

บทปริทัศน์

การประยุกต์ใช้เทคนิค FTIR ทางชีวการแพทย์

จิราพร จรอนันต์*, พัทธี เจียรนัยกุล**, พัทธราภรณ์ ทิพย์วัฒน์***

บทคัดย่อ

เทคนิค Infrared (IR) spectroscopy เป็นเทคนิคที่ใช้หลักการวิเคราะห์การสั่นของโมเลกุลของสารจากการได้รับพลังงานแสงอินฟราเรด ซึ่งคลื่นความถี่ที่จำเพาะของโมเลกุลหนึ่งๆ ทำให้เกิดพีค (peak) ที่ตำแหน่งเลขคลื่น (wave number) ทำให้ได้ลายพิมพ์อินฟราเรดสเปกตรัมตามพันธะในโมเลกุลของสารนั้นๆ ในการพัฒนาเทคนิคเพื่อให้สามารถทำงานได้รวดเร็วขึ้น มีความสามารถในการแยกสูง และสภาพไวสูง สามารถวิเคราะห์สารตัวอย่างที่มีในปริมาณน้อยๆ ได้ เทคนิค Fourier Transform-Infrared (FTIR) Spectroscopy จึงถูกพัฒนาขึ้น โดยคลื่นแสง IR จะถูกทำให้แทรกสอดกลายเป็นคลื่นเดี่ยวที่มีหลายความยาวคลื่น เรียกว่า Interferogram ซึ่งสามารถแปลงให้อยู่ในรูปแบบของสเปกตรัมได้โดยสมการ Fourier transform จากหลักการของ FTIR ที่สามารถวิเคราะห์แยกโมเลกุลของสารได้อย่างจำเพาะ ดังนั้น การนำเทคนิคดังกล่าวมาประยุกต์ใช้งานทางชีวการแพทย์จึงเป็นประเด็นที่น่าสนใจ เพื่อแสดงให้เห็นถึงประโยชน์ของเครื่องมือวิทยาศาสตร์ประเภทนี้ คณะผู้เขียนจึงรวบรวมข้อมูลงานวิจัยต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการใช้เทคนิค FTIR โดยมุ่งเน้นนำเสนอ การใช้เทคนิค FTIR ในงานทางด้านจุลชีววิทยา การศึกษาเซลล์ต้นกำเนิด (stem cells) และการศึกษามะเร็ง เพื่อให้เกิดความรู้และความเข้าใจ รวมถึงความเป็นไปได้ในการพัฒนาเทคนิค FTIR สู่การประยุกต์ใช้ในการแพทย์ที่เหมาะสม

คำสำคัญ: อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี, ชีวการแพทย์, จุลชีววิทยา, เซลล์ต้นกำเนิด, มะเร็ง

วันที่รับบทความ: ๑๕ พฤษภาคม ๒๕๖๐

วันที่อนุญาตให้ตีพิมพ์: ๑๘ กรกฎาคม ๒๕๖๐

* สาขาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

** กลุ่มวิชาเคมีคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

*** กลุ่มวิชาจุลชีววิทยาคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

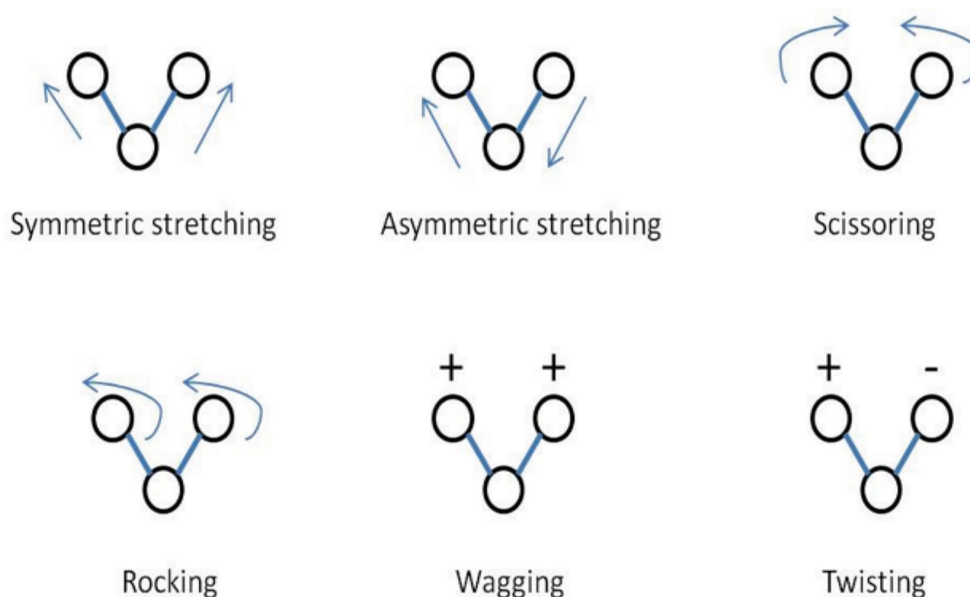
ผู้ให้ติดต่อ: อาจารย์ ดร.จิราพร จรอนันต์ สาขาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ๑๖๔ ถนนลงหาดบางแสน ตำบลแสนสุข อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี ๒๐๑๓๑ อีเมล chirapond1502@hotmail.com, chirapond@go.buu.ac.th

บทนำ

รังสีอินฟราเรดเป็นคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าที่มีช่วงอยู่ระหว่างแสงที่ตามองเห็นและรังสีไมโครเวฟ สามารถแบ่งตามความยาวคลื่นได้เป็น ๓ ช่วง ได้แก่ ๑) Far IR (ความยาวคลื่น ๒๕ - ๑,๐๐๐ μm) ๒) Mid IR (ความยาวคลื่น ๒.๕ - ๒๕ μm) และ ๓) Near IR (ความยาวคลื่น ๗๘๐ nm - ๒.๕ μm) ช่วงของรังสีที่นำมาประยุกต์ใช้ทางการแพทย์คือ ช่วงกลางของรังสีอินฟราเรด (mid IR) การอ้างอิงถึงช่วงคลื่นในย่านนี้ใช้เลขคลื่น (wave number) ซึ่งเป็นส่วนกลับของความยาวคลื่น มีหน่วยเป็นเซนติเมตร^{-๑} การดูดกลืนรังสีอินฟราเรดเกิดขึ้นได้ต่อเมื่อความถี่ที่ให้กับโมเลกุลเท่ากับค่าพื้นฐานของโมเลกุล การดูดกลืนคลื่นความถี่ที่จำเพาะของโมเลกุลหนึ่งๆ จะเกิดพีค (peak) ที่ตำแหน่งเลขคลื่นที่จำเพาะต่อโมเลกุลหนึ่งๆ เช่นกัน โดยปรกติโมเลกุลที่จะวิเคราะห์ด้วยรังสีอินฟราเรดจะต้องมีไดโพลโมเมนต์ (dipole moment) ซึ่งเป็นการเรียงตัวของ

ประจุไฟฟ้าสองประจุที่มีขนาดเท่ากันแต่มีเครื่องหมายตรงข้าม โดยที่ประจุทั้งสองจะวางอยู่ใกล้กันหรือมีการเปลี่ยนแปลงชั่วครู่ไฟฟ้า (electric dipole) ด้วย^๑ กล่าวอีกนัยคือการวัดการสั่นของพันธะในโมเลกุลนั่นเอง

การสั่นของโมเลกุลจำแนกได้เป็น ๒ ลักษณะ คือ ๑) การสั่นแบบยืดหด และ ๒) การบิดงอของพันธะ ลักษณะการสั่นแบบยืดหดเป็นการเปลี่ยนแปลงความยาวของพันธะ สามารถแบ่งการสั่นแบบยืดหดได้ ๒ ลักษณะคือ การยืดหดแบบสมมาตร (symmetric stretching) และการยืดหดแบบไม่สมมาตร (asymmetric stretching) การสั่นลักษณะที่สองคือ การบิดงอของพันธะ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงมุมของพันธะ ซึ่งสามารถแยกการสั่นลักษณะนี้ออกได้เป็น ๒ ประเภทใหญ่ๆ คือ การบิดงอในระนาบเดียวกัน ประกอบด้วย การสั่นแบบ scissoring และ rocking และการบิดงอนอกระนาบ ประกอบด้วย wagging และ twisting ดังแสดงในรูปที่ ๑



รูปที่ ๑ รูปแบบการสั่นของโมเลกุล

จากความสามารถในการจำแนกโมเลกุลชนิดต่างๆ จากรูปแบบการดูดกลืนรังสีอินฟราเรด ในระยะแรกจึงมีการประยุกต์เป็นเครื่องมืออินฟราเรดสเปกโตรสโคปี (infrared spectroscopy) ซึ่งมีส่วนประกอบคล้ายกับสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) แต่แหล่งกำเนิดแสงให้แสงที่ใช้เป็น IR ที่ถูกปล่อยออกมา เครื่องมือนี้สามารถวิเคราะห์ส่วนประกอบของสารในทางเคมีและชีวเคมี แต่มีข้อจำกัด คือ ใช้ระยะเวลาในการตรวจวิเคราะห์นาน เนื่องจากส่วนแยกแสงหรือโมโนโครเมเตอร์สามารถแยกรังสีได้ทีละความยาวคลื่น ต่อมาจึงมีการพัฒนา Fourier Transform-Infrared Spectroscopy (FTIR) ออกมาเพื่อช่วยลดระยะเวลาในขั้นตอนการตรวจวัด โดยคลื่นแสงจะถูกทำให้แทรกสอดกลายเป็นคลื่นเดี่ยวที่มีความยาวคลื่น เรียกว่า Interferogram ซึ่งสามารถแปลงให้อยู่ในรูปแบบของสเปกตรัมได้โดยสมการ Fourier transform^๑ จึงเรียกเทคนิคนี้ว่า FTIR

นอกจากนี้เทคนิค FTIR ยังถูกดัดแปลงให้สามารถนำมาใช้กับตัวอย่างได้สะดวกขึ้นโดยทำให้รังสีอินฟราเรดหักเหไปในคริสตัลที่มีดัชนีหักเหแสงด้วยหลักการ Attenuated Total Reflectance (ATR) หรือที่เรียกว่า ATR-FTIR เมื่อแสงถูกหักเหไปตามพื้นผิวของคริสตัล รังสี IR จะถูกดูดกลืนได้โดยตัวอย่างที่วางอยู่บนพื้นผิวคริสตัล และสะท้อนกลับเข้ามายังคริสตัล โดยเกิดเหตุการณ์ลักษณะนี้ไปจนถึงสิ้นสุดความยาวของพื้นผิว รังสีที่เหลือจะถูกสะท้อนกลับไปยังตัวรับสัญญาณ (detector) และประมวลผลออกมาในรูปแบบของสเปกตรัม สำหรับการตรวจวิเคราะห์ที่จำเป็นต้องเก็บข้อมูลสเปกตรัมจากตำแหน่งที่จำเพาะสามารถเพิ่มตัวเลือกให้กับเทคนิค FTIR ได้โดยใช้ microscope เลือกจุดที่ต้องการเก็บสเปกตรัม จากนั้นจึงเก็บสเปกตรัมตามหลักการของ FTIR ซึ่งเรียกเทคนิคนี้ว่า FTIR microspectroscopy อีกทางเลือกหนึ่งสำหรับงานวิจัยที่ต้องการสแกนตัวอย่างในพื้นที่กว้างๆ สามารถเพิ่ม Focal Plane Array (FPA) เข้าไป FTIR หรือที่เรียกว่า FPA-FTIR เพื่อสแกนพื้นที่ขนาด $n \times n$ ผลลัพธ์ที่ออกมาในลักษณะรูปภาพ (imaging) ซึ่งเป็นแผนภาพความร้อนของพื้นที่ผิวตัวอย่าง นอกจากนี้ยังให้ผลออกมาในรูปแบบของสเปกตรัมได้อีกด้วย

การตรวจวิเคราะห์ด้วยรังสีอินฟราเรดจะให้ผลออกมาในรูปแบบของสเปกตรัมที่แสดงความสัมพันธ์ของเลขคลื่นและ intensity โดยสารชีวโมเลกุลแต่ละชนิดจะมีชุดเลขคลื่นความถี่ที่จำเพาะ^๑ ดังนั้นเพื่อแสดงให้เห็นถึงประโยชน์ของรังสีอินฟราเรดในทางการแพทย์ ผู้เขียนจึงขอเสนอการประยุกต์ใช้เทคนิค FTIR ในงานด้านจุลชีววิทยา การศึกษาเซลล์ต้นกำเนิด (stem cells) และการศึกษาเซลล์มะเร็ง เป็นต้น

การประยุกต์ใช้ FTIR spectroscopy ในงานวิจัยด้านจุลชีววิทยา

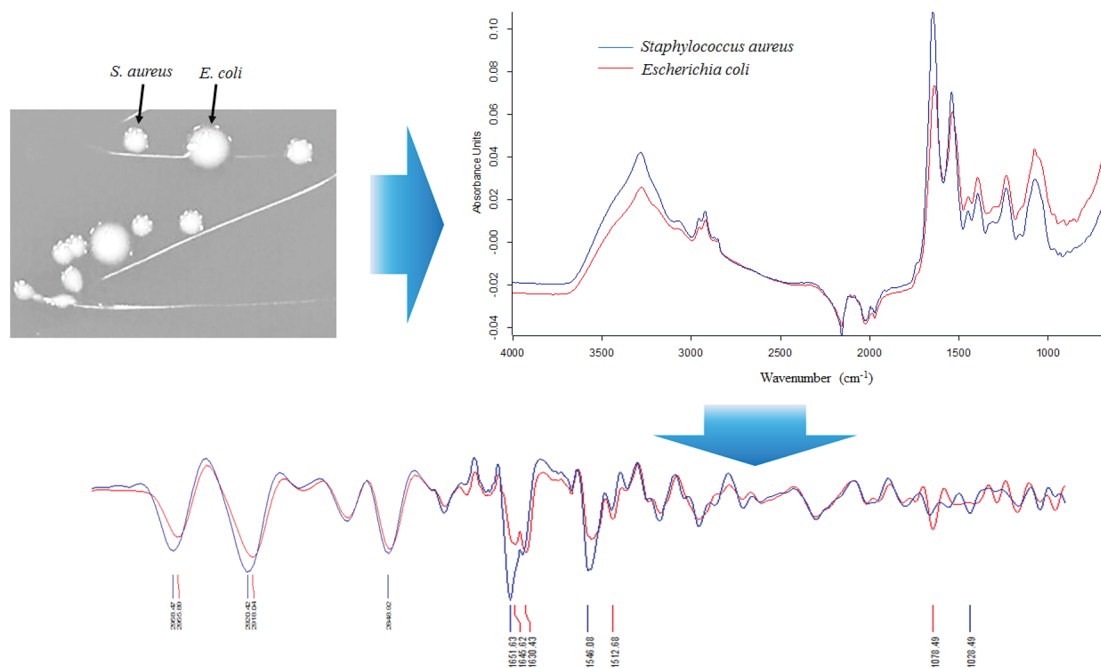
จุลชีววิทยาเป็นการศึกษาจุลินทรีย์ขนาดเล็กที่ต้องอาศัยการมองเห็นผ่านกล้องจุลทรรศน์ (microscopy) โดยแบคทีเรียเป็นกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีการศึกษาค้นคว้ามากที่สุด แบคทีเรียบางชนิดอาศัยอยู่บนร่างกายมนุษย์แบบพึ่งพาและแบคทีเรียหลายชนิดเป็นปัญหาก่อโรคในคน ในการแยกวินิจฉัยจุลินทรีย์ก่อโรคทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ใช้วิธีทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ (biochemical tests) มีหลายขั้นตอนต้องแยกเชื้อ เพาะเลี้ยงก่อนนำมาทดสอบ จึงใช้เวลานานและต้องอาศัยความชำนาญของผู้ปฏิบัติงาน ปัจจุบันแพทย์มักใช้การย้อมแกรมเพื่อจำแนกเชื้อก่อนและให้ยาต้านจุลชีพตามกลุ่มแกรมบวกหรือแกรมลบ การเพาะเลี้ยงและรายงานผลเพาะเชื้อจึงมักให้ผลในแง่การยืนยันการรักษาเบื้องต้น ทำให้มีความต้องการนวัตกรรมหรือเทคโนโลยีสมัยใหม่ในการช่วยแยกวินิจฉัยเชื้อที่มีความรวดเร็วและแม่นยำในอนาคต โดย FTIR spectroscopy ถูกนำมาใช้แยกวินิจฉัยจุลินทรีย์ด้วยการวิเคราะห์องค์ประกอบหลักของเซลล์แบคทีเรีย ได้แก่ โปรตีน กรดไขมัน คาร์โบไฮเดรต กรดนิวคลีอิก และไลโปโพลีแซคคาไรด์ เป็นต้น แม้ว่าสเปกตรัมของเซลล์แบคทีเรียส่วนใหญ่ดูคล้ายกันมาก แต่เมื่ออาศัยการวิเคราะห์ความแตกต่างเชิงปริมาณ ความเข้มข้นและความกว้างของสเปกตรัม ร่วมกับการระบุตำแหน่งเลขคลื่นความถี่ที่จำเพาะทำให้สามารถแยกความแตกต่างของเซลล์แบคทีเรียได้^๓ จากการวิเคราะห์องค์ประกอบรวมของเชื้อแบคทีเรียด้วย FTIR spectroscopy ได้มีการรวบรวมเป็นฐานข้อมูล ดังแสดงในตารางที่ ๑

ตารางที่ ๑ หมู่ฟังก์ชันที่สัมพันธ์กับสเปกตรัมการสั่นของโมเลกุลหลักของเชื้อแบคทีเรียที่ถูกระบุด้วยรังสีอินฟราเรด

เลขคลื่น (cm ⁻¹)	หมู่ฟังก์ชันของสารชีวโมเลกุล
๓๒๐๐	N-H stretching of amide A in proteins ^๗
๒๙๕๗	C-H asymmetric stretching of -CH ₃ in fatty acids ^๘
๒๙๑๙	C-H asymmetric stretching of > CH ₂ in fatty acids ^๖
๒๘๗๐	C-H symmetric stretching of -CH ₃ in fatty acids ^๗
๒๘๕๐	C-H symmetric stretching of > CH ₂ in fatty acids ^๗
๑๗๔๐	> C = O stretching of lipid esters ^๗
๑๖๙๕ - ๑๖๗๕	Amide I band component of proteins ^{๗, ๑๐}
๑๖๕๕	Amide I of α -helical structure of proteins ^{๗, ๑๐}
๑๖๓๗	Amide I of β -plated sheet structure of proteins ^{๗, ๑๐}
๑๕๕๐ - ๑๕๒๐	Amide II band of proteins ^{๑๐ - ๑๒}
๑๔๖๘	C-H deformation of > CH ₂ in lipids ^๗
๑๔๐๐	C = O symmetric stretching of COO- group in amino acids, fatty acids ^๗
	Amide III band components of proteins ^{๑๑ - ๑๓}
๑๓๐๕ - ๑๒๐๐	P = O asymmetric stretching in DNA, RNA and phospholipids ^{๑๐}
๑๒๔๕	P = O symmetric stretching in DNA, RNA and phospholipids ^{๑๐}
๑๐๘๐	Finger print region
๙๐๐ - ๖๐๐	

การแยกเชื้อแบคทีเรียด้วย FTIR spectroscopy สามารถทำได้โดยการนำเชื้อจากอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งมาเตรียมในลักษณะฟิล์มบางแบบแห้ง จากการวิเคราะห์กว่า ๒๔๐ สเปกตรัมของเชื้อจุลินทรีย์กว่า ๓๐ สายพันธุ์ ทั้งแบคทีเรียแกรมบวก แบคทีเรียแกรมลบ และยีสต์ สเปกตรัมของรังสีอินฟราเรดในช่วง ๓๐๐๐ - ๒๘๐๐, ๑๕๐๐ - ๑๔๐๐ และ ๑๒๐๐ - ๙๐๐ เซนติเมตร^๑ ทำให้จัดจำแนกตามองค์ประกอบด้วยการวิเคราะห์ hierarchical cluster analysis (HCA) สามารถแยกจุลินทรีย์แต่ละชนิดออกจากกัน รวมทั้งแยกวิเคราะห์ในระดับ genus และ species^๔ ดังแสดงในรูปที่ ๒ จึงทำให้ FTIR spectroscopy ถูกนำมาใช้เพื่อแยกวินิจฉัยเชื้อจุลินทรีย์ได้ ในการประยุกต์ใช้ทางการแพทย์ อาทิเช่น การแยกวินิจฉัยเชื้อก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร ได้แก่ การแยกวินิจฉัยเชื้อ *Listeria monocytogenes* ในตัวอย่างตรวจจากอาหาร สิ่งแวดล้อม คน และสัตว์ ด้วยพีคที่เลขคลื่น ๙๐๐ และ ๑๒๐๐ เซนติเมตร^๑ ในส่วนโพลีแซคคาไรด์ของเชื้อ และสามารถแยกเชื้อได้ในระดับซีโรวาร์ (serovar) จากการวิเคราะห์ช่วงสเปกตรัม ๙๐๐ - ๑๒๐๐ เซนติเมตร^๑ และ ๑๔๐๐ - ๑๘๐๐ เซนติเมตร^๑ การแยกความแตกต่างของเชื้อ *E. coli* ในระดับซีโรไทป์ (serotype) โดยใช้ FTIR spectroscopy วิเคราะห์ส่วนไลโปโพลีแซคคาไรด์

ของเชื้อที่สกัดด้วยฟีนอล จาก *E. coli* ทั้งหมด ๕ สายพันธุ์ โดยสามารถใช้ช่วงสเปกตรัม ๙๐๐ - ๑๒๐๐ เซนติเมตร^๑ ในส่วนของโพลีแซคคาไรด์ ซึ่งจำเพาะในระดับซีโรไทป์^๖ การตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อในกระแสเลือด โดยใช้ ATR-FTIR spectroscopy ที่ใช้ตรวจวิเคราะห์เชื้อแบคทีเรียในตัวอย่างเลือด ซึ่งสามารถวินิจฉัยแยกเชื้อ *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) ในการเพาะเชื้อจากเลือด โดยวิเคราะห์แบบแผนสเปกตรัมตามองค์ประกอบทางชีวเคมีของเชื้อ ได้แก่ ๑) โพลีแซคคาไรด์ในช่วงสเปกตรัม ๙๐๐ - ๑๒๐๐ เซนติเมตร^๑ โดยเฉพาะการสั่นสะเทือนของ C-O-C และ C-O-P stretching ๒) ช่วงสเปกตรัม ๑๓๐๐ - ๑๗๐๐ เซนติเมตร^๑ ที่สัมพันธ์กับไขมัน และโปรตีน [amide I ที่ ~๑๖๕๐ เซนติเมตร^๑, amide II ที่ ~๑๕๕๐ เซนติเมตร^๑ และที่ ~๑๔๐๐ เซนติเมตร^๑ (C = O stretching ของกรดอะมิโน)] ๓) C = O ของ lipids esters, carboxyl groups, และกรดนิวคลีอิกในช่วงสเปกตรัม ๑๗๕๐ - ๑๘๕๐ เซนติเมตร^๑ ๔) C-H ของ CH₂ ในกรดไขมัน และ CH₃ ในไขมันและโปรตีน ที่ช่วงสเปกตรัม ๒๘๐๐ - ๓๐๐๐ เซนติเมตร^๑ และ ๕) N-H ของ amide ในโปรตีน ที่ช่วงสเปกตรัม ๓๑๐๐ - ๓๔๐๐ เซนติเมตร^{๑ ๗}



รูปที่ ๒ การตรวจวิเคราะห์และจำแนกจุลชีพ *S. aureus* และ *E. coli* ด้วย FT-IR microspectroscopic

นอกจากการใช้จำแนกสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดแล้ว ดังที่กล่าวมา FTIR spectroscopy ยังสามารถแยกวินิจฉัยระหว่างเชื้อได้ เชื้อ *E. coli* และ *Salmonella Typhimurium* (*S. Typhimurium*) ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบรูปแท่งในกลุ่ม Enterobacteriaceae ซึ่ง FTIR spectroscopy สามารถแยกวินิจฉัยเชื้อ ๒ ชนิดนี้ได้โดยใช้พิกของช่วงสเปกตรัม ๑๕๘๙ - ๑๔๙๓ เซนติเมตร^๑ โดยปริมาณเชื้อต่ำสุดที่สามารถแยกวินิจฉัยได้ประมาณ ๕๐๐ CFU/ml^๒ การระบุและแยกเชื้อที่ไม่ทราบชนิดหรือสายพันธุ์ ดังการศึกษาของ Maity และคณะ^๓ ที่ใช้ FTIR spectroscopy จำแนกเชื้อ ๒ ชนิดที่แยกได้จากกากน้ำมัน (OS1 และ OS2) โดยใช้เชื้อ *Bacillus flexus* (*B. flexus*) และ *Sternotrophomonas maltophilia* (*S. maltophilia*) เป็นเชื้ออ้างอิง ซึ่งเชื้ออ้างอิง ๒ ชนิดนี้มีลักษณะรูปแท่ง (bacilli) เหมือนกัน แต่มีความแตกต่างกันที่ชั้นโครงสร้างของผนังเซลล์และองค์ประกอบอื่นๆ ของเชื้อ เช่น กรดนิวคลีอิก ไขมัน และโปรตีน โดย FTIR spectroscopy สามารถแยกเชื้อ ๒ ชนิดนี้ได้ เชื้อ OS1 มีความจำเพาะที่พิก ๑๓๓๙ เซนติเมตร^๑ และเชื้อ OS1 มีความจำเพาะที่พิก ๑๐๙๖ เซนติเมตร^๑ สำหรับองค์ประกอบของเซลล์ที่ทำให้เชื้อ OS1 คล้ายคลึงกับ *B. flexus* และเชื้อ OS2 คล้ายคลึงกับ

S. maltophilia ได้แก่ ผนังเซลล์ในช่วงสเปกตรัม ๓๐๐๐ - ๒๘๐๐ เซนติเมตร^๑ ไขมันในช่วงสเปกตรัม ๑๕๐๐ - ๑๓๐๐ เซนติเมตร^๑ และคาร์โบไฮเดรตในส่วนผนังเซลล์ในช่วงสเปกตรัม ๑๑๕๐ - ๑๐๐๐ เซนติเมตร^๑ ดังนั้น เมื่อเปรียบเทียบแบบแผนสเปกตรัมของเชื้อ ๒ ชนิด จากกากน้ำมันกับเชื้ออ้างอิง ทำให้ทราบได้ว่าเชื้อชนิดหนึ่งมีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *B. flexus* และอีกชนิดคล้ายกับ *S. maltophilia* แต่มีความแตกต่างกันในระดับสายพันธุ์ จากความจำเพาะในส่วน fingerprint region ช่วงสเปกตรัม ๑๕๐๐ - ๘๖๐ เซนติเมตร^๑ และ amide ช่วงสเปกตรัม ๑๓๐๐ - ๑๒๐๐ เซนติเมตร^๑ ^๔

ดูเหมือนว่า FTIR spectroscopy เป็นเทคนิคที่ให้ความหวังในการนำมาเพื่อตรวจสอบ หรือจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อจุลชีพได้ ตอบโจทย์เรื่องความรวดเร็ว โดยไม่จำเป็นต้องทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี ทำให้นอกจากลดเวลาแล้วยังลดการใช้น้ำยาหรือสารเคมีในการตรวจวิเคราะห์ คำถามที่เหลืออยู่ คือ ความถูกต้อง และแม่นยำ หากในอนาคตมีการเพิ่มขึ้นของฐานข้อมูล (database) ของอินฟราเรดสเปกตรัมของแต่ละเชื้อมากขึ้น รวมทั้งการทำให้การแปลผลอยู่ในรูปแบบเข้าใจง่ายขึ้น น่าจะเป็นปัจจัยเสริม ให้มีการประยุกต์ใช้ในวงกว้างขึ้น เช่น ทางด้านการแพทย์ อุตุสสาหกรรม และสิ่งแวดล้อม

การประยุกต์ใช้ FTIR spectroscopy ในงานวิจัยเซลล์ต้นกำเนิด

เซลล์ต้นกำเนิดเป็นเซลล์ที่มีความสามารถในการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนสูง และสามารถพัฒนาหรือเปลี่ยนแปลง (differentiation) ไปเป็นเซลล์เป้าหมายที่จำเพาะได้หลายชนิด เนื่องจากเซลล์เหล่านี้สามารถเปลี่ยนแปลงไปตามสิ่งแวดล้อม ดังนั้นก่อนที่จะนำเซลล์ต้นกำเนิดไปใช้ในทางการแพทย์เพื่อรักษาผู้ป่วย สิ่งที่สำคัญอย่างยิ่งคือ การคัดแยกและการจำแนกระยะของเซลล์ให้ถูกต้องมากที่สุด ปัจจุบันเทคนิคที่ใช้ในการจำแนกระยะการพัฒนาของเซลล์มีหลายเทคนิค เช่น polymerase chain reaction (PCR), flow cytometry, immunohistochemistry เทคนิคเหล่านี้มีข้อจำกัดในด้านการเตรียมตัวอย่าง ซึ่งใช้เวลานาน ใช้ตัวอย่างในปริมาณมากและสารเคมีบางชนิดยังก่อให้เกิดความเสียหายต่อเซลล์ ดังนั้นเทคนิค FTIR microspectroscopy จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่มีประสิทธิภาพและมีข้อดีเหนือกว่าวิธีอื่นๆ ที่กล่าวมาแล้ว

๑. การจำแนกระยะของเซลล์ต้นกำเนิดชนิด Embryonic stem cell (ESC) ด้วย FTIR microspectroscopy

การศึกษาแรกเริ่มเป็นงานวิจัยของ Ami และคณะ^{๓๔} ซึ่งใช้เทคนิค FPA-FTIR microspectroscopy ติดตามการเปลี่ยนแปลงเซลล์ต้นกำเนิดชนิด mouse ESC โดยเลี้ยงเซลล์แบบ spontaneous differentiation จากการวิเคราะห์สเปกตรัมของรังสีอินฟราเรด พบการลดลงของพีคที่เลขคลื่น ๙๙๔ และ ๙๑๔ เซนติเมตร^{๓๕} ในวันที่ ๑๐ ของการพัฒนาเซลล์ ซึ่งเป็นสเปกตรัมของกรดนิวคลีอิก และตำแหน่งเลขคลื่นที่ ๙๖๖ เซนติเมตร^{๓๖} เกิดจาก C-C stretching ของดีเอ็นเอก็ลดลงในวันที่ ๑๐ เช่นกัน ส่วนอินฟราเรดสเปกตรัมของโปรตีน α -helix และ β -turn secondary structures ที่เลขคลื่น ๑๗๐๐ - ๑๖๐๐ เซนติเมตร^{๓๗} กลับสูงขึ้นอย่างมาก ข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์รูปแบบของอินฟราเรดสเปกตรัมบ่งชี้ว่ากระบวนการถอดรหัสในระดับ mRNA เกิดขึ้นในช่วง ๙ วันแรกของการพัฒนาเซลล์ หลังจากนั้นเซลล์เริ่มมีการแปลรหัสจาก mRNA เป็นโปรตีนในรูปของโปรตีนปฐมภูมิและทุติยภูมิ นอกจากนี้ยังมีการประยุกต์ใช้เทคนิค FPA-FTIR microspectroscopy ติดตามการเปลี่ยนแปลง ESC ของมนุษย์ด้วย^{๓๘} โดยผู้วิจัยได้แสดงให้เห็นถึงศักยภาพของเทคนิค FPA-FTIR microspectroscopy ในการแยกระยะการพัฒนาของ human ESC ไปเป็นเซลล์ตั้งต้นทั้ง ๓ สาย คือ ectoderm, endoderm และ mesoderm ซึ่งการแยกเซลล์อาศัยความแตกต่างขององค์ประกอบของสารชีวโมเลกุลภายในเซลล์เพียง ๒ ชนิด คือ ไขมัน (เลขคลื่น

๒๙๒๐, ๒๘๕๐, ๑๗๓๐, ๑๔๕๐ และ ๑๓๙๐ เซนติเมตร^{๓๙}) และไกลโคเจน (เลขคลื่น ๒๙๒๐ และ ๑๑๕๕ เซนติเมตร^{๔๐}) เมื่อทำการยืนยันด้วยวิธีการวิเคราะห์สถิติ multivariate data analysis เช่น Principal Component Analysis (PCA), Partial Least Squares Discriminant Analysis (PLS-DA) และ Artificial Neural Networks (ANN) พบว่าการใช้เทคนิคนี้สามารถแยกเซลล์ทั้ง ๓ สายได้แม่นยำถึงร้อยละ ๙๗

เทคนิค FTIR microspectroscopy เมื่อนำมาใช้ร่วมกับแหล่งกำเนิดแสงแบบ synchrotron ซึ่งมีความเข้มแสงและความบริสุทธิ์สูงมาก พบว่าสามารถศึกษารายละเอียดเชิงองค์ประกอบของสารชีวโมเลกุลของเซลล์ได้ถึงระดับเซลล์เดี่ยว (single cell) โดยการศึกษาที่ประยุกต์ใช้ Synchrotron-FTIR microspectroscopy (SR-FTIR microspectroscopy) จำแนกระยะของเซลล์ต้นกำเนิดชนิด mouse ESC ที่พัฒนาไปเป็นเซลล์ตับ^{๔๑} พบว่าอินฟราเรดสเปกตรัมที่เลขคลื่น ๑๖๕๖ เซนติเมตร^{๔๒} ของ α -helix สูงขึ้นในเซลล์ตับที่โตเต็มวัยมากกว่าเซลล์ต้นกำเนิด ซึ่งสอดคล้องกับหน้าที่ของเซลล์ตับที่ทำหน้าที่ในการสร้างโปรตีน เช่น แอลบูมิน (albumin) ซึ่งมี α -helix เป็นองค์ประกอบ นอกจากนี้อินฟราเรดสเปกตรัมที่บ่งชี้ความแตกต่างระหว่าง mouse ESC กับเซลล์ตับคือ พีคที่เลขคลื่น ๑๖๒๗ เซนติเมตร^{๔๓} จาก β -sheet, เลขคลื่น ๒๘๕๒ และ ๒๙๒๓ เซนติเมตร^{๔๔} เกิดจาก C-H stretching ของไขมัน และพีคที่เลขคลื่น ๑๗๔๐ เซนติเมตร^{๔๕} ซึ่งเกิดจาก ester carbonyl stretching ของไขมันด้วย

ส่วนการเปรียบเทียบศักยภาพของเทคนิค FPA-FTIR microspectroscopy กับ SR-FTIR microspectroscopy ในการแยกระยะของเซลล์ต้นกำเนิด พบว่าเมื่อใช้ทั้ง ๒ เทคนิคนี้แยกระยะของเซลล์ต้นกำเนิดชนิด mouse ESC, neural progenitor cells (NPC) และ embryonic stem derived neural cells (ESNCS)^{๔๖} สิ่งที่ทำให้สามารถคัดแยกความแตกต่างระหว่างเซลล์ทั้ง ๓ ชนิดนี้ได้คือ อินฟราเรดสเปกตรัมของไขมันและโปรตีน พบว่าที่เลขคลื่น ๒๙๒๐ เซนติเมตร^{๔๗} เกิดจาก asymmetric CH_3 stretching เลขคลื่น ๒๘๕๐ เซนติเมตร^{๔๘} เกิดจาก symmetric CH_2 stretching และเลขคลื่นที่ ๑๗๔๐ เซนติเมตร^{๔๙} เกิดจาก C = O stretching ของ ester carbonyl ซึ่งเป็นอินฟราเรดสเปกตรัมที่เป็นเอกลักษณ์เฉพาะของไขมัน มีพีคเพิ่มสูงขึ้นในเซลล์ประสาทเมื่อเทียบกับเซลล์ NPC นอกจากนี้ยังพบว่าอินฟราเรดสเปกตรัมของทั้ง ๒ เทคนิคให้ผลสอดคล้องกันไม่ว่าจะใช้ FPA-FTIR microspectroscopy หรือใช้ SR-FTIR microspectroscopy ยิ่งไปกว่านั้น

อินฟราเรดสเปกตรัมที่ได้จากการวิเคราะห์จากเซลล์เดี่ยว (single cell) หรือเซลล์กลุ่ม (clump cell) ก็ให้ผลไม่ต่างกัน

๒. การจำแนกระยะของเซลล์ต้นกำเนิดชนิด Adult stem cell (ASC) ด้วย FTIR microspectroscopy

การประยุกต์ใช้เทคนิค FPA-FTIR microspectroscopy ในการจำแนกระยะของ ASC เกิดขึ้นครั้งแรกเมื่อปี ค.ศ. ๒๐๐๗^{๑๗} เป็นการศึกษาการแยกระยะของเซลล์ต้นกำเนิดมนุษย์ชนิดมีเซนไคม์ (human mesenchymal stem cell, hMSC) ที่เหนี่ยวนำให้พัฒนาไปเป็นเซลล์กระดูก (osteocyte) ซึ่งการคัดแยกระยะของเซลล์โดยใช้ FPA-FTIR microspectroscopy ทำได้ดีแม้ใช้เซลล์เพียงเซลล์เดี่ยว (single cell) พบว่าอินฟราเรดสเปกตรัมที่แตกต่างกันในเซลล์เหนี่ยวนำกับเซลล์ควบคุมที่เห็นได้ชัดเจนคือ พีคที่เลขคลื่น ๙๘๗, ๑๐๘๖ และ ๑๑๑๒ เซนติเมตร^๑ ของ calcium phosphate salt ซึ่งเป็นลักษณะโดยทั่วไปของเซลล์กระดูกที่มีการสะสมแคลเซียมภายในเซลล์ นอกจากนี้เทคนิค FTIR microspectroscopy ยังถูกนำมาใช้ศึกษาการจำแนกเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์ที่พัฒนาไปเป็นเซลล์กระดูกอ่อน (chondrocyte)^{๑๘} โดยเหนี่ยวนำเซลล์ต้นกำเนิดด้วยสารชักนำ ๒ ชนิดคือ TGF- β 3 และ BMP-6 เป็นระยะเวลา ๒๑ วัน สเปกตรัมจาก SR-FTIR microspectroscopy ของเซลล์ต้นกำเนิดที่ถูกกระตุ้นให้พัฒนาเป็นเซลล์กระดูกอ่อน เมื่อเวลาผ่านไป ๒๑ วัน จะปรากฏพีคชัดเจนที่ตำแหน่งเลขคลื่น ๑๒๐๓, ๑๒๓๔ และ ๑๓๓๘ เซนติเมตร^๑ ซึ่งเป็นอินฟราเรดสเปกตรัมที่เป็นเอกลักษณ์ของ collagen type II ซึ่งเป็นสารชีวโมเลกุลที่เป็นตัวบ่งชี้ที่สำคัญของเซลล์กระดูกอ่อน สารชีวโมเลกุลอีกชนิดหนึ่งที่พบในเซลล์กระดูกอ่อนคือ aggrecan ซึ่งมีซัลเฟต (SO₄, Sulfate) เป็นองค์ประกอบอยู่ โดยในเซลล์ต้นกำเนิดที่ถูกเหนี่ยวนำให้พัฒนาเป็นเซลล์กระดูกอ่อนจะพบพีคของ sulfate stretch ปรากฏที่ตำแหน่งเลขคลื่น ๑๒๔๕ เซนติเมตร^๑ ผลที่ได้จากการวิเคราะห์สเปกตรัมของเซลล์กระดูกอ่อนนี้ สอดคล้องกับผลที่ได้จากเทคนิค PCR และผลจากการย้อม immune-histochemistry ซึ่งพบการแสดงออกของสารชีวโมเลกุลที่เป็นองค์ประกอบหลักในเซลล์กระดูกอ่อน คือ collagen type II และ aggrecan

จากงานวิจัยดังกล่าวข้างต้นจะเห็นว่าการใช้เทคนิค FTIR microspectroscopy เพื่อคัดแยกระยะการพัฒนาของเซลล์ต้นกำเนิดชนิด ESC นั้น อาศัยความแตกต่างของอินฟราเรดสเปกตรัมของไขมัน โปรตีน และกรดนิวคลีอิก ส่วนอินฟราเรดสเปกตรัมที่สามารถใช้จำแนกระยะของเซลล์ต้นกำเนิด ASC เป็นสเปกตรัมที่มาจากการดูดกลืนแสงอินฟราเรดของ

สารชีวโมเลกุลที่จำเพาะต่อเซลล์เป้าหมายนั้นๆ หรือเป็นสารชีวโมเลกุลที่เซลล์เป้าหมายนั้นๆ สร้างขึ้นเพื่อเอื้อต่อการทำหน้าที่ที่สมบูรณ์ของเซลล์เอง

การประยุกต์ใช้ FTIR microspectroscopy ในงานวิจัยด้านมะเร็ง

การใช้เทคนิค FTIR microspectroscopy ในตัวอย่างเนื้อเยื่อทางชีวภาพ มีรายงานครั้งแรกโดย Barer R และคณะ^{๑๙} แต่การแปรผลของอินฟราเรดสเปกตรัมทำได้ยากเนื่องจากข้อจำกัดของเครื่องมือ ดังนั้นจึงมีการพัฒนาเครื่องมือและเทคนิค FTIR microspectroscopy จนสามารถนำมาใช้ในงานต่างๆ อย่างหลากหลายในปัจจุบัน ข้อดีของเทคนิคนี้คือไม่ทำให้ตัวอย่างถูกทำลายหลังการตรวจวิเคราะห์ และไม่จำเป็นต้องใช้สารเคมีในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง ดังนั้นการพัฒนาและประยุกต์ใช้เทคนิคนี้จึงมีประโยชน์ต่อการศึกษาวิจัยทางการแพทย์ รวมถึงการศึกษาในโรคมะเร็ง ทั้งในแง่ของการตรวจวินิจฉัยจำแนกโรค และการตรวจการตอบสนองต่อยาเคมีบำบัด โดยมีการศึกษาทั้งในระดับเซลล์เพาะเลี้ยง ตัวอย่างเนื้อเยื่อ และซีรัม

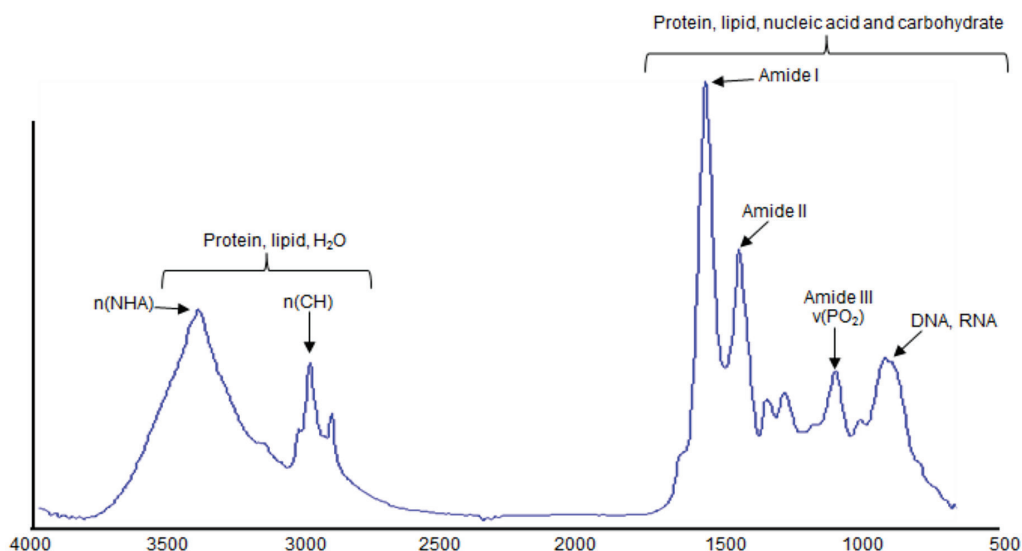
การตรวจวินิจฉัยจำแนกโรคมะเร็งชนิดต่างๆ ด้วย FTIR microspectroscopy

โรคมะเร็งเกิดจากเซลล์มีความผิดปกติของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการควบคุมการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์ การซ่อมแซมดีเอ็นเอและการตายของเซลล์แบบอะพอพโตซิส^{๒๐} ปัจจุบันโรคมะเร็งเป็นสาเหตุการเสียชีวิตอันดับ ๑ ในประเทศไทย รายงานจากสถาบันมะเร็งแห่งชาติในปี พ.ศ. ๒๕๕๔ พบว่ามีผู้เสียชีวิตด้วยโรคมะเร็งจำนวน ๖๑,๐๘๒ คน^{๒๑} สำหรับการตรวจวินิจฉัยที่เป็นวิธีมาตรฐานคือการตรวจชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยา ซึ่งต้องอาศัยความเชี่ยวชาญและประสบการณ์ของพยาธิแพทย์ ดังนั้นการพัฒนาเทคนิค วิธีการที่มีประสิทธิภาพและมีความถูกต้องสูงจึงมีความสำคัญต่อการตรวจวินิจฉัยโรคมะเร็ง

เทคนิค FTIR microspectroscopy สามารถตรวจวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของเซลล์และแสดงผลในรูปของอินฟราเรดสเปกตรัมซึ่งสามารถบ่งชี้ได้ถึงชีวโมเลกุล ได้แก่ โปรตีน คาร์โบไฮเดรต ไขมัน และกรดนิวคลีอิก ดังแสดงในรูปที่ ๓ และสามารถชี้ตัวบ่งชี้ทางชีวภาพของเซลล์ได้ มีรายงานการใช้เทคนิคนี้ในการศึกษาเพื่อวินิจฉัยโรคมะเร็งชนิดต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ ๒ เช่น มะเร็งปากมดลูก มะเร็งเต้านม มะเร็งลำไส้ และมะเร็งตับ เป็นต้น โดยแบ่งตำแหน่ง

ฟิสิกอินฟราเรดสเปกตรัมที่สำคัญเป็น ๒ ส่วน คือ ส่วนที่เป็นลายพิมพ์อินฟราเรดสเปกตรัม (Fingerprint spectral region) ตั้งแต่ ๑๘๐๐ - ๕๐๐ เซนติเมตร^๑ ได้แก่ ตำแหน่งของ C = O ester band ที่ ๑๗๔๐ เซนติเมตร^๑ ที่สัมพันธ์กับ phosphodiester bond, amide I ซึ่งเป็นด้าน C-terminal ของสายโปรตีนที่ฟิสิกประมาณ ๑๖๕๐ เซนติเมตร^๑, amide II ซึ่งเป็นด้าน N-terminal ของสายโปรตีนที่ฟิสิกประมาณ ๑๕๕๐ เซนติเมตร^๑

และตำแหน่งของ PO₂ - ที่ฟิสิกประมาณ ๑๒๔๐ เซนติเมตร^๑ และ ๑๐๘๐ เซนติเมตร^๑ ของสายดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอ และส่วนที่เป็นตำแหน่งของ C-H (C-H spectral region) ตั้งแต่ ๓๐๐๐ - ๒๘๐๐ เซนติเมตร^๑ ซึ่งสัมพันธ์กับคาร์โบไฮเดรต และไขมันที่ตำแหน่งประมาณ ๒๙๕๐ เซนติเมตร^๑, ๒๙๒๐ เซนติเมตร^๑, ๒๘๕๐ เซนติเมตร^๑ และ ๒๘๒๐ เซนติเมตร^๑



รูปที่ ๓ ตัวอย่างของรูปแบบอินฟราเรดสเปกตรัมที่แสดงตำแหน่งของสารชีวโมเลกุลต่างๆ

ตารางที่ ๒ แสดงตัวอย่างของการศึกษาด้วยเทคนิค FTIR microspectroscopy ในโรคมะเร็ง

ชนิดของโรคมะเร็ง	ศึกษาโดย	ผลการศึกษา
มะเร็งปากมดลูก	Wood BR และคณะ ในปี ค.ศ. ๒๐๐๔ ^{๒๒}	- ศึกษาในตัวอย่างชิ้นเนื้อปากมดลูก - ทำการวิเคราะห์ด้วย Cluster analysis - ชิ้นเนื้อปกติพบอินฟราเรดสเปกตรัมฟิสิก ที่ตำแหน่ง ๑๐๒๔ เซนติเมตร^๑ ซึ่งสัมพันธ์กับไกลโคเจนหรือไกลโคโปรตีนในเมือก - ชิ้นเนื้อมะเร็งพบอินฟราเรดสเปกตรัมฟิสิก ที่ตำแหน่ง Amide I และ Amide II ของโปรตีน
	Purandare NC และคณะ ในปี ค.ศ. ๒๐๑๓ ^{๒๓}	- ศึกษาในเซลล์เนื้อเยื่อปกติเปรียบเทียบกับเซลล์เนื้อเยื่อของผู้ป่วยในระยะไม่รุนแรง และระยะรุนแรง - เซลล์มะเร็งระยะไม่รุนแรงต่างจากเซลล์ปกติที่ตำแหน่งฟิสิก ๑๕๑๒ เซนติเมตร^๑, ๑๓๓๑ เซนติเมตร^๑ และ ๙๓๗ เซนติเมตร^๑ ซึ่งเป็นตำแหน่งของคาร์โบไฮเดรต - เซลล์มะเร็งระยะรุนแรงต่างจากเซลล์ปกติที่ตำแหน่งฟิสิก ๑๕๔๗ เซนติเมตร^๑ ของ Amide II, ๑๔๐๐ เซนติเมตร^๑ และ ๙๙๕ เซนติเมตร^๑ ของคาร์โบไฮเดรต

ตารางที่ ๒ แสดงตัวอย่างของการศึกษาด้วยเทคนิค FTIR microspectroscopy ในโรคมะเร็ง (ต่อ)

ชนิดของโรคมะเร็ง	ศึกษาโดย	ผลการศึกษา
มะเร็งเต้านม	Fabian H และ คณะ ในปี ค.ศ. ๒๐๐๖ ^{๒๔}	- ศึกษาในตัวอย่างชิ้นเนื้อของผู้ป่วยมะเร็งเต้านมเปรียบเทียบกับตัวอย่างเนื้องอก - ตัวอย่างมะเร็งเต้านมมีพีคที่ต่างจากตัวอย่างเนื้องอกที่ตำแหน่ง ๑๑๗๓ เซนติเมตร^{-๑}, ๑๓๘๐ เซนติเมตร^{-๑}, ๑๔๖๖ เซนติเมตร^{-๑}, ๒๘๕๒ เซนติเมตร^{-๑} และ ๒๙๒๓ เซนติเมตร^{-๑} - เทคนิคนี้ให้ผลการตรวจที่ถูกต้องถึงร้อยละ ๙๓
	Rehman S และคณะ ในปี ค.ศ. ๒๐๑๐ ^{๒๕}	- ศึกษาในตัวอย่างชิ้นเนื้อมะเร็งเต้านมทั้งที่ลุกลามและไม่ลุกลามเปรียบเทียบกับตัวอย่างชิ้นเนื้อปกติ - พบการย้ายตำแหน่งของพีค Amide I ที่ ๑๖๓๐ เซนติเมตร^{-๑} และพีคของ C-H ที่ ๑๔๕๒ เซนติเมตร^{-๑} ในตัวอย่างชิ้นเนื้อปกติไปที่ ๑๖๔๐ เซนติเมตร^{-๑} และ ๑๓๙๒ เซนติเมตร^{-๑} ในตัวอย่างมะเร็งทั้งสองชนิด
	Chiriboga L และคณะ ในปี ค.ศ. ๒๐๐๐ ^{๒๖}	- ศึกษาชิ้นเนื้อตับปกติ ชิ้นเนื้อโรคตับแข็ง และชิ้นเนื้อมะเร็งตับ - พบอินฟราเรดสเปกตรัมของไกลโคเจนที่ตำแหน่ง ๑๑๐๐ - ๙๐๐ เซนติเมตร^{-๑} สูงในชิ้นเนื้อโรคตับแข็ง และชิ้นเนื้อมะเร็งตับ เมื่อเทียบกับชิ้นเนื้อตับปกติ
	Sheng D และคณะ ในปี ค.ศ. ๒๐๑๕ ^{๒๗}	- ศึกษาในตัวอย่างเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งตับและเซลล์เพาะเลี้ยงตับปกติ - ตัวอย่างเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งตับมีสัดส่วนของอินฟราเรดสเปกตรัม ระหว่าง ๑๓๔๔/๑๐๘๒ เซนติเมตร^{-๑}, ๑๖๔๐/๑๕๓๕ เซนติเมตร^{-๑} และ ๑๑๒๑/๑๐๒๐ เซนติเมตร^{-๑} สูง แต่สัดส่วนระหว่างตำแหน่ง ๒๙๕๕/๒๙๒๑ เซนติเมตร^{-๑} ต่ำ เมื่อเทียบกับเซลล์เพาะเลี้ยงตับปกติ
มะเร็งตับ	Thumanu K และคณะ ในปี ค.ศ. ๒๐๑๔ ^{๒๘}	- ศึกษาในตัวอย่างซีรัมของผู้ป่วยโรคตับแข็ง ผู้ป่วยมะเร็งตับ และผู้ที่มีสุขภาพดี - ในซีรัมของป่วยโรคตับแข็งและผู้ป่วยมะเร็งตับมีพีคของอินฟราเรดสเปกตรัม ที่ ๑๖๖๒ เซนติเมตร^{-๑} และ ๑๖๓๙ เซนติเมตร^{-๑} สูงขึ้นเด่นชัดซีรัมของผู้ที่มีสุขภาพดีพบพีคที่ ๑๖๔๘ เซนติเมตร^{-๑} - โดยผลสัมพันธ์กับระดับของโปรตีนอัลบูมินที่ลดลงจากการทำงานของตับที่ผิดปกติในผู้ป่วย

ข้อจำกัดและปัจจัยที่สำคัญต่อความสำเร็จในการวิเคราะห์

๑. การเตรียมตัวอย่างที่เหมาะสม

เนื่องจากเทคนิคนี้มีรูปแบบในการตรวจอยู่ ๒ รูปแบบ คือ การตรวจด้วยการสะท้อนกลับ (reflection) และการตรวจด้วยการส่องผ่าน (transmission) ดังนั้นการเลือกสไลด์ที่ถูกต้องสำหรับการเตรียมตัวอย่างจึงมีความสำคัญต่อการตรวจวิเคราะห์ ในส่วนของการเตรียมตัวอย่างสำหรับการศึกษาในเชื้อแบคทีเรียสามารถทำได้โดยหยดสารละลายน้ำเกลือที่มีเชื้อลงบนสไลด์และทำให้แห้งในลักษณะฟิล์มบาง การเตรียมตัวอย่างสำหรับเซลล์เพาะเลี้ยงชนิดต่างๆ สามารถเพาะเลี้ยง

บนสไลด์ได้โดยตรงหรืออาจใช้วิธีการปั่นให้เซลล์ตกลงบนสไลด์ (cytospin) และหลังจากที่ได้เซลล์ที่ติดบนสไลด์สำหรับตรวจวิเคราะห์จึงทำการตรึงเซลล์ด้วยฟอร์มาลินที่ความเข้มข้น ๔% ในสารละลายน้ำเกลือ ๓๐ นาที แล้วจึงล้างด้วยน้ำ และทำให้แห้งก่อนนำไปตรวจวิเคราะห์^{๒๙} สำหรับการเตรียมตัวอย่างชิ้นเนื้อ หากเป็นชิ้นเนื้อที่ฝังในพาราฟิน จะต้องทำการเคลือบสไลด์ด้วยสารละลายเจลาตินเข้มข้น ๐.๒% ก่อนนำไปใช้เพื่อให้ชิ้นเนื้อถูกตรึงติดบนสไลด์ได้^{๓๐} และหลังจากได้ชิ้นเนื้อที่ตรึงบนสไลด์แล้วควรนำไปผ่านกระบวนการดึงเอาพาราฟินออกเพื่อป้องกันการรบกวนของพีคจากพาราฟินในการตรวจวิเคราะห์ สำหรับตัวอย่างชิ้นเนื้อที่เก็บแบบแช่แข็งสามารถตัด

แล้ววางลงบนสไลด์ได้โดยตรง อย่างไรก็ตามตัวอย่างชิ้นเนื้อบนสไลด์ทั้งสองชนิดจะต้องทำให้แห้งก่อนการไปตรวจวัดด้วยเทคนิค FTIR microspectroscopy เสมอ เพื่อไม่ให้ฟีดอินฟราเรดของน้ำ รบกวนผลของการวิเคราะห์

๒. ชนิดแหล่งกำเนิดแสง IR

ส่วนแหล่งกำเนิดแสงอินฟราเรดนั้น ถ้าใช้แสงจาก Synchrotron เมื่อเปรียบเทียบกับแสงจาก global พบว่าแสงจาก Synchrotron มีความสว่างจ้ามากและมีความบริสุทธิ์มากกว่า จึงทำให้สัญญาณรบกวนมีน้อย การวิเคราะห์ข้อมูลจึงถูกต้องและแม่นยำมากกว่า

บทสรุป

ปัจจุบันเทคนิคอินฟราเรดสเปกโทรสโกปีเป็นเทคนิคที่มีความสำคัญในงานด้านวิทยาศาสตร์การแพทย์ ทั้งที่เป็นงานพื้นฐานในห้องปฏิบัติการ ไปจนถึงการประยุกต์ใช้ในการวินิจฉัยโรค ทั้งนี้เนื่องจากเทคนิคอินฟราเรดสเปกโทรสโกปีเป็นเทคนิคที่ให้ข้อมูลเชิงโครงสร้างทางองค์ประกอบของสารชีวโมเลกุล จึงสามารถจำแนกความแตกต่างของเซลล์เสมือนลายพิมพ์นิ้วมือ ได้ โดยอาศัยความแตกต่างของการดูดกลืนรังสีอินฟราเรดของสารชีวโมเลกุลที่เป็นองค์ประกอบภายในเซลล์ต่างๆ จากตัวอย่างงานวิจัย ที่กล่าวมาข้างต้น แสดงให้เห็นถึงศักยภาพของเทคนิค FTIR microspectroscopy ในการประยุกต์ใช้กับงานด้านจุลชีววิทยา การศึกษาเซลล์ต้นกำเนิดและการศึกษาโรคมะเร็งได้อย่างถูกต้อง แม่นยำ การเตรียมตัวอย่างไม่ยุ่งยาก และสามารถศึกษาชีวโมเลกุลได้โดยตรงไม่ต้องใช้สารเคมีและน้ำยาเพื่อทดสอบ นอกจากนี้ยังสามารถประยุกต์ใช้กับตัวอย่างที่หลากหลาย และใช้ได้แม้การเตรียมตัวอย่างที่แตกต่างกัน เช่น ตัวอย่างที่ผ่านการรักษาสภาพด้วย paraffin ตัวอย่างที่เตรียมโดยการปั่นตกบนสไลด์ (cytospin) อย่างไรก็ตามข้อมูลอินฟราเรดสเปกตรัมที่ได้มีลักษณะเป็นแบบหลายตัวแปร (multivariate data) การวิเคราะห์สเปกตรัมที่ได้หลังจากการสแกนจึงจำเป็นต้องใช้โปรแกรมทางสถิติเข้ามาช่วยซึ่งโปรแกรมเหล่านี้ทำให้การวิเคราะห์ข้อมูลมีความถูกต้องและแม่นยำมากขึ้น ทำให้การใช้แสงไม่ว่าจากแหล่งกำเนิดแสงแบบ global หรือจาก Synchrotron ให้ผลการวิเคราะห์ข้อมูลเป็นไปในแนวทางเดียวกัน ยิ่งไปกว่านั้นข้อมูลอินฟราเรดสเปกตรัมที่ได้สามารถนำมาสร้างเป็นฐานข้อมูลที่ เปรียบเสมือนอัตลักษณ์ (finger print) ของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดเพื่อเป็นประโยชน์ต่อการจัดจำแนกสิ่งมีชีวิตนั้นๆ ได้อย่างมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

เอกสารอ้างอิง

- Valamehr B, Jonas SJ, Polleux J, Qiao R, Guo S, Gschwend EH, et al. Hydrophobic surfaces for enhanced differentiation of embryonic stem cell-derived embryoid bodies. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:14459-64.
- Osibanjo R, Curtis R, Lai Z. Infrared: Theory [Internet]. 2017 [cited 2017 March 8]. Available from: http://chem.libretexts.org/Core/Physical_and_Theoretical_Chemistry/Spectroscopy/Vibrational_Spectroscopy/Infrared_Spectroscopy/Infrared%3A_Theory.
- Davis R, Mauer LJ. Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy: A rapid tool for detection and analysis of foodborne pathogenic bacteria. In: Méndez-Vilas A, editor. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*. Badajoz: FORMATEX; 2010:1582-94.
- Beekes M, Lasch P, Naumann D. Analytical applications of Fourier transform-infrared (FT-IR) spectroscopy in microbiology and prion research. *Vet Microbiol* 2007;123:305-19.
- Rebuffo-Scheer CA, Schmitt J, Scherer S. Differentiation of *Listeria monocytogenes* serovars by using artificial neural network analysis of Fourier-transformed infrared spectra. *App Environ Microbiol* 2007;73:1036-40.
- Kim S BY, Ojanen-Reuhs T, Cousin MA, Reuhs BL, Mauer UJ. Differentiation of crude lipopolysaccharides from *Escherichia coli* strains using Fourier transform infrared spectroscopy and chemometrics. *J Food Sci* 2006;71:57-61.
- Marques Ade S, de Melo MC, Cidral TA, de Lima KM. Feature selection strategies for identification of *Staphylococcus aureus* recovered in blood cultures using FT-IR spectroscopy successive projections algorithm for variable selection: a case study. *J Microbiol Methods* 2014;98:26-30.

๘. Burgula Y, Khali D, Kim S, Krishnan SS, Cousin MA, Gore JP, et al. Detection of Escherichia coli 0157:H7 and Salmonella typhimurium using filtration followed by Fourier-transform infrared spectroscopy. *J Food Prot* 2006;69:1777-84.
๙. Maity JP, Kar S, Lin CM, Chen CY, Chang YF, Jean JS, et al. Identification and discrimination of bacteria using Fourier transform infrared spectroscopy. *Spectrochim Acta A, Mol Biomol spectrosc* 2013;116:478-84.
๑๐. Erukhimovitch V, Pavlov V, Talyshinsky M, Soup-run Y, Huleihel M. FTIR microscopy as a method for identification of bacterial and fungal infections. *J Pharm Biomed Anal* 2005;37:1105-8.
๑๑. Ngo Thi NA, Naumann D. Investigating the heterogeneity of cell growth in microbial colonies by FTIR microspectroscopy. *Anal Bioanal Chem* 2007;387:1769-77.
๑๒. Filip Z, Herrmann S, Kubat J. FT-IR spectroscopic characteristics of differently cultivated *Bacillus subtilis*. *Microbiol Res* 2004;159:257-62.
๑๓. Kong J, Yu S. Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures. *Acta Biochim Biophys Sin* 2007;39:549-59.
๑๔. Ami D, Neri T, Natalello A, Mereghetti P, Doglia SM, Zanoni M, et al. Embryonic stem cell differentiation studied by FT-IR spectroscopy. *Biochim Biophys Acta* 2008;1783:98-106.
๑๕. Heraud P, Ng ES, Caine S, Yu QC, Hirst C, Mayberry R, et al. Fourier transform infrared microspectroscopy identifies early lineage commitment in differentiating human embryonic stem cells. *Stem Cell Res* 2010;4:140-7.
๑๖. Thumanu K, Tanthanuch W, Ye D, Sangmalee A, Lorthongpanich C, Parnpai R, et al. Spectroscopic signature of mouse embryonic stem cell-derived hepatocytes using synchrotron Fourier transform infrared microspectroscopy. *J Biomed Opt* 2011;16:057005.
๑๗. Krafft C, Salzer R, Seitz S, Ern C, Schieker M. Differentiation of individual human mesenchymal stem cells probed by FTIR microscopic imaging. *Analyst* 2007;132:647-53.
๑๘. Chonanant C, Jearanaikoon N, Leelayuwat C, Limpaboon T, Tobin MJ, Jearanaikoon P, et al. Characterisation of chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells using synchrotron FTIR microspectroscopy. *Analyst* 2011;136:2542-51.
๑๙. Barer R, Cole AR, Thompson HW. Infra-red spectroscopy with the reflecting microscope in physics, chemistry and biology. *Nature* 1949;163:198-201.
๒๐. เต็มดวง ลีมีไพบูลย์. ยินมะเร็ง. ใน: มะเร็งวิทยาระดับโมเลกุล. ขอนแก่น: หจก.ขอนแก่นการพิมพ์; ๒๕๕๔. หน้า ๑๘-๕๑.
๒๑. กลุ่มงานเทคโนโลยีสารสนเทศ สถาบันวิจัยมะเร็งแห่งชาติ กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. ทะเบียนมะเร็งระดับโรงพยาบาล พ.ศ. ๒๕๕๗ = HOSPITAL BASED CANCER REGISTRY ANNUAL REPORT ๒๐๑๔. [อินเทอร์เน็ต]. ๒๕๕๗ [เข้าถึงเมื่อ วันที่ ๒ เมษายน พ.ศ. ๒๕๖๐]. เข้าถึงได้จาก: [http://www.nci.go.th/th/File_download/Nci%20Cancer%20Registry/HOSPITAL-BASED %202014.pdf](http://www.nci.go.th/th/File_download/Nci%20Cancer%20Registry/HOSPITAL-BASED%202014.pdf).
๒๒. Wood BR, Chiriboga L, Yee H, Quinn MA, McNaughton D, Diem M. Fourier transform infrared (FTIR) spectral mapping of the cervical transformation zone, and dysplastic squamous epithelium. *Gynecol Oncol* 2004;93:59-68.
๒๓. Purandare NC, Patel, II, Trevisan J, Bolger N, Kelehan R, von Bunau G, et al. Biospectroscopy insights into the multi-stage process of cervical cancer development: probing for spectral biomarkers in cytology to distinguish grades. *Analyst* 2013;138:3909-16.
๒๔. Fabian H, Thi NA, Eiden M, Lasch P, Schmitt J, Naumann D. Diagnosing benign and malignant lesions in breast tissue sections by using IR-microspectroscopy. *Biochim Biophys Acta* 2006;1758:874-82.

๒๕. Rehman S MZ, Darr JA, Rehman IU. Fourier transform infrared spectroscopic analysis of breast cancer tissues; Identifying differences between normal breast, invasive ductal carcinoma, and ductal carcinoma in situ of the breast. *App Spectros Rev* 2010;45:355-68.
๒๖. Chiriboga L YH, Diem M. Infrared spectroscopy of human cells and tissue. part VI: A comparative study of histopathology and infrared microspectroscopy of normal, cirrhotic, and cancerous liver tissue. *Appl Spectrosc* 2000;54.
๒๗. Sheng D, Xu F, Yu Q, Fang T, Xia J, Li S, et al. A study of structural differences between liver cancer cells and normal liver cells using FTIR spectroscopy. *J Mol Struct* 2015;1099:18-23.
๒๘. Thumanu K, Sangrajrang S, Khuaprema T, Kalalak A, Tanthanuch W, Pongpiachan S, et al. Diagnosis of liver cancer from blood sera using FTIR microspectroscopy: a preliminary study. *J Biophotonics* 2014;7:222-31.
๒๙. Wehbe K, Filik J, Frogley MD, Cinque G. The effect of optical substrates on micro-FTIR analysis of single mammalian cells. *Anal Bioanal Chem* 2013;405:1322-24.

Abstract

Applications of FTIR technique in biomedical sciences

Chirapond Chonanant*, Patcharee Jearanaikoon**, Patcharaporn Tippayawat***

* Department of Medical Technology, Faculty of Allied Health Science, Burapha University

** Division of Clinical Chemistry, Faculty of Associated Medical Sciences, Khon Kaen University

*** Division of Clinical Microbiology, Faculty of Associated Medical Sciences, Khon Kaen University

Corresponding author: Dr.Chirapond Chonanant Department of Medical Technology, Faculty of Allied Health Science, Burapha University 169 Longhaad Bangsaen Road, Saensook, Mueang, ChonBuri 20131 E-mail: chirapond1502@hotmail.com, chirapond@go.buu.ac.th

The vibrational modes in biological samples give rise to the IR spectrums which represent a fingerprint of samples that correspond to the frequencies of vibrations between the bonds of the atoms composition in the biological molecules. Fourier Transform-Infrared (FTIR) Spectroscopy was developed to improve for rapid scanning, sensitivity and more powerful by using interferometer. The interference patterns of two IR beams generate interferogram which finally transformed into a spectrum by the Fourier transform algorithm. Due to the FTIR technique provides spectral fingerprints of the complex biological structures resulting in a positive identification of every different kind of biological samples. This method has been introduced into various biological fields and found to be a very useful tool. Therefore, this review article aimed to emphasize the application of FTIR spectroscopy in biomedical research such as in microbiology, stem cells and cancer.

Key words: Infrared spectroscopy, Biomedical sciences, Microbiology, Stem cells, Cancer