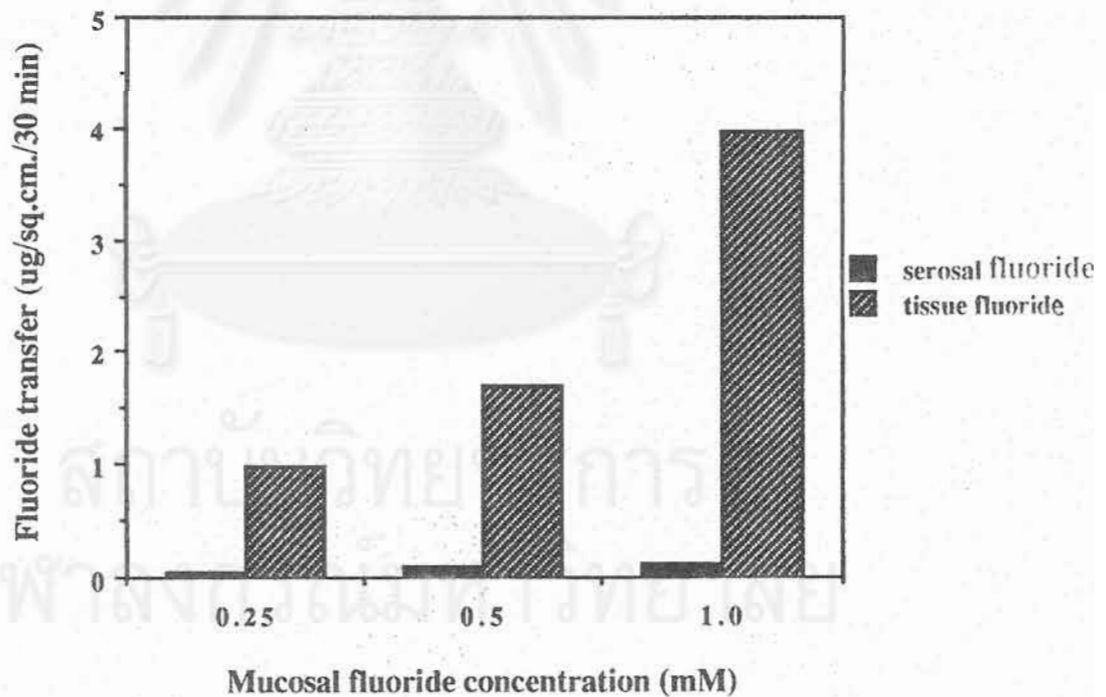
รูปที่ 2. การเปรียบเทียบการดูดซึมฟลูออไรด์ผ่านชั้นเซลล์ผนังลำไส้เล็ก ในเวลา 30 นาที เมื่อปริมาณความเข้มข้นของฟลูออไรด์ ในสารละลายที่สัมผัสด้านเซลล์ดูดซึม เป็น 0.25, 0.5 และ 1.0 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ ที่ค่าความเป็นกรดต่างของสารละลาย 7.5 กราฟรูปแท่งแต่ละอันแทนค่าเฉลี่ย (mean±SE, n 4)



รูปที่ 3. การเปรียบเทียบอัตราการขนส่งของฟลูออไรด์ ที่เติมลงไปในสารละลายค้ำาน เซลล์ดูดซิม ในเวลา 30 นาที ระหว่างชั้นเซลล์ผนังลำไส้ที่ตัดออกมา จากบริเวณลำไส้เจจูนัมกับลำไส้อิลีเยม



รูปที่ 4. แสดงการศึกษาเปรียบเทียบระหว่างปริมาณฟลูออไรด์ที่ถูกขนส่งผ่านชั้นเซลล์ผนังลำไส้เข้าไปสะสมอยู่ในสารละลายด้านหลอดเลือด กับปริมาณฟลูออไรด์ที่ตกค้างอยู่ในชั้นเซลล์ผนังลำไส้



2. การศึกษาผลของการเปลี่ยนแปลงสภาวะความเป็นกรดต่าง ต่อการขนส่งฟลูออไรด์

ทำการทดลองปรับสภาวะกรดต่างที่ 6.0, 7.0 และ 8.0 โดยร่วมกับการเปลี่ยนแปลงปริมาณความเข้มข้นของฟลูออไรด์ 3 ระดับคือ 0.25, 0.5 และ 1.0 มิลลิโมลาร์ ซึ่งการเปลี่ยนแปลง 2 อย่างด้วยกันนี้จะทำให้เกิดความแตกต่างในปริมาณความเข้มข้นของไฮโดรเจนฟลูออไรด์ในสารละลายด้านผิวคูดซิม ถึง 400 เท่า (ระหว่าง 7.1 ถึง 2818.4 นาโนโมลาร์)

ตารางที่ 2 และรูปที่ 5. แสดงปริมาณฟลูออไรด์ในสารละลายด้านหลอดเลือกค่าที่แสดงคือปริมาณการขนส่งเป็นโมโคกรัมของฟลูออไรด์ ใน 30 นาทีต่อพื้นที่ 1 ตารางเซนติเมตร

จากการคำนวณทางสถิติ (two-way analysis of variance) พบว่าการขนส่งฟลูออไรด์ แปรผันโดยตรงกับความเข้มข้นของฟลูออไรด์ทั้งหมดที่อยู่ในสารละลายด้านผิวคูดซิม ($p < 0.02$) การทดลองชุดนี้ไม่พบว่าการเปลี่ยนแปลงระดับความเป็นกรดต่างในสารละลายด้านผิวคูดซิม มีผลโดยตรงต่อการคูดซิมฟลูออไรด์ ($p > 0.9$)

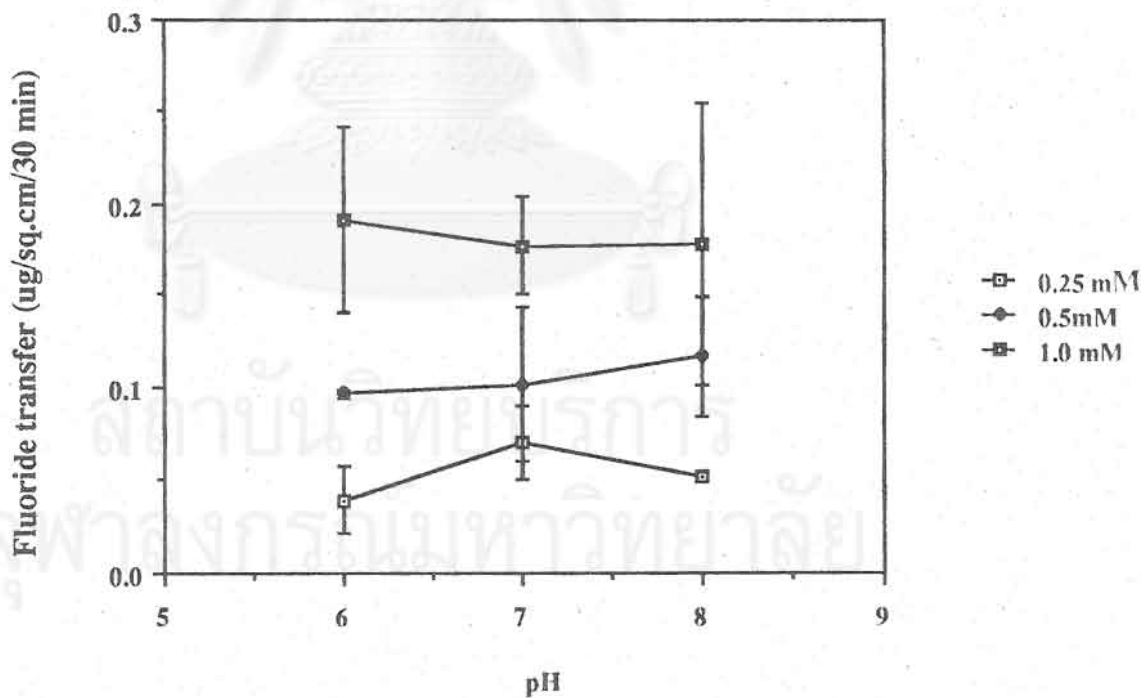
ตารางที่ 2. ผลของการเปลี่ยนแปลงระดับความเข้มข้นของฟลูออไรด์ และสภาวะความเป็นกรดต่างในสารละลายด้านดูคซิมต่ออัตราการดูคซิมฟลูออไรด์ ผ่านชั้นเซลล์ผนังลำไส้เล็ก ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย(mean±SE) จากการทดลอง 2-3 ครั้ง ของปริมาณฟลูออไรด์ และไฮโดรเจนฟลูออไรด์ ในสารละลายด้านหลอดเลือด

mucosal fluoride conc. (mM)	0.25	0.5	1.0
pH = 6.0			
HF conc. (nM)	704.6	1409.2	2818.4
ug F transported	0.039±.018	0.097±.002	0.191±.050
pH = 7.0			
HF conc. (nM)	70.5	140.9	281.8
ug F transported	0.070±.020	0.102±.042	0.177±.027
pH = 8.0			
HF conc. (nM)	7.1	14.1	28.2
ug F transported	0.052±.001	0.117±.033	0.178±.076

Anova table for a 2-factor analysis of variance for fluoride transport

Source	Sum of squares	D.F.	Mean square	F-test	P value
pH	0.651	2	0.326	.026	.9748
Mucosal F conc.	151.6	2	75.7	5.96	.0159
pH x F interaction	4.321	4	1.08	.085	.9855
Error	152.5	12	12.7		

รูปที่ 5. ผลของการเปลี่ยนแปลงระดับความเข้มข้นของฟลูออไรด์ และสภาวะความเป็นกรดต่างในสารละลายด้านคูควิม ต่ออัตราการคูควิมฟลูออไรด์ผ่านชั้นเซลล์ผนังลำไส้เล็ก ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย (mean±SE) จากการทดลอง 2-3 ครั้ง



3. การศึกษาผลของการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของโซเดียมไอออนต่อการขนส่งฟลูออไรด์

จากการเปลี่ยนแปลงปริมาณความเข้มข้นของโซเดียมไอออน ในสารละลายค้ำานผิวคูดซิมที่ระดับ 28,80 และ 131 มิลลิโมลาร์ พบว่าการลดลงของความเข้มข้นของโซเดียมไอออน มีผลทำให้ความเข้มข้นของฟลูออไรด์ในสารละลายค้ำานลดลงเหลือลดลงตามไปด้วย อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($r = -0.7$ $p < 0.0005$) (ตารางที่ 3 รูปที่ 6)

4. การศึกษาผลของการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของคลอไรด์ ไอออนต่อการขนส่งฟลูออไรด์

การเปลี่ยนแปลงปริมาณความเข้มข้นของคลอไรด์ไอออนในสารละลายค้ำานผิวคูดซิม มีผลผกผันกับการคูดซิมฟลูออไรด์ กล่าวคือ เมื่อความเข้มข้นของคลอไรด์ลดลง จะทำให้ปริมาณฟลูออไรด์ในสารละลายค้ำานลดลงเหลือค้ำาสูงขึ้น ($r = -0.6$ $p < 0.001$) (ตารางที่ 3 รูปที่ 7)

5. การศึกษาผลของวาเบนต่อการขนส่งฟลูออไรด์

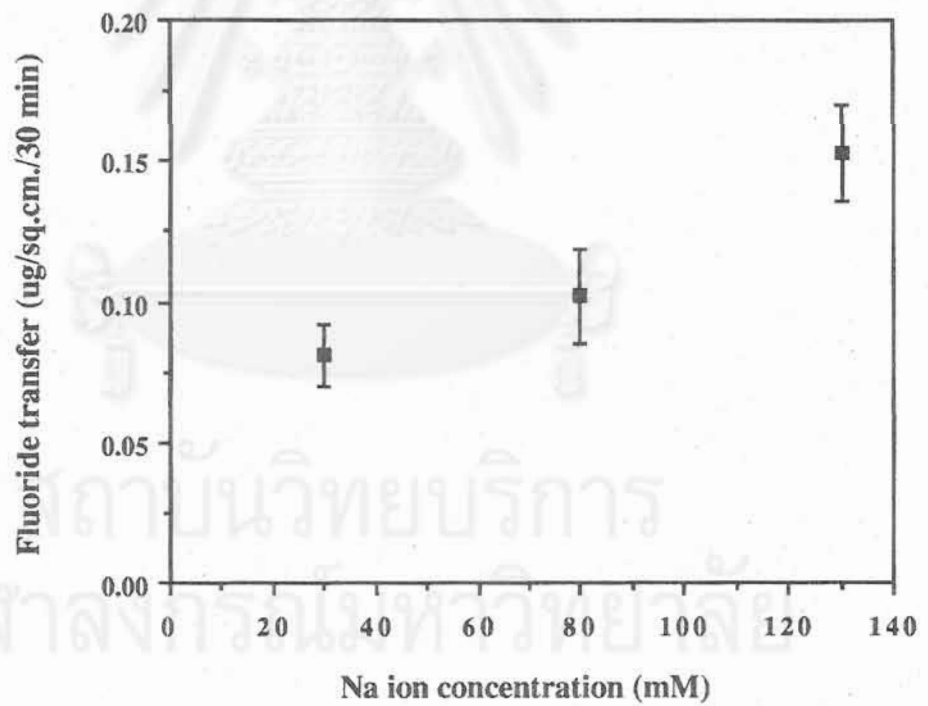
จากการทดลองเติมวาเบนลงไปนสารละลายค้ำานผิวคูดซิม เพื่อให้ได้ความเข้มข้นของวาเบน 0.2 และ 1.0 มิลลิโมลาร์ พบว่าทำให้การขนส่งฟลูออไรด์ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับในสภาวะที่ไม่ได้เติมวาเบน ($r = -0.7$ $p < 0.0001$) (ตารางที่ 3 รูปที่ 8)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

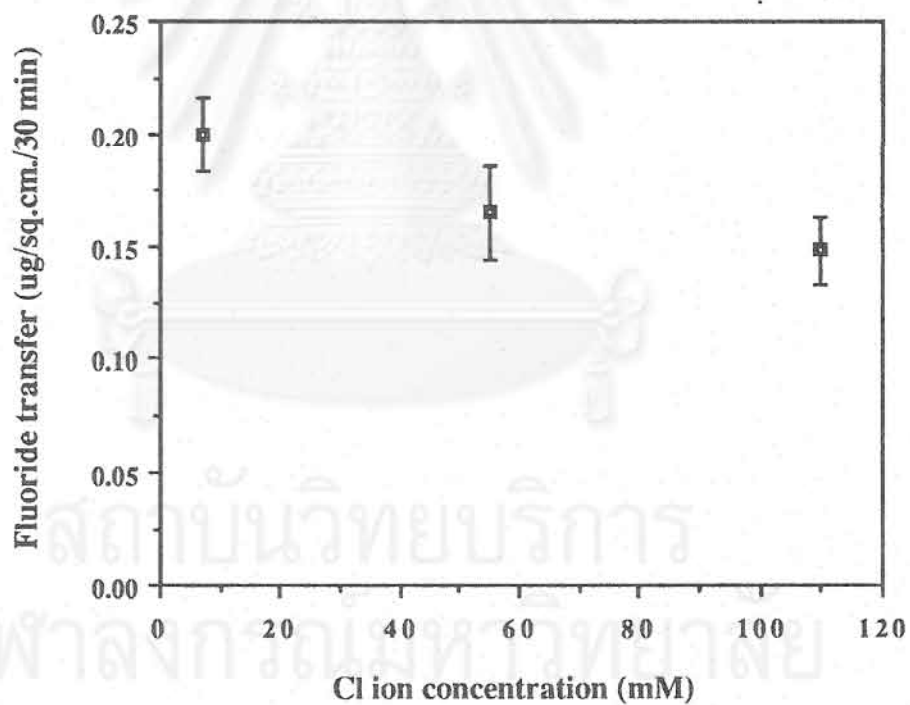
ตารางที่ 3. ผลของการเปลี่ยนแปลงระดับความเข้มข้นของโซเดียม ไอออน และ คลอไรด์ ไอออนในสารละลายค้ำคูดซึม และผลของการเติมวาเบนใน สารละลายค้ำคูดซึมต่ออัตราการคูดซึมฟลูออไรด์ผ่านชั้นเซลล์ผนังลำ ใต้เล็ก ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย (mean±SE)

Conditions	Fluoride transport (ug/sq.cm./30min)	% change
Na substitution (mM) (n=5)		
Na 131 (control)	0.153±0.017	-
Na 79	0.102±0.017	decrease 33.3
Na 28	0.081±0.011	decrease 47.1
overall significance	p=.0001	
Cl substitution (mM) (n=4)		
Cl 110 (control)	0.148±0.015	-
Cl 55	0.165±0.021	increase 11.5
Cl 7	0.200±0.017	increase 35.1
overall significance	p=.0005	
Ouabain (mM) (n=4)		
0 (control)	0.151±0.033	-
0.2	0.071±0.010	decrease 53.0
1.0	0.059±0.007	decrease 60.9
overall significance	p=.0001	

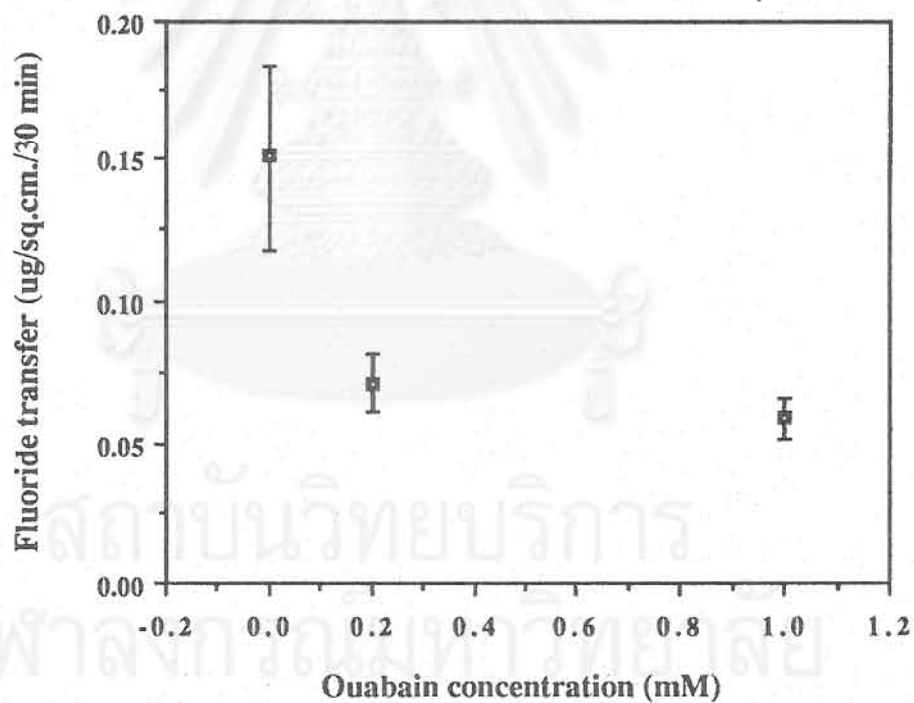
รูปที่ 6. ความสัมพันธ์ระหว่างการขนส่งของฟลูออไรด์ผ่านชั้นเซลล์ผนังลำไส้เล็ก กับ การเปลี่ยนแปลงระดับความเข้มข้นของโซเดียม ไอออน ในสารละลาย คำนวณซ้ำ (n=5)



รูปที่ 7. ความสัมพันธ์ระหว่างการขนส่งของฟลูออไรด์ผ่านชั้นเซลล์ผนังลำไส้เล็ก กับ การเปลี่ยนแปลงระดับความเข้มข้นของคลอไรด์ ไอออน ในสารละลาย คำนวณซ้ำ (n=4)



รูปที่ 8. ความสัมพันธ์ระหว่างการขนส่งของฟลูออไรด์ผ่านชั้นเซลล์ผนังลำไส้เล็ก
กับการปรับระดับความเข้มข้นของวาเบน ในสารละลายค้ำนหลอดเลือด
(n-4)



การอภิปรายผล

การขนส่งฟลูออไรด์ผ่านชั้นเซลล์ผนังลำไส้เล็กที่นำมาศึกษาภายนอกร่างกายโดยการตัดชิ้นเซลล์ผนังลำไส้เล็กมาซึ่งแผ่ระหว่างช่องว่าง 2 ช่อง (diffusion chamber) ซึ่งบรรจุสารละลาย เป็นวิธีการมาตรฐานที่ใช้โดยทั่วไปในการศึกษากลไกการขนส่งของสารต่างๆ ผ่านชั้นเซลล์คูดซิม โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารประเภทที่สามารถแตกตัวได้คิในสารละลาย (weak electrolyte) (17,18,19,23) ซึ่งถึงแม้การศึกษาโดยวิธีนี้จะมีข้อเสียที่ชั้นเซลล์คูดซิมที่ตัดออกมาจะขาดคุณสมบัติตามธรรมชาติบางประการเช่น การขาดเลือดมาหล่อเลี้ยง เป็นต้น แต่วิธีการนี้มีข้อดีที่สามารถทำการควบคุมการทดลองได้ เช่น สามารถปรับระดับความเป็นกรดต่างของสารละลาย หรือสามารถเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสารละลายในด้านเซลล์คูดซิมหรือด้านหลอดเลือดได้ตามต้องการ

โดยเหตุที่สภาวะความเป็นกรดต่างของสารละลายในร่างกายและในลำไส้เล็กค่อนข้างเป็นกลาง ดังนั้นฟลูออไรด์จึงปรากฏอยู่โดยส่วนมากในรูปของฟลูออไรด์ไอออน ส่วนในรูปของไฮโดรเจนฟลูออไรด์ จะมีเพียงเล็กน้อย ไฮโดรเจนฟลูออไรด์เป็นกรดอ่อน ซึ่งมีค่า pK_a เท่ากับ 3.45 จากการศึกษาการขนส่งผ่านชั้นเซลล์คูดซิมของกรดอ่อนหลายชนิด เช่น benzoic acid (ซึ่งมีค่า pK_a ใกล้เคียงกับไฮโดรเจนฟลูออไรด์) หรือ barbituric acid พบว่าการคูดซิมจะเกิดจากการกระจายของรูปที่ไม่แตกตัว (undissociated forms) ซึ่งจะขึ้นกับสภาวะความเป็นกรดต่างของสารละลาย กล่าวคือ ถ้าสารละลายด้านคูดซิมมีค่าเป็นกรดมากขึ้น จะเกิดการคูดซิมได้คิขึ้น (15,24,25) ทั้งนี้เป็นเพราะในสารละลายที่เป็นกรดมาก จะมีปริมาณของรูปที่ไม่แตกตัวเพิ่มสูงขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับที่มีผู้รายงานไว้ว่าผิวเยื่อเซลล์ ซึ่งประกอบไปด้วยชั้นของไขมัน จะเป็นตัวกีดกันไม่ให้พวกไอออนผ่าน แต่จะยินยอมให้รูปที่ไม่แตกตัวของกรดหรือค่างผ่านได้ (15,19)

สำหรับไฮโดรเจนฟลูออไรด์ ได้มีผู้รายงานหลายรายว่า สามารถกระจายผ่านชั้นเซลล์คูดซิมได้ดีกว่าฟลูออไรด์ไอออน (6,8) ในการทดลองชุดหนึ่งผู้ทดลองใช้ชั้นผิวเยื่อเซลล์สังเคราะห์ (synthetic lipid bilayer membranes) ได้รายงานว่า สัดส่วนของความยินยอมของผิวเยื่อเซลล์ที่ให้สารแพร่กระจายผ่าน (membrane permeability) ระหว่างไฮโดรเจนฟลูออไรด์ และฟลูออไรด์ไอออน มีค่าเท่ากับ $10^6 : 1$ (26) แต่หากจะพิจารณาสถานะความเป็นกรดต่างของสารละลายในลำไส้เล็กซึ่งมีค่าประมาณ 7.5 แล้ว จะพบว่าค่าสัดส่วนความเข้มข้นระหว่างไฮโดรเจนฟลูออไรด์ต่อฟลูออไรด์ไอออน เท่ากับ $1:10^4$ ดังนั้นหากการคูดซิมในลำไส้เล็กจะยังคงเกิดขึ้นในรูปของไฮโดรเจนฟลูออไรด์แล้ว ค่าสัดส่วนของความยินยอมให้สารแพร่กระจายผ่านระหว่างไฮโดรเจนฟลูออไรด์และฟลูออไรด์ไอออนจะต้องมีค่าเท่ากับหรือมากกว่า $10^4:1$

ถึงแม้จะมีรายงานหลายรายที่สนับสนุนแนวความคิดที่กล่าวว่าการขนส่งฟลูออไรด์ผ่านผิวเซลล์คูดซิมหลายชนิดเกิดจากการแพร่กระจายของไฮโดรเจนฟลูออไรด์ แต่ปรากฏการณ์นี้อาจจะไม่เกิดขึ้นในเซลล์คูดซิมของเนื้อเยื่อทุกชนิด โดยเฉพาะในเนื้อเยื่อที่สารละลายมีสถานะความเป็นกรดต่างที่ค่อนข้างเป็นกลาง (26) จะเห็นได้จากในรายงานชุดหนึ่งของ Whitford และคณะ (7) ที่ทำการศึกษาการขนส่งฟลูออไรด์ในกระเพาะปัสสาวะของหนู ซึ่งพบว่าเมื่อสถานะความเป็นกรดต่างของสารละลายที่อยู่ในกระเพาะปัสสาวะมีค่าระหว่าง 5.5 ถึง 8.0 ปริมาณการขนส่งฟลูออไรด์ผ่านชั้นเซลล์ผนังกระเพาะปัสสาวะมีค่าใกล้เคียงกัน ซึ่งถ้าหากสถานะความเป็นกรดต่างมีอิทธิพลต่อการคูดซิมของฟลูออไรด์ ควรจะพบว่าที่สถานะความเป็นกรดต่างเป็น 5.5 ปริมาณการคูดซิมจะต้องมีค่าสูงกว่าที่สถานะความเป็นกรดต่าง 8.0 อย่างเห็นได้ชัด นอกจากนี้ได้มีผู้พบว่าในเซลล์เม็ดเลือดแดงของคนและวัว ค่าความยินยอมให้สารแพร่กระจายของไฮโดรเจนฟลูออไรด์สูงกว่าฟลูออไรด์ไอออนเพียง 1 เท่าเท่านั้น (27)

ผลการทดลองในสุนัขชุดนี้ พบว่าสถานะความเป็นกรดต่างของสารละลายค้ำผิวคูดซิมไม่มีอิทธิพลต่อการขนส่งฟลูออไรด์ผ่านชั้นเซลล์ผนังลำไส้ (ตารางที่ 2 รูปที่ 3) กล่าวคือ เมื่อทำการปรับสถานะความเป็นกรดต่างของสารละลายค้ำผิวคูดซิมให้อยู่

ระหว่าง 6.0 ถึง 8.0 ปริมาณฟลูออไรด์ที่สะสมอยู่ในสารละลายด้านหลอดเลือดจะมีค่าใกล้เคียงกัน เป็นที่น่าสังเกตว่าที่สภาวะความเป็นกรดต่าง 6.0 มีความเข้มข้นของไฮโดรเจนฟลูออไรด์สูงกว่าที่สภาวะความเป็นกรดต่าง 8.0 ถึง 100 - 400 เท่า ซึ่งหากการดูดซึมของฟลูออไรด์เกิดขึ้นในรูปของไฮโดรเจนฟลูออไรด์ ได้ดีกว่าฟลูออไรด์ไอออน ควรจะพบว่า ที่ระดับความเป็นกรดต่าง 6.0 มีการดูดซึมฟลูออไรด์ได้ดีกว่าอย่างชัดเจน

การที่พบว่าสภาวะความเป็นกรดต่างไม่มีอิทธิพลต่อการขนส่งฟลูออไรด์ อาจอธิบายได้ 2 ประการ ประการแรก ผิวเยื่อเซลล์ของชั้นเซลล์ผนังลำไส้เล็กของสุนัขคงจะมีความยินยอมให้ไฮโดรเจนฟลูออไรด์แพร่กระจายผ่านได้ค่า ซึ่งค่าสัดส่วนของความยินยอมให้สารแพร่กระจายผ่านระหว่างไฮโดรเจนฟลูออไรด์ต่อฟลูออไรด์ไอออน อาจมีค่าน้อยกว่า $10^4:1$ มาก ประการที่สอง ที่ในสารละลายที่สภาวะความเป็นกรดต่าง 6.0 ความเข้มข้นของฟลูออไรด์ไอออน มีมากกว่าไฮโดรเจนฟลูออไรด์ประมาณ 3.5×10^2 เท่า ซึ่งด้วยปริมาณความเข้มข้นที่มากกว่านี้ อาจเป็นตัวผลักดันให้เกิดการดูดซึมในรูปของฟลูออไรด์ไอออนได้ดี ดังนั้นการดูดซึมของฟลูออไรด์ผ่านชั้นเซลล์ผนังลำไส้เล็กจึงน่าจะเกิดขึ้นในรูปของฟลูออไรด์ไอออน ซึ่งข้อสันนิษฐานนี้สอดคล้องกับ Jackson และคณะ(25) ซึ่งได้ทำการศึกษากการขนส่ง salicylic acid และ benzoic acid ผ่านชั้นเซลล์ผนังลำไส้เล็กของหนูภายนอกร่างกาย และได้เสนอแนะว่ารูปของไอออนในสารละลายกรดอ่อนหรือด่างอ่อน เป็นรูปแบบที่สำคัญที่ถูกขนส่งผ่านชั้นเซลล์ดูดซึมของลำไส้เล็ก

ชั้นเซลล์ผนังลำไส้เล็กจัดให้อยู่ในประเภทชั้นเซลล์ที่รวมอยู่กันแบบหลวมๆ (leaky epithelium) (28,29) ซึ่งมีลักษณะเฉพาะที่สำคัญ เช่น ความต่างศักย์ระหว่างชั้นเซลล์มีค่าต่ำ เป็นชั้นเซลล์ที่มีช่องว่างระหว่างเซลล์ (paracellular channels) ซึ่งสามารถให้เป็นทางขนส่งน้ำหรือสารบางชนิดผ่านเข้าสู่หลอดเลือดได้ ซึ่งช่องว่างระหว่างเซลล์เหล่านี้ในปัจจุบัน มีกลุ่มผู้วิจัยหลายรายสันนิษฐานว่า อาจเป็นช่องทางสำหรับการขนส่งสารบางอย่าง โดยการแพร่กระจายผ่านเข้าไปในรูปของไอออน (25,28,29,30,31) เช่น การแพร่กระจายของโซเดียมไอออน (31) เป็นต้น ได้มีผู้

คำนวณขนาดของช่องว่างระหว่างเซลล์ ว่าคงมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 4-5 แองสตรอม (Angstrom) ซึ่งเป็นขนาดที่ใหญ่พอที่จะยินยอมให้ไอออนที่อ้อมตัวด้วยน้ำ (hydrated ions) กระจายผ่านได้ (28) ซึ่งฟลูออไรด์ไอออนในสภาวะที่อยู่ในสารละลายจะมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 3.5 แองสตรอม (32) ซึ่งเป็นขนาดที่เล็กพอที่จะสามารถกระจายผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์ได้

โดยเหตุที่การทดลองในสุนัขชุดนี้ ไม่พบอิทธิพลของสภาวะความเป็นกรดค้างต่อการขนส่งฟลูออไรด์ จึงทำการทดลองเพื่อทดสอบความเป็นไปได้ที่ฟลูออไรด์จะถูกดูดซึมผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์ในรูปของฟลูออไรด์ไอออน ซึ่งได้แก่ การศึกษาผลของการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของโซเดียม และคลอไรด์ ไอออนต่อการดูดซึมฟลูออไรด์ และการศึกษาผลของวาเบนต่อการขนส่งฟลูออไรด์

ในการทดลองลดความเข้มข้นของโซเดียมในสารละลายด้านผิวดูดซึมลงจากระดับปกติ พบว่าทำให้ปริมาณฟลูออไรด์ที่สะสมอยู่ในสารละลายด้านหลอดเลือดลดลงด้วย ซึ่งแสดงว่าการขนส่งฟลูออไรด์ผ่านชั้นเซลล์ผนังลำไส้เล็กลดลง การที่ทำให้ปริมาณโซเดียมไอออนในสารละลายด้านผิวดูดซึมลดลง โดยการแทนที่โซเดียมไอออนด้วยโคลีน ซึ่งจะไม่ถูกดูดซึม อันจะทำให้เกิดการลดลงของค่าความต่างศักย์ระหว่างชั้นเซลล์ผนังลำไส้ จึงทำให้การขนส่งโซเดียมไอออน ซึ่งเป็นประจุบวกลดลง ฟลูออไรด์ไอออนซึ่งมีประจุลบ และจะเคลื่อนที่ตามการขนส่งของโซเดียมไอออน จึงถูกดูดซึมลดลง (33-47%) ตามไปด้วย ดังนั้นการแพร่กระจายของฟลูออไรด์ไอออน อาจเกิดขึ้นร่วมไปกับการแพร่กระจายของโซเดียมไอออน กล่าวคือ เมื่อเกิดการขนส่งโดยอาศัยพลังงาน นำโซเดียมไอออนเข้าไปสะสมมากขึ้นในช่องว่างระหว่างเซลล์ ทำให้เกิดบริเวณที่มีค่าความต่างศักย์สูง และเป็นบริเวณที่มีความเข้มข้นสูงด้วย จึงทำให้เกิดการแพร่กระจายของน้ำเข้าไปในบริเวณนั้น ในขณะที่เดียวกันไอออนที่มีประจุตรงข้าม เช่น ฟลูออไรด์ไอออน จะเคลื่อนที่เข้าไปพร้อมๆกันด้วย

สำหรับวาเบน ซึ่งจะออกฤทธิ์ยับยั้งการขนส่งโซเดียมไอออนโดยอาศัยพลังงาน (sodium pump) ที่บริเวณผิวเซลล์ด้านหลอดเลือด จะออกฤทธิ์ยับยั้งการขนส่ง

ฟลูออไรด์โดยทางอ้อมด้วย ซึ่งผลการทดลองพบว่าการดูดซึมฟลูออไรด์ลดลงถึง 60 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทำการเติมวาเบน 1 มิลลิโมลาร์ ลงไปในสารละลายค้ำนหลอดเลือด ซึ่งได้มีผู้รายงานว่า การปรับระดับความเข้มข้นของโซเดียมไอออนให้ต่ำลง หรือการเติมวาเบนลงไปในสารละลายค้ำนหลอดเลือด จะออกฤทธิ์การทำงานของโซเดียมพัมพ์ และทำให้โซเดียมไอออนแพร่กระจายผ่านผิวเยื่อเซลล์ได้ยากขึ้น(32)

การลดความเข้มข้นของคลอไรด์ในสารละลายค้ำนผิวดูดซึม โดยการทดแทนด้วยสารที่ไม่มีประจุ อาจทำให้ค่าความต่างศักย์ระหว่างชั้นเซลล์เพิ่มขึ้น จะเป็นผลให้เกิดการส่งเสริมการขนส่งฟลูออไรด์ ในการทดลองพบการเปลี่ยนแปลงในการขนส่งของฟลูออไรด์เพิ่มขึ้น 35 เปอร์เซ็นต์ เมื่อมีการลดลงอย่างมากของความเข้มข้นของคลอไรด์ไอออน ที่ผสมอยู่ในสารละลายค้ำนชั้นเซลล์ดูดซึม (ตารางที่ 3)



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ข้อสรุป

1. ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการขนส่งฟลูออไรด์ผ่านชั้นเซลล์ผนังลำไส้เล็กของสุนัข ไม่ได้ขึ้นอยู่กับได้อิทธิพลของสภาวะความเป็นกรดต่างของสารละลายด้านผิวคูดซิม ดังนั้นการคูดซิมของฟลูออไรด์จึงไม่น่าจะเกิดขึ้นในรูปของ ไฮโดรเจนฟลูออไรด์
2. ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่า ฟลูออไรด์ควรที่จะถูกขนส่งผ่านชั้นเซลล์ผนังลำไส้เล็กของสุนัข โดยการแพร่กระจายของฟลูออไรด์ไอออน ซึ่งอาจจะแพร่กระจายผ่านทางช่องว่างระหว่างเซลล์
3. การแพร่กระจายของฟลูออไรด์ไอออน อาจเกิดขึ้นโดยอาศัยไปกับการแพร่กระจายของโซเดียมไอออน กล่าวคือ เมื่อเกิดการขนส่งโดยอาศัยพลังงาน นำโซเดียมไอออนเข้าไปสะสมมากขึ้นในช่องว่างระหว่างเซลล์ ทำให้เกิดบริเวณที่มีค่าความต่างศักย์สูง และเป็นบริเวณที่มีความเข้มข้นสูงด้วย จึงทำให้เกิดการแพร่กระจายของน้ำเข้าไปในบริเวณนั้น ในขณะที่เดียวกันไอออนที่มีประจุตรงข้าม เช่น ฟลูออไรด์ไอออน จะเคลื่อนที่เข้าไปพร้อมๆกันด้วย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ส่วนอ้างอิง

1. Lehninger, A.L. Principles of biochemistry. Worth Publishers, New York, 1982, pp.78-84.
2. Stookey, G.K., Dellinger, E.L., and Muhler, J.C. In vitro studies concerning fluoride absorption. Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 115:298-301, 1964.
3. Borei, H. Inhibition of cellular oxidation by fluoride A.r.K.Kim.Mineral.Geol. 20A:1-215, 1945.
4. Shiota, T. Effect of sodium fluoride on oral lactobacilli isolated from the rat. J.Dent.Res. 35:939-946, 1956.
5. Helgeland, K., and Leirskar, J. pH and cytotoxicity of fluoride in an animal cell culture system. Scand.J.Dent.Res. 84:37-45, 1976.
6. Whitford, G.M., Pashley, D.H., and Stringer, G.I. Fluoride renal clearance : a pH-dependent event. Am.J.Physiol. 230:527-532, 1976.
7. Whitford, G.M., Pashley, D.H., and Reynolds, K.E. Fluoride absorption from the rat urinary bladder : a pH-dependent event. Am.J.Physiol. 232:F10-F15, 1977.
8. Whitford, G.M., and Pashley, D.H. Fluoride absorption : the influence of gastric acidity. Calcif.Tissue Int. 36:302-307, 1984.

9. Bawden, J.W., and Deaton, T.G. In vitro study of the cellular control of ^{18}F uptake in the enamel of developing rat molars. *Arch. Oral Biol.* 26:487-490, 1981.
10. Bawden, J.W., Deaton, T.G., and Crenshaw, M.A. Diffusion of fluoride through the rat enamel organ in vitro. *J. Dent. Res.* 64: 1360-1363, 1987.
11. Stookey, G.K., Crane, D.B. and Muhler, J.C. Further studies on fluoride absorption. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 115:295-298, 1964.
12. Zipkin, I., and Likins, R.C. Absorption of various fluorine compounds from the gastrointestinal tract of the rat. *Am. J. Physiol.* 191:549-550, 1957.
13. Lee, J.S. Contraction of villi and fluid transport in dog jejunal mucosa in vitro. *Am. J. Physiol.* 221:488-495, 1971.
14. Messer, H.H., Nopakun, J., and Rudney, J. Influence of pH on intestinal fluoride transport in vitro. *J. Dent. Assoc. Thai.* 39:226-233, 1989.
15. Jackson, M.J., Shiau, Y-F., Bane, S., and Fox, M. Intestinal transport of weak electrolytes. Evidence in favor of a three-compartment system. *J. Gen. Physiol.* 63:187-213, 1974.
16. Hakim, A., et al. Absorption by an in vitro preparation of dog small intestinal mucosa. *J. Appl. Physiol.* 18:409-413, 1963.

17. Vaccarezza, S.G., and Charney, A.N. Acid-base effects on ileal sodium chloride absorption in vitro. *Am. J. Physiol.* 254:G329-G333, 1988.
18. Schuttz, S.G., and Zalusky, R. Ion transport in isolated rabbit ileum I. Short-circuit current and Na fluxes. *J. Gen. Physiol.* 47: 567-584, 1964.
19. Jackson, M.J., and Airall, A.A. Transport of heterocyclic acids across rat small intestine in vitro. *J. Membrane Biol.* 38:255-269, 1978.
20. Singer, L., and Armstrong, W.D. Determination of fluoride in bone with the fluoride ion electrode. *Anal. Chem.* 40:613-614, 1968.
21. Taves, D.R. Determination of submicromolar concentrations of fluoride in biological samples. *Talanta* 15:1015-1023, 1968.
22. Ott, L. An introduction to statistical methods and data analysis. 2nd ed., Duxbury Press, Boston, 1984.
23. Lewis, S.A., and Diamond J.M. Na⁺ transport by rabbit urinary bladder, a tight epithelium. *J. Membrane Biol.* 28 : 1-40, 1976.

24. Hoegerle, M.L. and Winne, D. Drug absorption by the rat jejunum perfused in situ. Dissociation from the pH-partition theory and role of microclimate-pH and unstirred layer. *Arch. Pharmacol.* 322:249-255, 1983.
25. Jackson, M.J., Tai, C-Y., and Steane, J.E. Weak electrolyte permeation in alimentary epithelia. *Am. J. Physiol.* 240:G191-G198, 1981.
26. Gutknecht, J., and Walter, A. Hydrofluoric acid nitric acid transport through lipid bilayer membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 644, 153-156, 1981.
27. Tosteson, D.C. Halide transport in red blood cells. *Acta Physiol. Scand.* 46:19-41, 1959.
28. Schultz, S.G. The role of paracellular pathways in isotonic fluid transport. *Yale J. Biol. Med.* 50:99-112, 1977.
29. Diamond, J.M. Channels in epithelial cell membranes and junctions *Federation Proc.* 37:2639-2644, 1978.
30. Frizzell, R.A., and Schultz, S.G. Ionic conductances of extracellular shunt pathway in rabbit ileum. Influence of shunt on transmural sodium transport and electrical potential differences. *J. Gen. Physiol.* 59:318-346, 1972.
31. Munck, B.G., and Schultz, S.G. Properties of the passive conductance pathway across in vitro rat jejunum. *J. Membrane Biol.* 16:163-174, 1974.

32. Messer, H.H. Fluorine. In Biochemistry of the Essential Ultratrace Elements. E. Frieden., ed., Plenum Press, New York, 1984, pp. 55-87.
33. Simmons, N.L., and Naftalin, R.J. Bidirectional sodium ion movements via the paracellular and transcellular routes across short-circuited rabbit ileum. Biochim. Biophys. Acta 448:426-450, 1976.



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย