

การเปลี่ยนแปลงของอินฟราเรดสเปกตรัมที่สัมพันธ์กับหมู่ฟอสโฟไดเอสเทอร์ ของกรดนิวคลีอิก
ในเซลล์ปากมดลูก ก่อนและหลังการรักษา มะเร็งปากมดลูกด้วยรังสีรักษา



นางสาวอุษณีย์ สุวิมลธีระบุตร

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์ หลักสูตรวิทยาศาสตรการแพทย์


คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2544

ISBN 974-03-0882-1

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHANGES OF INFRARED SPECTRUM ASSOCIATED TO PHOSPHODIESTER GROUPS OF NUCLEIC ACID IN
EXFOLIATED CERVICAL CELLS BEFORE AND AFTER RADIATION THERAPY OF CARCINOMA OF CERVIX



Miss Usanee Suvimoltheerabute

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Medical Science

Programme of Medical Science

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic Year 2001

ISBN 974-03-0882-1

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การเปลี่ยนแปลงของอินพราเรดสเปกตรัมที่สัมพันธ์กับหมู่ฟอสโฟได-เอสเทอร์ของกรดนิวคลีอิกในเซลล์ปากมดลูก ก่อนและหลังการรักษามะเร็งปากมดลูกด้วยรังสีรักษา
โดย	นางสาวอุษณีย์ สุวิมลธีระบุตร
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์การแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ นายแพทย์พิเชฐ สัมปทานกุล
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วราภรณ์ ลิขิตพัฒนไพบูลย์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สนอง เอกสิทธิ์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีคณะแพทยศาสตร์
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ภิรมย์ กมลรัตนกุล)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ แพทย์หญิงวิไล ชินธเนศ)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์พิเชฐ สัมปทานกุล)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วราภรณ์ ลิขิตพัฒนไพบูลย์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สนอง เอกสิทธิ์)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ประเสริฐ ตริวิจิตรศิลป์)

อุษณีย์ สุวิมลธีระบุตร : การเปลี่ยนแปลงของอินฟราเรดสเปกตรัมที่สัมพันธ์กับหมู่ฟอสโฟไดเอสเทอร์ของกรดนิวคลีอิก ในเซลล์ปากมดลูก ก่อน และหลังการรักษามะเร็งปากมดลูกด้วยรังสี. (Changes of Infrared Spectrum Associated to Phosphodiester Groups of Nucleic Acid in Exfoliated Cervical Cells Before and After Radiation Therapy of Carcinoma of Cervix) อ.ที่ปรึกษา : รศ.นพ.พิเชฐ สัมปทานกุล, อ.ที่ปรึกษาร่วม : ผศ.ดร.วราภรณ์ ลิพิพัฒน์ไพบูลย์ อ.ที่ปรึกษาร่วม : ผศ.ดร.สนอง เอกสิทธิ์ จำนวนหน้า 61หน้า. ISBN 974-03-0882-1.

เทคนิคอินฟราเรดสเปกโทรสโคปี (FT-IR spectroscopy) เป็นเทคนิคที่ใช้ศึกษาโครงสร้างของสารประกอบอินทรีย์ โดยบอกถึงหมู่ฟังก์ชันต่างๆ ที่ปรากฏออกมาที่เลขคลื่นต่างกัน ในรูปแบบของอินฟราเรดสเปกตรัม การศึกษาครั้งนี้เป็นแบบ descriptive study โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของอินฟราเรดสเปกตรัมที่สัมพันธ์กับหมู่ฟอสโฟไดเอสเทอร์ของกรดนิวคลีอิกของเซลล์หลังการรักษาด้วยรังสี ระยะเวลา 2 เดือน ในผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูก โดยเปรียบเทียบกับเซลล์ก่อนการรักษา และเซลล์ปากมดลูกปกติ จากผู้ป่วย และผู้เข้ามารับการตรวจที่สถาบันมะเร็งแห่งชาติ จำนวน 30 ราย ตั้งแต่เดือน พฤศจิกายน 2543 ถึง ตุลาคม 2544 และคำนวณค่าความแตกต่าง โดยใช้ Pair t-test ซึ่งผลการศึกษาพบว่า ค่าการเปลี่ยนแปลงของอินฟราเรดสเปกตรัมที่สัมพันธ์กับหมู่ฟอสโฟไดเอสเทอร์ของกรดนิวคลีอิกของเซลล์ก่อน และหลังการรักษาด้วยรังสี ไม่แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.075$) และเลขคลื่นของหมู่ฟอสโฟไดเอสเทอร์ของกรดนิวคลีอิกในเซลล์ปกติ พบที่ 1080 cm^{-1} ในขณะที่เซลล์ก่อนและหลังการรักษาด้วยรังสี พบมีการเคลื่อนของตำแหน่งการดูดกลืนของพีคไปที่ตำแหน่งเลขคลื่นสูงขึ้นหรือต่ำลง ในผู้ป่วยแต่ละราย อยู่ในช่วงคลื่น $1078-1084 \text{ cm}^{-1}$ การศึกษานี้สรุปได้ว่า อินฟราเรดสเปกตรัมที่สัมพันธ์กับหมู่ฟอสโฟไดเอสเทอร์ของกรดนิวคลีอิก ไม่แสดงความแตกต่างกัน ในเซลล์ก่อนและหลังการรักษาด้วยรังสี อย่างมีนัยสำคัญ ฉะนั้นการประยุกต์ใช้เทคนิค FT-IR spectroscopy ในการศึกษาเซลล์หลังการรักษาด้วยรังสี จึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

หลักสูตร วิทยาศาสตร์การแพทย์	ลายมือชื่อนิติ.....
สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ปีการศึกษา 2544	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....
	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

สถาบันราชภัฏรำไพพรรณี
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

427 52772 30 : MAJOR MEDICAL SCIENCE

KEYWORDS : INFRARED SPECTRUM / NUCLEIC ACID / RADIATION THERAPY / CARCINOMA OF CERVIX

USANEE SUVIMOLTHEERABUTE : CHANGES OF INFRARED SPECTRUM ASSOCIATED TO PHOSPHODIESTER GROUPS OF NUCLEIC ACID IN EXFOLIATED CERVICAL CELLS BEFORE AND AFTER RADIATION THERAPY OF CARCINOMO OF CERVIX. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. PICHET SAMPATANUKUL, M.D., THESIS COADVISOR : ASSIS. PROF. VARAPORN LEEPIPATPIBOON, Ph.D., THESIS COADVISOR : ASSIS. PROF. SANONG EKGASIT, Ph.D. 61 pp. ISBN 974-03-0882-1.

FT-IR spectroscopy is a technique for probing molecular structure of organic compounds. It can discriminate functional groups by displaying peaks at wavenumber directly related to chemical structure. In this descriptive study, changes of Infrared spectrum associated to phosphodiester groups of nucleic acid in exfoliated cervical cells after radiation therapy of carcinoma of cervix for 2 months were compared with exfoliated cervical cells before radiation therapy and with normal cervical cells. The samples were taken from 30 patients in National Cancer Institute during November 2000 to October 2001. Their differences were evaluated by Pair t-test. The results, indicate no differentiated between infrared spectrum associated to phosphodiester groups of nucleic acid in cervical cell before and after radiation therapy: However, the differences were statistically insignificant ($p = 0.075$). Moreover, the wavenumber of phosphodiester groups of nucleic acid was found at 1080 cm^{-1} in all normal cervical cell contrasting a range of wavenumber that both before and after radiation samples were found shifted to a lower or higher wavenumber (between $1078\text{-}1084\text{ cm}^{-1}$) in cervical cell before and after radiation therapy. In conclusion, infrared spectrum associated to phosphodiester group of nucleic acid could not differentiate in cervical cell before and after radiation. The potential practical application of FT-IR spectroscopy in cervical cell after radiation therapy must be further evaluated.

Programme of Medical Science

Student's signature.....

Field of study Medical Science

Advisor's signature.....

Academic year 2001

Co-advisor's signature.....

Co-advisor's signature.....

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ นายแพทย์พิเชษฐ สัมปทานกุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วราภรณ์ ลีพิพัฒน์ไพบุลย์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สนอง เอกสิทธิ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาให้คำแนะนำ และช่วยเหลือเป็นอย่างดียิ่งตลอดเวลาการทำวิจัย รวมทั้งการเขียนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้เสร็จ โดยสมบูรณ์ ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ แพทย์หญิงวิไล ชินธเนศ และรองศาสตราจารย์ นายแพทย์ประเสริฐ ตรีวิจิตรศิลป์ ที่กรุณาให้คำแนะนำ และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

นอกจากนี้ผู้วิจัยขอขอบคุณหน่วยงานต่างๆ ที่มีส่วนช่วยเหลือการทำวิจัย ดังนี้

- กลุ่มงานมะเร็งนรีเวช และกลุ่มงานรังสีรักษา สถาบันมะเร็งแห่งชาติ ที่ช่วยเหลือในเรื่องการเก็บตัวอย่างเซลล์
 - กลุ่มงานวิจัยและค้นคว้า งานการศึกษาและวิจัยภาคสนาม, กลุ่มงานพยาธิวิทยา งานเซลล์วิทยา งานพยาธิวิทยา สถาบันมะเร็งแห่งชาติ ที่ช่วยเหลือ ในเรื่องการเตรียมเซลล์ตัวอย่าง การเก็บรักษาสภาพเซลล์, ผลการตรวจทางเซลล์วิทยา และพยาธิวิทยา
 - กลุ่มงานเวชทะเบียน และสถิติ สถาบันมะเร็งแห่งชาติ ที่ช่วยเหลือ ในเรื่องการสืบค้น และติดตามผู้ป่วย
 - ภาควิชาเคมี กลุ่มวิจัย Spectroscopy Research Group ของอ.ดร.สนอง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ เครื่องมือ อุปกรณ์ในการวิจัย
 - เพื่อนๆ ปรียญาโททุกคน
- ผู้วิจัยขอขอบคุณทุกท่านมา ณ ที่นี้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ	ฉ
สารบัญ	ช
สารบัญตาราง	ฅ
สารบัญภาพ	ญ
บทที่	
1. บทนำ	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
คำถามของการวิจัย	4
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	4
สมมติฐานของการวิจัย	5
ขอบเขตของการวิจัย	5
ข้อตกลงเบื้องต้น	5
คำสำคัญ	6
คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย	6
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	7
ขั้นตอนดำเนินการวิจัย	7
2. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	9
เทคนิค FT-IR spectroscopy กับจุดเริ่มของการศึกษาเกี่ยวข้องกับเนื้อเยื่อ และเซลล์	9
เทคนิค FT-IR spectroscopy กับการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้าง โมเลกุลในเซลล์มะเร็ง	10
สิ่งปนเปื้อนที่มีผลต่อการศึกษาโครงสร้างโมเลกุล โดยเทคนิค FT-IR spectroscopy	11
การเปรียบเทียบเทคนิค FT-IR spectroscopy กับวิธีเดิม คือ Pap smear	12
การรักษามะเร็งปากมดลูกด้วยรังสี, อูปสรรค และแนวทาง	13
3. วิธีดำเนินการวิจัย	14

บทที่	หน้า
ประชากร	14
เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย	15
สารเคมี	16
การดำเนินการวิจัย	16
การวิเคราะห์ข้อมูล.....	.22
4. ผลการวิเคราะห์ข้อมูล	23
กลุ่มตัวอย่าง	23
การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของเซลล์ที่ศึกษา	23
การเปรียบเทียบอินฟราเรดสเปกตรัมของเซลล์ตัวอย่าง โดยเทคนิค FT-IR spectroscopy	25
การวิเคราะห์ทางสถิติ	30
5. สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ	36
รายการอ้างอิง	38
ภาคผนวก	43
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	61

สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
1. FIGO staging ของมะเร็งปากมดลูก พ.ศ.2538.....	1
2. รูปแบบการสั้นของหมู่ฟังก์ชันที่ศึกษา.....	30
3. ค่า Integrate area ที่คำนวณได้จากเครื่อง FT-IR หลังจากทำ curve fitting แล้วของ หมู่ฟอสโฟไดเอสเทอร์ของกรดนิวคลีอิก ในเซลล์มะเร็งปากมดลูกก่อน และหลังการรักษาด้วยรังสี.....	30
4. การเปรียบเทียบตำแหน่งเลขคลื่นกับการศึกษาที่ผ่านมา.....	36
5. ช่วงต่างๆ ของอินฟราเรดสเปกตรัม.....	44
6. ช่วงเลขคลื่นของอินฟราเรดสเปกตรัม ในโครงสร้างระดับ macromolecule ของเซลล์.....	49
7. การรายงานผลการตรวจ Pap smear ในระบบเบเทสดา (TBS).....	55

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

ภาพประกอบ	หน้า
1. สถิติค่าเฉลี่ยของโรคมะเร็ง 10 อันดับแรกในเพศหญิง พ.ศ.2536.....	1
2. การเชื่อมต่อของหมู่ฟอสโฟไดเอสเทอร์ของกรดนิวคลีอิก.....	4
3. การเก็บเซลล์ตัวอย่าง	17
4. ตัวอย่างเซลล์ในหลอด microtube.....	18
5. การเตรียม sample holder.....	18
6. การวัดสเปกตรัมของเซลล์ตัวอย่าง.....	19
7. การป้ายเซลล์ลงบน Infrared window.....	20
8. การทำ Baseline correction.....	20
9. การทำ Normalize.....	21
10. การทำ Curve fitting.....	21
11. ลักษณะเซลล์มะเร็งชนิด Squamous cell carcinoma ก่อนการรักษา.....	24
12. ลักษณะเซลล์หลังการรักษาด้วยรังสี.....	24
13. ลักษณะอินฟราเรดสเปกตรัมของเซลล์มะเร็งปากมดลูกก่อนการรักษา.....	25
14. ลักษณะอินฟราเรดสเปกตรัมของเซลล์มะเร็งปากมดลูกหลังการรักษาด้วยรังสี.....	26
15. รูปแบบอินฟราเรดสเปกตรัมที่มีค่า absorbance ของหมู่ฟอสโฟไดเอสเทอร์ของ กรดนิวคลีอิกลดลง.....	27
16. รูปแบบอินฟราเรดสเปกตรัมที่มีค่า absorbance ของหมู่ฟอสโฟไดเอสเทอร์ของ กรดนิวคลีอิกเพิ่มขึ้น.....	28
17. การเปรียบเทียบตำแหน่งแลชคลื่นของผู้ป่วยก่อน และหลังการรักษาด้วยรังสี.....	28
18. อินฟราเรดสเปกตรัมของเซลล์ปกติ.....	29
19. การเปรียบเทียบค่าอินฟราเรดสเปกตรัมของหมู่ฟอสโฟไดเอสเทอร์ของกรดนิวคลีอิก ในเซลล์ปากมดลูกก่อน และหลังการรักษาด้วยรังสี.....	32
20. การวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม SPSS.....	33
21. การศึกษาเนื้อเยื่อโดยใช้ เครื่อง Infrared Micro-Spectroscopy.....	37
22. ตัวอย่างการสั่นการยืด และการสั่นแบบงอ.....	45
23. การสั่นแบบ simple harmonic oscillator และ curve การเปลี่ยนแปลงของพลังงาน ศักย์ที่เกิดขึ้น.....	46

สารบัญญภาพ (ต่อ)

ภาพประกอบ	หน้า
24. ลักษณะสเปกตรัมที่ได้จากการส่งผ่านรังสีออกมา.....	47
25. ส่วนประกอบของเครื่อง FT-IR.....	48
26. วิวัฒนาการ และการเจริญของรูปแบบของเซลล์มะเร็งปากมดลูก.....	51
27. วิธีการเตรียมสเมียร์.....	53
28. การสลายตัวของเซลล์ โดยกระบวนการ apoptosis.....	59
29. การสลายตัวของเซลล์โดยกระบวนการ necrosis.....	60



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

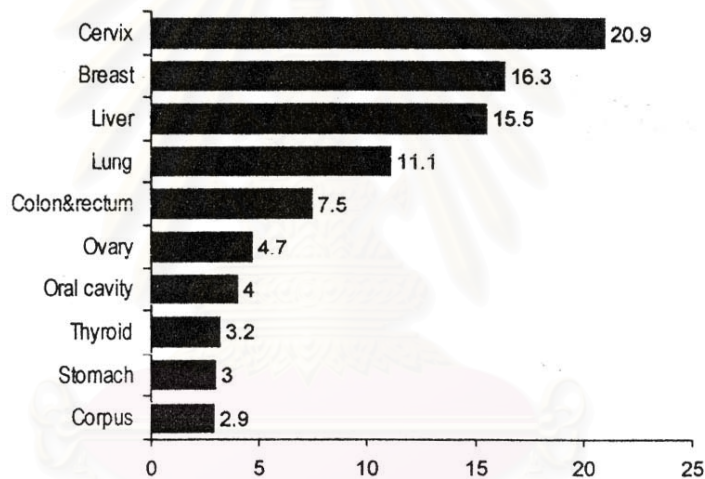
บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

มะเร็งปากมดลูกเป็นมะเร็งที่พบมากที่สุดในสตรีไทย จากรายงานใน Cancer in Thailand ของ IARC (International Agency for Research on Cancer, World Health Organization) ปี พ.ศ. 2542 ประมาณการว่าประเทศไทย มีจำนวนผู้ป่วยมะเร็งที่พบใหม่ 63,741 รายต่อปี เป็นเพศชาย 32,801 ราย และเป็นเพศหญิง 30,940 ราย โดยโรคมะเร็งที่พบมากที่สุดในเพศหญิงคือ มะเร็งปากมดลูก จำนวน 5,462 ราย คิดเป็นอุบัติการณ์ประมาณ 20.9 รายต่อประชากร 100,000 ราย⁽¹⁾ ดังรูปที่ 1

รูปที่ 1 สถิติค่าเฉลี่ยของโรคมะเร็ง 10 อันดับแรกในเพศหญิง พ.ศ. 2536



มะเร็งชนิดนี้จะพบสูงในประเทศที่กำลังพัฒนา ซึ่งรวมถึงประเทศไทย จึงก่อให้เกิดปัญหาและการสูญเสียทางเศรษฐกิจสูงมาก โดยปัจจุบันยังพบว่าอายุเฉลี่ยของมะเร็งชนิดนี้เริ่มเพิ่มขึ้นตั้งแต่อายุ 20 ปีขึ้นไป โดยอัตราเสี่ยงของมะเร็งปากมดลูกนี้จะสัมพันธ์กับการมีเพศสัมพันธ์ตั้งแต่อายุยังน้อย, การมีคู่นอนหลายคน, การสูบบุหรี่, การใช้ยาคุมกำเนิดเป็นระยะเวลานาน และการติดเชื้อ ซึ่งการติดเชื้อทางเพศสัมพันธ์ที่สำคัญคือ การติดเชื้อ Human Papilloma Virus (HPV) โดยเฉพาะการติดเชื้อ HPV ชนิด 16 และ 18 มีโอกาสเสี่ยงสูงที่จะพัฒนาเป็นมะเร็งปากมดลูกมากกว่าสตรีปกติที่ไม่มีการติดเชื้อ และจากการศึกษาพบ HPV-DNA ถึง 82-91%

ของมะเร็งปากมดลูกในสตรีไทย โดยมี HPV ชนิด 16 และ 18 ถึง 63-65% ขณะที่สตรีที่พบ HPV-DNA เพียง 9.4%⁽¹⁾

ในการรักษามะเร็งปากมดลูกนั้น สิ่งจำเป็นที่แพทย์ผู้รักษาต้องทราบ และเข้าใจก่อนอื่นเพื่อเป็นหลักในการตัดสินใจว่าจะรักษาด้วยวิธีใด คือ การแบ่งระยะ (stage) ของมะเร็งการ Staging ที่เป็นที่ยอมรับและใช้กันอย่างแพร่หลาย คือ International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) ซึ่งมีรายงานอยู่ใน Annual Report on the Results of Treatment in Gynecological Cancer นับตั้งแต่ปี พ.ศ. 2480 โดยมีการเปลี่ยนแปลง และเพิ่มเติมเป็นระยะๆ เรื่อยมาจนถึงปีล่าสุด พ.ศ. 2538⁽²⁾ ดังตารางที่ 1

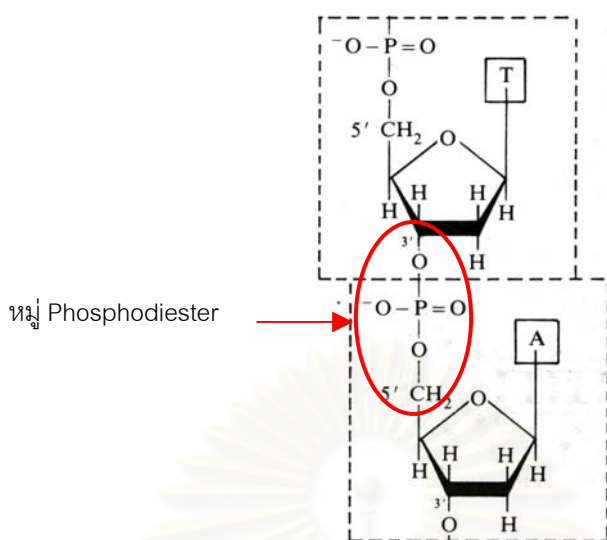
ตารางที่ 1 FIGO staging ของมะเร็งปากมดลูก, พ.ศ. 2538

Stage I	<p>Carcinoma is strictly confined to the cervix (extension to the corpus should be disregarded)</p> <p>IA Invasive Cancer identified only microscopically</p> <p>IA1 Measured invasion of stroma no greater than 3 mm in depth and no wider than 7 mm</p> <p>IA2 Measured invasion of stroma greater than 3 mm and no greater than 5 mm and no wider than 7 mm</p> <p>IB Clinical lesion confined to the cervix or preclinical lesion greater than IA</p> <p>IB1 Clinical lesion no greater than 4 cm in size</p> <p>IB2 Clinical lesion greater than 4 cm in size</p>
Stage II	<p>Carcinoma extends beyond the cervix but has not extended on to the pelvic wall; the carcinoma involves the vagina but not as far as the lower third</p> <p>IIA No obvious parametrial involvement</p> <p>IIB Obvious parametrial involvement</p>
Stage III	<p>Carcinoma has extended to the pelvic wall, on rectal examination, there is no cancer-free space between the tumor and pelvic wall; the tumor involves the lower third of the vagina, all cases with a hydronephrosis or non functioning kidney should be included unless they are known to be due to other cause</p> <p>IIIA Involvement of the lower third of the vagina</p> <p>IIIB Extension onto the pelvic wall or hydronephrosis or non functioning kidney</p>
Stage IV	<p>Carcinoma has extended beyond true pelvis or has clinically involved the mucosa of the bladder or rectum</p> <p>IVA Spread to the growth to adjacent organs</p> <p>IVB Spread to distant organs</p>

จากสถิติของสถาบันมะเร็งแห่งชาติ พบมะเร็งปากมดลูกระยะลุกลามมากกว่าครึ่งอยู่ในระยะที่ 2 และ 3 คือในระยะที่ 2 คิดเป็น 35.2% และในระยะที่ 3 คิดเป็น 29.6% ของมะเร็งปากมดลูกทั้งหมด⁽³⁾ การรักษามะเร็งปากมดลูกในระยะที่ 2 และ 3 นี้ จะใช้การรักษาด้วยรังสีเป็นหลัก ซึ่งมีวัตถุประสงค์เพื่อการหายขาดจากโรค⁽⁴⁾ แต่การรักษาด้วยรังสีนั้นมีโอกาสกลับคืนมาของมะเร็งได้ ภายหลังกการรักษาอย่างได้ผล โดยในมะเร็งปากมดลูกระยะที่ 2 พบร้อยละ 12.9 และในระยะที่ 3 ร้อยละ 29.8⁽⁵⁾ ฉะนั้น หลังการรักษา จึงต้องมีการติดตามผลการรักษา เพื่อตรวจว่ามีการกลับคืนมาของโรคหรือไม่ การติดตามทางห้องปฏิบัติการที่เป็นที่ยอมรับอยู่ในปัจจุบัน คือการตรวจทางเซลล์วิทยา หรือที่เรียกว่า แป๊ปสเมียร์ (Pap smear) เป็นการตรวจทางรูปลักษณะ (morphology) ของเซลล์ ข้อดีของวิธีนี้ คือเป็นวิธีการที่คุ้นเคย และเป็นที่ยอมรับว่าสามารถตรวจพบการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ในส่วนที่แพทย์มองไม่เห็นด้วยตาเปล่า หรือมองเห็นแต่ไม่แน่ใจ แต่การตรวจชนิดนี้มีข้อจำกัด คือความไว (sensitivity) ต่ำ และความยากในการแปลผล เนื่องจากผลของรังสี จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงต่อเนื้อเยื่อ และเซลล์ จากการศึกษพบว่า รังสีทำลายเซลล์ใน 3 รูปแบบ คือ reproductive death, apoptosis และ necrosis⁽⁶⁾ ทำให้เกิดพังผืด (fibrosis) หรือเนื้อเยื่อเกี่ยวพันเพิ่มขึ้น จึงปิดบังเซลล์มะเร็งที่อาจมีอยู่ข้างใต้ นอกจากนี้ยังทำให้รูปลักษณะของเซลล์ปกติเปลี่ยนแปลงไป ทำให้ยากต่อการแปลผลว่า รูปลักษณะของเซลล์ที่ผิดปกติที่พบเห็นเป็นผลของรังสี หรือเป็นเซลล์มะเร็งเกิดใหม่

เทคนิคอินฟราเรดสเปกโทรสโกปี (Fourier transform infrared spectroscopy: FT-IR) เป็นเทคนิคหนึ่งที่ได้มีการทดลองตรวจสอบเซลล์ของปากมดลูกเช่นกัน เทคนิคนี้ เป็นวิธีการใหม่ในประเทศไทย แต่เป็นเทคนิคที่ได้รับการทดลอง และเป็นที่ยอมรับในประเทศต่างๆ เช่น แคนาดา สหรัฐอเมริกา และออสเตรเลีย เป็นต้น ว่าสามารถแยกเซลล์มะเร็งปากมดลูกกับเซลล์ปกติได้อย่างชัดเจน⁽⁷⁻¹⁰⁾ และมีประสิทธิภาพสูง โดยหลักการของเทคนิคนี้ จะแตกต่างจากการตรวจรูปลักษณะของเซลล์ โดย Pap smear คือ อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี จะตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างในระดับโมเลกุล จากหมู่ฟังก์ชันภายในสารชีวโมเลกุล (biomolecules) และจะแสดงผลออกมาในรูปแบบกราฟ หรืออินฟราเรดสเปกตรัมที่สามารถนำมาแปลผลได้ว่า เซลล์ตัวอย่างของปากมดลูก เป็นเซลล์ปกติ, ผิดปกติ หรือเป็นมะเร็งแล้ว โดยสารชีวโมเลกุลที่สำคัญต่อการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ คือ กรดนิวคลีอิก ซึ่งในธรรมชาติแบ่งออกเป็นสองชนิด คือ ดีเอ็นเอ (DNA) และอาร์เอ็นเอ (RNA) โดยทั้งสองชนิดนี้ จะมีหมู่ฟอสโฟไดเอสเทอร์เป็นหมู่ฟังก์ชันนำเชื่อมอยู่ระหว่างน้ำตาลสองตัว เรียกว่า Phosphodiester linkage⁽¹¹⁾ ดังรูปที่ 2

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 2 การเชื่อมต่อของหมู่ฟอสโฟไดเอสเทอร์ของกรดนิวคลีอิก

จากการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ปกติเป็นเซลล์มะเร็งพบว่า มีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ และอาร์เอ็นเอ เพิ่มขึ้น⁽¹²⁾ ส่งผลให้มีการเพิ่มขึ้นของหมู่ฟอสโฟไดเอสเทอร์ด้วย ซึ่งสามารถตรวจพบได้โดยเทคนิค FT-IR spectroscopy นี้ และจากการศึกษาโดยเทคนิคนี้ยังพบอีกว่าการเปลี่ยนแปลงของสารชีวโมเลกุลของเซลล์นี้ จะเกิดขึ้นก่อนการเปลี่ยนแปลงรูปลักษณะของเซลล์นั้นๆ⁽⁹⁾ จึงอาจจะกล่าวโดยสรุปได้ว่าเทคนิคนี้เป็นทางเลือกใหม่ที่น่าสนใจในการนำมาใช้ในการติดตามผลการรักษาด้วยรังสี และสิ่งที่เราคาดหวังในเทคนิคนี้ คือ รังสีจะไม่มีผลต่อ อินฟราเรดสเปกตรัมของเซลล์หลังการรักษาด้วยรังสี

อย่างไรก็ตามยังไม่มีการศึกษาเกี่ยวข้องกับข้อมูลพื้นฐานของเทคนิคอินฟราเรด สเปกโทรสโคปีในการตรวจเซลล์ภายหลังจากการได้รับรังสีรักษา ผู้วิจัยจึงได้ขอทำการศึกษาในเรื่องนี้เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นที่จะนำไปสู่การพัฒนาการนำเทคนิคอินฟราเรดสเปกโทรสโคปีมาใช้ประโยชน์ในการติดตามการเกิดเป็นซ้ำของมะเร็งปากมดลูกภายหลังจากได้รับรังสีรักษาในอนาคต

คำถามของการวิจัย

คำถามหลัก การเปลี่ยนแปลงของกรดนิวคลีอิกของเซลล์หลังการรักษาด้วยรังสีรักษา 2 เดือน มีความเหมือนหรือ แตกต่างกันอย่างไร กับของเซลล์มะเร็งปากมดลูกก่อนการรักษา

คำถามรอง อินฟราเรดสเปกตรัมที่สัมพันธ์กับหมู่ฟอสโฟไดเอสเทอร์ของกรดนิวคลีอิกของเซลล์หลังการรักษาด้วยรังสีรักษา 2 เดือน มีความเหมือน หรือแตกต่างกันหรือไม่ อย่างไร กับอินฟราเรดสเปกตรัมของเซลล์ปกติ

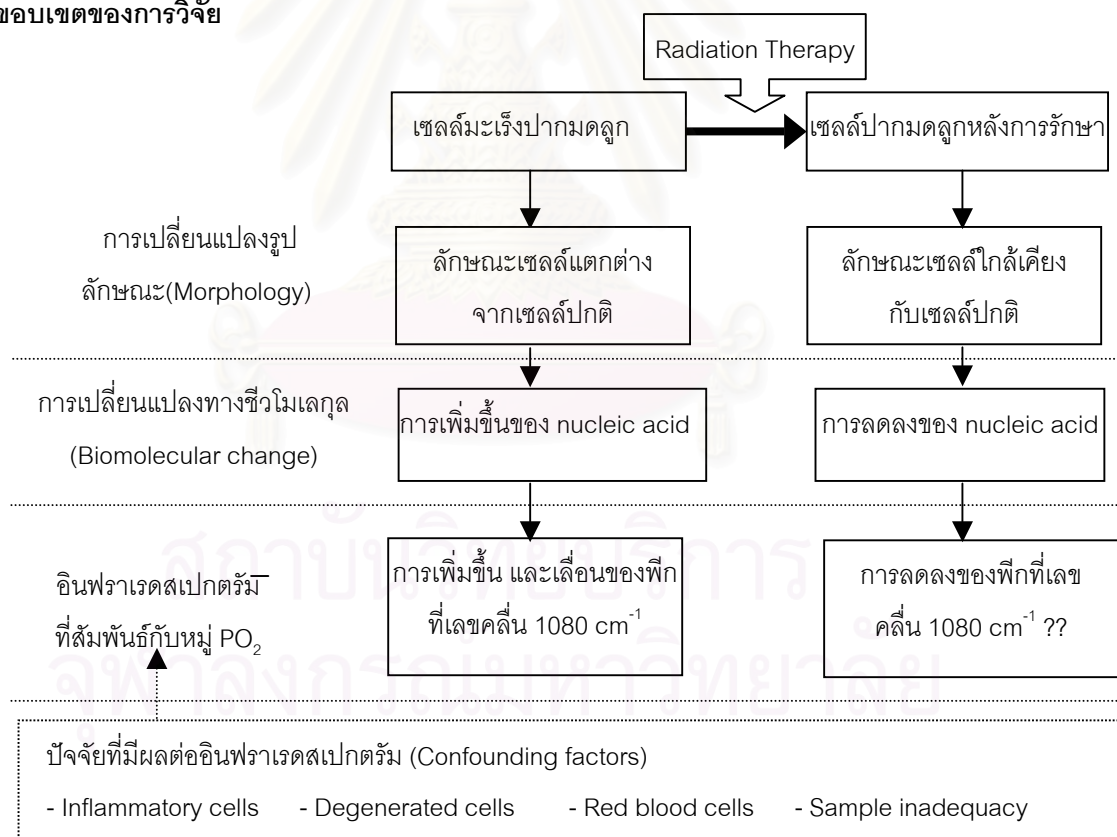
วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของอินฟราเรดสเปกตรัมที่สัมพันธ์กับหมู่ฟอสโฟไดเอสเทอร์ของกรดนิวคลีอิกของเซลล์หลังการรักษาด้วยรังสีรักษาเป็นระยะเวลา 2 เดือนในผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูก โดยเปรียบเทียบกับเซลล์ก่อนการรักษาด้วยรังสีรักษา และเซลล์ปากมดลูกปกติ

สมมติฐานของการวิจัย

ลักษณะของอินฟราเรดสเปกตรัมที่สัมพันธ์กับหมู่ฟอสโฟไดเอสเทอร์ของกรดนิวคลีอิกของเซลล์หลังการรักษาด้วยรังสีรักษา ในระยะเวลา 2 เดือนในผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูก มีความแตกต่างกับเซลล์ก่อนการรักษา โดยเซลล์หลังการรักษา น่าจะมีลักษณะสเปกตรัมกลับมาเหมือนกับเซลล์ปกติ

ขอบเขตของการวิจัย



ข้อตกลงเบื้องต้น

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาเชิงพรรณนา (Descriptive Study) โดยประชากรที่ศึกษา คือผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูก จะได้รับสิ่งแทรกแซง หรือการรักษาด้วยรังสี นั้นอยู่แล้วในการรักษาตามปกติ ซึ่งผู้วิจัยเพียงแค่

เฝ้าติดตามผลที่จะเกิดขึ้น คือศึกษาการเปลี่ยนแปลงของอินฟราเรด สเปกตรัมของเซลล์หลังการรักษาด้วยรังสี และนำมาเปรียบเทียบกับ การเปลี่ยนแปลงของอินฟราเรดสเปกตรัมของเซลล์ก่อนการรักษาด้วยรังสีเท่านั้น และในการวิจัยนี้ได้ทำการทดลองเพิ่มเติมในส่วนของคุณสมบัติ เพื่อนำอินฟราเรดสเปกตรัมที่ได้มาเปรียบเทียบกับผลของเซลล์หลังการรักษาด้วยรังสี

คำสำคัญ

Infrared Spectrum

Nucleic acid

Radiation Therapy

Carcinoma of Cervix

คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย

เทคนิคอินฟราเรดสเปกโทรสโกปี (Fourier transform infrared spectroscopy: FTIR) คือเทคนิคที่ใช้ตรวจสอบในระดับโมเลกุล จากหมู่ฟังก์ชันนัลภายในสารชีวโมเลกุลนั้น และแสดงผลออกมาในรูปแบบกราฟ หรือ อินฟราเรดสเปกตรัม

รังสีรักษา หมายถึง การรักษาด้วยการใส่แร่เข้าไปในโพรงมดลูก ร่วมกับการฉายรังสีจากด้านนอกร่างกาย ซึ่งเป็นแนวทางการรักษามาตรฐานในปัจจุบันสำหรับผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกระยะลุกลาม ตั้งแต่ Stage IB เป็นต้นไป

แนวทางการมาตรฐานที่ใช้รักษาผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกระยะที่ 2 และ 3 ของสถาบันมะเร็งแห่งชาติ คือระยะที่ 2 (Stage II) – การฉายรังสีจากภายนอกจะฉายรังสีบริเวณอุ้งเชิงกรานทั้งหมด (whole pelvis) ประมาณ 4,000 - 4,500 Gray ร่วมกับการใส่แร่เดี่ยว 3,000 Gray ที่จุด A (จุด A คือจุดที่ห่างจากปากมดลูกออกด้านข้าง 2 ซม. และสูงจากปากมดลูกขึ้นไป 2 ซม.)

ระยะที่ 3 (Stage III) – การฉายรังสีจากภายนอกจะฉายรังสีบริเวณอุ้งเชิงกรานทั้งหมด ประมาณ 5,000 Gray ร่วมกับการใส่แร่เดี่ยว 3,000 Gray ที่จุด A

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การเปลี่ยนแปลงก่อนการรักษา หมายถึง ตัวอย่างที่ได้จากผู้ป่วยขณะที่มีภาวะวินิจฉัยทางเซลล์วิทยา หรือพยาธิวิทยาว่าเป็นมะเร็งปากมดลูกระยะลุกลาม

การเปลี่ยนแปลงหลังการรักษา หมายถึง ตัวอย่างที่ได้จากผู้ป่วยที่ได้รับรังสีรักษาครบถ้วนแล้ว เป็นระยะเวลา 2 เดือน อันแบ่งระยะเวลาที่แพทย์จะนัดผู้ป่วยมาตรวจติดตามผลการรักษาครั้งแรกหลังจากการรักษาครบตามเกณฑ์กำหนด

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

เพื่อให้ได้ข้อมูลพื้นฐานที่จะใช้เป็นแนวทางในการศึกษา ปรับปรุง และพัฒนาเทคนิคอินฟราเรดสเปกโทรสโคปี ให้มีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้น สำหรับการติดตามการกลับเป็นซ้ำใหม่ของมะเร็งปากมดลูก ภายหลังการรักษาด้วยรังสีรักษาในอนาคต

ขั้นตอนดำเนินการวิจัย

กลุ่มตัวอย่างเซลล์

1. กลุ่มตัวอย่างเซลล์ของผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูก

- ใช้ตัวอย่างเซลล์ จากผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกที่มารับการตรวจรักษามะเร็งปากมดลูกที่สถาบันมะเร็งแห่งชาติ จำนวน 30 ราย โดยเก็บเซลล์ครั้งที่ 1 ในผู้ป่วยก่อนการรักษาด้วยรังสี ที่มีผลการตรวจ pap smear หรือผลตรวจชิ้นเนื้อเป็นมะเร็งปากมดลูก และเก็บเซลล์ครั้งที่ 2 ในผู้ป่วยคนเดิมหลังสิ้นสุดการรักษาด้วยรังสี ระยะเวลา 2 เดือน หรือระยะห่างจากการเก็บเซลล์ครั้งแรก 4 เดือน

2. กลุ่มตัวอย่างเซลล์ปกติ

- ใช้ตัวอย่างเซลล์ปกติ จากสตรีที่มาตรวจร่างกายประจำปี ที่มีผลการตรวจทาง pap smear และคลื่นปกติ จำนวน 20 ราย

ขั้นตอนในการวิจัย

จากกลุ่มตัวอย่างเซลล์ 1 และ 2 นำมาศึกษาโดย
ขั้นที่ 1 ผู้วิจัยรับตัวอย่างเซลล์ หรือสิ่งส่งตรวจ (specimens) จากแพทย์ที่ทำการตรวจ Pap smear ผู้ป่วยที่สถาบันมะเร็งแห่งชาติ โดยใช้ตัวอย่างจากการตรวจตามปกติของแพทย์ คือเมื่อแพทย์ทำการเก็บสิ่งส่งตรวจโดยใช้ spatula และแบ่งเป็น 2 ส่วน คือ

ส่วนที่ 1 จะทำสเมียร์ลงบนแผ่นกระจก fix ทันทันใน 95% ethyl alcohol เพื่อส่งตรวจทางเซลล์วิทยา หรือ pap smear และ

ส่วนที่ 2 คือส่วนที่เหลือติด spatula จะใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 50 ml ที่บรรจุ Normal saline solution อยู่ ซึ่งจะนำมาใช้ในการทดลองในครั้งนี้

ขั้นที่ 2 นำส่วนที่ 2 มาทำการเขย่า เพื่อให้เซลล์หลุดจาก spatula โดยเครื่อง Vortex mixture นำ spatula ออกจากนั้น ทำการ centrifuge ที่ 4000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทสารละลายส่วนบนออก นำส่วนที่เหลือใส่ใน microtube และนำไป centrifuge ต่อที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที และเทสารละลายส่วนบนออกให้เหลือแต่ตะกอนเท่านั้น นำส่วนที่เหลือมาทำการทดลองต่อ หรือเก็บในตู้แช่แข็ง -80°C เพื่อรอการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค FT-IR spectroscopy ต่อไป

ขั้นที่ 3 นำส่วนที่ได้จากขั้นที่ 2 มาป้ายลงบน Infrared window แล้วนำไปเข้าเครื่อง Vacuum filtration เพื่อดูดน้ำออก เก็บใน desiccator หรือตู้ควบคุมความชื้น

ขั้นที่ 4 ตรวจดูเซลล์ด้วยเครื่อง Fourier transform infrared spectroscopy ซึ่งจะให้ผลเป็น สเปกตราระหว่างปริมาณการดูดกลืน (absorbance) กับเลขคลื่นต่างๆ (wavenumber)

ขั้นที่ 5 นำสเปกตรภาพที่ได้ มาทำ baseline correction และ normalization เพื่อลดความผิดพลาดที่อาจจะเกิดจากความหนาของตัวอย่างที่ไม่เท่ากันด้วยพีค amide I (เลขคลื่น 1655 cm^{-1}) และให้มีค่า absorbance ต่ำสุด และสูงสุดที่ 0.0 และ 1.0 เนื่องจากสเปกตรัมของโปรตีนนี้ จะมีการเปลี่ยนแปลงค่า absorbance น้อยมากในเซลล์ จากนั้นทำ curve fitting เพื่อหา Integrate area ของสเปกตรัมที่ศึกษา ด้วย OPUS 3.0 spectroscopic software

ขั้นที่ 6 นำค่าที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยหลักทางสถิติ

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การศึกษาเกี่ยวกับมะเร็งปากมดลูกโดยใช้ เทคนิค FT-IR spectroscopy นี้ได้มีการศึกษา มากกว่า 10 ปี แล้ว ในต่างประเทศ แต่สำหรับในประเทศไทยนั้น เพิ่งจะมีการศึกษา เมื่อประมาณ 4 ปีนี้เอง และในการนำเทคนิคนี้มาศึกษาในเซลล์หลังการรักษาด้วยรังสี เพื่อใช้ในการติดตามการเกิดเป็นซ้ำของมะเร็งปากมดลูกนั้น ยังไม่มีผู้ทำการศึกษามาก่อน และจากการที่เทคนิคนี้ยังไม่เป็นที่รู้จักมากนัก ผู้เชี่ยวชาญทางด้านนี้มีอยู่จำกัดมาก และเครื่องมือมีน้อยมากในประเทศไทย ทำให้ไม่ได้รับความสนใจเท่าที่ควร

ดังนั้นผู้วิจัย จึงได้รวบรวมงานวิจัยที่ได้ทำไว้ในต่างประเทศ และในประเทศไทย โดยหัวข้องานวิจัยต่างๆ ที่ได้รวบรวมมาได้แก่

1. เทคนิค FT-IR spectroscopy กับจุดเริ่มของการศึกษาเกี่ยวกับเนื้อเยื่อ และเซลล์
2. เทคนิค FT-IR spectroscopy กับการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างโมเลกุลในเซลล์มะเร็ง
3. สิ่งปนเปื้อนที่มีผลต่อการศึกษาโครงสร้างโมเลกุล โดยเทคนิค FT-IR spectroscopy
4. การเปรียบเทียบเทคนิค FT-IR spectroscopy กับวิธีเดิม คือ Pap smear
5. การรักษามะเร็งปากมดลูกด้วยรังสี, อุปสรรค และแนวทาง

เทคนิค FT-IR spectroscopy กับจุดเริ่มของการศึกษาเกี่ยวกับเนื้อเยื่อ และเซลล์

เทคนิค FT-IR spectroscopy เป็นเทคนิคหนึ่งที่น่าจะใช้วิเคราะห์สารประกอบอินทรีย์ เนื่องจากสามารถพิสูจน์เอกลักษณ์ของสาร (Identify) ได้ดี⁽¹³⁾ และสามารถศึกษาเกี่ยวกับโครงสร้างโมเลกุล (molecular structure) ของสารชีวโมเลกุล อันได้แก่ โปรตีน, ไขมัน, และกรดนิวคลีอิก ได้โดยจะแสดงลักษณะที่แตกต่างกันนั้นในรูปของอินฟราเรดสเปกตรัม เทคนิค FT-IR spectroscopy นี้เริ่มต้นจากการค้นพบรังสีอินฟราเรดจากสเปกตรัมของคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า โดย Sir William Herschel นักดาราศาสตร์ชาวอังกฤษ ในปี ค.ศ. 1800⁽¹⁴⁾ ซึ่ง 35 ปีต่อมา ได้มีการค้นพบรังสีอินฟราเรดช่วงกลาง (mid infrared) และอีก 90 ปีต่อมาได้มีการพัฒนาเทคนิคนี้ และนำมาประยุกต์ใช้ในด้านต่างๆ ทั้งทางด้านฟิสิกส์, เคมี, ชีววิทยา และทางการแพทย์ ซึ่งทางการแพทย์ Woernley 1952⁽¹⁵⁾ ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบจากตัวอย่างของเนื้อเยื่อปกติ และเนื้อเยื่อมะเร็ง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โดยเทคนิคนี้ และสรุปว่า พบ DNA และ RNA ในเนื้อเยื่อหลายชนิด ที่บริเวณช่วงคลื่น 1250 – 909 cm^{-1} โดยรูปแบบของอินฟราเรดสเปกตรัม จะสัมพันธ์กับเลขคลื่น 1235, 1070 และ 971 cm^{-1} ซึ่งมีองค์ประกอบหลัก คือ น้ำตาลเพนโตส (pentose) และ กรดฟอสโฟริก (phosphoric acid) และความเข้มข้น (intensity) จะแสดงที่เลขคลื่น 1235, 1075 และ 971 cm^{-1} โดยจะสัมพันธ์กับ intensity ของ กรดนิวคลีอิก จากการศึกษาทำให้มีการศึกษาเพิ่มเติมในเนื้อเยื่อ และเซลล์จากส่วนต่างๆของร่างกาย

Benedetti et al. 1990⁽¹⁶⁾ ได้เริ่มทำการศึกษาดังตัวอย่างเซลล์ปกติ (normal cell) และเซลล์เนื้องอก (neoplastic cell) โดยเปรียบเทียบความแตกต่างของอินฟราเรดสเปกตรัม พบว่า มีการเพิ่มขึ้นของ intensity ที่เลขคลื่นหลักที่สัมพันธ์กับการสั่นของ PO_2 อย่างสมมาตร (symmetrical vibration) และการสั่นอย่างไม่สมมาตร (asymmetrical vibration) ของ DNA และค่าสัดส่วนของ integrate areas ที่เลขคลื่น 1080 cm^{-1} ของ DNA มีความแตกต่างกันทั้งในเซลล์ปกติและเซลล์ผิดปกติ และได้เสนอแนะว่าค่าพารามิเตอร์นี้อาจนำไปใช้เป็นจุดเริ่มในการแยกเนื้องอกในระยะเริ่มแรกได้

Wong et al. 1991⁽¹⁷⁾ ได้สรุปการศึกษาอินฟราเรดสเปกตรัมของเนื้อเยื่อ และเซลล์มะเร็งจากหลายๆ อวัยวะของร่างกาย พบว่า สิ่งสำคัญก่อนอื่นที่ควรรู้จัก คือการเปลี่ยนแปลงสเปกตรัมในโครงสร้างเดิมของเซลล์อาจเป็นผลมาจากส่วนหนึ่งของวิถีทาง (pathway) ของการก่อมะเร็ง (carcinogenesis) ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของสเปกตรัมที่สำคัญที่สุดในการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อและเซลล์มะเร็ง พบในการสั่นอย่างสมมาตรและไม่สมมาตรของหมู่ฟอสโฟไดเอสเทอร์

เทคนิค FT-IR spectroscopy กับการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างโมเลกุลในเซลล์มะเร็ง

เทคนิค FT-IR spectroscopy ได้ถูกนำเข้ามาประยุกต์ใช้ในการตรวจเซลล์จากปากมดลูก โดย Wong et al. 1991⁽⁹⁾ พบว่าเทคนิคนี้สามารถตรวจพบการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ได้ก่อนที่เซลล์จะเกิดการเปลี่ยนแปลงรูปลักษณะ โดยตรวจจากการเปลี่ยนแปลงของหมู่ฟังก์ชันนัลของสารภายในเซลล์ ซึ่งจะแสดงผลออกมาในรูปอินฟราเรดสเปกตรัมที่เปลี่ยนแปลงไป และพบพีกปกติของหมู่ฟอสโฟไดเอสเทอร์ จะแสดงที่เลขคลื่น 1082 และ 1244 cm^{-1}

Cohenford et al. 1998⁽¹⁸⁾ ได้นำเทคนิคนี้ มาตรวจสอบใน Individual cells โดยใช้ Infrared Micro-Spectroscopy พบว่า ในเซลล์ปากมดลูกปกติของผู้ป่วยที่เป็นเนื้องอก (neoplasia) มีลักษณะโครงสร้างทางโมเลกุลต่างจากเซลล์ปกติ ในผู้ป่วยที่ไม่เป็นเนื้องอก ซึ่งเป็นผลมาจากขบวนการเกิดมะเร็งปากมดลูก (cervical carcinogenesis)

จากการศึกษาที่ผ่านมาอาจจะกล่าวสรุปเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงของอินฟราเรดสเปกตรากับการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างโมเลกุลในเซลล์มะเร็ง ที่ศึกษาโดยเทคนิคนี้ได้ว่า^(8-10, 19)

1. เลขคลื่น 970 cm^{-1} พบสเปกตรัมใหม่ ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ลักษณะเซลล์มะเร็ง
2. เลขคลื่น 1023 และ 1155 cm^{-1} พบการลดลงของค่าการดูดกลืนแสงแสดงถึงการลดลงของระดับไกลโคเจนในเซลล์มะเร็ง
3. เลขคลื่น 1080 cm^{-1} พบการเลื่อนของสเปกตรัม และการเพิ่มขึ้นของค่า การดูดกลืนแสงแสดงถึงการเพิ่มขึ้นของ the symmetric phosphate stretching band ของ phosphodiester groups ของ nucleic acid ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้การเกาะกันแน่นของ nucleic acid ในเซลล์มะเร็ง
4. เลขคลื่น 1155 และ 1170 cm^{-1} พบการลดลงของค่าการดูดกลืนแสงแสดงถึงการลดลงของ hydrogen bond ของ C-OH groups ของคาร์โบไฮเดรต และโปรตีนจากการ phosphorylation ในเซลล์มะเร็ง
5. เลขคลื่น 1240 cm^{-1} พบการเลื่อนของสเปกตรัมไปที่เลขคลื่นประมาณ 1220 cm^{-1} และมีการเพิ่มขึ้นของค่าการดูดกลืนแสงแสดงถึงการเพิ่มขึ้นของ hydrogen bond บน phosphodiester groups ของ nucleic acid ในเซลล์มะเร็ง
6. เลขคลื่น 1400 และ 1455 cm^{-1} พบการเพิ่มขึ้นของค่าการดูดกลืนแสงแสดงถึงการเพิ่มขึ้นของระดับความไม่เป็นระเบียบของ methylene chains ใน membrane lipids ในเซลล์มะเร็ง

สิ่งปนเปื้อนที่มีผลต่อการศึกษาโครงสร้างโมเลกุล โดยเทคนิค FT-IR spectroscopy

การศึกษาโดยเทคนิคนี้ก็มีข้อจำกัดเช่นกัน Chiriboga et al. 1998⁽²⁰⁾ ได้ศึกษา สเปกตรัมจากเนื้อเยื่อมนุษย์ พบว่าการปนเปื้อนของ เม็ดเลือดแดง แบคทีเรีย (bacteria) เชื้อรา (fungi) และเมือก (mucus) จะทำให้รูปแบบสเปกตรัมต่างไปจากปกติได้

Wood et al. 1998⁽²¹⁾ ได้ศึกษาเซลล์ชนิดต่างๆ ในปากมดลูก และตัวแปรหรือสิ่งปนเปื้อน (contaminants) แต่ละชนิดที่จะมีผลต่อสเปกตรัมของเซลล์มะเร็ง โดยทำให้เกิดการแปรผลของสเปกตรัมผิดพลาดได้ คือ (1) เม็ดเลือดขาว โดยเฉพาะลิมโฟไซต์ (lymphocytes) ซึ่งพบเมื่อมีการทำลายของเนื้อเยื่อ จะแสดงสเปกตรัมในช่วง phosphodiester ($1300 - 1000\text{ cm}^{-1}$) เช่นกัน, (2) ไฟโบรบลาสต์ (fibroblast) พบลักษณะสเปกตรัมคล้ายกับเซลล์มะเร็ง ซึ่งสามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้เซลล์มะเร็งระยะลุกลามได้ เนื่องจากจะไม่พบเซลล์ชนิดนี้ในตัวอย่างที่ปกติ, (3) เมือกภายในปากมดลูก (endocervical mucin) พบสเปกตรัมคล้ายกับเซลล์

มะเร็ง โดยเฉพาะในช่วง secretory phase ของประจำเดือน ดังนั้นในการวินิจฉัยโดยใช้เทคนิคนี้ จึงต้องอาศัยรายละเอียดทางคลื่นร่วมด้วย, (4) เม็ดเลือดแดง (erythrocyte) พบการลดลงของสเปกตรัมที่เลขคลื่น 1080 cm^{-1} ด้วยเนื่องจากการขาด nucleic acid, (5) เกร็ดเลือด (thrombocytes) พบสเปกตรัมที่เลขคลื่น 980 และ 935 cm^{-1} ร่วมด้วย, (6) เซ็่อสุจิ (sperm) จะพบสเปกตรัมที่เลขคลื่น 981 และ 968 cm^{-1} ร่วมด้วย, (7) เซ็่อรา (Candida albicans) มีผลต่อสเปกตราน้อยมาก เหมือนกับแบคทีเรีย (bacteria) (8) ไนลอน (nylon) แสดงสเปกตรัมที่แตกต่างอย่างเด่นชัด

Cohenford et al. 1997⁽⁷⁾ ได้ศึกษาเซลล์เย็บปากมดลูกปกติ และผิดปกติ โดยทำการวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (Principal Component Analysis, PCA) ที่มีผลต่อสเปกตรัม พบว่า ในผู้ป่วยที่ atrophic และ neoplastic จะมีลักษณะสเปกตรัมที่คล้ายกันที่เลขคลื่น 1000-1200 cm^{-1} และเซลล์เม็ดเลือดแดง อาจจะสามารถสเปกตรัมได้

Wong 2001⁽²²⁾ ได้ศึกษาเพิ่มเติมพบว่า สเปกตรัมของเม็ดเลือดขาว โดยเฉพาะที่เลขคลื่น 1240 cm^{-1} จะมีลักษณะเหมือนกับลักษณะสเปกตรัมของเซลล์ระยะก่อนเป็นมะเร็ง และเซลล์ผิดปกติได้ ซึ่งจะนำไปสู่การอ่านผลที่เป็นผลบวกเทียมได้ (false positive)

การเปรียบเทียบเทคนิค FT-IR spectroscopy กับวิธีเดิม คือ Pap smear

จากการศึกษาเซลล์ปากมดลูกของ Yazdi et al. 1996⁽¹⁰⁾ ได้นำเทคนิคนี้มาศึกษาความเป็นไปได้ในการที่จะนำมาทำการตรวจคัดกรอง (screening) พบว่า ในผู้ป่วยที่มีผลการตรวจ Pap smear ผิดปกติ จะแสดงสเปกตรัมที่ต่างจากในผู้ป่วยที่มีผลการตรวจ Pap smear ปกติทุกราย

จากนั้น Fung et al. 1997⁽⁸⁾ ได้ทำการเปรียบเทียบเทคนิคนี้กับการตรวจ Pap smear โดยมีผลการตรวจทางพยาธิวิทยาเป็นมาตรฐาน (gold standard) ผลที่ได้คือ เทคนิคนี้มีควมไว (sensitivity) 98.6% ความจำเพาะ (specificity) 98.8% ผลลบเทียม (false negative) 1.4% และผลบวกเทียม (false positive) 1.2% โดยในการตรวจผู้ป่วย 12 รายที่เป็นมะเร็ง ไม่พบผลลบเทียมเลย ในขณะที่การตรวจ Pap smear พบถึง 3 ราย

ส่วนการศึกษาในประเทศไทยได้เริ่มมีการศึกษาในโครงการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์หรือ senior project จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดย ญัฐิยา และภัสสรพอล 2540⁽²³⁾ ได้ศึกษาดูตัวอย่างเซลล์ปากมดลูกจำนวน 100 ตัวอย่าง พบความแตกต่างของอินฟราเรดสเปกตรัมของเนื้อเยื่อปากมดลูกปกติกับเนื้อเยื่อปากมดลูกที่เป็นมะเร็งอย่างชัดเจนโดยเซลล์ปากมดลูกของคนปกติจะให้เส้นสเปกตรัมที่สำคัญ 3 พีก คือ

ที่เลขคลื่น 1026 cm^{-1} , 1080 cm^{-1} , และ 1155 cm^{-1} ขณะที่เซลล์ปากมดลูกในผู้ป่วยมะเร็งพบแถบช่วงพลังงานที่กว้าง มีการเลื่อนของพีคที่เลขคลื่น 1080 cm^{-1} เป็นเลขคลื่นที่ 1083 cm^{-1}

จิราวรรณ และ ศักกรพงศ์ 2542⁽²⁴⁾ ได้ทำการศึกษาต่อโดยนำมาศึกษาเพิ่มในสตรีไทย 1,000 ราย พบว่า การอักเสบของเนื้อเยื่อ และการใช้ยาคุมกำเนิดมีผลต่อสเปกตรัมได้ และทางด้านเทคนิคสามารถใช้ลมร้อนแทนลมเย็นได้ ในการเป่าเนื้อเยื่อตัวอย่างให้แห้งบน silica plate

การรักษา มะเร็งปากมดลูกด้วยรังสี, อุตสรรค และแนวทาง

การรักษา มะเร็งปากมดลูกด้วยรังสี เป็นการรักษาที่ได้ผลดี โดยพบว่า มะเร็งปากมดลูกในระยะที่ 2 และ 3 จะมีอัตราการรอดชีวิต (5 year survival) ประมาณร้อยละ 60-65 และร้อยละ 30-35 ตามลำดับ ขึ้นอยู่กับ การทำนายโรค (prognostic significance) ซึ่งได้แก่ ขนาดของก้อนมะเร็ง, การลุกลามไปยังต่อมน้ำเหลือง, grading ของ tumor และความลึกของปากมดลูกที่ถูกลุกลามด้วยมะเร็ง⁽²⁵⁾ การรักษาด้วยรังสีนั้น จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทั้งในเซลล์มะเร็ง และเซลล์ที่ไม่ใช่มะเร็ง ส่งผลให้การตรวจติดตามผู้ป่วยหลังการรักษาด้วยการตรวจ Pap smear มีความยากในการแปลผล คือต้องแยกลักษณะเซลล์ที่เปลี่ยนแปลงจากรังสีออกจากเซลล์มะเร็ง⁽²⁶⁾ นอกจากนี้ปัญหาสำคัญที่สุด คือผลลบลงจากการที่ผู้ป่วยหลังรับการรักษาด้วยรังสี มีเนื้อเยื่อพังผืด หรือไฟโบรซิส (fibrosis) เกิดขึ้น ปิดบังเซลล์มะเร็งที่อยู่ข้างใต้ Shield et al. 1992⁽²⁷⁾ ได้ศึกษาความเที่ยงของการตรวจ Pap smear ในผู้ป่วยหลังการรักษาด้วยรังสี เพื่อดูการกลับคืนมาของมะเร็ง (recurrence) พบว่ามีความไว (sensitivity) ต่ำ คือประมาณ 32.8 % แต่มีความจำเพาะ (specificity) สูง Campos 1970⁽²⁸⁾ พบว่าการที่ผลการตรวจ Pap smear เป็นผลลบ (negative) เมื่อจบการรักษาด้วยรังสีรักษาไม่ได้เป็นเครื่องรับประกันว่าจะปลอดจากมะเร็ง สิริศักดิ์ และเฉลิมศรี 2527⁽⁵⁾ พบว่าการกลับคืนมาของมะเร็งปากมดลูกระยะที่ 2 และ 3 จะเริ่มพบหลังการรักษาแล้ว 6 เดือนแรก และพบเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ เมื่อระยะเวลาผ่านไปนานมากขึ้น ฉะนั้นหลังการรักษาด้วยรังสี จึงควรมีการติดตามผลการรักษาอย่างสม่ำเสมอ

สำหรับงานวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของอินฟราเรดสเปกตรัมของกรดนิวคลีอิก ในเซลล์มะเร็งปากมดลูกก่อนและหลังการรักษาด้วยรังสีรักษา เนื่องจากยังไม่มีผู้ทำการศึกษามาก่อน ผลการศึกษาในครั้งนี้ จะเป็นข้อมูลพื้นฐานที่จะนำไปอ้างอิง และวางแผนการวิจัยในขั้นต่อไป เพื่อนำเทคนิคนี้มาใช้ในการติดตามการเกิดเป็นซ้ำของมะเร็งปากมดลูกในผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาด้วยรังสี ในอนาคต

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

ประชากร

1. ประชากรเป้าหมาย (Target population)

- ผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูก ระยะที่ 2 และ 3 ตาม FIGO Staging

2. ประชากรตัวอย่าง (Population to be Sampled)

- ผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูก ระยะที่ 2 และ 3 ตาม FIGO Staging ที่มารับการตรวจรักษาที่สถาบันมะเร็งแห่งชาติ จากระบบส่งต่อ (Refer case) ตั้งแต่เดือนพฤศจิกายน 2543 ถึง ตุลาคม 2544

การพิจารณาขนาดตัวอย่าง⁽³⁰⁾

จากการศึกษานำร่อง เปรียบเทียบผลของอินฟราเรดสเปกตรัม ในเซลล์ก่อนและหลังการรักษาด้วยรังสี พบว่าค่า Integrate area ของหมู่ฟอสโฟไดเอสเทอร์ ที่เลขคลื่น 1084 cm^{-1} เป็น 0.117 และ 0.396 ตามลำดับ

$$Z_{\alpha} = 1.64, \quad Z_{\beta} = 1.28, \quad \sigma^2 = 0.003, \quad d = 0.396 - 0.117 = 0.279$$

$$n \text{ pair} = (Z_{\alpha} + Z_{\beta})^2 \sigma^2 / d^2 \\ = (1.64 + 1.28)^2 (0.003)^2 / (0.279)^2 = 0.329$$

∴ จะต้องใช้ตัวอย่าง 0.329 ราย

หมายเหตุ: เนื่องจากข้อมูลค่า Integrate area ของหมู่ฟอสโฟไดเอสเทอร์ของเซลล์ก่อน และหลังการรักษาด้วยรังสี มีความแตกต่างกันมาก ทำให้ได้ขนาดตัวอย่างน้อย แต่ค่าการยอมรับจากความคิดเห็นของผู้เชี่ยวชาญในงานวิจัยในการศึกษาโรคมะเร็ง จะยอมรับกลุ่มตัวอย่าง 30 รายขึ้นไป ในการวิจัยนี้ จึงได้ศึกษาในผู้ป่วย 30 ราย ก่อนและหลังการรักษาด้วยรังสี

กฎเกณฑ์ในการคัดเลือกเข้า (Inclusion criteria) ได้แก่

- ผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกในระยะที่ 2 และ 3 ที่ได้รับการรักษาด้วยรังสีเป็นหลัก

กฎเกณฑ์ในการตัดออก (Exclusion criteria) ได้แก่

- ผู้ป่วยที่ตั้งครรภ์

- มีตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์ทางเทคนิค FT-IR spectroscopy ไม่ครบถ้วน (ทั้งก่อน และหลังการรักษาด้วยรังสี) หรือไม่เพียงพอที่จะแปลผล (ค่า absorbance < 0.05)

3. การเก็บตัวอย่างผู้ป่วย

เก็บตัวอย่างแบบ Non-Probability Sampling โดยวิธี Purposive Sampling คือสุ่มตัวอย่างโดยไม่อาศัยทฤษฎีความน่าจะเป็น การเลือกตัวอย่างจะถูกเลือกตามจุดมุ่งหมาย ซึ่งตัวอย่างมีโอกาสในการถูกเลือกไม่เท่ากัน โดยเลือกเฉพาะตัวอย่างที่มีอาการมาศึกษา หรือเลือกเฉพาะตัวอย่างที่มีลักษณะพิเศษ

4. กลุ่มตัวอย่างเซลล์ที่ใช้ในการศึกษา

4.1 กลุ่มตัวอย่างเซลล์ของผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูก

ใช้ตัวอย่างเซลล์ จากผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกที่ได้รับการตรวจรักษามะเร็งปากมดลูกที่สถาบันมะเร็งแห่งชาติ จำนวน 30 ราย โดยเก็บเซลล์ครั้งที่ 1 ในผู้ป่วยก่อนการรักษาด้วยรังสี ที่มีผลการตรวจ pap smear หรือผลตรวจชิ้นเนื้อเป็นมะเร็งปากมดลูก และเก็บเซลล์ครั้งที่ 2 ในผู้ป่วยคนเดิมหลังสิ้นสุดการรักษาด้วยรังสี ระยะเวลา 2 เดือน หรือระยะห่างจากการเก็บเซลล์ครั้งแรก 4 เดือน

4.2 กลุ่มตัวอย่างเซลล์ปกติ

ใช้ตัวอย่างเซลล์ปกติ จากสตรีที่มาตรวจร่างกายประจำปี ที่มีผลการตรวจทาง Pap smear และคลื่นปกติ จำนวน 20 ราย

เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

1. Fourier transform infrared spectrometer (Bruker Vector 33 FT-IR spectrometer, Bruker Optics)
2. Infrared windows และ Sample holder (Patwong Technologies Inc.)
3. Vacuum filter
4. Centrifuge (Sigma 3k30)
5. Centrifuge tube 50 ml
6. Microtube
7. Automatic Pipette ขนาด 100 และ 10 μ l
8. Pipette tip
9. Racks พลาสติก ใช้กับ tube 50 ml

10. Racks พลาสติก ใช้กับ microtube
11. Forceps
12. ปีกเกอร์
13. ถังมือยาง
14. ตู้ควบคุมความชื้น (Desiccator)
15. Slides

สารเคมี

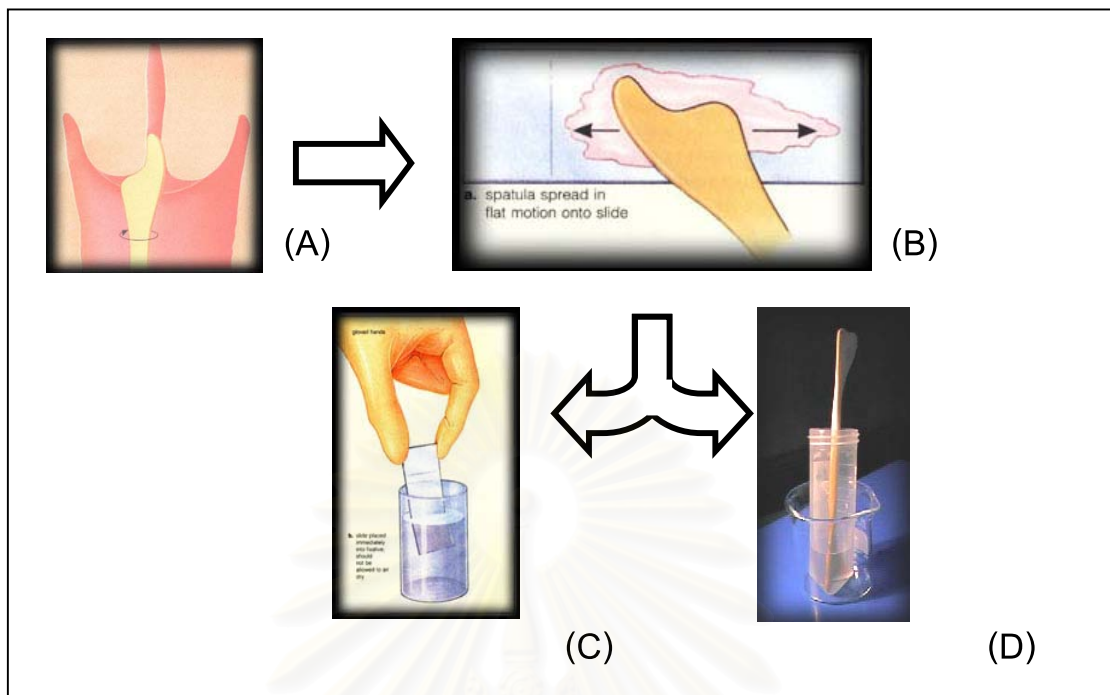
1. NaCl (AR grade)
2. น้ำกลั่น
3. Acetone
4. 70% ethyl alcohol
5. 95% ethyl alcohol
6. Methanol
7. Silica Gel

การดำเนินการวิจัย

การเก็บเซลล์ตัวอย่าง

ผู้วิจัยรับตัวอย่างเซลล์ หรือสิ่งส่งตรวจ (specimens) จากแพทย์ที่ทำการตรวจผู้ป่วยที่สถาบันมะเร็งแห่งชาติ โดยใช้ตัวอย่างจากการตรวจภายในช่องคลอดตามปกติของแพทย์ คือเมื่อแพทย์ทำการเก็บตัวอย่างเซลล์ โดยใช้ spatula และแบ่งเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนที่ 1 จะทำ สเมียร์ลงบนแผ่นกระจก fix ทันทีใน 95% ethyl alcohol เพื่อส่งตรวจทางเซลล์วิทยา หรือ pap smear และส่วนที่ 2 คือส่วนที่เหลือติด spatula จะใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 50 ml ที่บรรจุ Normal saline solution จำนวน 15 ml อยู่ ซึ่งจะนำมาใช้ในการทดลองในครั้งนี้ ดังรูปที่ 3

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 3 การเก็บเซลล์ตัวอย่าง A) การป้ายเซลล์จากปากมดลูก B) การ smear ลงบนสไลด์ C) ส่วนที่ 1 นำสไลด์ fix ใน 95% alcohol D) ส่วนที่ 2 นำไม้ spatula จุ่มในหลอดทดลองที่มี normal saline บรรจุอยู่ ซึ่งใช้ในการทดลองในครั้งนี้

การเตรียมเซลล์ตัวอย่างก่อนทำการวิเคราะห์

1. นำส่วนที่ 2 มาเขย่า โดยเครื่อง Vortex mixture เพื่อให้เซลล์หลุดออกจากไม้ spatula มากที่สุด จากนั้นเอาไม้ ออก
2. นำไป centrifuge ที่ 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที
3. เมื่อ centrifuge เสร็จแล้ว ให้เทสารละลายส่วนบน (normal saline) ออกอย่างรวดเร็ว ให้เหลือไว้เฉพาะเซลล์ ที่ตกตะกอนด้านล่าง
4. ใช้ Automatic pipette ขนาด 100 μl ดูดส่วนที่เป็นตะกอน ไปใส่ไว้ใน microtube ให้ได้มากที่สุด ถ้าหากยังมี ส่วนที่เป็นเนื้อเยื่อเหลือติดอยู่ สามารถเติม normal saline ลงไปเล็กน้อยเพื่อทำการชะ แล้วจึงดูดเนื้อเยื่อที่ เหลือทั้งหมดไปใส่ไว้ใน microtube จากนั้นนำไป centrifuge ที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที
5. ใช้ Automatic pipette ขนาด 100 μl ดูดส่วนที่เป็นสารละลายออกจนไม่เหลือของเหลวอีก (ควรเปลี่ยน pipette tip ทุกครั้งเมื่อเตรียมเสร็จในแต่ละตัวอย่าง) จะได้ผล ดังรูปที่ 4



ตะกอนตัวอย่างเซลล์ที่ได้

รูปที่ 4 ตัวอย่างเซลล์ในหลอด microtube

6. เก็บตัวอย่างที่เตรียมได้ในตู้แช่ที่ อุณหภูมิ -80°C จนกว่าจะนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค FT-IR spectroscopy ต่อไป

การวิเคราะห์เซลล์ตัวอย่างด้วยเทคนิค FT-IR spectroscopy

1. ทำการลงทะเบียนตัวอย่างเซลล์ บันทึกสี และลักษณะของตัวอย่าง
2. ทำความสะอาด Infrared window โดยใช้ acetone และทำให้แห้ง จากนั้นนำใส่ใน sample holder ดังรูปที่ 5 โดยให้ด้านที่สะท้อนแสงของ Infrared window หงายขึ้น และทำการติดชื่อของตัวอย่างที่จะวิเคราะห์ให้เรียบร้อย



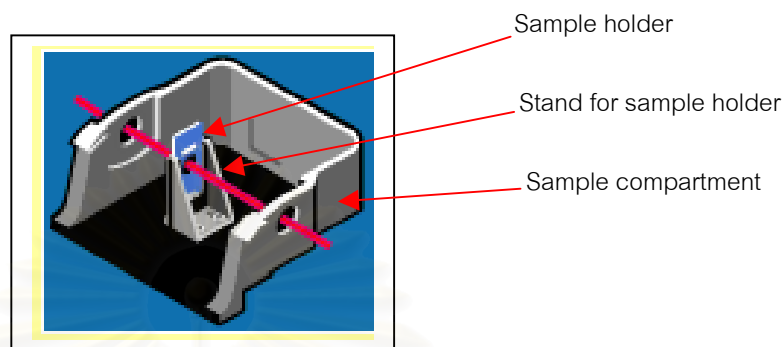
รูปที่ 5 การเตรียม sample holder

หมายเหตุ

1. สำหรับ Infrared window ใหม่ที่ยังไม่เคยใช้งาน ต้องทำการขจัดคราบสกปรกที่อาจติดมาจาก โรงงานผลิต โดยการจุ่มใน acetone แล้วเช็ดด้วยผ้านุ่มไร้ขนให้แห้ง
2. สำหรับ Infrared window ที่ใช้แล้ว เมื่อจะนำมาใช้ใหม่ สามารถทำได้โดยแช่ใน methanol 1 คืนเพื่อล้างเซลล์ตัวอย่างที่ติดอยู่ออก จากนั้นจุ่มใน acetone เช่นเดียวกับกรณีแรก

3. ระวังอย่าให้มีรอยนิ้วมือไปติดอยู่บน Infrared window เพราะคราบไขมันจากปลายนิ้ว อาจทำให้เกิดสเปกตรัมที่รบกวนการวิเคราะห์ได้

3. นำ sample holder ไปเสียบไว้ที่ stand for sample holder ในส่วนของ sample compartment ของเครื่อง FT-IR ดังรูปที่ 6



รูปที่ 6 การวัดสเปกตรัมของเซลล์ตัวอย่าง

แล้วบันทึกสเปกตรัม โดยใช้เงื่อนไขดังต่อไปนี้

3.1 การตั้งพารามิเตอร์ของอุปกรณ์ (instrumental parameter) สำหรับการวิเคราะห์ ด้วยเทคนิค FT-IR spectroscopy ก่อนการทดลอง จะมีการปรับ (set up) ตัวแปร ในการวิเคราะห์ดังนี้

Collect Setup

Number of sample scans: 64

Result Spectrum: Transmittance

Resolution: 4.0 cm^{-1}

Zero filling: 2

Apodization: Blackman-Harris3-term

Spectral range: $4000\text{-}400 \text{ cm}^{-1}$

Final format: Absorbance

Optical Bench Setup

Detector: DTGS

Source: Global (MIR)

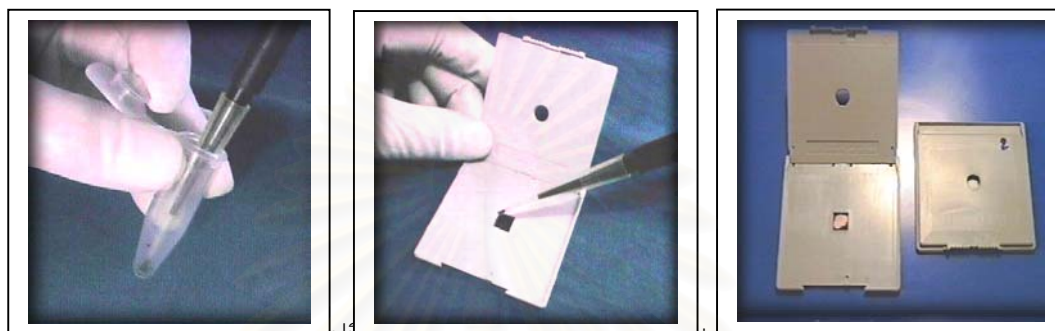
Beamsplitter: Ge on KBr

Scanner velocity: 6; 10.0 KHz

Aperture: Open

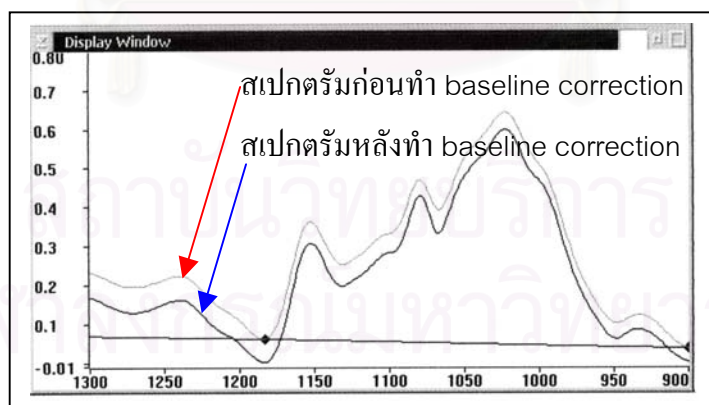
Gain: Automatic

4. นำ Infrared window มาใส่ตัวอย่างเซลล์ โดยใช้ Automatic pipette ขนาด 10 μL ดูดตัวอย่างขึ้นมาป้ายบน Infrared window เกลี่ยให้ทั่ว และดูเป็นเนื้อเดียวกัน (homogeneous) จนมองไม่เห็นส่วนที่สะท้อนแสงของ Infrared window ดังรูปที่ 7



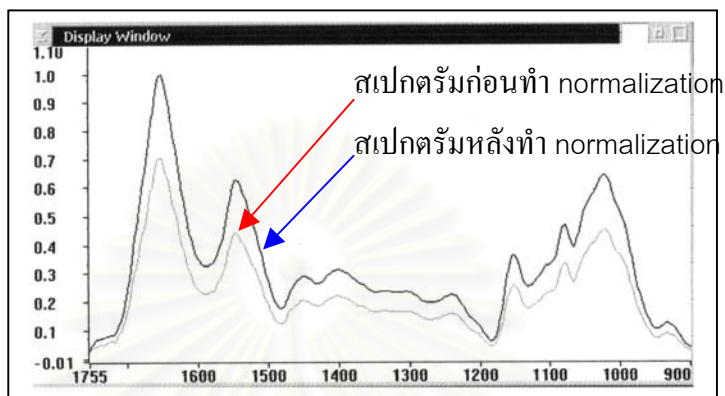
รูปที่ 7 การป้ายเซลล์ลงบน infrared window

5. กำจัดน้ำออก โดยนำไปเข้าเครื่อง Vacuum filtration จากนั้นทำการวัดสเปกตรัมของเซลล์ตัวอย่าง ในกรณีที่ ไม่ได้ทำการวัดสเปกตรัมทันทีให้เก็บไว้ใน desiccator หรือตู้ควบคุมความชื้น จนกว่าจะนำไปวิเคราะห์
6. บันทึกสเปกตรัมของเซลล์ตัวอย่าง ตามเงื่อนไขในข้อ 3 จะได้สเปกตรัมของเซลล์ตัวอย่าง ในรูปของ absorbance กับ wavenumber (cm^{-1})
7. นำสเปกตรัมของเซลล์ตัวอย่างที่ได้ มาทำ Baseline Correction เพื่อทำให้สเปกตรัมมีค่า absorbance เริ่มต้นที่ 0 ดังรูป 8



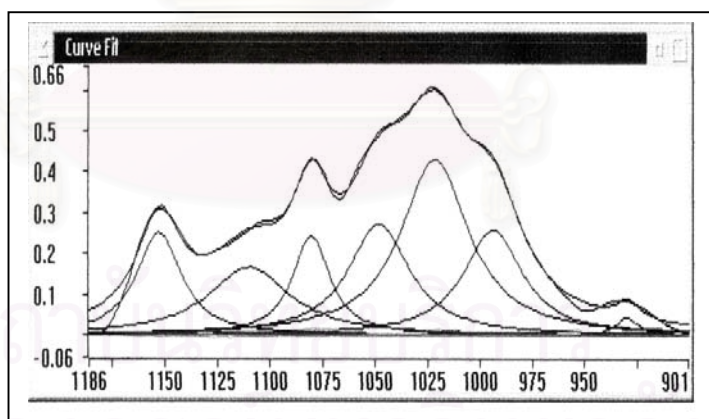
รูปที่ 8 การทำ Baseline correction

8. ทำ Normalized จากสเปกตรัมที่ได้ในข้อ 7 โดยใช้ค่า absorbance ของ amide I (เลขคลื่น 1655 cm^{-1}) มาคำนวณ เพื่อลดความผิดพลาดที่อาจจะเกิดจากความหนาของตัวอย่างที่ไม่เท่ากันด้วย amide I (เลขคลื่น 1655 cm^{-1}) และให้มีค่า absorbance ต่ำสุด และสูงสุดที่ 0.0 และ 1.0 เนื่องจากสเปกตรัมของโปรตีนนี้เป็น strong band จึงมีการเปลี่ยนแปลงค่า absorbance น้อยมากในเซลล์⁽²⁹⁾ ดังรูปที่ 9



รูปที่ 9 การทำ Normalize

9. ทำ Curve fitting (การคำนวณค่า single component ในระบบที่มี overlapping band) จากสเปกตรัมที่ได้ในข้อ 8 เพื่อหา Integrate area ของสเปกตรัมหรือระบบที่ศึกษาด้วย OPUS 3.0 spectroscopic software ดังรูปที่ 10



รูปที่ 10 การทำ Curve fitting

การวิเคราะห์ข้อมูล

เปรียบเทียบ ค่า Integrate area ที่คำนวณได้จากเทคนิค FT-IR spectroscopy หลังจากทำ curve fitting แล้วของหมู่ฟอสโฟไดเอสเทอร์ของกรดนิวคลีอิกในเซลล์มะเร็งปากมดลูกก่อน และหลังการรักษา ด้วยรังสี ซึ่งสามารถวิเคราะห์ความแตกต่างได้ โดยวิธี Pair t-test^(30,31) ดังสูตร

$$t = \frac{\bar{d}}{S_d / \sqrt{n}} \quad ; \quad \bar{d} = \frac{\sum d}{n}, \quad S_d = \sqrt{\frac{\sum d^2 - (\sum d)^2 / n}{n - 1}}$$

\bar{d} = ค่าเฉลี่ยของผลต่างในแต่ละคู่

S_d = ค่า SD ของผลต่างในแต่ละคู่

n = จำนวนคู่ของข้อมูล

t = ค่า t ที่ระดับความเชื่อมั่น ด้วย $df = n - 1$

หมายเหตุ

การศึกษานี้ ใช้โปรแกรม SPSS เพื่อช่วยในการคำนวณค่าทางสถิติ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

กลุ่มตัวอย่าง

1. กลุ่มตัวอย่างเซลล์ จากผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกจำนวนทั้งหมด 30 ราย แบ่งเป็นผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูก ระยะที่ 2 จำนวน 13 ราย มีอายุเฉลี่ย 47.8 ปี (ช่วงระหว่าง 38 – 65 ปี) และในระยะที่ 3 จำนวน 17 ราย มีอายุเฉลี่ย 52.1 ปี (ช่วงระหว่าง 34 – 78 ปี) โดยทำการศึกษาก่อน และหลังการรักษาด้วยรังสี
ผลการตรวจทางพยาธิวิทยาพบว่า
Squamous cell carcinoma จำนวน 26 รายคิดเป็นร้อยละ 83.3
Adenocarcinoma จำนวน 1 รายคิดเป็นร้อยละ 3.3
Adenosquamous cell carcinoma จำนวน 3 รายคิดเป็นร้อยละ 13.3
2. กลุ่มตัวอย่างเซลล์ปกติ จำนวน 20 ราย มีอายุเฉลี่ย 47.52 (ช่วงระหว่าง 34-69 ปี) และมีผลการตรวจทาง pap smear เป็น negative

การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของเซลล์ที่ศึกษา

ในผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูก ก่อนและหลังการรักษาด้วยรังสีจะพบการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ โดยในเซลล์มะเร็งก่อนการรักษา ดังรูปที่ 11 จะมีลักษณะดังนี้ คือ

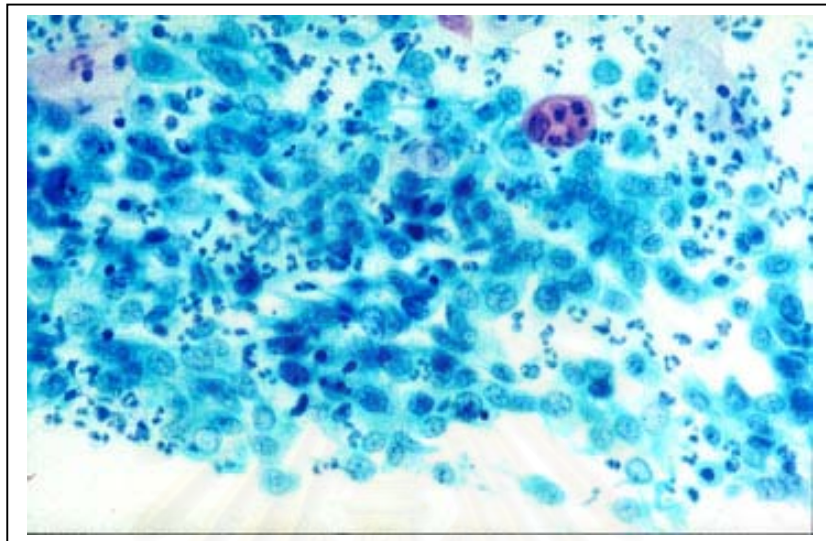
1. นิวเคลียส มีขนาดใหญ่ขึ้น โครมาตินหยาบ อาจพบนิวคลีโอล ซึ่งมักใหญ่และรูปร่างแตกต่างกัน
2. ไซโตพลาสซึม มีลักษณะแตกต่างกันแล้วแต่ differentiation ของเซลล์ และมีรูปร่างหลายแบบ
3. ลักษณะพื้นสเมียร์สกปรก มีการอักเสบ มีเม็ดเลือดแดง ทั้งเก่า และใหม่ มีเศษและร่องรอยของเซลล์ที่ถูกทำลาย

ส่วนในเซลล์หลังการรักษาด้วยรังสี ดังรูปที่ 12 จะมีลักษณะดังนี้ คือ

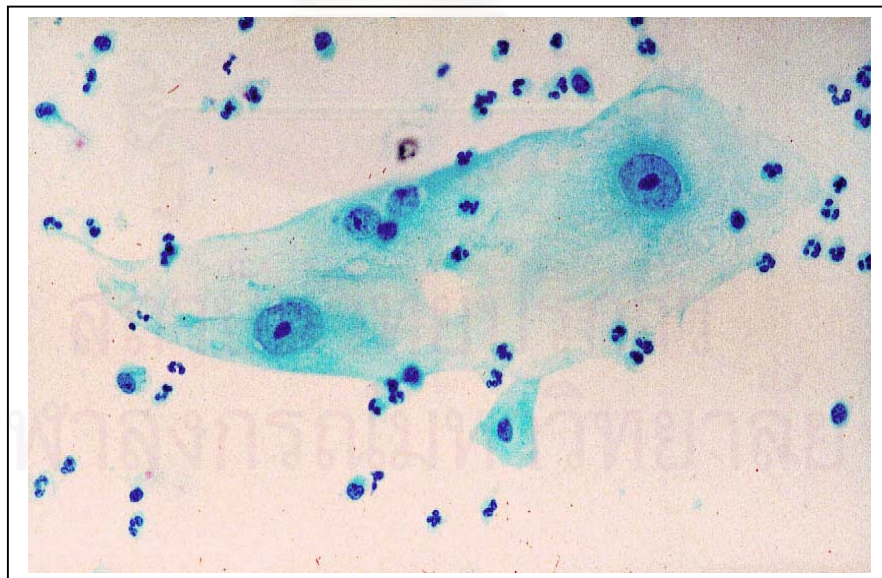
1. นิวเคลียส บวมใหญ่ขึ้น มีช่องว่างในนิวเคลียส แตก สลาย และนิวคลีโอลใหญ่ขึ้น เพิ่มจำนวนมากขึ้น และมีขนาดแตกต่างกัน

2. ซัยโตพลาสซึม มีช่องว่างภายใน ขนาดใหญ่ขึ้น ติดสีแตกต่างจากภาวะปกติ อาจมีเม็ดเลือดขาวแทรกในเซลล์ และขอบของเซลล์ไม่ชัดเจน

3. ลักษณะฟีนสเมียร์ มีการอักเสบได้ อาจมีลักษณะการขาดฮอร์โมนเอสโตรเจน มี histiocyte และ foreign body giant cell



รูปที่ 11 ลักษณะเซลล์มะเร็งชนิด Squamous cell carcinoma ก่อนการรักษา

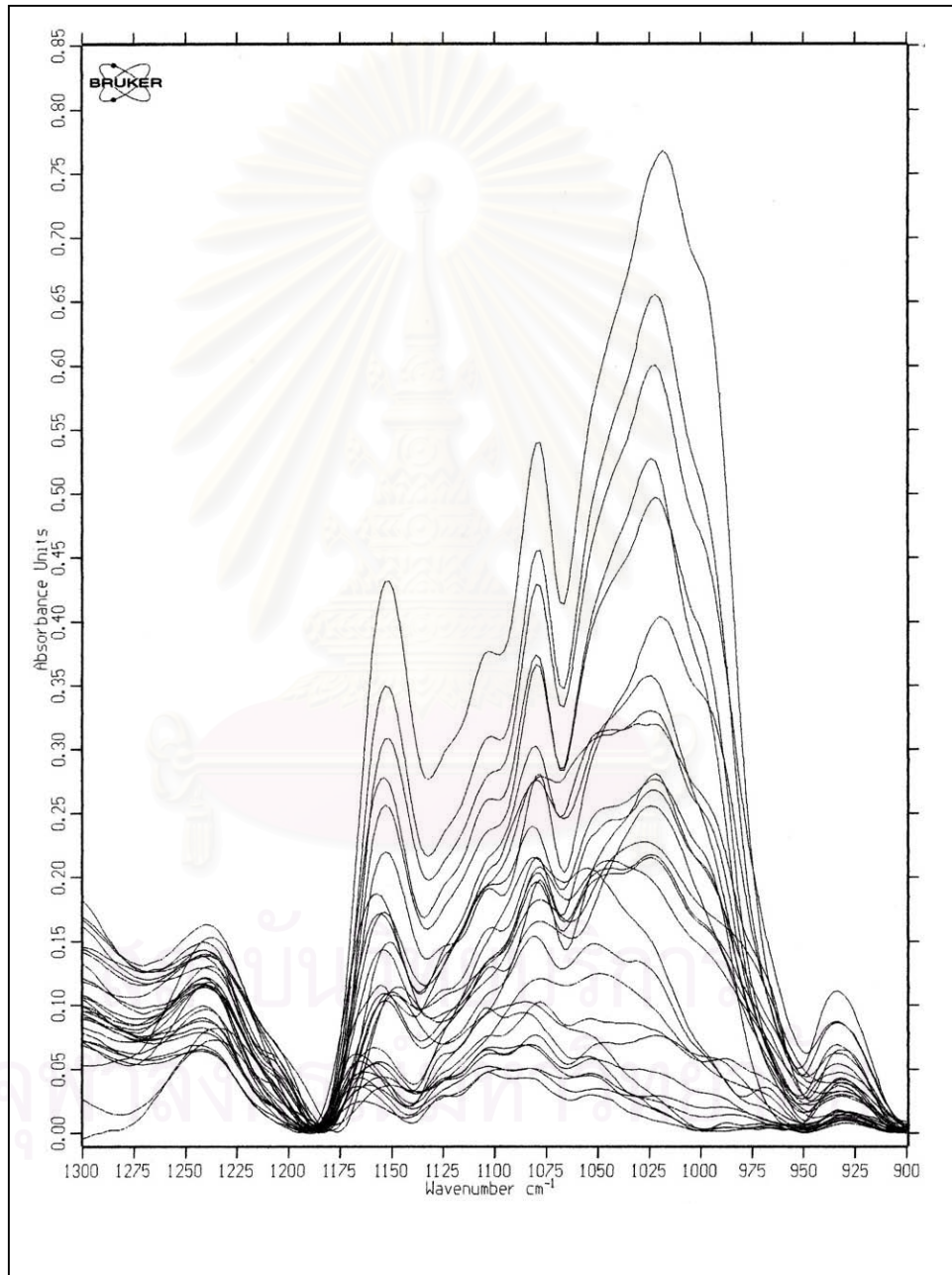


รูปที่ 12 ลักษณะเซลล์หลังการรักษาด้วยรังสี

การเปรียบเทียบอินฟราเรดสเปกตรัมของเซลล์ตัวอย่าง โดยเทคนิค FT-IR spectroscopy

1. กลุ่มเซลล์มะเร็งเรื้องรังปากมดลูกก่อนการรักษา

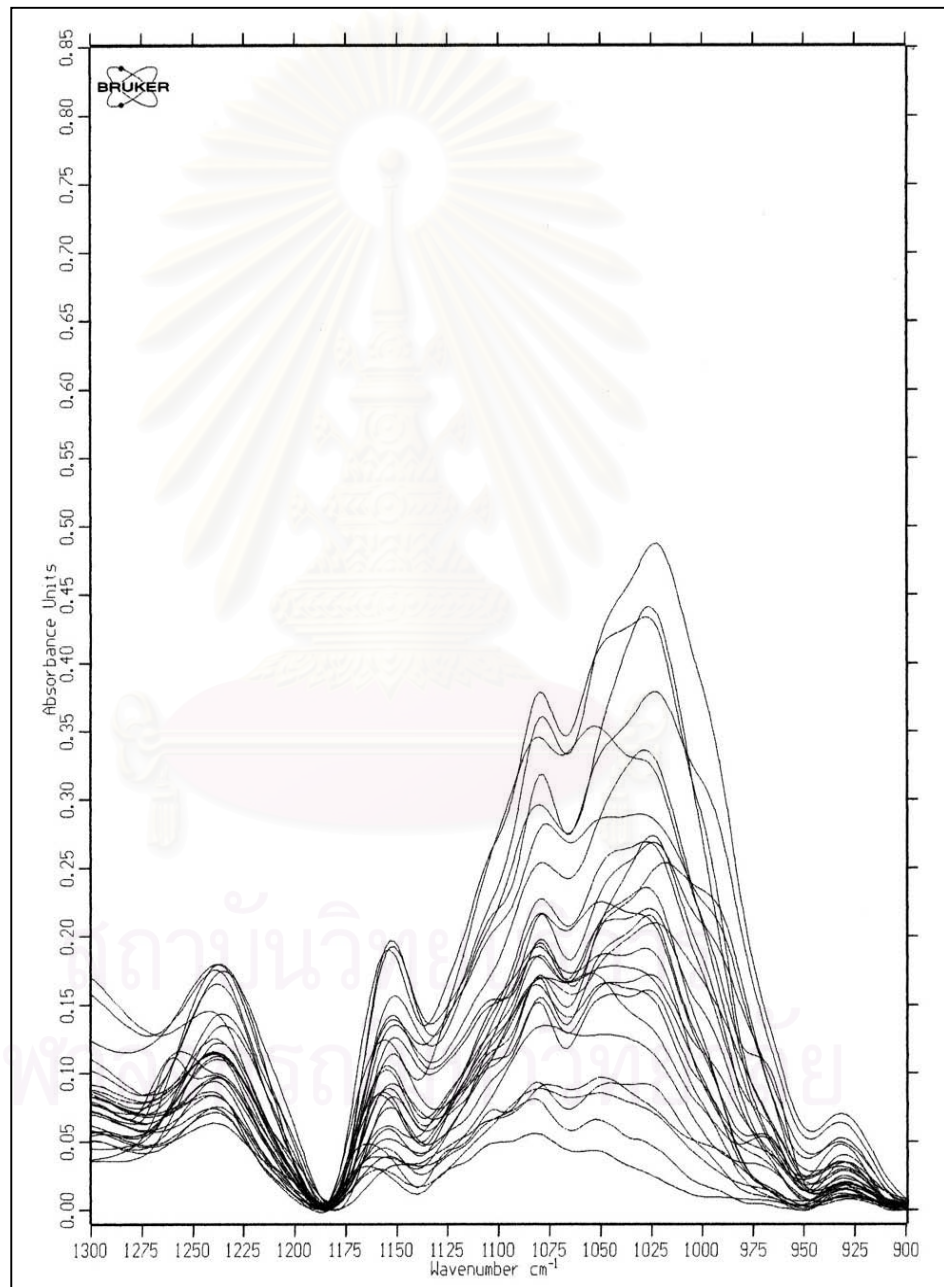
จากการศึกษาจะพบอินฟราเรดสเปกตรัม และมีค่า absorbance ที่มีลักษณะที่แตกต่าง และหลากหลายในผู้ป่วยแต่ละราย ดังรูปที่ 13 แสดงการเปรียบเทียบอินฟราเรดสเปกตรัมในผู้ป่วย 30 ราย



รูปที่ 13 ลักษณะอินฟราเรดสเปกตรัมของเซลล์มะเร็งเรื้องรังปากมดลูกก่อนการรักษา

2. กลุ่มเซลล์หลังการรักษา

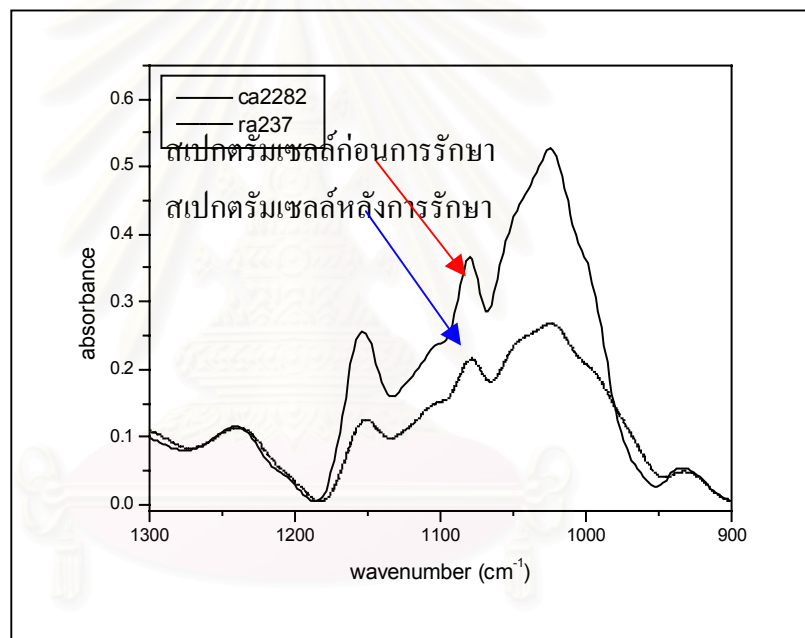
จากการศึกษาจะพบลักษณะ และรูปแบบที่แตกต่างกัน ในผู้ป่วยแต่ละราย ดังรูปที่ 14 แสดงการเปรียบเทียบอินฟราเรดสเปกตรัมในผู้ป่วย 30 ราย



รูปที่ 14 ลักษณะอินฟราเรดสเปกตรัมของเซลล์ปากมดลูกหลังการรักษาด้วยรังสี

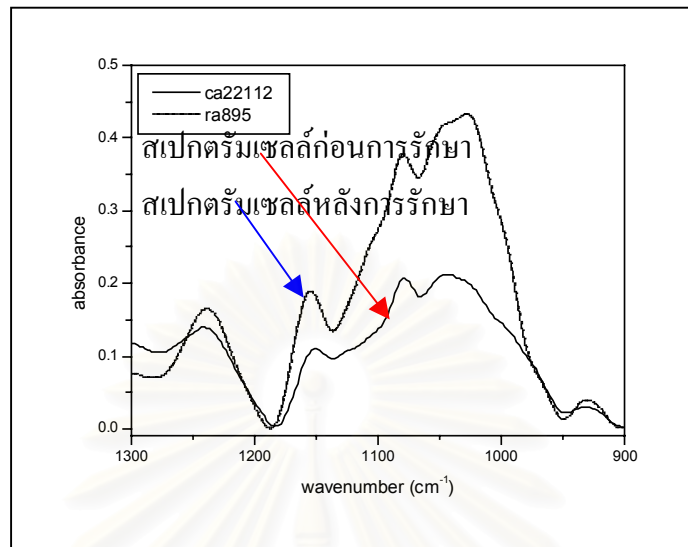
แต่เมื่อมองภาพโดยรวมของอินฟราเรดสเปกตรัมของผู้ป่วยก่อนและหลังการรักษาด้วยรังสีมาเปรียบเทียบกันจะพบว่ากลุ่มเซลล์มะเร็งปากมดลูกก่อนการรักษามีค่า absorbance สูงกว่า เซลล์หลังการรักษาด้วยรังสี แต่ในงานวิจัยนี้ ศึกษาเปรียบเทียบในผู้ป่วยรายเดียวกันก่อน และหลังการรักษาด้วยรังสี โดยผลที่ได้แบ่งเป็น

1. รูปแบบสเปกตรัมของเซลล์ปากมดลูกก่อน และหลังการรักษาด้วยรังสี ที่มีค่า absorbance ของหมู่ฟอสโฟไดเอสเทอร์ของกรดนิวคลีอิกลดลง ดังรูปที่ 15 จำนวน 12 ราย
2. รูปแบบสเปกตรัมของเซลล์ปากมดลูกก่อน และหลังการรักษาด้วยรังสี ที่มีค่า absorbance ของหมู่ฟอสโฟไดเอสเทอร์ของกรดนิวคลีอิกเพิ่มขึ้น ดังรูปที่ 16 จำนวน 18 ราย



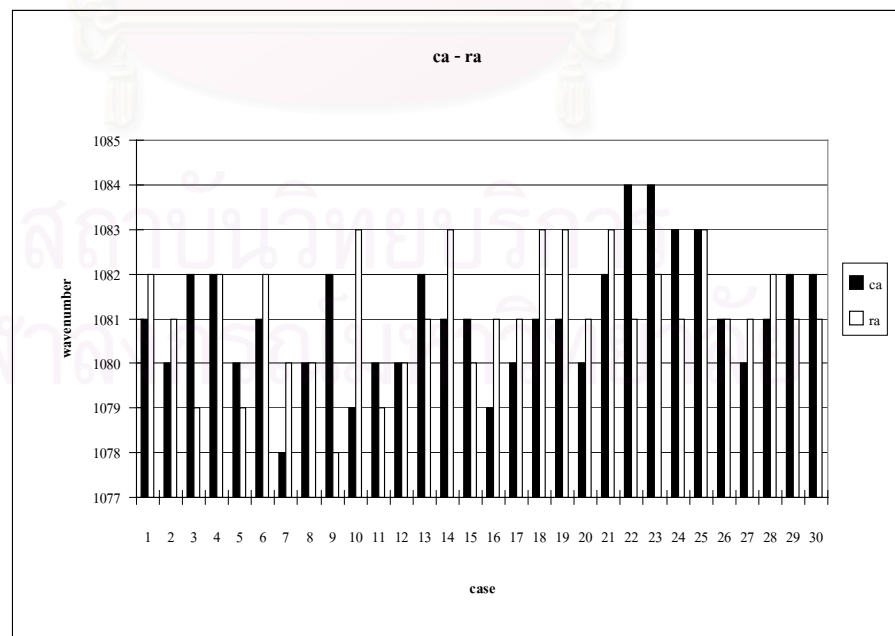
รูปที่ 15 รูปแบบอินฟราเรดสเปกตรัมที่มีค่า absorbance ของหมู่ฟอสโฟไดเอสเทอร์ของกรดนิวคลีอิกลดลง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 16 รูปแบบอินฟราเรดสเปกตรัมที่มีค่า absorbance ของหมู่ฟอสโฟไดเอสเทอร์ของกรดนิวคลีอิกเพิ่มขึ้น

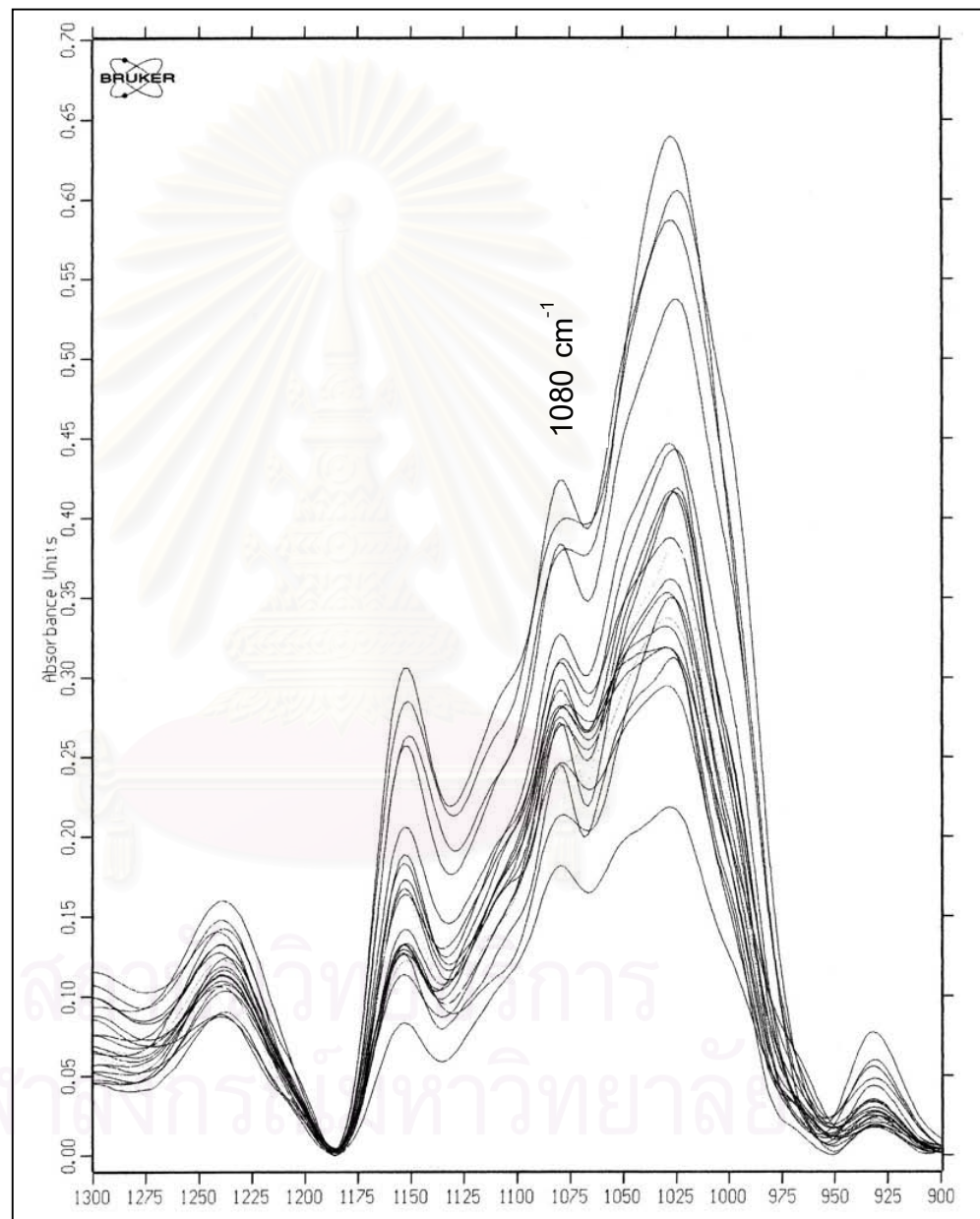
และเมื่อนำเลขคลื่นที่ศึกษาของเซลล์ปากมดลูกก่อน และหลังการรักษาด้วยรังสี แต่ละราย มาเปรียบเทียบกัน จะพบตำแหน่งที่แตกต่างกัน และพบเลขคลื่นของหมู่ฟอสโฟไดเอสเทอร์ที่สัมพันธ์กับกรดนิวคลีอิกอยู่ในช่วงคลื่น ระหว่าง $1078-1084 \text{ cm}^{-1}$ ดังรูปที่ 17 แสดงค่าเลขคลื่นของเซลล์ปากมดลูกก่อน และหลังการรักษาด้วยรังสี จากผู้ป่วย จำนวน 30 ราย



รูปที่ 17 การเปรียบเทียบตำแหน่งเลขคลื่นของผู้ป่วยก่อน และหลังการรักษาด้วยรังสี

3. กลุ่มตัวอย่างเซลล์ปกติ

จากการศึกษาพบรูปแบบของอินฟราเรดสเปกตรัมที่คล้ายคลึงกันในแต่ละตัวอย่างเซลล์ และเลขคลื่นของหมู่ฟอสโฟไดเอสเทอร์ของกรดนิวคลีอิกจะพบที่ตำแหน่งเดียวกัน คือที่ 1080 cm^{-1} ดังรูปที่ 18 แสดงอินฟราเรดสเปกตรัมของตัวอย่างเซลล์ปกติ จำนวน 20 ราย



ในช่วงคลื่นที่ทำการศึกษาใน ครั้งนี้จะพบรูปแบบการสั่นของหมู่ฟังก์ชัน ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 รูปแบบการสั่นของหมู่ฟังก์ชันที่ศึกษา

Wavenumber(cm^{-1})	Assignment ^a
1171-1154	VC-O of proteins and carbohydrates
1120, 1160	RNA, ribose VC-O
1080-1090	Nucleic acids, $\nu_s\text{PO}_2$
1050	DNA and RNA ribose C-O skeletal vibrations
1025, 1047	Glycogen, VC-O
1015	Glycogen, VC-O ribose

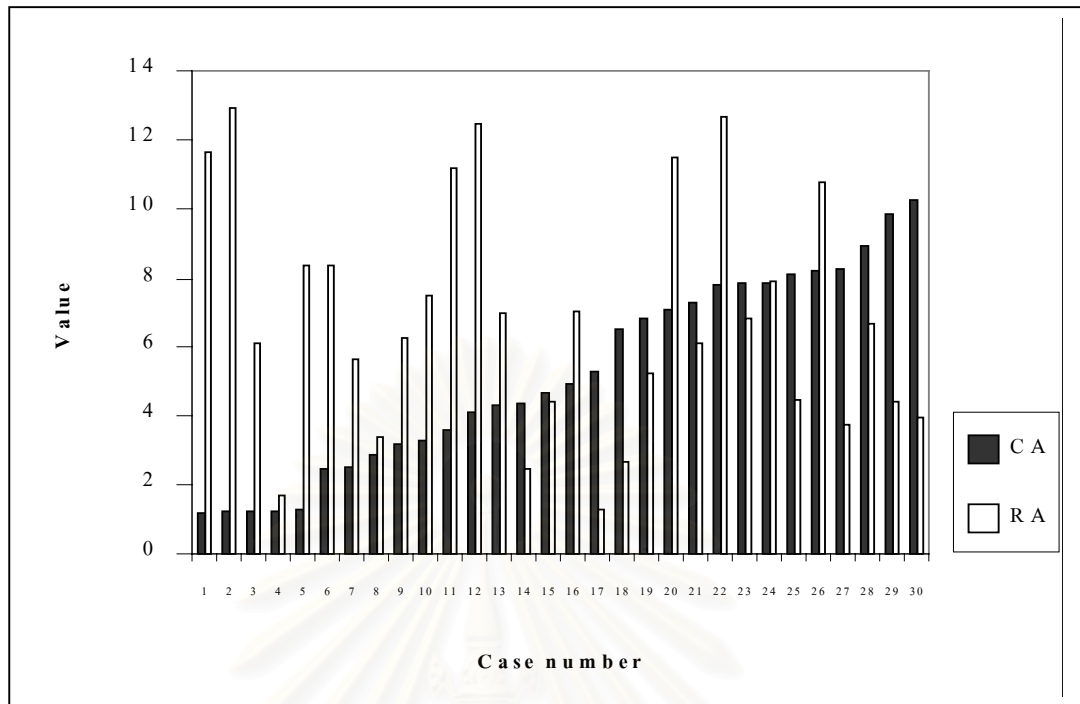
การวิเคราะห์ทางสถิติ

ทำการวิเคราะห์โดยใช้ค่าพื้นที่ใต้กราฟ (Integrate area) ของอินฟราเรดสเปกตรัมที่ศึกษาจะ
ได้ ดังตารางที่ 3 และแสดงผลการเปรียบเทียบค่าพื้นที่ใต้กราฟของอินฟราเรดสเปกตรัมของหมู่ฟอสโฟไดเอส
เทอร์ของกรดนิวคลีอิก ในเซลล์ปากมดลูกก่อน และหลังการรักษาด้วยรังสี ดังรูปที่ 19 พบค่า Integrate area มี
ค่าทั้งเพิ่มขึ้น และลดลงในเซลล์ก่อนและหลังการรักษา

ตารางที่ 3 ค่า Integrate area ที่คำนวณได้จากเครื่อง FT-IR หลังจากทำ curve fitting แล้วของหมู่ ฟอสโฟได
เอสเทอร์ของกรดนิวคลีอิก ในเซลล์มะเร็งปากมดลูกก่อน และหลังการรักษาด้วยรังสี

No	พื้นที่ใต้กราฟของอินฟราเรด สเปกตรัมของเซลล์มะเร็งปาก มดลูก	พื้นที่ใต้กราฟของอินฟราเรด สเปกตรัมของเซลล์หลังการ รักษา	Difference d
1.	1.170	11.640	-10.470
2.	1.210	12.920	-11.710
3.	1.240	6.130	-4.890
4.	1.250	1.700	-0.450
5.	1.290	8.410	-7.120
6.	2.490	8.410	-5.920
7.	2.540	5.660	-3.120

No	พื้นที่ใต้กราฟของอินฟราเรด สเปกตรัมของเซลล์มะเร็งปาก มดลูก	พื้นที่ใต้กราฟของอินฟราเรด สเปกตรัมของเซลล์หลังการ รักษา	Difference d
8.	2.860	3.390	-0.530
9.	3.190	6.300	-3.110
10.	3.290	7.510	-4.220
11.	3.620	11.150	-7.530
12.	4.140	12.480	-8.340
13.	4.300	6.980	-2.680
14.	4.370	2.450	1.920
15.	4.700	4.420	0.280
16.	4.920	7.060	-2.140
17.	5.320	1.290	4.030
18.	6.550	2.680	3.870
19.	6.840	5.260	1.580
20.	7.120	11.480	-4.360
21.	7.320	6.120	1.200
22.	7.810	12.640	-4.830
23.	7.860	6.860	1.000
24.	7.870	7.910	-0.040
25.	8.120	4.470	3.650
26.	8.230	10.740	-2.510
27.	8.270	3.780	4.490
28.	8.940	6.710	2.230
29.	9.840	4.440	5.400
30.	10.260	3.950	6.310
\bar{X}	5.231	6.831	-1.600
SD	4.738		



รูปที่ 19 การเปรียบเทียบพื้นที่ใต้กราฟของอินฟราเรดสเปกตรัมของหมู่ฟอสโฟไดเอสเทอร์ของกรดนิวคลีอิก ในเซลล์ปากมดลูกก่อน และหลังการรักษาด้วยรังสี

นำมาวิเคราะห์ความแตกต่างโดยวิธี Pair t-test จากโปรแกรม SPSS ดังรูปที่ 20 จะได้ว่าช่วงผลต่างอยู่ระหว่าง -3.367 ถึง 0.17 ที่ 95% CI ซึ่งคลุม 0 ดังนั้น ค่าอินฟราเรดสเปกตรัมของหมู่ฟอสโฟไดเอสเทอร์ของกรดนิวคลีอิก ในเซลล์ปากมดลูกก่อน และหลังการรักษาด้วยรังสี จึงไม่มีความแตกต่างกัน และพบค่า $p = 0.075$ ซึ่งมากกว่าค่า 0.05 จึงสรุปค่าอินฟราเรดสเปกตรัมของหมู่ฟอสโฟไดเอสเทอร์ของกรดนิวคลีอิก ในเซลล์ปากมดลูกก่อน และหลังการรักษาด้วยรังสี ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.075$)

T-Test**Paired Samples Statistics**

		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	CA	5.23100	30	2.83884	.51830
	RA	6.83133	30	3.38980	.61889

Paired Samples Correlations

		N	Correlation	Sig.
Pair 1	CA & RA	30	-.151	.425

Paired Samples Test

		Paired Differences				t	
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference		
					Lower		Upper
Pair 1	CA - RA	-1.60033	4.73896	.86521	-3.36989	.16922	-1.850

Paired Samples Test

		df	Sig. (2-tailed)
Pair 1	CA - RA	29	.075

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของอินฟราเรดสเปกตรัมที่สัมพันธ์กับหมู่ฟอสโฟไดเอสเทอร์ของกรดนิวคลีอิกในเซลล์ปากมดลูกก่อน และหลังการรักษามะเร็งปากมดลูกด้วยรังสี จากกลุ่มตัวอย่าง จำนวน 30 ราย สรุปผลการวิจัยได้ดังนี้

1. กลุ่มตัวอย่างมะเร็งปากมดลูก ทุกรายก่อนการรักษา มีผลการตรวจทางพยาธิวิทยา และผลการตรวจ pap smear เป็น Positive ทุกราย และหลังการรักษามีผลการตรวจ pap smear เป็น Negative ส่วนในกลุ่มตัวอย่างปกติ ทุกรายมีผลการตรวจ pap smear เป็น Negative
2. การเปลี่ยนแปลงรูปลักษณะ (morphology) ของเซลล์หลังการรักษาด้วยรังสี ที่ 2 เดือน ในการตรวจ pap smear ทุกรายพบมีการเปลี่ยนแปลงรูปลักษณะของเซลล์ที่ดีขึ้น โดยกลับมาใกล้เคียงกับเซลล์ปกติ และพบการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ที่เป็นผลจากรังสีทุกราย
3. การเปรียบเทียบรูปแบบสเปกตรัมของเซลล์ปากมดลูกก่อน และหลังการรักษาด้วยรังสี แบ่งเป็นที่มี Intensity ของหมู่ฟอสโฟไดเอสเทอร์ของกรดนิวคลีอิกลดลง จำนวน 12 ราย และเพิ่มขึ้นจำนวน 18 ราย และตำแหน่งเลขคลื่นของหมู่ฟอสโฟไดเอสเทอร์ของกรดนิวคลีอิกในเซลล์ก่อน และหลังการรักษาด้วยรังสี พบที่ช่วงคลื่น $1078 - 1084 \text{ cm}^{-1}$ ส่วนเลขคลื่นของเซลล์ปกติ พบที่ 1080 cm^{-1}
4. การเปลี่ยนแปลงของอินฟราเรดสเปกตรัมที่สัมพันธ์กับหมู่ฟอสโฟไดเอสเทอร์ของกรดนิวคลีอิกในเซลล์ปากมดลูกก่อน และหลังการรักษามะเร็งปากมดลูกด้วยรังสี จากการคำนวณค่าความแตกต่างทางสถิติ ด้วยวิธี Pair t-test พบว่าค่าอินฟราเรดสเปกตรัมที่สัมพันธ์กับ หมู่ฟอสโฟไดเอสเทอร์ของกรดนิวคลีอิก ไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P=0.075$) ในเซลล์ตัวอย่างก่อนและหลังการรักษาด้วยรังสี

อภิปรายผล

1. การเปรียบเทียบรูปแบบสเปกตรัมของเซลล์ก่อน และหลังการรักษา แบ่งเป็น

1.1 กลุ่มที่มี Intensity ของหมู่ฟอสโฟไดเอสเทอร์ของกรดนิวคลีอิกลดลง ซึ่งเป็นผลมาจากรังสีทำลายเซลล์มะเร็ง ทำให้มีการลดลงของกรดนิวคลีอิก Diane D et al. 1992 ทำการศึกษาในเซลล์หลังการรักษาด้วยรังสี พบว่ามีการลดลงของ DNA content ซึ่งรวมถึงกรดนิวคลีอิกเช่นกัน

1.2 กลุ่มที่มี Intensity ของหมู่ฟอสโฟไดเอสเทอร์ของกรดนิวคลีอิกเพิ่มขึ้น อาจเป็นผลจาก confounding factor คือ เม็ดเลือดขาว (inflammatory cells) โดยจะพบจำนวนมากหลังการรักษา Wong 1999 พบการเพิ่มขึ้นของเม็ดเลือดขาว ทำให้มีการเพิ่มขึ้นของ Intensity ของหมู่ฟอสโฟไดเอสเทอร์ของกรดนิวคลีอิก

2. การเปรียบเทียบรูปแบบสเปกตรัมของเซลล์ก่อน และหลังการรักษา กับเซลล์ปกติ พบว่า

2.1. รูปแบบสเปกตรัมของเซลล์ปกติบางสเปกตรัม มีลักษณะใกล้เคียงกับรูปแบบสเปกตรัมของเซลล์ก่อน และหลังการรักษา Chiriboga et al.^(20,32) ทำการศึกษาโดยใช้ Infrared Micro-Spectroscopy พบรูปแบบสเปกตรัมที่แตกต่างกันของเซลล์แต่ละชั้นในเนื้อเยื่อปากมดลูกปกติ โดยมีบางส่วน คือในชั้น basal พบรูปแบบสเปกตรัมคล้ายคลึงกับเซลล์ผิดปกติ Cohenford et al.⁽⁷⁾ พบเซลล์ปกติที่ atrophic pattern หรือ low estrogenic activity จะมีรูปแบบสเปกตรัมที่คล้ายคลึงกันระหว่างเซลล์ปกติกับเซลล์ผิดปกติ จึงอาจกล่าวได้ว่า ลักษณะที่พบนี้เป็น confounding factor อีกหนึ่งอย่างของการศึกษาโดยเทคนิค FT-IR spectroscopy

2.2. การเปรียบเทียบตำแหน่งเลขคลื่นของหมู่ฟอสโฟไดเอสเทอร์ของกรดนิวคลีอิกในเซลล์ก่อน และหลังการรักษา กับเซลล์ปกติ สรุปได้ดังตารางที่ 4 พบรูปแบบสเปกตรัมของเซลล์ก่อน และหลังการรักษามีลักษณะที่ broad กว่า เซลล์ปกติ และมีการเคลื่อนของตำแหน่งการดูดกลืนของพีคของหมู่ฟอสโฟไดเอสเทอร์ของกรดนิวคลีอิก ไปที่ตำแหน่งเลขคลื่นสูงขึ้น หรือต่ำลง ในผู้ป่วยแต่ละราย อยู่ในช่วงคลื่น $1078-1084\text{ cm}^{-1}$ ซึ่งต่างจากรูปแบบสเปกตรัมของเซลล์ปกติจะมีตำแหน่งเลขคลื่นของหมู่ฟอสโฟไดเอสเทอร์ของกรดนิวคลีอิกชัดเจน ที่ 1080 cm^{-1} จากการศึกษา หมู่ฟอสโฟไดเอสเทอร์ของกรดนิวคลีอิก Wong et al.⁽⁹⁾, Yazdi et al.⁽¹⁰⁾, Fung Kee Fung et al.⁽⁸⁾ พบว่าเลขคลื่นของเซลล์ปกติที่ $1082, 1082.5$ และ 1080 cm^{-1} ตามลำดับ และมีการ shift ไปยังตำแหน่งที่สูงขึ้นในเซลล์ผิดปกติ เช่นกัน Cohenford et al.⁽¹⁸⁾ พบเลขคลื่นของเซลล์ปกติที่ 1080 cm^{-1} และมีการ shift เปลี่ยนตำแหน่งในเซลล์มะเร็ง ที่ช่วงคลื่น $1080-1085\text{ cm}^{-1}$

ตารางที่ 4 การเปรียบเทียบตำแหน่งเลขคลื่นกับการศึกษาที่ผ่านมา

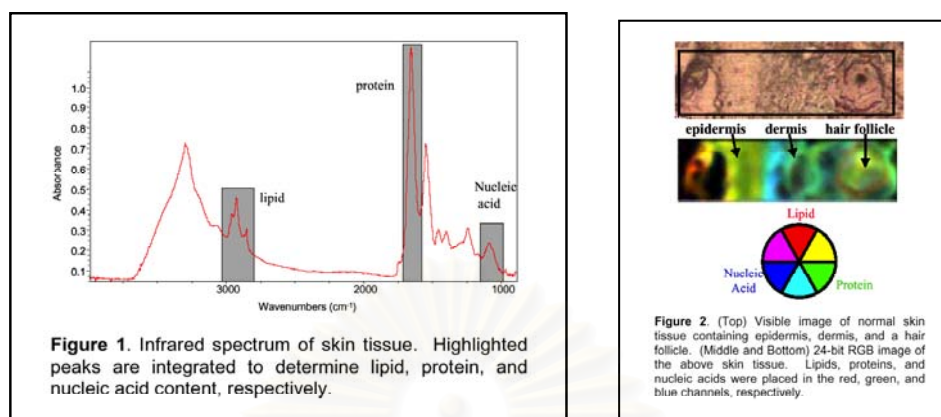
เซลล์	ตำแหน่งเลขคลื่น (cm^{-1})				
	การวิจัยครั้งนี้	Wong 1991	Yazdi 1996	Fung 1997	Cohenford 1998
ปกติ	1080	1082	1082.5 ↓	1080	1080
มะเร็ง	1078-1084	1082 ↑	1082.5 ↑	1080 ↑	1080-1085
หลังการรักษา	1078-1084	-	-	-	-

การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ พบปัญหาที่เป็นอุปสรรคต่อการวิจัย คือ

1. ปัญหาจากผู้ป่วย เนื่องจากการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้เป็นการศึกษาในผู้ป่วยรายเดียวกัน ก่อนและหลังการรักษา ทำให้มีปัญหาในการติดตามผู้ป่วยมาทำการรักษา และในผู้ป่วยบางราย ระหว่างทำการรักษามีการเพิ่มขึ้นของรอยโรคที่เป็นอยู่ ทำให้ต้องทำการรักษาด้วยวิธีอื่นด้วย เช่น การให้เคมีบำบัด เป็นต้น จึงเป็นเหตุทำให้เกิดการสูญเสียตัวอย่างเป็นอย่างมาก

2. ปัญหาจากตัวอย่างเซลล์ ในด้านการเก็บตัวอย่าง และการเตรียมตัวอย่างเซลล์ ก่อนทำการวิเคราะห์ เนื่องจากขั้นตอนในการทำได้มาจากวารสารและการศึกษาในโครงการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ ที่ผ่านมาซึ่งได้อ้างอิงไว้เพียงคร่าวๆเท่านั้น ทำให้ช่วงต้นๆของการศึกษา จึงเป็นไปได้ในลักษณะลองผิดลองถูกเสียเป็นส่วนใหญ่ เป็นเหตุให้เกิดการสูญเสียของตัวอย่างเซลล์ไปจำนวนหนึ่ง และในตัวอย่างเซลล์หลังการรักษาด้วยรังสี พบว่าในผู้ป่วยบางรายได้ตัวอย่างเซลล์จำนวนน้อยมาก เนื่องจากผิวหนังบริเวณที่ถูกรังสี ค่อนข้างแห้ง ทำให้เวลาทำ smear จึงไม่ค่อยได้เซลล์ ทำให้เกิดการสูญเสียของตัวอย่างเช่นกัน และในผู้ป่วยบางรายพบมีเม็ดเลือดขาวปริมาณมาก บดบังเซลล์หลังการรักษา ทำให้รูปแบบสเปกตรัมผิดไปจากความเป็นจริง

3. ปัญหาจากอุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษา จากการศึกษาที่ผ่านมาในต่างประเทศ พบว่ามีการนำ microscope มาเชื่อมต่อกับเครื่อง FT-IR ทำให้การศึกษามีความแม่นยำมากขึ้น เนื่องจากการใช้ microscope ทำให้สามารถเลือกเซลล์ หรือเนื้อเยื่อ และส่วนของ macromolecule ที่ต้องการศึกษาได้⁽³³⁾ ดังรูปที่ 21 แสดงตัวอย่างการนำ Infrared Micro-Spectroscopy มาใช้ในการศึกษาเนื้อเยื่อบริเวณผิวหนัง (skin) โดยจะพบความแตกต่างของ macromolecule ในแต่ละส่วนของเนื้อเยื่อที่ต้องการศึกษาได้จากสีที่ต่างกัน



รูปที่ 21 การศึกษาเนื้อเยื่อโดยใช้ เครื่อง Infrared Micro-Spectroscopy

ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ ใช้เครื่อง conventional FT-IR สเปกตรัมที่ได้จึงเป็นค่าเฉลี่ยของเซลล์ทั้งหมดบน Infrared window จึงทำให้เกิดความผิดพลาดได้ เพราะเซลล์ทั้งหมดอาจไม่ใช่เซลล์ที่ต้องการศึกษา คืออาจจะเป็นเม็ดเลือดขาว เม็ดเลือดแดง หรือสิ่งปนเปื้อนชนิดอื่น ที่ไม่ใช่เซลล์ปากมดลูก อย่างไรก็ตาม Infrared Micro-Spectroscopy ที่มีอยู่ในประเทศไทย มีจำนวนน้อยมาก และยังไม่มีการนำมาใช้ในการศึกษาทางการแพทย์

ข้อเสนอแนะ

สำหรับแนวทางการศึกษาต่อไป เนื่องจากการศึกษาในครั้งนี้เป็นเพียงข้อมูลพื้นฐานในการนำ เทคนิค FT-IR spectroscopy มาใช้ในการตรวจเซลล์ภายหลังการได้รับรังสีรักษา จึงควรทำการศึกษาเพิ่มเติมในผู้ป่วยหลังรักษาในระยะเวลา 6 เดือนต่อไป เนื่องจากการศึกษาหลังการรักษา 2 เดือน จะพบเม็ดเลือดขาวจำนวนมาก ซึ่งส่งผลต่อสเปกตรัม และการกลับคืนมาของมะเร็ง มักพบในระยะ 6 เดือนขึ้นไปหลังการรักษา⁽⁵⁾ และจากการศึกษาที่หีมูฟอสโฟไดเอสเทอร์ของกรดนิวคลีอิก ที่เลขคลื่น 1080 cm^{-1} เพียงเลขคลื่นเดียวอาจไม่เป็นตัวแทนที่ดี จึงควรศึกษาเพิ่มเติมในส่วนของ macromolecule หรือหมู่ฟังก์ชัน หรือเลขคลื่นอื่นต่อไป

กล่าวโดยสรุปได้ว่า ลักษณะของอินฟราเรดสเปกตรัมที่สัมพันธ์กับหีมูฟอสโฟไดเอสเทอร์ของกรดนิวคลีอิกของเซลล์หลังการรักษาด้วยรังสีรักษา ในระยะเวลา 2 เดือน ในผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูก ยังไม่พบความแตกต่างกับเซลล์ก่อนการรักษา และมีรูปแบบของสเปกตรัมในผู้ป่วยบางรายที่คล้ายคลึงกับเซลล์ปกติ



ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับ Fourier transform infrared spectroscopy

ฟูเรียร์ทรานสฟอร์มอินฟราเรดสเปกโตรสโคปี (Fourier transform infrared spectroscopy: FT-IR) เป็นแบบหนึ่งของเครื่องอินฟราเรดสเปกโตรสโคปีที่พัฒนาขึ้นทำให้การวิเคราะห์รวดเร็วขึ้น การแยก (resolution) ดีขึ้น หรือเป็นการทำให้ signal to noise ratio ดีขึ้นกว่าวิธีเดิม และเป็นเทคนิคอย่างหนึ่งที่นิยมใช้ในการวิเคราะห์ ตรวจสอบ พิสูจน์ ศึกษาเกี่ยวกับโมเลกุล และธรรมชาติทางเคมีสาร โดยหากจากหมู่ฟังก์ชันของสารนั้น เทคนิคนี้ใช้รังสีอินฟราเรด ซึ่งเป็นช่วงหนึ่งของสเปกตรัมของการแผ่แม่เหล็กไฟฟ้าที่มีเลขคลื่น (wavenumber) 12800 ถึง 10 cm^{-1} หรือช่วงความยาวคลื่น 0.78 ถึง $1000\ \mu\text{m}$ ช่วงของอินฟราเรดสเปกตรัมยังแบ่งออกเป็น 3 ช่วง⁽³⁴⁾ ดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ช่วงต่างๆ ของอินฟราเรดสเปกตรัม

ช่วง (region)	ช่วงความยาวคลื่น (μm)	เลขคลื่น (cm^{-1})	ช่วงความถี่ (Hz)
ช่วงใกล้ (near IR region)	0.78-2.5	12800-4000	3.8×10^{14} - 1.2×10^{14}
ช่วงกลาง (middle IR region)	2.5-50	4000-400	1.2×10^{14} - 6.0×10^{12}
ช่วงไกล (far IR region)	50-1000	400-10	6.0×10^{12} - 3.0×10^{11}

หมายเหตุ :

ในการบอกตำแหน่งของพีคของ IR สเปกตรัมนั้น นิยมบอกเป็นความยาวคลื่นในหน่วยไมโครเมตร (μm) หรือบอกเป็นจำนวนเลขคลื่น (wavenumber, $\tilde{\nu}$) ซึ่งหาได้จากสูตร

$$\tilde{\nu} = \frac{1}{\lambda(\text{cm})} = \frac{10^7}{\lambda(\text{nm})} = \frac{10^4}{\lambda(\mu\text{m})} \text{ cm}^{-1}$$

และบางครั้งบอกเป็นความถี่ (frequency, ν) :

$$\nu = c\tilde{\nu} \quad ; c = \text{ความเร็วของแสง} = 2.998 \times 10^{10} \text{ cm sec}^{-1}$$

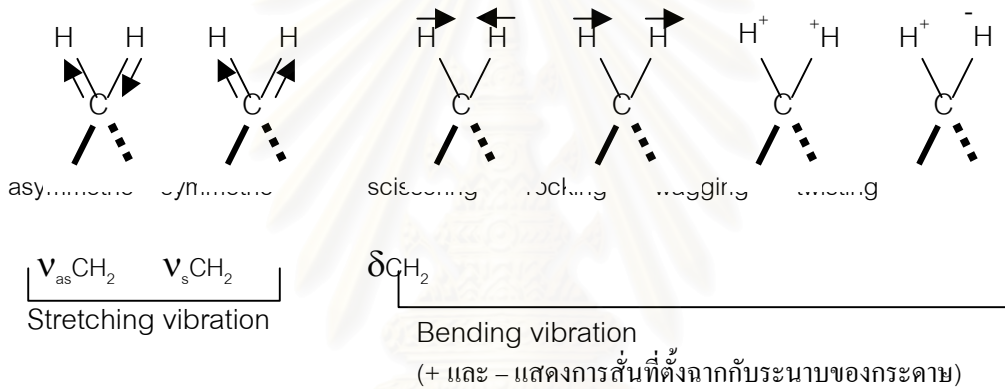
ช่วงของรังสี IR ที่จะใช้ประโยชน์ในการวิเคราะห์นั้น ส่วนใหญ่จะอยู่ช่วงกลางอินฟราเรด คือ จาก $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$ หรือ $2.5\text{-}25\ \mu\text{m}$ และยังพบว่าในช่วงนี้ยังประกอบด้วยย่านลายพิมพ์นิ้วมือ (finger print region) ซึ่งเป็นช่วงอยู่ระหว่าง $1300\text{-}650\text{ cm}^{-1}$ โดยสเปกตรัมส่วนใหญ่ ได้จากพวก functional group ที่เกิดจากโครงสร้างของโมเลกุลที่สมบูรณ์ ดังนั้นการวิเคราะห์ในช่วงนี้สามารถนำสเปกตรัมที่ได้มาเปรียบเทียบกับสเปกตรัมของสารที่ทราบโครงสร้างแล้ว

หลักการของ FT-IR

โมเลกุลของสารใดๆ ประกอบขึ้นด้วยอะตอมมายึดจับกันเข้าด้วยสิ่งที่เรียกว่า พันธะเคมี โดยจะพบว่าอะตอมเหล่านี้ไม่ได้อยู่นิ่ง แต่จะเคลื่อนไหว หรือสั่น(vibrate) ไปมาด้วย การสั่นพื้นฐานมีอยู่ 2 ประเภท⁽³⁴⁻³⁹⁾ คือ

1. การสั่นแบบยืด (Stretching หรือ Valency vibration) เกิดขึ้นเมื่ออะตอม 2 อะตอมที่สร้างพันธะกัน สั่นในแนวแกนของพันธะทำให้ระยะห่างหรือความยาวระหว่างอะตอมทั้งสองนั้นมากขึ้น หรือน้อยลง โดยจะมีทั้งการยืดแบบมีสมมาตร (Symmetrical stretching) และ การยืดแบบไม่มีสมมาตร (Asymmetrical stretching) ดังตัวอย่างรูปที่ 22

2. การสั่นแบบงอ (Bending) เกิดขึ้นเมื่อการสั่นทำให้ตำแหน่งของอะตอมเปลี่ยนไปจากแนวแกนเดิมของพันธะ หรือเกิดการเปลี่ยนแปลงมุมระหว่าง 2 พันธะ ซึ่งจะมีด้วยกัน 4 แบบ คือการงอแบบกรรไกร (scissoring), การงอแบบโคลง (rocking), การงอแบบกระดิก(wagging) และการงอแบบบิด(twisting) ดังรูปที่ 22



รูปที่ 22 ตัวอย่างการสั่นแบบยืด และการสั่นแบบงอ

พลังงานที่เกี่ยวข้องกับการสั่นของพันธะในโมเลกุลนี้พิจารณาได้จากสมการแสดงความสัมพันธ์ ตามหลักวิชาควมอดัม คือ

$$E = h\nu \quad ; E = \text{พลังงาน}, \nu = \text{ความถี่}$$

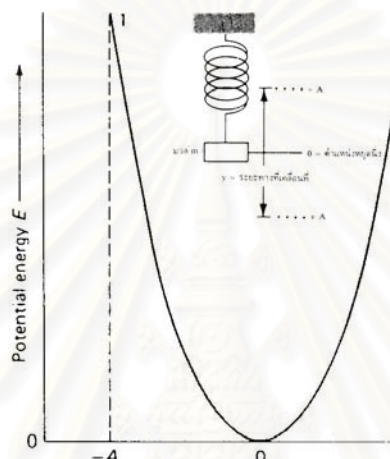
$$h = \text{ค่าคงตัวของ Planck} = 6.6242 \times 10^{-27} \text{ erg sec}$$

พบว่า การสั่นแบบยืดและงอของแต่ละพันธะนี้ จะมีความถี่ที่มีค่าเฉพาะ เมื่อโมเลกุลได้รับรังสี IR ที่มีความถี่ตรงกับการสั่นของพันธะใดๆ จะดูดกลืนรังสีที่มีความถี่นั้น ในรูปของพลังงานตามความสัมพันธ์ข้างต้น และในขณะนั้น โมเลกุลจะมีพลังงานมากกว่าปกติ เรียกว่า อยู่ในสภาวะกระตุ้น (excited state) และเมื่อโมเลกุลพยายามกลับสู่ภาวะปกติ (ground state) เรียกว่า ไวเบรชัน ทรานซิชัน (vibrational

transition) ก็จะได้ปลดปล่อยพลังงานที่รับไว้ที่ออกมาในรูปของความร้อน และจากการสั่นนี้จะต้องมีการเปลี่ยนแปลงค่าของไดโพลโมเมนต์ (dipole moment) ภายในโมเลกุล จึงจะทำให้เห็นยอดแหลม (peak) ในสเปกตรัม

IR สเปกโทรสโคปี เกี่ยวข้องกับการวัดรังสี IR ที่ถูกดูดกลืนโดยโมเลกุลของสาร จึงเรียก IR สเปกโทรสโคปี หรือเรียกได้อีกอย่างหนึ่งว่า สเปกโทรสโคปีแบบดูดกลืน (absorption spectroscopy)

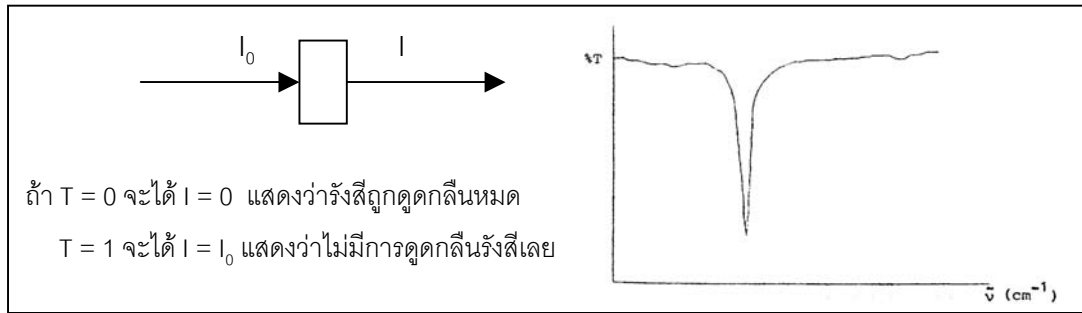
และในกรณีการสั่นแบบยี่ดั้นนั้นเป็นลักษณะการสั่นแบบ simple harmonic oscillator ซึ่งมีลักษณะคล้ายกับมีมวล 2 ก้อนต่อกันด้วยสปริง และสามารถเขียนกราฟระหว่างค่าพลังงานศักย์ และระยะทางรวมที่มีมวล m เคลื่อนที่ไป⁽³⁹⁾ ดังรูปที่ 23 โดยจะพบว่าพลังงานศักย์จะสูงที่สุดเมื่อสปริงถูกกด หรือยืดเต็มที่ และจะเป็นศูนย์เมื่ออยู่ที่ตำแหน่งสมดุล



รูปที่ 23 การสั่นแบบ simple harmonic oscillator และเคิร์ฟการเปลี่ยนแปลงของพลังงานศักย์ที่เกิดขึ้น

ผลที่ได้จากการฉายรังสี IR ไปยังโมเลกุลของสาร โมเลกุลจะดูดกลืนรังสีบางส่วน เมื่อรังสีส่วนที่เหลือซึ่งส่งผ่านออกมา (transmit) จะปรากฏเป็นสเปกตรัม โดยสเปกตรัมที่ได้จะเป็นการบันทึกระหว่างปริมาณรังสีที่ส่งผ่านออกมา (transmittance) กับเลขคลื่นในช่วงต่าง⁽³⁶⁾ ดังรูปที่ 24

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 24 ลักษณะสเปกตรัมที่ได้จากการส่งผ่านรังสีออกมา

จากรูปสามารถแสดงความสัมพันธ์ได้ดังสูตร

$$T \text{ (transmittance)} = \frac{I}{I_0}$$

$$\%T = \frac{I}{I_0} \times 100$$

ซึ่งสามารถเปลี่ยนเป็นค่าการดูดกลืน (absorbance, A) ได้ ดังสูตร

$$A = \log\left(\frac{I_0}{I}\right) = \log\left(\frac{1}{T}\right)$$

และจาก Beer-Lambert's law

$$\frac{I}{I_0} = e^{-\epsilon lc}$$

ดังนั้น $A = \log\left(\frac{I_0}{I}\right) = \epsilon lc$; ϵ = absorption coefficient ของสาร, c = ความเข้มข้น mol/l

l = ความหนาของเซลล์

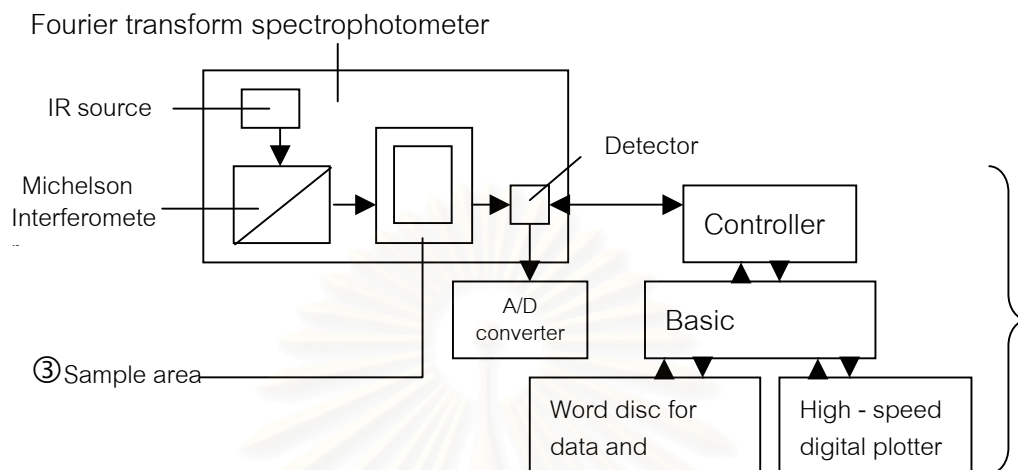
ถ้า $A = \infty$ แสดงว่ารังสีถูกดูดกลืนหมด ค่า I เมื่อผ่านสารตัวอย่างแล้ว $= 0$

$A = 0$ แสดงว่าไม่มีการดูดกลืนรังสีเลย ค่า $I_0 = I$ (เนื่องจาก $\log 1 = 0$)

ตำแหน่งและลักษณะของยอดแหลมที่ปรากฏในสเปกตรัม IR เป็นลักษณะเฉพาะของแต่ละหมู่ฟังก์ชัน เพราะฉะนั้นถ้าสเปกตรัม IR ของสารหนึ่งไม่มีการดูดกลืนรังสี IR ที่ตำแหน่งของการดูดกลืนของหมู่ฟังก์ชันใด แสดงว่าสารนั้นไม่มีหมู่ฟังก์ชันนั้นแน่นอน

ส่วนประกอบของเครื่อง FT-IR

ประกอบด้วยส่วนที่สำคัญ^(34,35) ดังรูปที่ 25 คือ



รูปที่ 25 ส่วนประกอบของเครื่อง FT-IR

1. ต้นกำเนิดแสงอินฟราเรด (IR Source) มักใช้เป็นของแข็งเฉื่อย ที่สามารถเผาให้ร้อนด้วยไฟฟ้าจนมีอุณหภูมิประมาณ 1500-2000 K ได้อย่างต่อเนื่อง ซึ่งจะให้แสงที่มีความเข้มสูงสุดที่ความถี่ประมาณ 5000 cm^{-1} เช่น เนินสต์ โกลเวอร์ (The Nernst glower) มาจากออกไซด์ของพวกธาตุแควร์ เอิร์ท (rare earth oxides)

2. อินเตอร์เฟอโรมิเตอร์ (Interferometer) หรือที่เรียก Michelson Interferometer เป็นส่วนที่ทำหน้าที่ปรับ (modulate) ลำแสงจากแหล่งกำเนิด ให้มีความถี่เหมาะสมก่อนเข้ามาใน detector ทำให้สามารถวัดการดูดกลืนแสงที่ความถี่ต่างๆกัน ได้พร้อมกัน

3. บริเวณที่ใส่ตัวอย่าง (Sample area) เป็นส่วนที่ใช้ใส่สารที่ต้องการวิเคราะห์ ในเครื่อง FT-IR จะมีบริเวณที่ใส่ตัวอย่างต่างกับเครื่อง IR แบบทั่วไป คือ sample holder จะสามารถเลื่อนเปลี่ยนระยะทางได้

4. เครื่องวัดแสงอินฟราเรด (IR Detector) ควรเป็นเครื่องที่มีความไวในการตอบสนอง (response time) และสภาพไว (sensitivity) ดี ในเครื่อง FT-IR นี้ นิยมใช้ ไตรไกลซีนซัลเฟต (triglycine sulphate, TGS) และ เมอร์คิวรีแคดเมียมเทลลูไรด์ (mercury cadmium telluride, MCT)

5. การคำนวณและรายงานผล (Computation and Report) การคำนวณทำได้ด้วยเครื่องคอมพิวเตอร์ เพื่อเปลี่ยนผลที่ได้จาก detector ให้อยู่ในรูปของความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มของแสงที่ส่งผ่าน

ออกมา (transmittance) กับเลขคลื่นแล้วรายงานผลออกมาเป็นสเปกตรัม ซึ่งสามารถนำสเปกตรัมที่ได้ไปเปรียบเทียบกับสเปกตรัมมาตรฐานก็จะทำให้ทราบว่าเป็นโมเลกุลของสารชนิดใด

การเตรียมสารตัวอย่าง

การวิเคราะห์ตัวอย่างด้วยเทคนิคอินฟราเรดสเปกโทรสโกปี สามารถวิเคราะห์สารตัวอย่างได้ทั้งในรูปของแข็ง ของเหลว และก๊าซ ซึ่งเป็นเทคนิคที่ไม่ทำลายตัวอย่าง แต่สิ่งสำคัญ คือ การเตรียมตัวอย่างให้เหมาะสม สิ่งที่ต้องทราบเกี่ยวกับตัวอย่าง⁽¹³⁾ คือ

1. วัตถุประสงค์ของการวิเคราะห์ เช่น ทำคุณภาพวิเคราะห์ (Qualitative) หรือทำปริมาณวิเคราะห์ (Quantitative)
2. แหล่งที่มาของสารตัวอย่าง (the origin of the sample)
3. ความสามารถในการละลายในน้ำ (solubility)
4. ความสามารถในการทำปฏิกิริยา (reactivity)
5. ความเป็นพิษ (toxicity)
6. ความแข็ง (hardness)

การศึกษาในสิ่งมีชีวิต โดยใช้เทคนิค FT-IR spectroscopy

จากการพัฒนาและปรับปรุงเทคนิค FT-IR spectroscopy ให้มีความไวและมี ประสิทธิภาพดียิ่งขึ้นจึงได้มีการนำเทคนิคนี้มาประยุกต์ใช้ในการศึกษาโครงสร้างระดับ macromolecule ของเซลล์ จากสิ่งมีชีวิตเช่นกัน โดยได้พัฒนาให้สามารถตรวจเซลล์จากส่วนต่างๆ ของร่างกาย เช่น ปากมดลูก^(7-10,40), ลำไส้⁽⁴¹⁻⁴³⁾, ผิวหนัง⁽⁴⁴⁾, เต้านม⁽⁴⁵⁾, ตับ^(46,47) และปอด⁽⁴⁸⁾ เป็นต้น การศึกษาโดยเทคนิคนี้ เป็นการศึกษาโครงสร้างระดับ macromolecule ของเซลล์ และแสดงออกมาในรูปแบบของสเปกตรัม ซึ่งสามารถสรุปเลขคลื่นของอินฟราเรดสเปกตรัม ที่สัมพันธ์กับโครงสร้างโมเลกุลของเซลล์⁽⁴⁹⁾ ได้ดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ช่วงเลขคลื่นของอินฟราเรดสเปกตรัม ในโครงสร้างระดับ macromolecule ของเซลล์

Wavenumber(cm ⁻¹)	Assignment ^a
2956	$\nu_{as}CH_3$ acyl chains lipids
2922	$\nu_{as}CH_2$ acyl chain lipids
2874	ν_sCH_3 acyl chain lipids
2852	ν_sCH_2 acyl chain lipids
1715	A-DNA base pairing vibration ($\nu C=O$ & $\nu C=N$)
1708	B-DNA base pairing vibration ($\nu C=O$ & $\nu C=N$)

ตารางที่ 6 (ต่อ) ช่วงเลขคลื่นของอินฟราเรดสเปกตรัม ในโครงสร้างระดับ macromolecule ของเซลล์

Wavenumber(cm^{-1})	Assignment ^a
1610	DNA and RNA, $\text{VC}_4=\text{C}_5$ imidazole ring
1720-1666	$\text{VC}=\text{O}$ from purine and pyrimidine bases
1650	Proteins, amide I
1635	Proteins, amide I β -pleated sheet structure
1605-1603	DNA, δNH_2
1578	DNA and RNA, $\text{VC}=\text{N}$ imidazole ring vibrations
1545-1530	Proteins, amide II
1530-1330	DNA and RNA conformational markers
1520-1474	Lipids, CH_2 scissoring
1450	Proteins, δCH_2
1457	$\delta_{\text{as}}\text{CH}_3$ of cellular proteins
1400	VCOO of fatty acids and amino acid side chains
1300-1250	Proteins, amide III
1244	RNA, $\text{V}_{\text{as}}\text{PO}_2$
1230	DNA, $\text{V}_{\text{as}}\text{PO}_2$
1171-1154	VC-O of proteins and carbohydrates
1120, 1160	RNA, ribose VC-O
1080-1090	Nucleic acids, V_sPO_2
1050	DNA and RNA ribose C-O skeletal vibrations
1047	Glycogen, VC-O
1025	Glycogen, VC-O
1015	Glycogen, VC-O ribose
996	Glycogen, V and δ ring of uracil
970, 915, 880, 870, 815	RNA, ribose-phosphate main chain vibrations
965	Nucleic acid, ribose main chain skeletal vibrations
890, 830	DNA marker bands

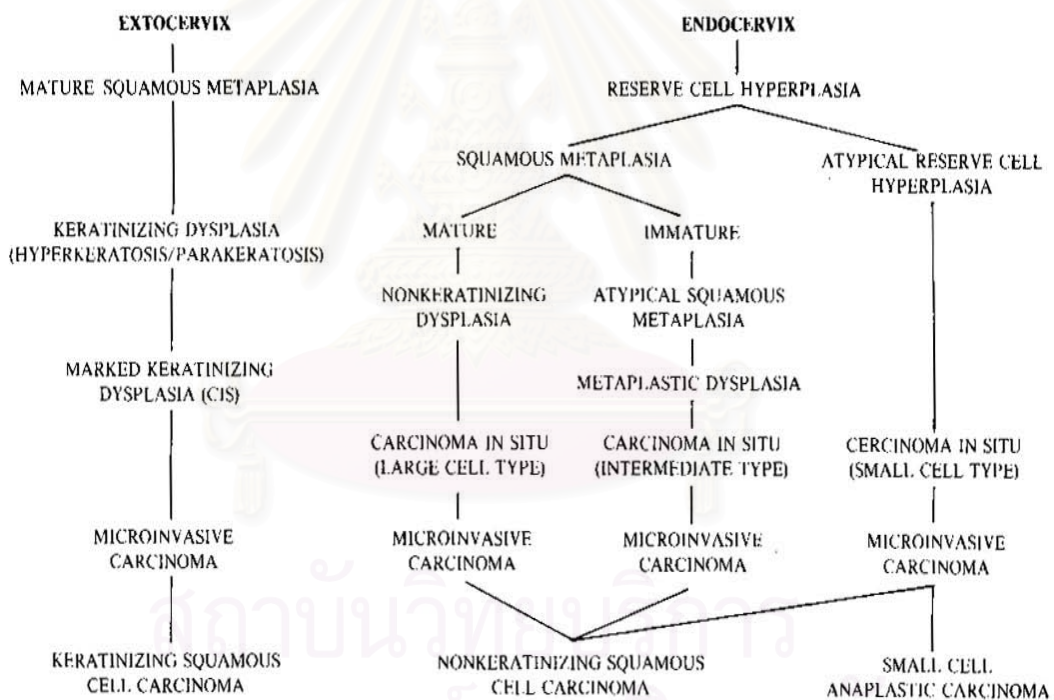
A Note: V = stretch, V_s = symmetric stretch, V_{as} = asymmetric stretch, δ = deformation

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับมะเร็งปากมดลูกก่อน และหลังการรักษาด้วยรังสี

มะเร็ง คือกลุ่มของโรคที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อในบางอวัยวะของร่างกาย ซึ่งการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวทำให้การเจริญเติบโตของกลุ่มเซลล์ผิดไปจากที่พบในเซลล์ปกติ โดยจะมีอัตราการเกิดเซลล์ใหม่รวดเร็วมาก เพราะเซลล์เหล่านี้จะแบ่งตัวทวีจำนวนอยู่เรื่อยๆ ทำให้มีหน้าที่และรูปร่างผิดไปจากเซลล์ปกติ รวมทั้งสามารถแทรกซึมไปสู่เนื้อเยื่อปกติข้างเคียง แล้วแย่งอาหารจนเซลล์ปกตินั้นพิการหรือตายไป และเซลล์ที่ผิดปกติดังกล่าวเซลล์ก็อาจจะหลุดเข้าไปในหลอดเลือด หลอดน้ำเหลือง เกิดเป็นก้อนมะเร็งในอวัยวะต่างๆ ของร่างกาย

มะเร็งปากมดลูกเป็นโรคที่ตรวจพบเซลล์มะเร็งที่เนื้อเยื่อของปากมดลูก ซึ่งการเกิดของมะเร็งชนิดนี้ เป็นขบวนการเกิดแบบต่อเนื่อง (continuity of process) โดยมีวิวัฒนาการ และการเจริญของรูปแบบของเซลล์มะเร็งปากมดลูก (Morphogenesis of carcinoma of uterine cervix)⁽⁵⁰⁾ ดังรูปที่ 26



รูปที่ 26 วิวัฒนาการ และการเจริญของรูปแบบของเซลล์มะเร็งปากมดลูก

มะเร็งปากมดลูกมักเริ่มที่ Squamocolumnar junction และพบว่าลักษณะของมะเร็งปากมดลูก ประมาณร้อยละ 80-86 เป็นชนิด Squamous cell carcinoma ที่เหลือประมาณ ร้อยละ 12-19 เป็นชนิด

Adenocarcinoma⁽¹⁾ หรือบางครั้งอาจพบมีพยาธิสภาพ 2 ชนิดร่วมกัน ที่เรียกว่า Adenosquamous หรือ Mucoepitheloid carcinoma

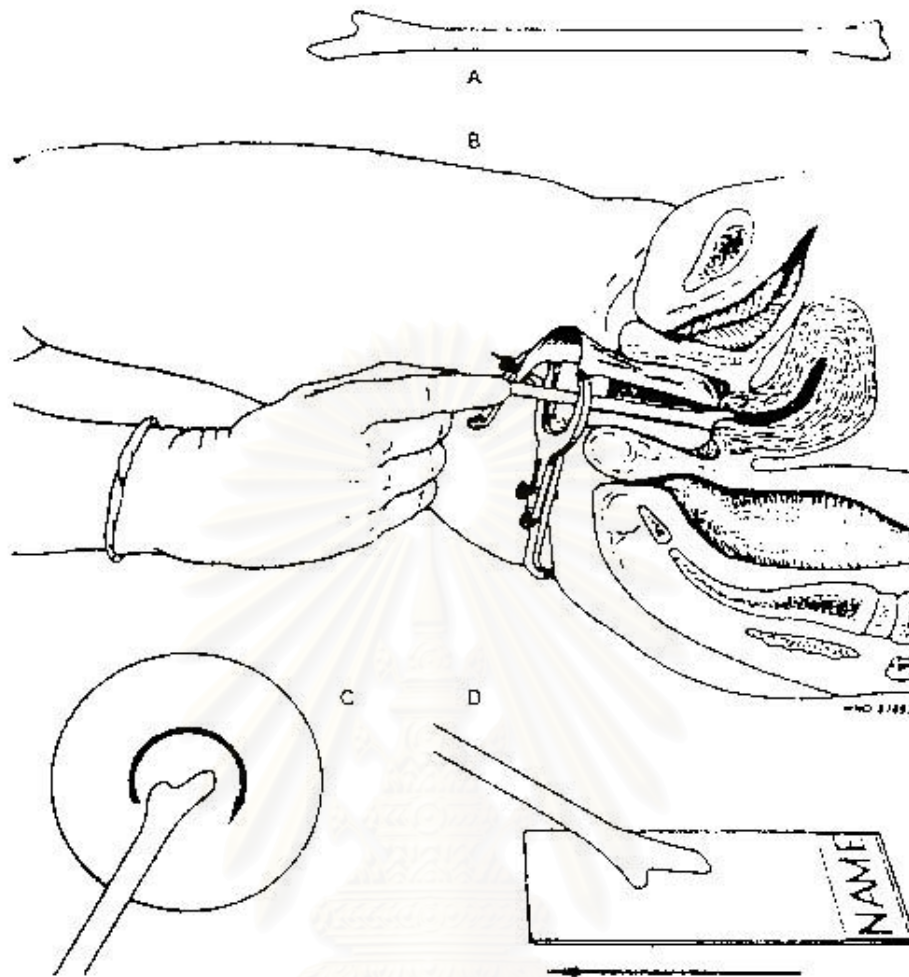
จากการที่ปากมดลูกเป็นอวัยวะที่อยู่ในตำแหน่งที่จะตรวจได้ง่าย จึงสามารถศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเยื่อบุปากมดลูกได้ตั้งแต่เริ่มมีลักษณะผิดปกติเพียงเล็กน้อย จนถึงขั้นเปลี่ยนแปลงเป็นมะเร็งได้ ซึ่งการตรวจที่ได้ผลดี และเป็นที่ยอมรับกันอยู่ในปัจจุบัน คือ การตรวจ Pap smear หรือการตรวจทางเซลล์วิทยา

การตรวจ Pap smear

การตรวจทาง Pap smear คือ การตรวจเซลล์ที่เก็บจากปากมดลูก (ectocervix) และคอมดลูก (endocervix) หรือช่องคลอดด้านหลัง (posterior fornix) หรือช่องคลอด (vagina) ซึ่งสามารถตรวจ การติดเชื้อ การอักเสบ เซลล์ที่ผิดปกติ และเซลล์มะเร็งได้ เป็นการตรวจที่มีค่าใช้จ่ายต่ำ มีความไว และความจำเพาะสูง ในการตรวจเซลล์ที่ผิดปกติในระยะเริ่มแรก และสร้างความไม่สะดวกสบายแก่ผู้รับการตรวจเพียงเล็กน้อย

ขั้นตอนในการตรวจ Pap smear

ขั้นตอนในการตรวจ Pap smear จะเริ่มจากการใช้เครื่องมือที่เรียกว่า speculum สอดเข้าภายในช่องคลอด เพื่อช่วยให้แพทย์สามารถเห็นส่วนบนของช่องคลอดและ ปากมดลูก และเพื่อทำสเมียร์ได้สะดวก จากนั้นแพทย์ทำการป้ายเซลล์ โดยใช้ช้อนไม้ที่เรียกว่า spatula ซึ่งมีลักษณะเป็นปากแบนกว้าง และทุ่ ป้ายลงบนสไลด์แก้ว โดยการป้ายที่ดี ควรได้ส่วนของ transformation zone ด้วยเนื่องจากเป็นบริเวณที่พบว่าเกิดการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ เป็นมะเร็งได้มากที่สุด⁽⁵¹⁾ ดังรูปที่ 27



รูปที่ 27 วิธีการเตรียมสเมียร์ a) Spatula b) ใส Speculum c) เก็บเซลล์จากเยื่อผิวปากมดลูก d) สเมียร์บนแผ่นกระจก

การตรวจ Pap smear เป็นการปาดเอาเพียงผิวด้านนอกของปากมดลูกไปตรวจ เมื่อป้ายเซลล์ลงบนสไลด์แก้วแล้ว ต้องทำการจุ่มทันทีใน 95% ethyl alcohol เพื่อรักษาสภาพเซลล์ให้คงรูปร่างคล้ายกับสภาพที่ยังมีชีวิตอยู่ จากนั้นทำการย้อมสี ที่เรียกว่า Papanicolaou Staining Method และทำการตรวจเซลล์ ด้วยกล้องจุลทรรศน์ ซึ่งจะทำในห้องปฏิบัติการ โดยมีเจ้าหน้าที่ หรือเจ้าพนักงานวิทยาศาสตร์ หรือนักวิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ปฏิบัติงานในสาขาเซลล์วิทยาทำการตรวจเซลล์ และอ่านผลเบื้องต้น และมีพยาธิแพทย์เป็นผู้รับผิดชอบการรายงานผลในขั้นสุดท้าย รวมทั้งการวินิจฉัยเซลล์ที่มีความผิดปกติต่างๆ ตลอดจนเป็นผู้ให้คำปรึกษากับแพทย์ผู้ดูแลรักษา ในสตรีที่มีผลการตรวจ Pap smear ผิดปกติ จะมีการทำการตรวจปากมดลูกโดยละเอียดใหม่อีกครั้ง ซึ่งในการตรวจมักใช้การตรวจทาง Colposcopy ที่เป็นเทคนิคการตรวจโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ชนิดพิเศษสอดเข้าไปทางช่องคลอด เครื่องมือนี้จะช่วยชี้ตำแหน่งและขอบเขตของความผิดปกติของปากมดลูก และการตรวจทาง Histology ซึ่งเป็นการตรวจเนื้อเยื่อ ที่ได้จากการตัดชิ้นเนื้อบริเวณรอยโรค (lesion) และส่งไปให้พยาธิ

แพทย์วินิจฉัยยืนยันผลการตรวจทาง Pap smear หรือการวินิจฉัยที่แน่นอนต่อไป การตรวจชนิดนี้จึงถือเป็น Gold Standard ที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน

การรายงานผลการตรวจทาง Pap smear

การรายงานผลการตรวจทาง Pap smear ที่ปัจจุบันนิยมใช้อยู่ทั่วไป และที่สถาบันมะเร็งแห่งชาติ คือการรายงานผลด้วยระบบเบเทสดา (The Bethesda System; TBS) ระบบนี้กำหนดขึ้นในปี พ.ศ.2527 ที่สหรัฐอเมริกา จากการประชุมที่จัดโดยสถาบันมะเร็งแห่งชาติของสหรัฐอเมริกา และได้มีการทบทวนล่าสุดในปี 2545 โดยมีส่วนประกอบที่สำคัญ 3 ส่วนคือ

1. Statement of specimen adequacy
2. General categorization
3. Descriptive interpretation/Result

โดยมีรายละเอียด ดังตารางที่ 7



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 7 การรายงานผลการตรวจ Pap smear ในระบบเบเทสดา (TBS)

The 2001 Bethesda System	
SPECIMEN ADEQUACY	
Satisfactory for evaluation (describe presence or absence of endocervical/transformation zone component and any other quality indicators, e.g., partially obscuring blood, inflammation, etc.)	
Unsatisfactory for evaluation... (specify reason)	
Specimen rejected/not processed (specify reason)	
Specimen processed and examined, but unsatisfactory for evaluation of epithelial abnormality because of (specify reason)	
GENERAL CATEGORIZATION (optional)	
Negative for Intraepithelial lesion or Malignancy	
Epithelial Cell Abnormality: See Interpretation/Result (specify 'squamous' or 'glandular' as appropriate)	
Other: See Interpretation/Result (e.g. endometrial cells in a woman 40 years of age)	
INTERPRETATION/RESULT	
NEGATIVE FOR INTRAEPITHELIAL LESION OR MALIGNANCY	
Organisms:	
Trichomonas vaginalis	
Fungal organisms morphologically consistent with Candida spp	
Shift in flora suggestive of bacterial vaginosis	
Bacteria morphologically consistent with Actinomyces spp.	
Cellular changes consistent with Herpes simplex virus	
Other non neoplastic findings	
Reactive cellular changes associated with	
Inflammation (includes typical repair)	
Radiation	
Intrauterine contraceptive device (IUD)	
Glandular cells status post hysterectomy	
Atrophy	
Other	
Endometrial cells (in a woman 40 years of age)(Specify if 'negative for squamous intraepithelial lesion')	
EPITHELIAL CELL ABNORMALITIES	
Squamous cell	
Atypical squamous cells	
Of undetermined significance (ASC-US)	
Cannot exclude HSIL (ASC-H)	
Low grade squamous intraepithelial lesion (LSIL)	
Encompassing: HPV/mild dysplasia/CIN 1	
High grade squamous intraepithelial lesion (HSIL)	
Encompassing: moderate and severe dysplasia, CIS/CIN2 and CIN3	
With features suspicious for invasion (if invasion is suspected)	
Squamous cell carcinoma	
Glandular cell	
Atypical	
Endocervical cells (NOS or specify in comments)	
Endometrial cells (NOS or specify in comments)	
Glandular cells (NOS or specify in comments)	
Atypical	
Endocervical cells, favor neoplastic	
Glandular cells, favor neoplastic	
Endocervical adenocarcinoma in situ	
Adenocarcinoma	
Endocervical	
Endometrial	
Extrauterine	
Not otherwise specified (NOS)	
Other malignant neoplasms: (specify)	

ที่มาจาก: <http://www.bethesda2001.cancer.gov/terminology.html>

การตรวจทาง Pap smear เป็นการตรวจที่ต้องอาศัยบุคลากรที่มีความชำนาญทางด้านนี้โดยตรง ซึ่งในปัจจุบันมีอยู่จำกัดมากในประเทศไทย จากการศึกษาพบว่า มีผลลบเท็จ (false negative) เกิดขึ้นจากการตรวจ pap smear ในโรงพยาบาลต่างๆ ได้ตั้งแต่ 6-55% ซึ่งการเกิดผลลบเท็จนี้ อาจเกิดขึ้นได้หลายกรณีทั้งจากการป้ายที่ไม่ตรงตำแหน่ง การเตรียมตัวอย่างที่หนา มีเซลล์ซ้อนทับกันมาก ทำให้อ่านผลพลาด ตลอดจนการล้างของผู้ทำงานเอง ที่ต้องพยายามตรวจ pap smear จำนวนมาก ด้วยเหตุนี้จึงได้มีการคิดค้นเทคโนโลยีใหม่ๆที่จะมาช่วยในการตรวจ pap smear ทั้งวิธีที่จะเตรียมตัวอย่างเซลล์ให้วางตัวเป็นชั้นเดียว (monolayered cell preparation หรือ Thin pap)⁽⁵²⁾ และการตรวจวิเคราะห์เซลล์ด้วยคอมพิวเตอร์ (Computational Analysis and Interpretation หรือ Papnet)⁽⁵³⁾ ซึ่งเทคโนโลยีเหล่านี้มีราคาค่อนข้างสูง จึงมีความเป็นไปได้ค่อนข้างน้อยที่จะนำมาใช้ในประเทศไทย

การเปลี่ยนแปลงของเซลล์มะเร็งเปรียบเทียบกับเซลล์ปกติ

จากการศึกษา และวิจัยคุณสมบัติของเซลล์มะเร็งเปรียบเทียบกับเซลล์ปกติ พบสรุปได้ว่า เซลล์ทั้งสองมีความแตกต่างกันหลายประการ คือ

1.รูปร่างของเซลล์ไม่เหมือนเดิม ทั้งนี้เพราะเซลล์มะเร็งมีเยื่อหุ้มเซลล์ หรือเซลล์เมมเบรนแตกต่างไปจากเซลล์เดิม เนื่องจากโปรตีนโครงสร้างของเซลล์ (cytoskeleton) ซึ่งมีหน้าที่ช่วยรักษาโครงสร้างของเซลล์เมมเบรนในเซลล์มะเร็งจะเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม เช่น มีโปรตีน actin (ส่วนประกอบของ cytoskeleton) ลดลงมาก และกระจัดกระจายไม่เป็นระเบียบ อันเป็นสาเหตุให้ผนังเซลล์ไม่คงรูปและรูปร่างผิดไป

2.เซลล์ปกติจะมีคุณสมบัติการเจริญเติบโตที่มีการยับยั้งโดยการสัมผัสกัน (contact inhibition) ซึ่งคุณสมบัตินี้จะสูญเสียไปในเซลล์มะเร็งกล่าวคือ เซลล์มะเร็งจะแบ่งตัวอย่างรวดเร็ว แต่จะไม่รวมตัวเป็นแผ่น แต่จะรวมตัวกันเป็นกลุ่มก้อน เพราะขาดคุณสมบัติ contact inhibition

3.เซลล์มะเร็งจะมีอัตราเมตาบอลิซึมสูงกว่าเซลล์ปกติโดยเฉพาะอย่างยิ่งในขบวนการไกลโคไลซิส (glycolysis) เพราะเซลล์มะเร็งมีอัตราการเจริญเติบโตสูง จึงต้องใช้พลังงานมากกว่าเซลล์ปกติ และมีความต้องการอาหารมากกว่าจึงแย่งอาหารจากเซลล์ปกติของร่างกาย โดยการส่งผ่านกลูโคสเข้าสู่เซลล์มากขึ้น

4.เซลล์มะเร็งสามารถแบ่งตัวได้ตลอดเวลา และมีอัตราการเจริญเติบโตสูงกว่าเซลล์ปกติ ทำให้มีกระบวนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ อาร์เอ็นเอ และโปรตีนในอัตราการเกิดที่มากกว่าเซลล์ปกติ

สถานวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5. เซลล์มะเร็งมีการสร้างชีวโมเลกุลที่ช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตของมันด้วย เพื่อนำไปใช้ภายในเซลล์มะเร็งเองในการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว ลักษณะเช่นนี้เรียกว่า autocrine secretion

6. เซลล์มะเร็งมีการสังเคราะห์โปรตีเอส (protease) และ คอลลาจีเนส (collagenase) ขึ้นมาเพื่อช่วยในการแพร่กระจาย ไปตามอวัยวะต่างๆ คุณสมบัตินี้ทำให้เซลล์มะเร็งสามารถหลุดออกจากเนื้อเยื่อถิ่นกำเนิดของมันเข้าไปในกระแสโลหิต และแพร่กระจายไปตามอวัยวะอื่น มันก็จะยึดตัวมันเองให้ติดอยู่กับอวัยวะนั้นแล้วเจริญเติบโต ทำให้อวัยวะนั้นกลายเป็นมะเร็งไปได้อีก ปรากฏการณ์เช่นนี้เรียกว่า เมตาสตาซิส (metastasis) ความสามารถของเซลล์มะเร็งที่แพร่กระจายไปตามอวัยวะต่างๆนั้น ทำให้มีชื่อภาษาอังกฤษว่า cancer ซึ่งแปลว่า ปลูก นั่นเอง

การรักษามะเร็งปากมดลูกด้วยรังสี

มะเร็งปากมดลูกเป็นมะเร็งที่สามารถตรวจพบได้ง่าย และสามารถรักษาให้หายได้ การรักษาด้วยรังสีมีบทบาทสำคัญอย่างยิ่งในการรักษามะเร็งปากมดลูก เนื่องจากมะเร็งที่พบส่วนใหญ่จะมีความไวต่อรังสีมากกว่าเนื้อเยื่อปกติข้างเคียง หลักการให้รังสีมีหลักใหญ่ 2 ข้อ^(4,54) คือ

1. การใช้แร่เรเดียมใส่เข้าไปในโพรงมดลูกและบริเวณปากมดลูก (Brachytherapy) การใส่แร่อย่างเดียว จะใช้ได้ผลดีเฉพาะในมะเร็งปากมดลูกระยะที่หนึ่งเท่านั้น ซึ่งเป็นระยะที่ไม่มีการลุกลามของมะเร็งไปนอกปากมดลูกทั้งนี้เนื่องจากคุณสมบัติของแร่นี้ จะมีความเข้มข้นลงไปตามกฎของระยะทาง คือ ที่ระยะห่างออกไป ความเข้มของแร่จะลดลงอย่างมาก ดังนั้นถ้ามะเร็งลุกลามออกนอกปากมดลูกการใส่แร่เรเดียมอย่างเดียวจะไม่เพียงพอที่จะควบคุมโรคได้ ต้องอาศัยการฉายรังสีจากภายนอกประกอบด้วย

2. การฉายรังสีจากภายนอก (External irradiation) โดยใช้เครื่องโคบอลต์-60 หรือเครื่องเร่งอนุภาค (Linear accelerator) นิยมใช้ในมะเร็งปากมดลูกระยะที่สองขึ้นไป ซึ่งการลุกลามของโรคไปยังอวัยวะอื่นๆ เช่น ช่องคลอดหรือมดลูก ซึ่งยังอยู่ในช่องเชิงกราน การฉายรังสีแบบนี้ต้องการระยะเวลาานประมาณ 4-5 สัปดาห์ เพื่อที่จะควบคุมโรคไม่ให้ลุกลามออกนอกเชิงกรานแล้วจึงตามด้วยการใส่แร่เข้าโพรงมดลูก

หลักการรักษาดังนี้ยังอาศัยความแตกต่างทางชีวรังสีระหว่างเนื้อเยื่อปกติและมะเร็ง ตลอดจนการเลือกพลังงาน และการกำหนดทิศทางเพื่อก่อให้เกิดความแตกต่างของปริมาณรังสีระหว่างมะเร็งและเนื้อเยื่อปกติให้มากที่สุด

การรักษามะเร็งปากมดลูกที่สถาบันมะเร็งแห่งชาติ แบ่งตามระยะต่างๆ โดยย่อ⁽⁵⁴⁾

ระยะแรก (Stage I) แบ่งเป็น

IA microinvasive - มักจะทำผ่าตัดมดลูก (TAH) ถ้าผู้ป่วยทำผ่าตัดไม่ได้หรือไม่ต้องการผ่าตัด ก็

อาจใส่แร่เรเดียม โดยประมาณ 6,000 – 8,000 mg/hr.

IB flank invasive – อาจทำผ่าตัด Wertheim operation หรือใช้ฉายรังสีบริเวณอวัยวะเชิงกรานทั้งหมด (whole pelvis) ประมาณ 2,000 – 2,500 rads ร่วมกับการใส่แร่เรเดียม 2,500 – 3,500 rads ที่จุด A (จุด A คือจุดที่ห่างจากปากมดลูกออกด้านข้าง 2 cm และสูงจากปากมดลูกขึ้นไป 2 cm)

ระยะที่สอง (Stage II)

- ฉายรังสี whole pelvis ประมาณ 4,000 – 4,500 rads ร่วมกับการใส่แร่เรเดียม 3,000 rads ที่จุด A

ระยะที่สาม (Stage III)

- ฉายรังสี whole pelvis ประมาณ 5,000 rads ร่วมกับการใส่แร่เรเดียม 3,000 rads ที่จุด A

ระยะที่สี่ (Stage IV)

- การรักษาพิจารณาเป็นรายๆไป ในบางรายอาจให้รังสีอย่างเดียว (IVA) บางรายอาจให้เคมีบำบัด ซึ่งในระยะนี้ถึงแม้ว่าการใช้รังสีรักษาจะไม่สามารถเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของผู้ป่วย แต่ก็สามารถใช้บรรเทาความเจ็บปวดทุกข์ทรมานได้ เช่น การใช้รังสีเพื่อให้เลือดหยุด หรือทำให้ตกขาวซึ่งมีกลิ่นเหม็นให้มีจำนวนน้อยลง หรือในกรณีที่มีการลามของมะเร็งไปยังกระดูกเชิงกราน ซึ่งผู้ป่วยจะมีอาการปวดกระดูกมากขึ้น รังสีรักษาก็จะบรรเทาอาการปวดได้

ผลการรักษา

พบว่ามียุทธการรอดชีวิต 5 ปี (5 year survival) โดย

Stage I พบประมาณร้อยละ 80-90

Stage II พบประมาณร้อยละ 60-70

Stage III พบประมาณร้อยละ 30-35

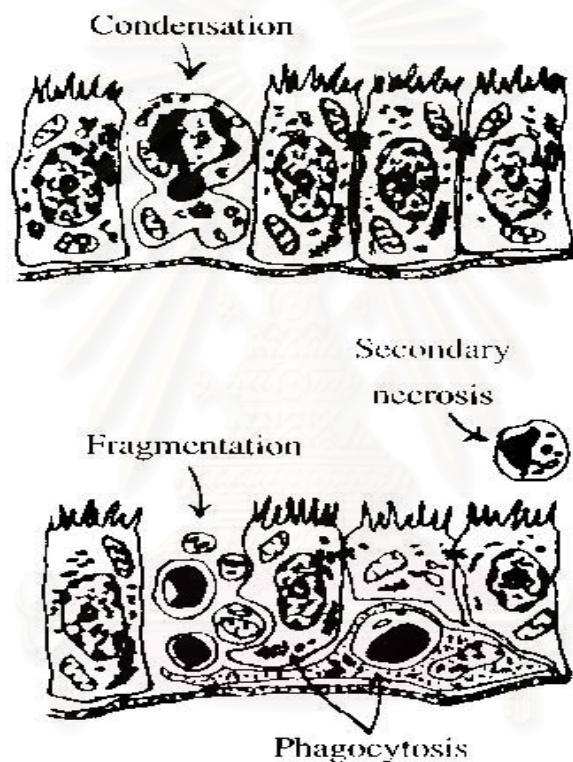
Stage IV พบประมาณร้อยละ 10-15

การเปลี่ยนแปลงของมะเร็งปากมดลูก หลังการรักษาด้วยรังสี

ในการรักษามะเร็งปากมดลูกด้วยรังสีนั้น รังสีจะทำลายเซลล์ได้ 3 รูปแบบ⁽⁶⁾ คือ

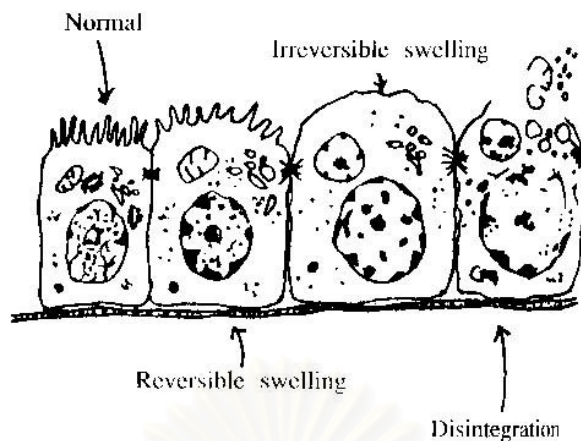
1. Reproductive death เป็นผลจากรังสีบั่นทอนขีดความสามารถของเซลล์ในการแบ่งตัว จากหลายสิบครั้งเหลือเพียง 2-5 ครั้ง

2. Apoptosis หรือที่เรียกว่า programmed cell death เป็นกระบวนการสลายตัวตามธรรมชาติของเซลล์ โดยรังสีจะเป็นตัวเร่งกระบวนการดังกล่าวให้แสดงออกเร็วขึ้น เซลล์ที่กำลังจะสลายตัวนั้น จะตรวจพบการหดตัว และแตกของเส้นใย chromatin เป็นท่อนเล็กๆ ในขณะที่เดียวกันเซลล์จะเปลี่ยนเป็นรูปกลมเพื่อแยกตัวจากการเกาะเกี่ยวกับเซลล์รอบข้าง เยื่อหุ้มเซลล์จะเว้า และโอบขึ้นส่วนของ chromatin กลายเป็นถุงเล็กๆ เรียกว่า apoptotic body ซึ่งจะถูกกินโดยเซลล์ข้างเคียง และ macrophage ดังรูปที่ 28



รูปที่ 28 การสลายตัวของเซลล์ โดยกระบวนการ apoptosis

3. Necrosis เป็นการสลายตัวของเซลล์ที่ได้รับบาดเจ็บอย่างรุนแรง และส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในเซลล์ที่สามารถตรวจพบ โดยกล้องจุลทรรศน์ เริ่มตั้งแต่การเกิดการบวมของเซลล์ ทำให้ organelle ต่างๆ เกิดการแตกสลาย เช่น lysosome เป็นผลให้มีการปลดปล่อยเอนไซม์ต่างๆ มาย่อยสลายเนื้อเซลล์ ดังรูปที่ 29 การตายแบบ necrosis นี้ จะนำไปสู่การเกิดปฏิกิริยาอักเสบและก่อให้เกิดแผลเป็น หรือพังผืด (fibrosis) ในภายหลัง ซึ่งแตกต่างจากการตายแบบ apoptosis ที่จะไม่ก่อให้เกิดการอักเสบ



รูปที่ 29 การสลายตัวของเซลล์โดยกระบวนการ necrosis

นอกจากรังสีจะทำลายเซลล์แล้ว ยังทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงต่อ chromosome และลักษณะของยีนที่จะส่งลักษณะต่อไปให้แก่เซลล์ที่เกิดขึ้นใหม่ ฉะนั้นการรักษาด้วยรังสีจึงมีผล ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ที่ไม่ใช่มะเร็งอย่างถาวรตลอดชีวิตของผู้ป่วย

การตรวจติดตามผลภายหลังการรักษา

จากการกลับเป็นซ้ำของมะเร็งปากมดลูกภายหลังการรักษาด้วยรังสี พบว่าร้อยละ 50 จะเกิดในปีแรก และร้อยละ 75 เกิดภายใน 2 ปีหลัง⁽⁵⁵⁾ ฉะนั้นหลังการรักษาด้วยรังสี จึงต้องมีการตรวจติดตามผลการรักษา โดยในระยะ 2 ปีหลังการรักษา ควรจะตรวจทุก 3 เดือน หลังจากนั้นตรวจทุก 6 เดือน จนครบ 5 ปี ต่อไปก็ตรวจประจำปี

การตรวจ Pap smear เป็นการตรวจที่นิยมใช้ในการตรวจติดตามผลภายหลังการรักษา เนื่องจากเป็นการตรวจที่ง่าย ราคาถูก และสามารถวินิจฉัยความผิดปกติของเซลล์ได้ตั้งแต่วัยแรก แต่การแปลผล Pap smear ในผู้ป่วยที่รักษาด้วยรังสีนั้นยาก และอาจผิดพลาดได้ง่าย เนื่องจากรังสีจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทั้งในเซลล์มะเร็ง และเซลล์ที่ไม่ใช่มะเร็ง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวอุษณีย์ สุวิมลธีระบุตร เกิดวันที่ 3 ธันวาคม พ.ศ.2512 ที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีการศึกษาศาสตรบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์-เคมี คณะศึกษาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ บางเขน ในปีการศึกษา 2535 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ที่จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อ พ.ศ. 2541 ปัจจุบัน รับราชการที่สถาบันมะเร็งแห่งชาติ จังหวัดกรุงเทพมหานคร



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย