



การตรวจวัดระดับเซลล์ตายแบบอะพอพโตซิสในชิ้นเนื้อมะเร็งท่อน้ำดีที่ได้รับยาเคมีบำบัด 5-FU ด้วยฟูเรียร์ทรานสฟอร์มอินฟราเรดไมโครสเปกโตรสโคปี

The Detection of Apoptosis Levels in 5-FU treated Cholangiocarcinoma Tissues using Fourier Transform Infrared (FTIR) Microspectroscopy

โมลิน ว่องวัฒนากุล^{1,2,3} พชราภรณ์ ทิพย์วัฒน์^{1,4} และ พัชรี เจียรนัยกุล^{1,2*}

¹ศูนย์วิจัยและพัฒนาการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์

มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น 40002

²สถาบันวิจัยมะเร็งท่อน้ำดี มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น 40002

³บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น 40002

⁴กลุ่มวิชาจุลชีววิทยาคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น 40002

*Corresponding Author, E-mail: patjea@kku.ac.th

บทคัดย่อ

โรคมะเร็งท่อน้ำดีเป็นโรคที่มีอุบัติการณ์สูงในประเทศไทย โดยเฉพาะในภาคอีสาน ผู้ป่วยส่วนใหญ่ได้รับการวินิจฉัยในระยะท้ายและมักไม่ตอบสนองต่อยาเคมีบำบัด ดังนั้นการพัฒนาเทคนิคเพื่อตรวจสอบการตอบสนองต่อยาเคมีบำบัดจึงมีความสำคัญต่อผลการรักษา เทคนิคฟูเรียร์ทรานสฟอร์มอินฟราเรดไมโครสเปกโตรสโคปีเป็นเทคนิคที่ตรวจหาความเปลี่ยนแปลงของโมเลกุลภายในเซลล์และเนื้อเยื่อที่มีพยาธิสภาพได้ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินระดับการตอบสนองต่อยาเคมีบำบัด 5-FU ด้วยวิธีฟูเรียร์ทรานสฟอร์มอินฟราเรดไมโครสเปกโตรสโคปี ในตัวอย่างชิ้นเนื้อมะเร็งท่อน้ำดีจากผู้ป่วย 8 ราย ซึ่งถูกจัดกลุ่มการตอบสนองต่อยาด้วยวิธี Histoculture drug response assay ที่ทำการเลี้ยงชิ้นเนื้อในสภาวะที่มียาเคมีบำบัด 5-FU ความเข้มข้น 200 μM นำชิ้นเนื้อที่ได้ฝังในพาราฟินและตัดชิ้นเนื้อแบ่งเป็น 2 ส่วน ส่วนที่หนึ่งนำไปวัดการเกิดอะพอพโตซิสด้วยการย้อม TUNEL คำนวณหาการตอบสนองต่อยาเป็นค่าร้อยละของการยับยั้งด้วยยาเคมีบำบัด (%Inhibition Index;%II) ชิ้นเนื้อส่วนที่สองนำไปตรวจวัดด้วยวิธีฟูเรียร์ทรานสฟอร์มอินฟราเรดไมโครสเปกโตรสโคปีและทำการวิเคราะห์จำแนกความแตกต่าง เปรียบเทียบกับ %II ด้วย Principal component analysis (PCA) ผลการศึกษาพบว่าอินฟราเรดสเปกตรัมของตัวอย่างที่ต่อยาหรือมีค่า %II ต่ำสามารถแยกออกจากกลุ่มที่ไวต่อยาหรือค่า %II

สูงได้ และสเปกตรัมที่ใช้จำแนกคือตำแหน่ง 1621 cm^{-1} และ 1639 cm^{-1} มาจากผลการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนภายในเซลล์เนื่องจากกระบวนการอะพอพโตซิส ซึ่งให้เห็นความเป็นไปได้ในการใช้เทคนิคอินฟราเรดไมโครสเปกโตรสโคปีเพื่อคัดกรองการตอบสนองต่อยา อย่างไรก็ตามควรทำการศึกษาในตัวอย่างที่มีเซลล์อะพอพโตซิสในระดับต่าง ๆ เพิ่มขึ้น เพื่อสามารถใช้ คำนวณระดับของเซลล์ตายแบบอะพอพโตซิสต่อไป

ABSTRACT

Cholangiocarcinoma (CCA) is an epithelial bile duct cancer which is found mostly in the northeast of Thailand. CCA patients have a low rate of survival due to delayed diagnosis and poor responses to chemotherapeutic drugs. Thus, drug response screening is expected to improve the clinical outcome. Recently, Fourier Transform Infrared (FTIR) microspectroscopy is a potential tool for molecular changed detection in cells and tissues. Therefore, this study aimed to classify the chemotherapeutic responses in 8 CCA tissues by using Conventional-FTIR microspectroscopy. Tissue biopsies from CCA patients were cultured with $200\text{ }\mu\text{M}$ of 5-FU. Samples were paraffin embedded and sectioned into two pieces for, first, TUNEL staining to count apoptotic cells and calculate drug response as a % inhibitory index (%I) and, second, FTIR measurement. Principal Component Analysis (PCA) was performed after FTIR experiment to classify the group of apoptotic levels. The results showed that FTIR microspectroscopy could distinguish resistant samples from a set of sensitive samples. In particular, we observed changes of bands at 1621 cm^{-1} in resistant samples shift to 1639 cm^{-1} in sensitive samples which is associated to the process of cell apoptosis. This approach is proposed as a rapid method for the apoptotic cell detection in chemotherapeutic response of CCA tissues before treatment. The correlation between the IR spectral signature and various % I should be evaluated in more samples in further study.

คำสำคัญ: ระดับเซลล์ตายแบบอะพอพโตซิส มะเร็งท่อน้ำดี พูเรียร์ทรานสฟอร์มอินฟราเรดไมโครสเปกโตรสโคปี อินฟราเรดสเปกตรัม

Keywords: Apoptotic cell detection, Cholangiocarcinoma, Fourier Transform Infrared Microspectroscopy, Infrared spectrum

บทนำ

มะเร็งท่อน้ำดีเป็นโรคมะเร็งที่พบได้สูงในอันดับต้นและยังคงเป็นปัญหาที่สำคัญในภาคอีสาน โดยมีพยาธีกาเนดที่สัมพันธ์กับการติดเชื้อพยาธิใบไม้

ตับ โดยพบอุบัติการณ์ของโรคนี้ถึง 317.6 รายต่อ 100,000 คน และมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นในทุก ๆ ปี (Vatanasapt et al., 2002; Sriamporn et al., 2004; Patel, 2006; Sripa et al., 2008) การรักษาด้วยการผ่าตัดมักได้ผลดีกับผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งท่อน้ำดี

ระยะต้นแต่ผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีส่วนใหญ่ไม่แสดงอาการ จึงได้รับการวินิจฉัยในระยะท้าย ทำให้ผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีมีระยะการรอดชีพหลังการรักษาสั้นเพียง 5-7 เดือน (Shaib et al., 2004) แนวทางการรักษาจึงพิจารณาการผ่าตัดและรักษาด้วยยาเคมีบำบัดหลังการผ่าตัดซึ่งเป็นทางเลือกให้ผู้ป่วยมีอัตราการรอดชีวิตที่ยาวขึ้น โดย 5-Fluorouracil (5-FU) เป็นยาตัวเลือกหนึ่งในการรักษา ซึ่งกลไกการออกฤทธิ์อาศัยการยับยั้งการแบ่งเซลล์และเหนี่ยวนำให้เกิด DNA damage และเกิดการตายแบบอะพอพโตซิส (Longley et al., 2003) โดยเซลล์ที่เกิดการตายแบบอะพอพโตซิสหรือเซลล์อะพอพโตซิส แสดงถึงความไวต่อการตอบสนองต่อการรักษาด้วยยาชนิดนี้ อย่างไรก็ตามการรักษาดังกล่าวอาจไม่พบการตอบสนองในทุกราย หรือที่เรียกว่า การดื้อต่อยาเคมีบำบัด ปัจจุบันยังไม่มีข้อบ่งชี้ใดสำหรับแนวทางที่ให้ผลการรักษาที่มีประสิทธิภาพในผู้ป่วยเฉพาะราย โดยแพทย์ทำการประเมินผลการรักษาจากขนาดของก้อนมะเร็งที่ลดลงซึ่งต้องประเมินหลังการรักษาทำให้มีค่าใช้จ่ายสูงและเสี่ยงต่อการที่ผู้ป่วยจะพัฒนาการดื้อยาและมีการดำเนินโรคที่รุนแรงมากขึ้น ดังนั้น การตรวจการตอบสนองของเซลล์มะเร็งในคนไข้เฉพาะราย (Personalized chemotherapy) เพื่อวิเคราะห์การตอบสนองกับยาเคมีบำบัดก่อนให้การรักษา จึงอาจเป็นแนวทางช่วยแพทย์ตัดสินใจในการเลือกยาเคมีบำบัดที่จะให้ผลในการรักษาดีขึ้นลดอัตราการดื้อยาและเพิ่มอัตราการรอดชีวิตในผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี ปัจจุบันมีรายงานเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมะเร็งเพื่อทดสอบฤทธิ์ของยาในหลอดทดลอง เรียกว่า Histoculture drug response assay (HDRA) ที่มีศักยภาพในการนำมาใช้ตรวจคัดกรองเพื่อทำนายการตอบสนองหรือเลือกใช้เคมีบำบัดต่อผู้ป่วยมะเร็งโดยตรง (Furukawa et al., 1995)

และนำเซลล์ไปวัดจำนวนเซลล์ที่ตายด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุลที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ เช่น การย้อม Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) (Muppidi et al., 2004; Hewitson et al., 2010) เป็นต้น อย่างไรก็ตามการประเมินการตอบสนองต่อยาเคมีบำบัดด้วยวิธี HDRA ยังมีข้อจำกัดเนื่องจาก American Society of Clinical Oncology (ASCO) ไม่แนะนำให้ใช้ในการคัดกรองการตอบสนองต่อยาเคมีบำบัด โดย ASCO ให้ความสำคัญกับการพิจารณาจากงานวิจัยเชิงทดลองทางคลินิก (Clinical trials) และสุขภาพของผู้ป่วยเป็นหลัก (Burststein et al., 2011) ฉะนั้น การหาเทคนิคและวิธีการเพื่อใช้ในการตรวจวิเคราะห์ถึงระดับของการเกิดอะพอพโตซิสของเซลล์มะเร็งต่อการตอบสนองต่อยาเคมีบำบัดอันจักเป็นประโยชน์ในการบ่งชี้การตอบสนองต่อการรักษาด้วยยาเคมีบำบัดของผู้ป่วยแต่ละรายได้นำไปสู่การรักษาที่มีประสิทธิภาพและประสบความสำเร็จในการรักษา

เทคนิคฟูเรียร์ทรานสฟอร์มอินฟราเรดไมโครสเปกโตรสโคปี (Fourier Transform Infrared; FTIR microspectroscopy) เป็นเทคนิคที่สามารถตรวจวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของโมเลกุลภายในเซลล์หรือเนื้อเยื่อ โดยอาศัยการวัดการสั่นของพันธะโควาเลนต์ในโมเลกุล และแสดงผลเป็นรูปแบบของอินฟราเรดสเปกตรัมที่จำเพาะของโปรตีน คาร์โบไฮเดรต ไขมัน และกรดนิวคลีอิกได้ (Dumas et al., 2006; Cao et al., 2013) ซึ่งมีหลายการศึกษาที่นำเทคนิค FTIR microspectroscopy มาประยุกต์ใช้ในการตรวจมะเร็งชนิดต่าง ๆ เช่น มะเร็งปากมดลูก (Wood et al., 2004; Walsh et al., 2007) มะเร็งเต้านม (Fabian et al., 2006) และมะเร็งตับ (Chiriboga et al., 2000; Diem et al., 2000; Sheng et al., 2015)

เป็นต้น รวมทั้งเทคนิคนี้ยังสามารถใช้ในการตรวจหาการตายของเซลล์แบบอะพอโทซิส (Gasparri et al., 2003; Munro et al., 2010) และเซลล์ที่ต่อต่อยาเคมีบำบัด (Zwielly et al., 2009; Rutter et al., 2014; Wongwattanukul et al., 2016) ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะนำ FTIR microspectroscopy มาใช้ในการตรวจวิเคราะห์จำแนกกระดงของเซลล์อะพอโทซิสในตัวอย่างชิ้นเนื้อของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีที่ทดสอบการตอบสนองต่อยาเคมีบำบัดชนิด 5-FU ซึ่งผลที่ได้น่าจะเป็นประโยชน์ในการวางแผนการรักษาผู้ป่วยมะเร็งได้อย่างมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

วัสดุและวิธีการศึกษา

1. ตัวอย่างชิ้นเนื้อผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี

ตัวอย่างชิ้นเนื้อในการศึกษานี้ทั้งหมด 8 รายได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์พยาธิใบไม้ตับและมะเร็งท่อน้ำดี โดยผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีเข้ารับการผ่าตัด ณ โรงพยาบาลศรีนครินทร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น และ การศึกษานี้ผ่านการรับรองจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์จากมหาวิทยาลัยขอนแก่นเลขที่ HE571442

2. การทดสอบการตอบสนองต่อยาเคมีบำบัด 5-FU ด้วยวิธี Histoculture drug response assay (HDRA) และการตรวจวัดระดับเซลล์อะพอโทซิส

ตัวอย่างชิ้นเนื้อมะเร็งท่อน้ำดีที่ได้หลังจากการผ่าตัด ถูกนำส่งโดยเก็บในอาหารเลี้ยงเซลล์ ชนิด RPMI 1640 ที่มี 20% Fetal bovine serum และ 2.5% Penicillin/Streptomycin เพื่อนำมาทดสอบการตอบสนองต่อยาเคมีบำบัด 5-FU ด้วยวิธี HDRA โดยชิ้นเนื้อถูกตัดด้วยเทคนิคปราศจากเชื้อ เป็นชิ้นที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 mm แล้วนำไปวางบน Collagen gel sponge (Pharmacia and Upjohn,

MI, USA) ที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์สมบูรณ์ (PRMI 1640 ที่ประกอบด้วย 10% Fetal bovine serum และ 1% Penicillin/Streptomycin) สำหรับเป็นตัวอย่างควบคุม และอาหารเลี้ยงเซลล์สมบูรณ์ที่เติมยาเคมีบำบัด 5-FU ความเข้มข้น 200 μ M สำหรับเป็นตัวอย่างทดสอบ หลังจากนั้นนำไปทำการเพาะเลี้ยงในอุณหภูมิ 37°C ที่มี CO₂ เข้มข้น 5% เป็นเวลา 4 วัน เมื่อครบกำหนด ทำการเก็บตัวอย่างใน 10% Formalin buffer และนำไปทำการฝังในพาราฟิน (Paraffin-embedding)

การตรวจวัดระดับเซลล์อะพอโทซิสทำโดยการย้อม TUNEL ซึ่งตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ตัดให้มีความบาง 4 μ m ถูกนำมาย้อมตามวิธีการในคู่มือประกอบน้ำยาของบริษัท Promega ประเทศสหรัฐอเมริกา หลังจากนั้นนำมาคำนวณค่าร้อยละของการยับยั้งด้วยยาเคมีบำบัด (% Inhibitory index; %II) (Hahnvejawanong et al., 2012) โดยสมการ %II = [1-(ค่าเฉลี่ยร้อยละของเซลล์มะเร็งที่มีชีวิตในกลุ่มทดสอบ/ค่าเฉลี่ยร้อยละของเซลล์มะเร็งที่มีชีวิตในกลุ่มควบคุม)] \times 100

3. การตรวจวัดระดับเซลล์อะพอโทซิสด้วยเทคนิค Conventional-FTIR microspectroscopy

ตัวอย่างชิ้นเนื้อมะเร็งท่อน้ำดีกลุ่มทดสอบที่ตัดให้มีความบาง 4 μ m และวางบนสไลด์ชนิดพิเศษสำหรับใช้ตรวจด้วย FTIR microspectroscopy (MirriR slide, Kevley Technologies, Ohio, USA) นำไปกำจัดพาราฟินและเก็บไว้ที่อุณหภูมิความชื้นก่อนนำไปตรวจวัด

ตัวอย่างชิ้นเนื้อทั้ง 8 รายของกลุ่มทดสอบนำไปตรวจวิเคราะห์ด้วย Conventional-FTIR microspectroscopy ณ สถาบันวิจัยแสงซินโครตรอนแห่งชาติ (องค์การมหาชน) ประเทศไทย โดยใช้เครื่อง

Bruker Vertex 70 FTIR spectrometer เชื่อมกับ Bruker Hyperion 2000 FTIR microscope และมีตัวตรวจวัดชนิด Liquid nitrogen cooled mercury cadmium telluride (MCT) ซึ่งพารามิเตอร์ที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์คือ 128 co-added scans ด้วยขนาดของ aperture ที่ $20\ \mu\text{m} \times 20\ \mu\text{m}$ และใช้ Spectral resolution ที่ $4\ \text{cm}^{-1}$

อินฟราเรดสเปกตรัมที่ได้จากการตรวจวัดถูกวิเคราะห์ด้วยการทำ Second derivative ด้วย 9 Smoothing points และ Third order polynomial หลังจากนั้นวิเคราะห์ด้วยการทำ Extended Multiplicative Scattering Correction (EMSC) เพื่อใช้ในการปรับฐานของกราฟสเปกตรัม แล้วทำการวิเคราะห์หลายตัวแปร ด้วย Principal Component Analysis (PCA) โดยโปรแกรม Unscrambler® 9.7 ในตำแหน่งลายพิมพ์สเปกตรัม ($1800\text{-}1000\ \text{cm}^{-1}$) ซึ่งสัดส่วนของตำแหน่งพาราฟินที่ $1470\text{-}1440\ \text{cm}^{-1}$ และ $1390\text{-}1370\ \text{cm}^{-1}$ ออกจากการวิเคราะห์

ผลการศึกษา

1. ผลการตอบสนองต่อยาเคมีบำบัดของตัวอย่างชิ้นเนื้อมะเร็งท่อน้ำดีด้วยวิธี HDRA

ในศึกษาการตอบสนองของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีต่อยาเคมีบำบัด ตัวอย่างชิ้นเนื้อมะเร็งท่อน้ำดีที่ได้หลังจากการผ่าตัด ถูกนำมาทดสอบการตอบสนองต่อยาเคมีบำบัด 5-FU ด้วยวิธี HDRA และตรวจวัดระดับเซลล์อะพอพโตซิสทำโดยการย้อม TUNEL แสดงผลการศึกษาของการย้อมเซลล์อะพอพโตซิสในชิ้นเนื้อมะเร็งท่อน้ำดีดังรูปที่ 1 และจากผลการตอบสนองต่อยาเคมีบำบัดในตัวอย่างชิ้นเนื้อมะเร็งท่อน้ำดีจากผู้ป่วยทั้ง 8 ราย สามารถแบ่งกลุ่มตัวอย่างออกเป็นกลุ่มที่ไวต่อยาเคมีบำบัดและกลุ่มที่ดื้อต่อยาเคมีบำบัดโดยใช้ค่ามัธยฐาน (Hahnvanawong et al., 2012) ซึ่ง

การศึกษานี้ใช้ค่ามัธยฐานที่ 40% โดยตัวอย่างที่มีค่า % น้อยกว่า 40% จัดเป็นกลุ่มที่ดื้อต่อยาเคมีบำบัด เนื่องจากมีเซลล์ที่ตายแบบอะพอพโตซิสน้อย ขณะที่ตัวอย่างที่มีค่า % สูงกว่า 40% จัดเป็นกลุ่มที่ไวต่อยาเคมีบำบัดเนื่องจากพบเซลล์ที่ตายแบบอะพอพโตซิสมากกว่า ดังตารางที่ 1

2. ผลการจำแนกระดับเซลล์ตายแบบอะพอพโตซิสด้วย FTIR microspectroscopy

การศึกษานี้ครั้งนี้ ผู้วิจัยมีความสนใจนำเทคนิค FTIR microspectroscopy มาใช้ในการประเมินการตอบสนองของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีต่อยาเคมีบำบัด 5-FU จากการศึกษาได้ทำการวิเคราะห์อินฟราเรดสเปกตรัมของตัวอย่างกลุ่มทดสอบด้วยวิธี PCA เพื่อจำแนกระดับของเซลล์ที่ตายแบบอะพอพโตซิส ซึ่งทำการเปรียบเทียบแบบจับคู่ และเนื่องจากการแบ่งกลุ่มโดยใช้ค่ามัธยฐานที่ 40% ทำให้สามารถแบ่งกลุ่มตัวอย่างที่ไวต่อยาเคมีบำบัดได้เป็น 3 ระดับ (ตารางที่ 1) โดยตัวอย่างที่ 66.6% นั้น มีการตอบสนองที่ระดับกึ่งกลางของกลุ่มไวต่อยา 5-FU

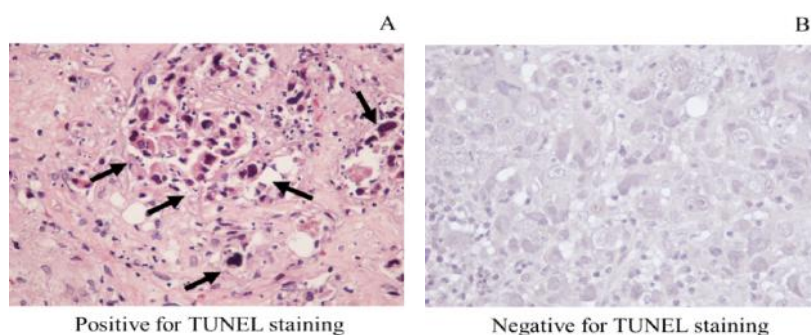
ดังนั้นการศึกษานี้จึงใช้ตัวอย่างที่มีค่า 66.6% เป็นเกณฑ์ในการวิเคราะห์เปรียบเทียบกับกลุ่มตัวอย่างอื่น ๆ ซึ่งผลของการวิเคราะห์เปรียบเทียบแสดงในรูปที่ 2 พบว่ากลุ่มตัวอย่างที่ให้ค่าที่ 0% ทั้ง 2 ราย ซึ่งไม่พบเซลล์อะพอพโตซิส สามารถจำแนกออกจากตัวอย่างที่มีการตอบสนองต่อยาที่ 66.6% ได้อย่างชัดเจนโดยแกน PC1 (รูป 2A) สำหรับตัวอย่างที่มีค่า % เท่ากับ 36.3% พบว่ามีการกระจายของอินฟราเรดสเปกตรัมของเซลล์มะเร็งแตกต่างจากชิ้นเนื้อที่มีการตอบสนองต่อยาที่ 66.6% อย่างชัดเจนแยกได้โดยแกน PC2 (รูปที่ 2B) และในการวิเคราะห์ตัวอย่างชิ้นเนื้อที่มีการตอบสนองต่อยา 38.8% กับ 66.6% พบว่าเริ่มมีการซ้อนทับกันของอินฟราเรด

สเปกตรัมที่ได้จากการตรวจวัดเซลล์มะเร็งที่มีการเกิดอะพอโตซิส แต่ยังคงสามารถแยกสองตัวอย่างนี้ได้โดยแกน PC1 (รูปที่ 2C) ขณะที่ตัวอย่างที่จัดอยู่ในกลุ่มไวต่อยาเคมีบำบัดชนิด 5-FU (42.8%II และ 100%II) ไม่สามารถแยกออกจากตัวอย่างที่ 66.6%II โดยใช้แกน PC1 และ PC2 ซึ่งเป็นแกนที่มีความสามารถสูงที่สุดในการจำแนก แต่สามารถใช้แกน PC3 ในการแบ่งตัวอย่างสองกลุ่ม แม้ว่ายังคงพบการซ้อนทับของอินฟราเรดสเปกตรัมที่ได้จากการตรวจวัดเซลล์มะเร็งที่มีการเกิดอะพอโตซิสอยู่

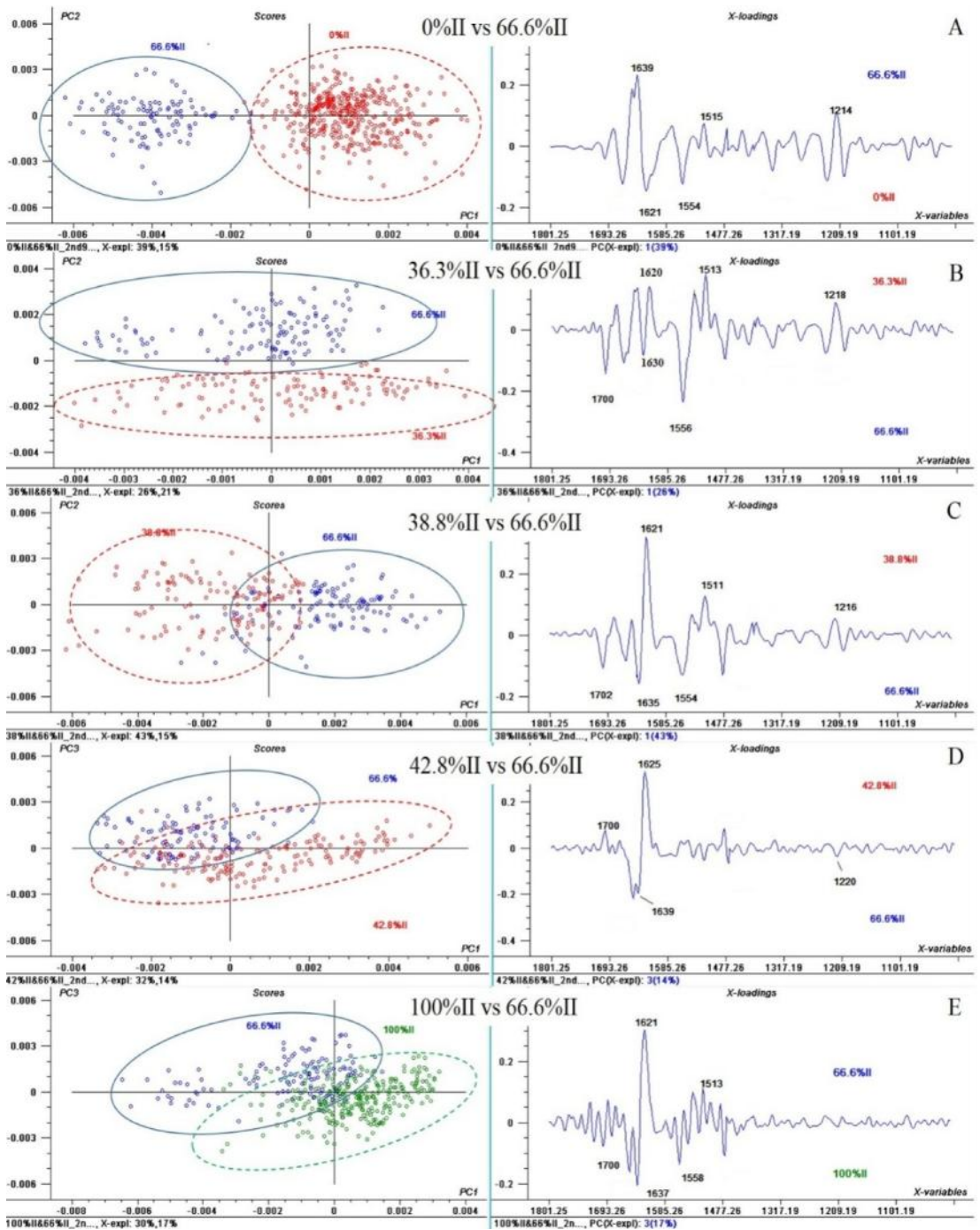
จากผลการวิเคราะห์จำแนกความแตกต่างนี้สามารถบ่งชี้ถึงความจำเพาะของเซลล์ที่มีการตอบสนองต่อยาเคมีบำบัดได้โดยการอ่านค่าจากกราฟ Loading plots ซึ่งพบว่าตำแหน่งของพีคอินฟราเรดสเปกตรัมที่สำคัญที่พบตรงกันในกลุ่มตัวอย่างที่ติดต่อยาเคมีบำบัดชนิด 5-FU ที่ 1621 cm^{-1} โดยพีคที่ตำแหน่งนี้สัมพันธ์กับการโครงสร้าง -sheet ของโปรตีน ในขณะที่ตัวอย่างกลุ่มที่ไวต่อยาเคมีบำบัดชนิด 5-FU มีพีคของอินฟราเรดสเปกตรัมที่สำคัญในช่วง $1630\text{-}1639\text{ cm}^{-1}$ ซึ่งสัมพันธ์กับ Amide I ของโปรตีน

ตารางที่ 1 ระดับเซลล์อะพอโตซิสและการแปลผลของการตอบสนองต่อยาเคมีบำบัด 5-FU ในตัวอย่างชิ้นเนื้อของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี

ค่าร้อยละของการยับยั้งด้วยยาเคมีบำบัด (%II)	จำนวนตัวอย่าง	การแปลผล
0	2	ติดต่อการรักษาด้วยยาเคมีบำบัด 5-FU
36.3	1	ติดต่อการรักษาด้วยยาเคมีบำบัด 5-FU
38.8	1	ติดต่อการรักษาด้วยยาเคมีบำบัด 5-FU
42.8	1	ไวต่อการรักษาด้วยยาเคมีบำบัด 5-FU
66.6	1	ไวต่อการรักษาด้วยยาเคมีบำบัด 5-FU
100	2	ไวต่อการรักษาด้วยยาเคมีบำบัด 5-FU



รูปที่ 1 ตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ย้อมเซลล์อะพอโตซิสด้วยวิธี TUNEL โดยภาพ A แสดงตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อการย้อม (ลูกศรชี้) และ ภาพ B แสดงตัวอย่างที่ให้ผลลบต่อการย้อมเซลล์อะพอโตซิส



รูปที่ 2 ผลการจำแนกอินฟราเรดสเปกตรัมของตัวอย่างขึ้นเนื้อตามระดับค่าร้อยละของการยับยั้งด้วยยาเคมีบำบัด (%II) จากการวิเคราะห์ด้วย Principal Component Analysis (PCA) โดยกลุ่มตัวอย่างที่ถูกเลือกในวงกลมเส้นทึบแสดงตัวอย่างที่มีค่า 66.6%II และวงกลมเส้นประแสดงตัวอย่างที่มีค่า %II น้อยกว่าและมากกว่า 66%

วิจารณ์ผลการศึกษา

การตรวจวิเคราะห์เซลล์ที่ตายแบบอะพอพโตซิสด้วยการย้อม TUNEL มีข้อจำกัดคือไม่จำเพาะต่อเซลล์อะพอพโตซิสเพียงอย่างเดียวแต่ยังสามารถย้อมติดเซลล์ที่มีการตายแบบเนโครซิสได้ (Graskraupp et al., 1995) และยังสามารถให้ผลบวกปลอมจากการที่มี endogenous endonucleases ที่กำจัดได้ไม่หมดระหว่างขั้นตอนการย้อมในตัวอย่างชิ้นเนื้อ (Stahelin et al., 1998) ดังนั้นการพัฒนาเทคนิคหรือวิธีการที่มีความจำเพาะในการตรวจวัดเซลล์ที่ตายแบบอะพอพโตซิสจึงยังคงมีความสำคัญ

การศึกษานี้ให้ผลที่สามารถแยกความแตกต่างในแต่ละระดับของการเกิดอะพอพโตซิสจากการทดสอบด้วยยาเคมีบำบัดชนิด 5-FU ในผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีแต่ละรายได้ ซึ่งยังไม่พบการรายงานการใช้ฟูเรียร์ทรานสฟอร์มอินฟราเรดไมโครสเปกโตรสโคปีในการจำแนกระดับการเกิดอะพอพโตซิสในชิ้นเนื้อมะเร็งมาก่อน อย่างไรก็ตามมีการศึกษาด้วยเทคนิคนี้ในตัวอย่างเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งเม็ดเลือดขาวที่ให้ยา Arsenic trioxide และพบการเปลี่ยนแปลงของอินฟราเรดสเปกตรัมในเซลล์ที่มีการเกิดอะพอพโตซิสโดยมีการย้ายตำแหน่งของพีคอินฟราเรดสเปกตรัมจาก 1639 cm^{-1} ในเซลล์ที่ไม่มีการตายแบบอะพอพโตซิสเนื่องจากไม่ได้ให้ยา เป็น 1650 cm^{-1} ในเซลล์ที่เกิดอะพอพโตซิส (Munro et al., 2010) ซึ่งคล้ายกับผลการศึกษาของผู้วิจัยในครั้งนี้ที่พบว่ากลุ่มตัวอย่างที่ดื้อต่อยามีพีคของอินฟราเรดสเปกตรัมที่ 1621 cm^{-1} และมีการย้ายตำแหน่งของพีคอินฟราเรดสเปกตรัมที่ 1639 cm^{-1} ในกลุ่มที่ไวต่อยาซึ่งมีเซลล์ตายแบบอะพอพโตซิส นอกจากนี้ผลการศึกษานี้ยังคล้ายกับการศึกษาของ Gasparri และคณะ ที่ไม่พบพีคที่ 1621 cm^{-1} ในเซลล์ที่ตายแบบอะพอพโตซิส (Gasparri et al., 2003) โดย

การพบเหตุการณ์เช่นนี้เกิดจากมีการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนภายในเซลล์จากกระบวนการอะพอพโตซิส

สรุปผลการศึกษา

การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าเทคนิคฟูเรียร์ทรานสฟอร์มอินฟราเรดไมโครสเปกโตรสโคปีมีความสามารถในการจำแนกระดับของเซลล์ตายแบบอะพอพโตซิสในตัวอย่างชิ้นเนื้อมะเร็งหลังจากที่ได้รับยาเคมีบำบัดได้โดยตรง เครื่องมืออินฟราเรดไมโครสเปกโตรสโคปีดังกล่าวสามารถวิเคราะห์ได้ในห้องปฏิบัติการโดยไม่ต้องใช้น้ำยาทดสอบ อย่างไรก็ตามข้อจำกัดของการใช้เทคนิคนี้คือการแปลผลยังต้องอาศัยการวิเคราะห์ ด้วยโปรแกรมที่จำเพาะและต้องการผู้ชำนาญ ดังนั้นการศึกษาในตัวอย่างที่มีเซลล์อะพอพโตซิสในระดับต่าง ๆ ที่เพิ่มขึ้น เพื่อสร้างเป็นโมเดล บ่งชี้ระดับของเซลล์ตายแบบอะพอพโตซิสด้วยการใช้เทคนิคฟูเรียร์ทรานสฟอร์มอินฟราเรดไมโครสเปกโตรสโคปีโดยตรง จะช่วยให้การนำไปใช้มีความสะดวกและถูกต้องมากขึ้นในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษานี้ได้รับทุนสนับสนุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยผ่านโครงการปริญญาเอกกาญจนาภิเษก (ทุนเลขที่ PHD/0315/2552 ของนางสาวโมลิน ว่องวัฒนากุล) และ ศูนย์วิจัยและพัฒนาการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น นอกจากนี้การตรวจวัดด้วย Conventional-FTIR microspectroscopy ได้ผ่านการพิจารณาเข้าใช้เครื่องมือที่สถาบันวิจัยแสงซินโครตรอนแห่งชาติ (องค์การมหาชน) ประเทศไทย

เอกสารอ้างอิง

- Burstein, H. J., Mangu, P. B., Somerfield, M. R., Schrag, D., Samson, D., Holt, L., Zelman, D. and Ajani, J. A., (2011). American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Update on the Use of Chemotherapy Sensitivity and Resistance Assays. *Journal of Clinical Oncology* 29(24): 3328-3330.
- Cao, J., Ng, E. S., McNaughton, D., Stanley, E. G., Elefanty, A. G., Tobin, M. J. and Heraud, P. (2013). The characterisation of pluripotent and multi-potent stem cells using Fourier transform infrared microspectroscopy. *Int J Mol Sci.* 14(9): 17453-17476.
- Chiriboga, L., Yee, H. and Diem, M. (2000). Infrared Spectroscopy of Human Cells and Tissue. Part VI: A Comparative Study of Histopathology and Infrared Microspectroscopy of Normal, Cirrhotic, and Cancerous Liver Tissue. *Applied Spectroscopy* 54: 1-8.
- Diem, M., Chiriboga, L. and Yee, H. (2000). Infrared spectroscopy of human cells and tissue. VIII. Strategies for analysis of infrared tissue mapping data and applications to liver tissue. *Biopolymers* 57(5): 282-290.
- Dumas, P., Sockalingum, G. D. and Sule-Suso, J. (2006). Adding synchrotron radiation to infrared microspectroscopy: what's new in biomedical applications? *Trends in Biotechnology* 25(1): 40-44.
- Fabian, H., Thi, N., Eiden, M., Lasch, P., Schmitt, J. and Naumann, D. (2006). Diagnosing benign and malignant lesions in breast tissue sections by using IR-microspectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta* 1758: 874-882.
- Furukawa, T., Kubota, T. and Hoffman, R. M. (1995). Clinical applications of the histoculture drug response assay. *Clin Cancer Res* 1(3): 305-311.
- Gasparri, F. and Muzio, M. (2003). Monitoring of apoptosis of HL60 cells by Fourier-transform infrared spectroscopy. *Biochem. J.* 369: 239-248.
- Graskraupp, B., Ruttkaynedecky, B., Koudelka, H., Bukowska, K., Bursch, W. and Schultehermann, R. (1995). In-Situ Detection of Fragmented DNA (Tunel Assay) Fails to Discriminate among Apoptosis, Necrosis, and Autolytic Cell-Death - a Cautionary Note. *Hepatology* 21(5): 1465-1468.
- Hahnvajjanawong, C., Chaiyagool, J., Seubwai, W., Bhudhisawasdi, V., Namwat, N., Khuntikeo, N., Sripan, B., Pugkhem, A. and Tassaneeyakul, W. (2012). Orotate phosphoribosyl transferase mRNA expression and the response of cholangiocarcinoma to 5-fluorouracil. *World J Gastroenterol.* 18(30): 3955-3961.
- Hewitson, T. D. and Darby, I. A. (2010). In situ localization of apoptosis using TUNEL. *Methods Mol Biol.* 611: 161-170.
- Longley, D. B., Harkin, D. P. and Johnston, P. G. (2003). 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer.* 3(5): 330-338.
- Munro, K. L., Bambery, K. R., Carter, E. A., Puskar, L., Tobin, M. J., Wood, B. R. and Dillon C. T. (2010). Synchrotron radiation infrared microspectroscopy of arsenic-induced changes to intracellular biomolecules in live leukemia cells. *Vibrational Spectroscopy* 53: 39-44.
- Muppidi, J., Porter, M. and Siegel, R. M. (2004). Measurement of apoptosis and other forms

- of cell death. *Curr Protoc Immunol Chapter 3: unit 3.17.*
- Patel, T. (2006). Cholangiocarcinoma. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol.* 3(1): 33-42.
- Rutter, A. V., Siddique, M. R., Filik, J., Sandt, C., Dumas, P., Cinque, G., Sockalingum, G. D., Yang, Y. and Sulé-Suso, J. (2014). Study of gemcitabine-sensitive/resistant cancer cells by cell cloning and synchrotron FTIR microspectroscopy. *Cytometry A* 85(8): 688-697.
- Shaib, Y. and El-Serag, H. B. (2004). The epidemiology of cholangiocarcinoma. *Semin Liver Dis.* 24(2): 115-125.
- Sheng, D. P., Xu, F. C., Yu, Q., Fang, T. T., Xia, J. J., Li, S. R. and Wang, X. (2015). A study of structural differences between liver cancer cells and normal liver cells using FTIR spectroscopy. *Journal of Molecular Structure* 1099: 18-23.
- Sriamporn, S., Pisani, P., Pipitgool, V., Suwanrungruang, K., Kamsa-ard, S. and Parkin, D. M. (2004). Prevalence of *Opisthorchis viverrini* infection and incidence of cholangiocarcinoma in Khon Kaen, Northeast Thailand. *Trop Med Int Health.* 9(5): 588-594.
- Sripa, B. and Pairojkul, C. (2008). Cholangiocarcinoma: lessons from Thailand. *Curr Opin Gastroenterol.* 24(3): 349-356.
- Stahelin, B. J., Marti, U., Solioz, L., Zimmermann, H. and Reichen, J. (1998). False positive staining in the TUNEL assay to detect apoptosis in liver and intestine is caused by endogenous nucleases and inhibited by diethyl pyrocarbonate. *Journal of Clinical Pathology-Molecular Pathology* 51(4): 204-208.
- Vatanasapt, V., Sriamporn, S. and Vatanasapt, P. (2002). Cancer Control in Thailand. *Jpn J clin Oncol.* 32 (Supplement 1): S82-S91.
- Walsh, M. J., German, M. J., Singh, M., Pollock, H. M., Hammiche, A., Kyrgiou, M., Stringfellow, H. F., Paraskevaidis, E., Martin-Hirsch, P. L. and Martin, F. L. (2007). IR microspectroscopy: potential applications in cervical cancer screening. *Cancer Lett.* 246(1-2): 1-11.
- Wongwattanukul, M., Hahnvajanawong, C., Tippayawat, P., Chio-Srichan, S., Leelayuwat, C., Limpaboon, T., Jearanaikoon, P. and Heraud, P. (2016). Classification of Gemcitabine resistant Cholangiocarcinoma cell lines using synchrotron FTIR microspectroscopy. *J. Biophotonics*: DOI: 10.1002/jbio.201500253.
- Wood, B. R., Chiriboga, L., Yee, H., Quinn, M. A., McNaughton, D. and Diem, M. (2004). Fourier transform infrared (FTIR) spectral mapping of the cervical transformation zone, and dysplastic squamous epithelium. *Gynecol Oncol.* 93(1): 59-68.
- Zwielly, A., Gopas, J., Brkic, G. and Mordechaj, S. (2009). Discrimination between drug-resistant and non-resistant human melanoma cell lines by FTIR spectroscopy. *Analyst* 134(2): 294-300.

