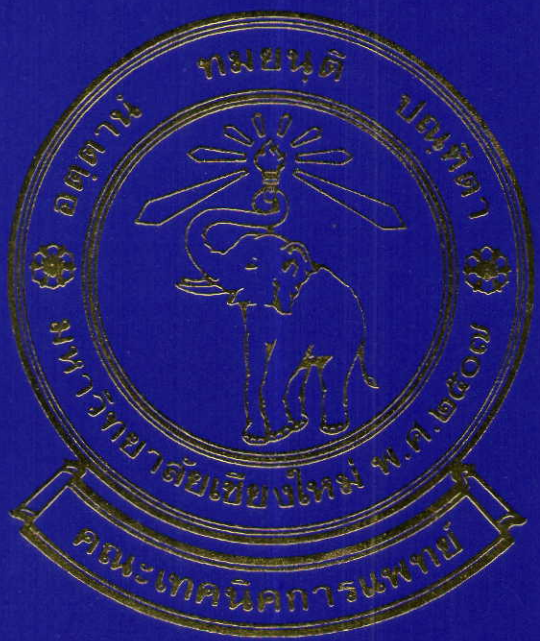
วารสาร เทคนิคการแพทย์ เชียงใหม่



BULLETIN OF CHIANG MAI ASSOCIATED MEDICAL SCIENCES

ปีที่ 33 ฉบับที่ 3 กันยายน 2543

ISSN 0125-5347

วารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่

วัตถุประสงค์	เพื่อเผยแพร่ผลงานทางวิชาการสาขาเทคนิคการแพทย์ รังสีเทคนิค กิจกรรมบำบัด กายภาพบำบัด และสาขาอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับทางด้านวิทยาศาสตร์สุขภาพ			
เจ้าของ	คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่			
ที่ปรึกษากิตติมศักดิ์	ชัยโรจน์ แสงอุดม			
	อุดมศักดิ์	เห่วซึ่งเจริญ		
บรรณาธิการ	วาสนา	ศิริรังษี		
รองบรรณาธิการ	วัชระ	กสิณฤกษ์		
กองบรรณาธิการ	เดือนจิตร	แจ่มศิลป์	เทียม	ศรีคำจักร
	นันทยา	ชนะรัตน์	ประภาส	โพธิ์ทองสุนันท์
	ประสิทธิ์	ชนะรัตน์	สุชาติ	ปันจัยสีห์
	วารุณี	คุณาชีวะ		
ผู้จัดการ	จริยา	กาทอง		
ฝ่ายจัดการและทะเบียน	ทรงพร	ยอดไชย	ธวัช	พยัคฆา
	มนัส	ศรีสัตบุตร	วันทนา	แสงไพโรจน์
	รุ่งทิวา	ศรีวิชัย	อัมพร	จุ้มเขียว
	สนั่น	นันต๊ะเสน	อรพรรณ	สามคำ
เหรัญญิก	สุภาพร	นิลเกษ		
ศิลปกรรม	ธนัทพล	ศรีแสวง		
กำหนดออก	ราย 4 เดือน (มกราคม, พฤษภาคม, กันยายน)			
พิมพ์ที่	หจก. ธนบรรณการพิมพ์ 319/1-2 ถนนเจริญเมือง ต.วัดเกต อ.เมือง จ.เชียงใหม่ โทร. (053) 244365, 244786 Fax: (053) 244365			

BULLETIN OF CHIANG MAI
ASSOCIATED MEDICAL SCIENCES

OFFICIAL PUBLISHER : Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand.

OBJECTIVE : Bull Chiang Mai Assoc Med Sci (ISSN 0125-5347) publishes the editorials, original research articles, general articles, short technical report, notes, letters to the editor, miscellany and abstracts. Manuscripts relevant to any of all aspects of medical technology, radiologic technology, occupational therapy and physical therapy are welcome.

HONORED CONSULTANT : Chairoj Saeng-Udom, Audomsark Haesungcharern

EDITOR IN CHIEF : Wasna Sirirungsi

ASSOCIATED EDITOR : Watchara Kasinrerk

BOARD OF EDITORS : Nantaya Chanarat, Prasit Chanarat, Prapas Pothongsunun, Suchart Punjaisee, Tiam Sricomejuk, Tueanjit Jamsil, Warunee Kunachiwa

BUSINESS MANAGER : Jariya Karthong

MANAGER AND REGISTRA STAFFS : Songporn Yodchai, Tawat Payakkha, Manus Srisuttaboot, Wantana Sangpairojana, Rungtiwa Sriwichai, Amporn Jumkeow, Sanun Nuntasane, Orrapun Sam-come

TREASURER : Supaporn Nilakesh

ILLUSTRATOR : Tanatpon Srisawaeng

PUBLISHED : Tertially (January, May, September)

SUBSCRIPTION : Subscriptions are to be prepaid; and rates per year : $US 15 for all outsides.

EDITORIAL OFFICE : All correspondence should be addressed to the editor
Wasna Sirirungsi
Faculty of Associated Medical Sciences,
Chiang Mai University, Thailand 50200

28 ต.ค. 2543

วารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่
ปีที่ 33 ฉบับที่ 3 กันยายน 2543

สารบัญ

หน้า

บทบรรณาธิการ 160

นิพนธ์ต้นฉบับ

การผลิตและเตรียมให้บริสุทธิ์โปรตีน $MSP1_{19}$ ของเชื้อพลาสโมเดียม โยอิลิอาย ระยะเมอโรซอยท์ ในรูปของ FLAG Fusion Protein จากยีสต์ แซคคาโรมายเซส เซรีวิเซีย 161

ศุภชัย ศักดิ์ขจรภพ, สาธิต พิชยางกูร, จักร์กริช หิรัญเพชรรัตน์

การทดสอบหาแอนติบอดีต่อแอนติเจนของเชื้อรา เพนนิซิเลียม มาเนฟฟิไอ ของกลุ่มประชากรคนปกติที่อาศัยอยู่ในจังหวัดเชียงใหม่ 172

ลดาวัลย์ สาริยา, รสสุคนธ์ กลิ่นหอม, ธารินี ไชยวงศ์, สาคร พรประเสริฐ

การกดการแบ่งตัวของลิมโฟซัยท์คนปกติโดยพลาสมาของผู้ป่วยเอดส์ที่ติดเชื้อ เพนนิซิเลียม มาเนฟฟิไอ 182

ธิดาดาว แหล่งอุโมงค์, สาคร พรประเสริฐ

บทความทั่วไป

การดำเนินงานจัดทำห้องปฏิบัติการสะอาด 190

สุชาดา ไชยสวัสดิ์

รังสีโปรตอนคืออะไร ? 204

สุมาลัย วังวรรณรัตน์

ผลของอนุมูลอิสระต่อความทนทานในการออกกำลังกายในโรคปอดอุดกั้นเรื้อรัง 212

นัฏฐกาล ลีลารุ่งระยับ

บันทึก

ชิ้นส่วนชีวภาพกำซาบด้วยสารพลาสติก 221

รณิดา ชมสูง, ผาสุก มหรรฆานุเคราะห์

ปกิณกะ

แผนกลยุทธ์การประกันคุณภาพการศึกษา 224

ประสิทธิ์ ชนะรัตน์, ชมนาด วัณณสุทธางกูร

ย่อเอกสาร

เปรียบเทียบการคัดเลือกสารที่มีประสิทธิภาพสูงในการต่อต้าน 230
Mycobacterium tuberculosis **กับ** ***Mycobacterium avium*** **โดยวิธี**
Microplate Alumar Blue Assay กับ BACTEC 460 System

เกษรา จันทรสิทธิผล

ผลของเวลาในการทดสอบ Prothrombin Time [PT] และ 231
Activated Partial Thromboplastin Time [APTT] เมื่อเก็บ
สิ่งส่งตรวจในสภาวะที่แตกต่างกัน

จตุรัส สุนุรัตน์

การตรวจพบ Alkaline Phosphatase Isoenzyme ชนิดผิดปกติในผู้ป่วย 231
ที่เป็นโรคมะเร็งของกระเพาะอาหาร

ชุติมา พิสิฐพงศกร

การตรวจสอบการปนเปื้อนของเลือดแม่ด้วยวิธี Alkaline Denaturation Test 232
เพื่อใช้ทดสอบเลือดจากสะดือทารก เพื่อการวินิจฉัยก่อนคลอด

กนกวรรณ ปันวารี

ผลของ Serum-Clot Contact Time ที่มีต่อผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการ 232
เคมีคลินิก

ธีรพงศ์ บุญเฟือง

การตรวจหาผู้ป่วย Chronic Myeloid Leukemia ในระยะแรก หลังการปลูกถ่ายไขกระดูก ด้วยวิธี Hypermetaphase Fluorescence *In situ* Hybridization 233

นฤมล แก้วมา

ผลของ Essential Oils ต่อการยับยั้งกระบวนการสร้างสปอร์และการหายใจของ Filamentous Fungi 234

กชกร หลีเจริญ

Reduction of Diagnostic Window by New Fourth-Generation Human Immunodeficiency Virus Screening Assays 234

คู่ฤทัย พระเอก

กลไกของ Neutrophil ในการฆ่าเชื้อรา *Penicillium marneffei* โดยการเหนี่ยวนำของ Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF) 235

จิราพร สันกลกิจ

อิทธิพลของความชื้นสัมพัทธ์ต่อการควบคุมไรฝุ่นบ้าน *Dermatophagoides farinae* 236

กาญจนา เตชะประเสริฐ

การยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย PHA โดยโพลีโคลนอลแอนติบอดี ต่อ CD4 โมเลกุลที่ผลิตโดยวิธี DNA Immunization 237

เกรียงไกร ชวาลสันตติ

การใช้ชนิด และช่วงอายุของระยะต่างๆ ของแมลงวันที่พบได้จากศพมาประมาณระยะเวลาหลังการตาย เพื่อช่วยในการวินิจฉัยทางนิติเวช 237

จีระนันท์ ทิพนันท์

ดรรชนีผู้แต่ง : ปีที่ 33 พ.ศ. 2543 239

ดรรชนีหัวเรื่อง : ปีที่ 33 พ.ศ. 2543 240

BULLETIN OF CHIANG MAI
ASSOCIATED MEDICAL SCIENCES
Volume 33 Number 3 September 2000

CONTENTS

Page

Editorial 160

Research Articles

Production and Purification of the 19-kDa Carboxyl-terminal Fragment of *Plasmodium yoelii* Merozoite Surface Protein-1 ($MSP1_{19}$) as a FLAG Fusion Protein Expressed in *Saccharomyces cerevisiae* 161
Sakkhachornphop S, Pichyangkul S, Hirunpetcharat C

Detection of Antibodies Against *Penicillium marneffei* Antigens in Chiang Mai Healthy Population 172
Sariya L, Klinhom R, Chaiwong T, Pornprasert S

Inhibitory Effect of Plasma from *Penicillium marneffei* Infected AIDS Patient on Proliferation of Normal Lymphocytes 182
Langumong T, Pronprasert S

General Articles

Clean Laboratory Set Up 190
Chaisawad S

What is Proton Beam ? 204
Vangvannarath S

Free Radicals and Exercise Tolerance in Chronic Obstructive Pulmonary Diseases : COPD 212
Leelarungrayab N

Note

Plastination 221

Chomsung R, Mahankanukor P

Miscellany

Strategic Planning of Quality Assurance in Education 224

Chanarat P, Wannasutthangkul C

Abstracts

Microplate Alamar Blue Assay Versus BACTEC 460 System for High-Throughput Screening of Compounds Against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*. 230

Chantarasittipol K

Stability of Prothrombin Time and Activated Partial Thromboplastin Time Test under Different Storage. 231

Sunurat J

An Unusual Alkaline Phosphatase Associated with Gastric Carcinoma. 231

Pisitpongsakorn C

Accuracy of Haemoglobin Alkaline Denaturation Test for Detecting Maternal Blood Contamination of Fetal Blood Sample for Prenatal Karyotyping. 232

Punwaree K

Effect of Serum-Clot Contact Time on Clinical Chemistry Laboratory Result. 232

Boonfuang T

Early Detection of Relapse by Hypermetaphase Fluorescence *in situ* Hybridization after Allogeneic Bone Marrow Transplantation for Chronic Myeloid Leukemia. 233

Kaewma N

Antisporulating and Respiration-Inhibitory Effect of Essential Oils on Filamentous Fungi. 234

Leecharoen K

Reduction of Diagnostic Window by New Fourth-Generation Human Immunodeficiency Virus Screening Assays. 234
Praeak K

Machanism of the *in vitro* Fungicidal Effects of Human Neutrophils Against *Penicillium marneffei* Induced by Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF). 235
Sankolkit J

Reducing Relative Humidity to Control the House Dust Mite *Dermatophagoides farinae.* 236
Taechaprasert K

Inhibition of PHA-Induced Cell Proliferation by CD4 Antibodies Generated by DNA Immunization. 237
Chavansantati K

Forensic Use of *Megaselia abdita* and *M. scalaris* (Phoridae: Diptera): Case Studies, Development Rate and Egg Structure. 237
Tippanan J

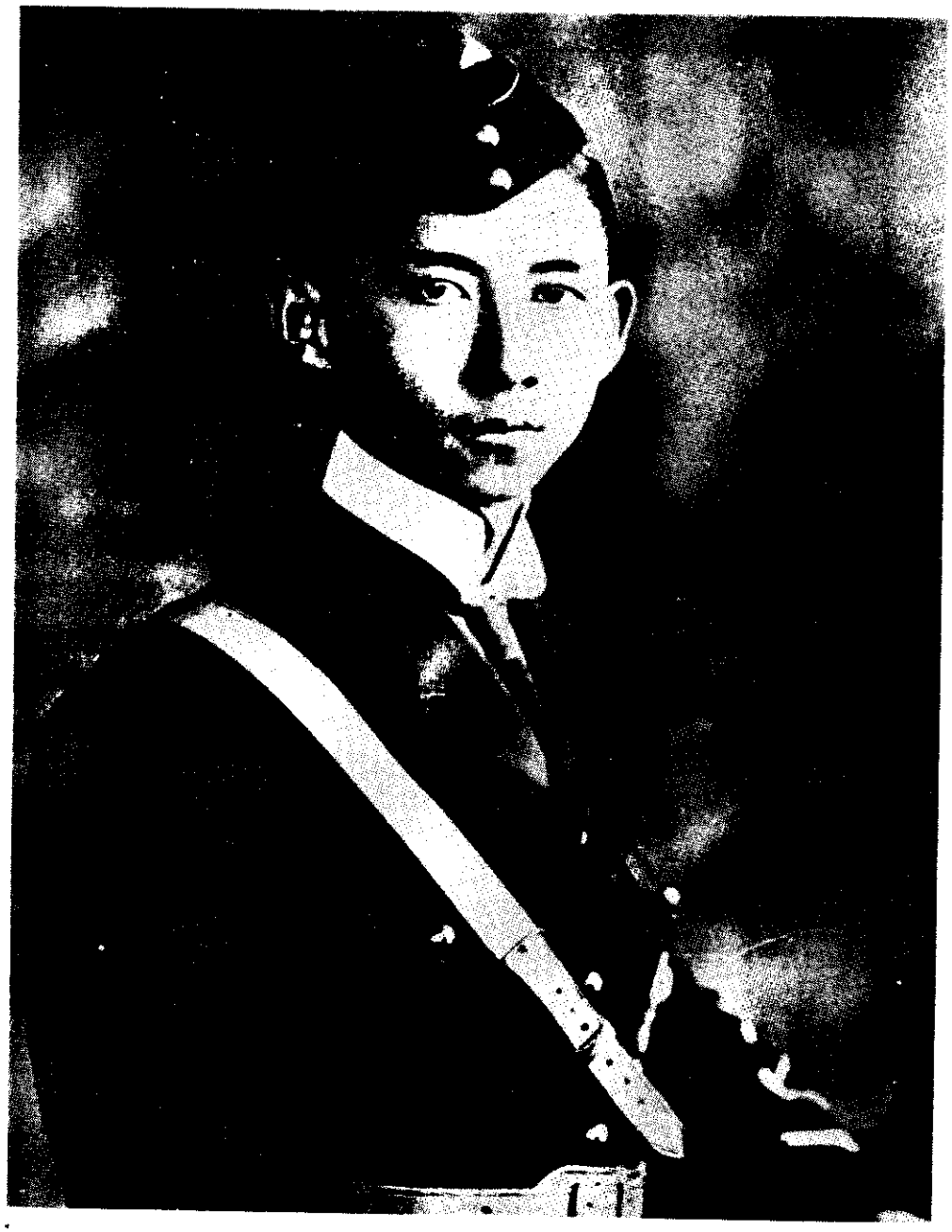
Author Index : Volume 33, 2000 239

Subject Index : Volume 33, 2000 240

ด้วยสำนึกในพระมหากรุณาธิคุณของ

สมเด็จพระมหิตลาธิเบศร อดุลยเดชวิกรม พระบรมราชชนก

"พระบิดาแห่งวงการแพทย์ และสาธารณสุขไทยแผนปัจจุบัน"



กองบรรณาธิการวารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่

24 กันยายน 2543

บทบรรณาธิการ

"วันมหิดล" เวียนมาบรรจบอีกวาระหนึ่งในปี พ.ศ. 2543 กองบรรณาธิการวารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่ สำนึกในพระมหากรุณาธิคุณของสมเด็จพระมหิดลาธิเบศ อดุลยเดชวิกรม พระบรมราชชนก พระราชบิดาแห่งวงการแพทย์แผนปัจจุบันของไทย

และในเดือนกันยายนนี้ คณะเทคนิคการแพทย์ได้มีโอกาสแสดงมุทิตาจิตต่อ ศ.นพ.เทอดชัย ชีวะเกตุ ในวาระเกษียณอายุราชการ ผลงานอันทรงคุณค่าของอาจารย์ที่ได้ริเริ่มก่อตั้งสาขาวิชากิจกรรมบำบัด ตลอดจนส่งเสริมสนับสนุนให้มีความเจริญก้าวหน้าในสาขาวิชานี้ตลอดมา จะจารึกอยู่ในประวัติศาสตร์ของคณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และในวิชาชีพกิจกรรมบำบัดของประเทศไทยตลอดไป

วารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่ฉบับนี้เป็นฉบับส่งท้ายสำหรับปี พ.ศ. 2543 หรือ ปี ค.ศ. 2000 ที่ดูเหมือนจะดำเนินมาอย่างปกติ มิได้มีเหตุการณ์แปลกประหลาดใดๆ เกิดขึ้น สิ่งดีๆ ที่พอจะมองเห็นได้ในวงการอุดมศึกษา และวงการวิทยาศาสตร์การแพทย์ คือความตื่นตัว และเริ่มปฏิบัติอย่างเป็นรูปธรรมของการพัฒนาระบบคุณภาพทั้งทางด้านการประกันคุณภาพการศึกษา และการพัฒนาระบบคุณภาพทางห้องปฏิบัติการสู่มาตรฐานสากล บุคลากรคงจะเริ่มคุ้นเคยกับการจัดทำเอกสารต่างๆ ที่อาจมองดูเป็นภาระในระยะแรก แต่ต่อไปจะทำให้เกิดประโยชน์อย่างมากเมื่อได้มีการวิเคราะห์ และมีการปรับปรุงผลการทำงานให้ดียิ่งๆ ขึ้นไป สำหรับเนื้อหาในวารสารฯฉบับนี้มีความหลากหลาย และน่าสนใจ ได้แก่ การผลิตและการเตรียมโปรตีนบางชนิดจากเชื้อพลาสโมเดียม ที่อาจนำไปสู่การเตรียมวัคซีนสำหรับป้องกันโรคมาเลเรีย การทดสอบแอนติบอดีต่อเชื้อเพนนิซิเลียม มาเนฟฟิไอ ในประชากรชาวเชียงใหม่ การกดการแบ่งตัวของลิมโฟซัยท์คนปกติโดยพลาสมาผู้ป่วยเอดส์ที่ติดเชื้อเพนนิซิเลียม มาเนฟฟิไอ ตลอดจนวิธีการจัดทำห้องปฏิบัติการสะอาด ที่มีรายละเอียดครบถ้วนสามารถนำไปปรับใช้กับห้องปฏิบัติการต่างๆ ได้ สำหรับเนื้อหาทางด้านรังสีเทคนิคได้นำความรู้เกี่ยวกับรังสีโปรตอนกับการใช้งานทางด้านการแพทย์ซึ่งเป็นเรื่องค่อนข้างใหม่ของบ้านเรามาแนะนำให้รู้จัก ส่วนการศึกษาทางด้านกายภาพบำบัดทรวงอกก็เป็นสิ่งที่น่าสนใจเกี่ยวเนื่องกับการเปลี่ยนแปลงในระดับชีวเคมีของร่างกาย นอกจากนี้บทความเกี่ยวกับการเก็บรักษาชิ้นเนื้อโดยวิธี Plastinization ก็จะเป็นประโยชน์ต่อการเรียนการสอนทางด้านกายวิภาคศาสตร์ และพยาธิวิทยาเป็นอย่างยิ่ง ในด้านมาตรฐานคุณภาพการศึกษาได้นำเสนอเอกสารของภาควิชาจุลทรรศนศาสตร์คลินิกมาเป็นตัวอย่าง ปิดท้ายด้วยย่อเอกสาร ของบทความทางวิชาการใหม่ๆ ที่น่าสนใจจำนวน 12 เรื่อง เชิญติดตามอ่านได้ในเล่ม

วาสนา ศิริรังษี
บรรณาธิการ

นิพนธ์ต้นฉบับ

การผลิตและเตรียมให้บริสุทธิ์โปรตีน $MSP1_{19}$ ของเชื้อพลาสโมเดียม โยอิลิอาย ระยะเมอโรซอยท์ ในรูปของ FLAG Fusion Protein จากยีสต์ แซคคาโรมายเซส เซรีวิเซีย

ศุภชัย ศักดิ์ขจรภพ* , สาธิต พิชยางกูร**, จักร์กริช หิรัญเพชรรัตน์***

บทคัดย่อ

ความเป็นมา : $MSP1_{19}$ เป็นโปรตีนส่วนปลายคาร์บอนของโปรตีน Merozoite surface protein-1 (MSP1) ซึ่งอยู่บนผิวของเมอโรซอยท์ (เชื้อมาลาเรียระยะติดเชื้อในเลือด) มีน้ำหนักโมเลกุล 19 กิโลดาลตัน สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันในหนูและลิงให้ป้องกันการติดเชื้อมาลาเรียได้ $MSP1_{19}$ ที่ใช้ในการทดลองดังกล่าวสร้างจากเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* หรือ ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ด้วยวิธีพันธุวิศวกรรม ในรูปของ Glutathione-S-transferase (GST)-MSP1 19 หรือ His6-MSP1 19 ตามลำดับ

วิธีการ : ผลิต FLAG-$MSP1_{19}$ fusion protein จากเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* โดยมี FLAG peptide ซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโนแปดตัวเชื่อมต่ออยู่ทางด้าน N-terminus ในการผลิต FLAG- $MSP1_{19}$ จากเชื้อยีสต์ เริ่มแรกนำยีสต์ที่สร้าง FLAG- $MSP1_{19}$ มาคัดเลือกเพื่อให้ได้โคลนที่สร้างโปรตีน FLAG-$MSP1_{19}$ ปริมาณสูง แล้วทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเพื่อให้ได้ประสิทธิภาพดีที่สุด และประหยัด การเตรียมให้บริสุทธิ์ทำโดยผ่าน Anti-FLAG M1 antibody agarose gel column และทดสอบคุณสมบัติของ FLAG-$MSP1_{19}$ ที่เตรียมได้ด้วยวิธี SDS-PAGE และวิธี Western blot

ผลการทดลอง : ระยะเวลาที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อยีสต์คือ 48 ชั่วโมง ปริมาตรของน้ำเลี้ยงเชื้อยีสต์ที่ได้ < 30 มล. สามารถจับกับ gel ได้หมด แต่เมื่อใช้ 40 มล. พบว่าเตรียม FLAG-$MSP1_{19}$ ได้ปริมาณมากกว่าและมีค่า % yield สูงกว่า ผลการทดสอบด้วย SDS-PAGE พบแถบโปรตีนเพียงแถบเดียว และอยู่ในตำแหน่งใกล้เคียงกับ His_6-$MSP1_{19}$ และทำปฏิกิริยากับ Anti-His_6-$MSP1_{19}$ serum, Anti-*P. yoelii* hyperimmune serum และ Mab 302 เมื่อทดสอบด้วย Westen blot

สรุป : สามารถสร้าง $MSP1_{19}$ ขึ้นในรูป FLAG-$MSP1_{19}$ ซึ่งประกอบด้วยส่วนของแอนติเจนที่ถูกต้องเหมือนกับในธรรมชาติได้ **วารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่ 2543; 33: 161-71.**

คำหัส : มาลาเรีย, อัฟฟีนิติโครมาโตกราฟี, MSP1, FLAG

* ฝ่ายวิจัยโรคติดเชื้อและโรคเมืองร้อน สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สุขภาพ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เชียงใหม่
** ภาควิชาภูมิคุ้มกันวิทยา สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ทหารบก ฝ่ายสหรัฐ กรุงเทพฯ
*** งานจุลชีววิทยา คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ

Abstract : Production and Purification of the 19-kDa Carboxyl-terminal Fragment of *Plasmodium yoelii* Merozoite Surface Protein-1 ($MSP1_{19}$) as a FLAG Fusion Protein Expressed in *Saccharomyces cerevisiae*

Sakkhachornphop S* , Pichyangkul S, Hirunpetcharat C*****

Background : The 19-kDa carboxyl-terminal fragment of merozoite surface protein-1 ($MSP1_{19}$), a leading malaria vaccine candidate, can induce protective immunity in mice and monkeys against challenge infection. The *Plasmodium yoelii* $MSP1_{19}$ can produce from *Escherichia coli* as a glutathione-S-transferase (GST)-$MSP1_{19}$ or from *Saccharomyces cerevisiae* as His6-$MSP1_{19}$.

Methods : $MSP1_{19}$ as a FLAG fusion protein (FLAG-$MSP1_{19}$) was produced from *S. cerevisiae*. The FLAG peptide composes of 8 amino acids and is linked to the N-terminus of $MSP1_{19}$. After selectively cloned FLAG-$MSP1_{19}$-expressed yeast, we optimized the conditions for production. The FLAG-$MSP1_{19}$ was purified by passing yeast-culture supernatant through an anti-FLAG M1 antibody agarose gel column and characterized by SDS-PAGE and Western blot.

Results : The optimal culture incubation time is 48 h. In passing through the anti-FLAG column, up to 30 mL. of yeast culture supernatant of all FLAG-$MSP1_{19}$ bound to the gel. However, application of 40 mL. of the supernatant gave more yield recovery after elution from the column. By SDS-PAGE, there was a single band with similar level as His_6- $MSP1_{19}$. By Western blot, FLAG-$MSP1_{19}$ reacted to anti-His_6-$MSP1_{19}$ serum, anti-*P. yoelii* hyperimmune serum, and Mab 302.

Conclusion : These results indicate that $MSP1_{19}$ can be constructed with a correct configuration in a form of FLAG-$MSP1_{19}$ fusion protein. **Bull Chiang Mai Assoc Med Sci 2000; 33: 161-71.**

Key words: Malaria, affinity chromatography, MSP1, FLAG

* Division of Infectious and Tropical diseases, Research Institute for Health Sciences, Chiang Mai University, Chiang Mai.

** Department of Immunology, US. Armed Forces Research Institute of Medical Science, Bangkok.

*** Department of Microbiology, Faculty of Public Health, Mahidol University, Bangkok.

บทนำ

MSP1 เป็นโปรตีนอยู่บนผิวของเมอโรซอยท์ (Merozoite) มีน้ำหนักโมเลกุลระหว่าง 190-230 กิโลดาลตัน แล้วแต่ชนิดของพลาสโมเดียม MSP1 สร้างขึ้นในระหว่างที่เชื้อมาลาเรียเจริญเติบโตในเม็ดเลือดแดง ในขณะที่เมอโรซอยท์กำลังหลุดจากเม็ดเลือดแดงเอนไซม์จะตัด MSP1 ให้เป็นโปรตีนชิ้นเล็ก ๆ มีชื่อเรียกตามน้ำหนักโมเลกุลดังนี้ $MSP1_{83}$, $MSP1_{30}$, $MSP1_{38}$ และ $MSP1_{42}$ ซึ่ง $MSP1_{42}$ จะถูกตัดด้วยเอนไซม์อีกครั้งขณะที่เมอโรซอยท์จะเข้าสู่เม็ดเลือดแดงอันใหม่ เป็น $MSP1_{33}$ และ $MSP1_{19}$ สำหรับโปรตีน $MSP1_{19}$ เท่านั้นที่ยังเกาะติดกับผิวเมอโรซอยท์ ส่วนโปรตีนท่อนอื่น ๆ จะถูกสลัดออกไป[1] ลำดับกรดอะมิโนของ $MSP1_{19}$ ของเชื้อมาลาเรียต่างสายพันธุ์ (Strain) มีความเหมือนกันมาก (High conserved) อย่างเชื้อ *P. falciparum* มีกรดอะมิโนเพียง 7 ตัวเท่านั้นใน 120 ตัวที่ไม่เหมือนกัน[2,3]

การศึกษาภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อมาลาเรียโดยการกระตุ้นด้วยโปรตีน $MSP1_{19}$ ทั้งในหนูทดลองและลิงพบว่า $MSP1_{19}$ สามารถกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันในการป้องกันการติดเชื้อมาลาเรีย *P. yoelii*[4-6] และ *P. falciparum*[7] ได้ตามลำดับ $MSP1_{19}$ ที่ใช้ในการทดลองดังกล่าวเตรียมโดยวิธีพันธุวิศวกรรมจาก *E. coli* รูปของ Glutathione-S-transferase (GST)-$MSP1_{19}$ และจากเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ในรูปของ His_6-tagged $MSP1_{19}$[7,8] การป้องกันของภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้นอาศัยแอนติบอดีเป็นหลัก จากการทดลองกระตุ้นภูมิคุ้มกันให้หนูทดลองปกติด้วย $MSP1_{19}$ พบว่าหนูสร้างแอนติบอดีต่อ $MSP1_{19}$ ได้สูงมาก และเมื่อกำจัด $CD4^+$ T cells ของหนูพบว่าหนูยังคงป้องกันการติดเชื้อได้ และหนู B cell knockout mice ซึ่งไม่มี B cells ในร่างกาย เมื่อฉีดด้วย $MSP1_{19}$ ไม่สามารถป้องกันการติดเชื้อมาลาเรียได้[5] นอกจากนี้ การฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วย $CD4^+$ T cell epitope peptides หรือ การถ่าย $CD4^+$ T cells ที่จำเพาะกับ $MSP1_{19}$ ให้กับหนูที่ไม่มีภูมิคุ้มกันมาก่อน ไม่สามารถป้องกันการติดเชื้อมาลาเรียได้[9]

ในการศึกษานี้ได้สร้างยีสต์ที่สร้าง $MSP1_{19}$ ออกมาในรูป FLAG-$MSP1_{19}$ fusion protein โดยใช้ N-terminal yeast FLAG expression kit โดย *S. cerevisiae* ได้ออกแบบมาสำหรับการเชื่อมต่อ FLAG peptide เข้ากับโปรตีนที่ต้องการ (ในที่นี้คือ $MSP1_{19}$) ทางด้าน N-terminus และได้ศึกษาถึงสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อยีสต์ดังกล่าวเพื่อให้ยีสต์สามารถสร้าง FLAG-$MSP1_{19}$ fusion protein ออกมาอย่างมีประสิทธิภาพ และหาภาวะที่เหมาะสมในการแยก FLAG-$MSP1_{19}$ จากน้ำเลี้ยงเชื้อยีสต์ให้บริสุทธิ์

วัสดุและวิธีการศึกษา

1. การคัดเลือกโคลนของยีสต์ที่ผลิต $MSP1_{19}$ และหาสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยง

ยีสต์ที่สร้าง FLAG-$MSP1_{19}$ fusion protein สร้างขึ้นที่สถาบัน Queensland Institute of Medical Research, Brisbane, Australia โดยใช้ N-Terminal Yeast FLAG Expression kit (Scientific Imaging System, Kodak)[10] ตามวิธีการที่ระบุไว้ นำยีสต์ที่ได้มาเลี้ยงแยกเชื้อบนอาหารเลี้ยงยีสต์ YPD agar (ประกอบด้วย 1% yeast extract, 2% peptone, 2% dextrose และ 2% agar) ให้ได้โคโลนีเดี่ยว ๆ ที่ 30°ซ เป็นเวลา 2-3 วัน จากนั้นเลือกมา 10 โคโลนี เลี้ยงใน YPD liquid medium (ประกอบด้วย 1% yeast extract, 2% peptone, และ 2% dextrose) ที่ 30°ซ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และเขย่าที่ 250 รอบต่อนาทีด้วยเครื่อง Orbital incubator shaker (GYROMAX™ 732R Amerex

Instruments Inc.) หลังจากนั้นนำน้ำเลี้ยงเชื้อยีสต์ (Culture supernatant) ไปปั่นที่ 5,000 g 30 นาที แล้วทดสอบหาปริมาณ $MSP1_{19}$ ที่ยีสต์สร้างขึ้นโดยวิธี ELISA จากนั้นเลือกโคลนที่สร้าง $MSP1_{19}$ ได้ดีมาเลี้ยงแยกเชื้อต่อบน YPD agar อีกครั้งที่ 30°ซ เป็นเวลา 2-3 วัน จากนั้นนำเชื้อจานเลี้ยง 10 โคโลนี ไปเลี้ยงใน YPEM (ประกอบด้วย 1% dextrose, 3% glycerol, 1% yeast extract, และ 2% peptone) ที่ 30°ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมงและเขย่า 250 รอบต่อนาที เมื่อครบเวลาเก็บน้ำเลี้ยงเชื้อไปตรวจหา FLAG peptide และ $MSP1_{19}$ โดยทำปฏิกิริยากับ Anti-FLAG M1 mAb และ Anti- $MSP1_{19}$ serum โดยวิธี ELISA

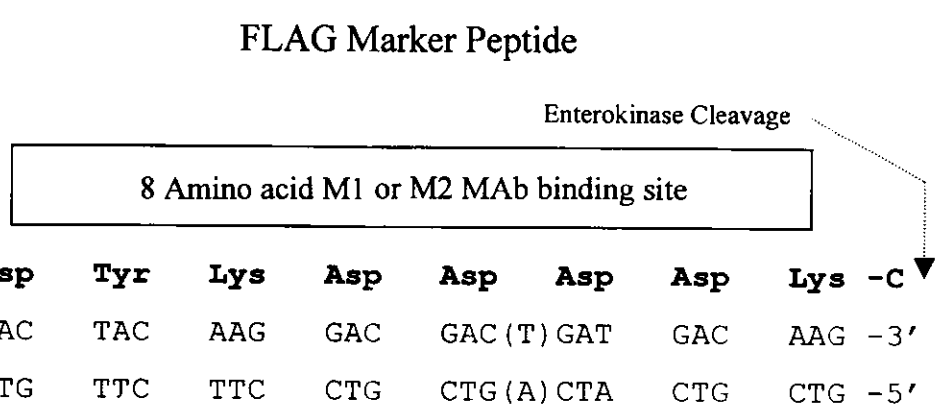
ในการทดสอบหาภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อยีสต์ นำเชื้อยีสต์เลี้ยงใน YPEM ที่ 28°ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมงและเขย่า 250 รอบต่อนาที จากนั้นถ่ายลงใน YPHSM (1% dextrose, 3% glycerol, 1% yeast extract, และ 8% peptone) ความเข้มข้น 5% yeast culture และเลี้ยงที่ 28°ซ เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมงตามลำดับ เมื่อครบเวลานำไปปั่นที่ 5,000 g 30 นาที (SORVALL, DUPONT instruments) นำไปทดสอบหาปริมาณ $MSP1_{19}$ โดยวิธี ELISA และทดสอบหาปริมาณกลูโคส ความเป็นกรด-ด่าง และหาปริมาณโปรตีนโดย Labstix ® (BAYER)

2. การทดสอบหาปริมาณ $MSP1_{19}$ และ FLAG peptide ในน้ำเลี้ยงเชื้อยีสต์โดยวิธี ELISA

นำน้ำเลี้ยงเชื้อยีสต์มาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นต่าง ๆ ก่อนนำมาใส่ในหลุมของ ELISA plate (Maxisorp™ immunoplat, NUNC) หลุมละ 100 µL ที่ 4°ซ หนึ่งคืน ล้างด้วย 0.05% Tween20/PBS 4 ครั้ง เติมด้วย 1%BSA/ PBS หลุมละ 200 µL ที่ 37°ซ 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาดูดเอา Blocking solution ออก แล้วเติม Anti-$MSP1_{19}$ serum เจือจาง 1/1,000 หรือ Anti-FLAG M1 MAb เจือจาง 1/4,000 หลุมละ 100 µL ตั้งไว้ที่ 37°ซ 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาล้าง 4 ครั้ง แล้วเติม HRP-conjugated goat anti-mouse Igs (Organon Teknika Corp Boxtel, Holland.) เจือจาง 1/3,000 หลุมละ 100 µL ตั้งไว้ที่ 30°ซ 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาล้าง 4 ครั้ง แล้วเติม OPD substrate solution หลุมละ 100 µL ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลาหยุดปฏิกิริยาด้วย 1N H_2SO_4 หลุมละ 50 µL อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร โดยเครื่อง CERES UV900 Hdi (Biotek Instruments Inc.) สำหรับการหา FLAG peptide ใช้วิธีการเดียวกันยกเว้นใช้ Blocking solution เป็น 1% BSA/TBS/Ca และ Washing solution เป็น 0.05% Tween20/TBS/Ca

3. การเตรียม $MSP1_{19}$ ให้บริสุทธิ์โดยใช้ Anti-FLAG M1 antibody agarose gel column

นำน้ำเลี้ยงเชื้อยีสต์ไป Dialyse ใน 0.85% NaCl (Normal saline) ที่ 4°ซ อย่างน้อย 3 ครั้งเพื่อกำจัด Phosphate ซึ่งมีอยู่ในอาหารเลี้ยงยีสต์ จากนั้นกรองด้วยแผ่นกรอง ขนาด 0.22 µm เติม 10x TBS/Ca (0.5 M Tris pH 7.4, 1.5 M NaCl, 100 mM $CaCl_2$) ลงไป 1 ส่วนรวมกับ 9 ส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อยีสต์ จากนั้นเตรียม Anti-FLAG M1 antibody gel column โดยปั่นล้างที่ 750 g 2 นาที (KUBOTA 5200) ด้วย 0.1M glycine HCl pH 3.5 อย่างน้อย 5 เท่าของปริมาตร Gel จำนวน 3 ครั้ง ตามด้วย TBS (50 mM Tris pH7.4 , 0.15 M NaCl) อย่างน้อย 5 เท่าของปริมาตร Gel จำนวน 3 ครั้ง เมื่อล้างเสร็จนำมาผสมกับน้ำเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ปริมาตรต่างๆ คือ 10, 20, 30 และ 40 mL วางบนเครื่องโยก (Model VRN-200) ที่อุณหภูมิ 4°ซ



รูปที่ 1 ลักษณะและองค์ประกอบของ FLAG peptide

เป็นเวลาหนึ่งคืนและปั่นล้างด้วย TBS/Ca อย่างน้อย 5 เท่าของปริมาตรเจล จำนวน 3 ครั้ง ที่ 750 g 2 นาที แล้วผสมเจลที่ล้างแล้วใน TBS/Ca 5 mL บรรจุลงใน Column ปล่อยให้ Buffer ไหลอย่างอิสระ จากนั้นเติม 0.1M glycine HCl pH 3.5 ลงใน Column และเก็บสารละลายที่ไหลผ่าน Column ออกมาในหลอดทดลอง 6 หลอด ๆ ละ 1 mL ซึ่งมี 1 M Tris pH 8.0 อยู่ 1-2 หยดเพื่อปรับ pH ของสารละลายที่ผ่านออกมาให้เป็นกลาง เมื่อเสร็จเรียบร้อยล้างเจลด้วย TBS อย่างน้อย 5 เท่าของปริมาตรเจล จำนวน 3 ครั้ง แล้วเก็บรักษาเจล ไว้ใน 0.02% NaN_3/TBS แล้วทดสอบหาปริมาณ $MSP1_{19}$ ที่ได้โดยวิธี ELISA และคำนวณหาค่า % Recovery

4. การทดสอบความบริสุทธิ์ของ $MSP1_{19}$ โดยวิธี SDS-PAGE และ Western Blot

การทดสอบความบริสุทธิ์ของ $MSP1_{19}$ ที่เตรียมขึ้นเองเปรียบเทียบกับ His_6-tagged $MSP1_{19}$ ที่ผลิตขึ้นจากห้องปฏิบัติการของ David Kaslow[8] โดยวิธี SDS-Polyaceylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) ซึ่งใช้ 12.5 % running acrylamide gel และ 5% stacking acrylamide gel นำโปรตีนผสมกับ 5x SDS buffer และต้มในน้ำเดือด 5 นาทีก่อนหยอดลงบนเจล ที่ประกอบกับเครื่องเรียบร้อยแล้วใน Chamber บนและล่างใส่ Electrophoresis buffer pH 8.3 (Tris 3.03 g, Glycine 14.4 g, SDS 1.0 g และน้ำกลั่น 1,000 mL) แล้วปล่อยกระแสไฟฟ้าผ่านในช่วงแรก 120 โวลท์ ในช่วงที่โปรตีนวิ่งใน Stacking gel เมื่อโปรตีนเคลื่อนเข้าสู่ Running gel ปรับกระแสไฟฟ้าเป็น 200 โวลท์ จนกระทั่งโปรตีนวิ่งไปถึงปลายด้านล่างของเจล จึงปิดกระแสไฟฟ้า นำแผ่นเจล มาทำ Blotting เพื่อถ่ายโปรตีนลงบนแผ่น Nitrocellulose นำส่วนหนึ่งนำไปย้อมโปรตีนด้วย 0.1% Amido black และอีกส่วนหนึ่งที่เหมือนกันนำไปทำ Western blot

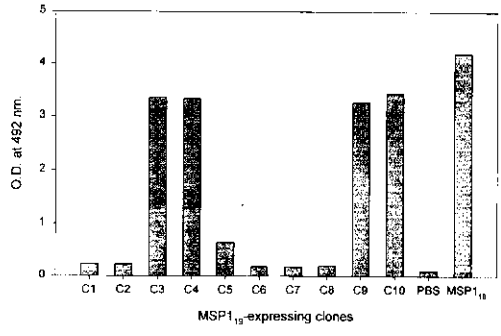
ในการทำ Western blot เริ่มจากนำ Nitrocellulose ที่ Blot protein เรียบร้อยแล้ว Block ด้วย 5% skim milk 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง ล้างด้วย 0.05% Tween20/PBS แล้วเติมแอนติบอดีต่าง ๆ คือ Anti- $MSP1_{19}$ serum[6] ความเข้มข้น 1/200, Anti- *P. yoelii YM* hyperimmune serum[11] ความเข้มข้น 1/200 และ Mab 302 (Anti- $MSP1_{19}$ mAb)[12] ความเข้มข้น 10 µg/mL เป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง ครบเวลาล้างด้วย Buffer แล้วเติม HRP-conjugated goat anti-mouse Igs ที่ความ

เข้มข้น 1/300 เป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง แล้วเติม DAB substrate solution 5 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยล้างแผ่น Nitrocellulose ด้วยน้ำกลั่น

ผลการทดลอง

1. ผลการคัดเลือกโคลนของยีสต์ที่ผลิต $MSP1_{19}$

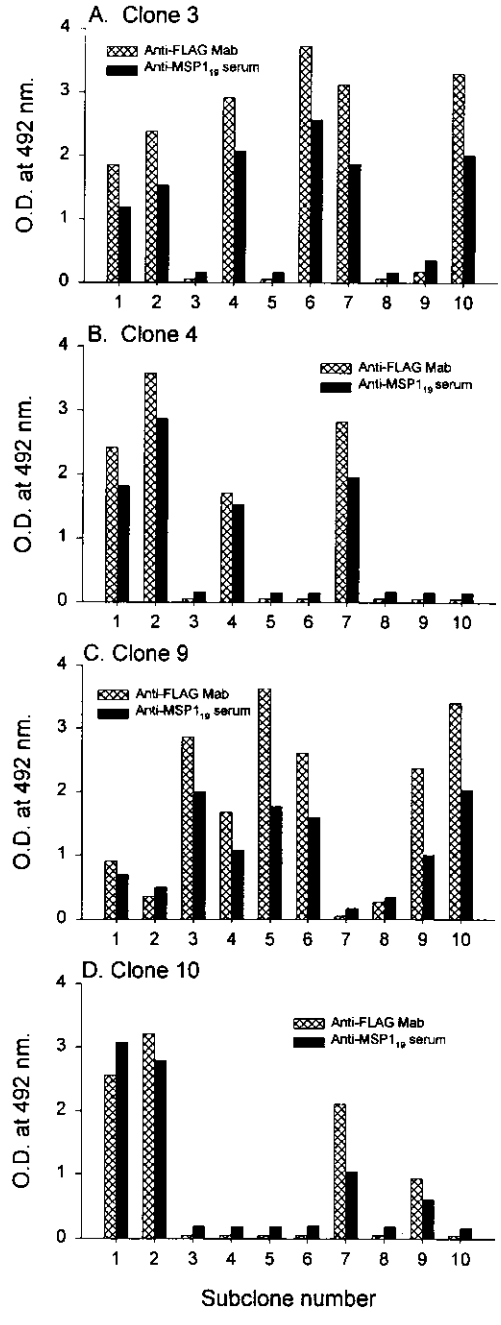
เมื่อเริ่มแรกได้นำยีสต์มาเลี้ยงบน Agar plate และนำโคโลนีที่ขึ้นไปเลี้ยงใน YPD broth แล้วนำ supernatant ที่ได้มาหาระดับ $MSP1_{19}$ ด้วยวิธี ELISA พบว่า 4 ใน 10 โคโลนี สร้าง $MSP1_{19}$ ได้ในระดับที่สูง คือ โคลน C3, C4, C9 และ C10 (รูปที่ 2) เพื่อให้ได้โคลนที่มีความถาวรในการสร้าง $MSP1_{19}$ จึงนำโคลนที่ได้ดังกล่าวไปแยกเลี้ยงต่อ พบว่า มีจำนวน 6/10, 4/10, 5/10 และ 3/10 โคลนย่อยจากโคลน C3, C4, C9 และ C10 ตามลำดับที่สร้าง $MSP1_{19}$ ได้สูงเมื่อใช้เกณฑ์ค่าการดูดกลืนแสง > 0.5 (รูปที่ 3) ในการเตรียม $MSP1_{19}$ จึงเลือกใช้โคลนที่ 3 โคลนย่อยที่ 6 (ซึ่งเรียกว่าโคลน 3.6) เนื่องจากสร้าง $MSP1_{19}$ ได้ปริมาณสูง



รูปที่ 2 ระดับการสร้าง FLAG-$MSP1_{19}$ ของยีสต์ *S. cerevisiae* ที่แยกคัดเลือกจำนวน 10 โคลน

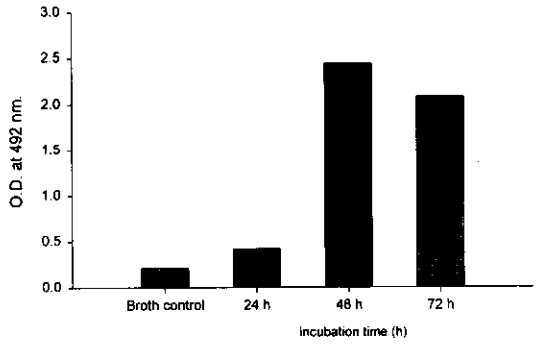
2. ระยะเวลาที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อยีสต์ที่ผลิต $MSP1_{19}$

ได้ทดลองเลี้ยงยีสต์ใน YPHSM broth ที่อุณหภูมิ 28 °C และเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที แล้วเก็บ Supernatant ที่ระยะเวลาต่าง ๆ คือ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง มาทดสอบหาปริมาณ $MSP1_{19}$ ที่สร้างขึ้น พบว่า การเลี้ยงยีสต์ดังกล่าวเป็นเวลา 48 ชั่วโมงให้ผลการสร้าง $MSP1_{19}$ ออกมาปริมาณมากที่สุด (รูปที่ 4) โดยมีสภาพความ



รูปที่ 3 ระดับการสร้าง FLAG-$MSP1_{19}$ ของยีสต์ *S. cerevisiae* จากโคลน C3, C4, C9 และ C10

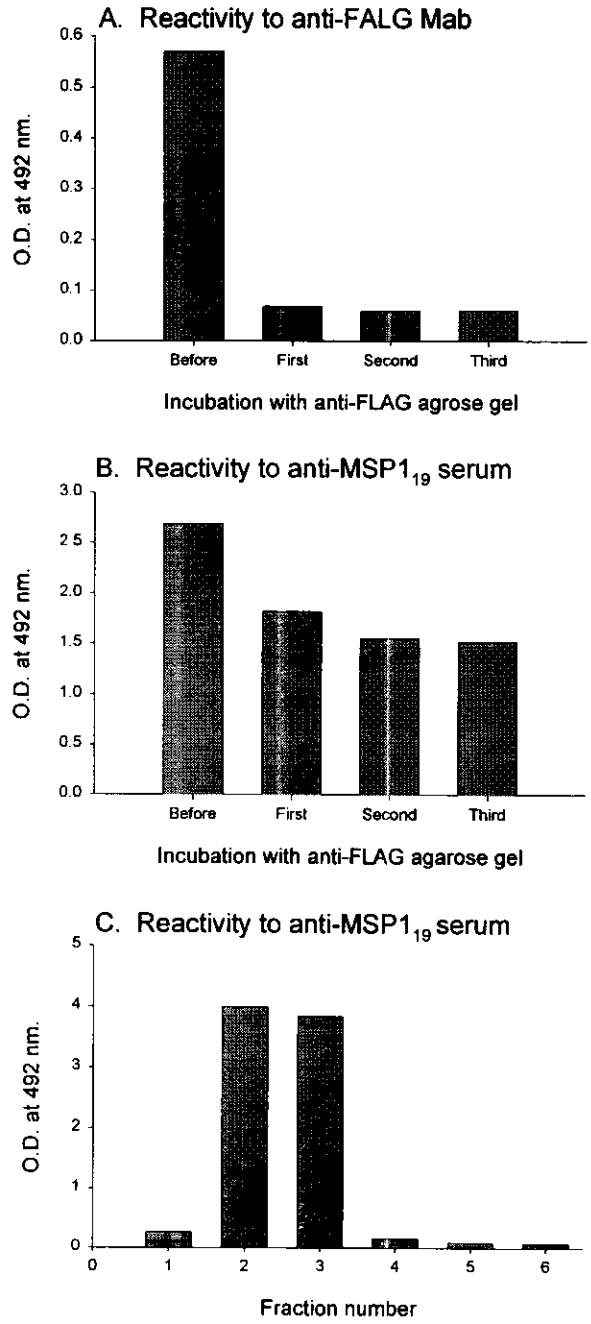
เป็นกรด-ด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อยังเป็นกลาง และปริมาณกลูโคสถูกใช้หมด



รูปที่ 4 การผลิต FLAG-MSP1$_{19}$ ของยีสต์ *S. cerevisiae* ที่ระยะเวลาต่างๆ

3. ผลการแยก MSP1$_{19}$ ให้บริสุทธิ์ด้วย Anti-FLAG M1 antibody agarose gel column

เพื่อทดสอบหาภาวะที่เหมาะสมในการแยก MSP1$_{19}$ ให้บริสุทธิ์โดยใช้ Anti-FLAG M1 antibody agarose gel column จึงนำ Supernatant ที่ได้จากการเลี้ยงยีสต์ข้างต้นปริมาณ 10 mL มา Incubate กับ Anti-FLAG M1 antibody agarose gel ปริมาตร 1 mL ค้างคืนที่ 4°ซ เก็บ Supernatant ที่ได้ไปผ่านเจล อีก 2 ครั้งใน Column โดยตรง Supernatants ที่เก็บไว้บางส่วนก่อนผ่าน Column (Pre-application) เมื่อผ่าน Column ครั้งที่หนึ่ง (Post first application) เมื่อผ่าน Column ครั้งที่สอง (Post second application) และเมื่อผ่าน Column ครั้งที่สาม (Post third application) นำไปตรวจหา MSP1$_{19}$ และ FLAG peptide โดยวิธี ELISA (รูปที่ 5) ผลปรากฏว่า MSP1$_{19}$ ใน Culture supernatant เมื่อผ่าน Column เพียงครั้งเดียวก็ถูกจับได้หมด (รูปที่ 5A และ B)ซึ่งจะเห็นว่าตรวจไม่พบ FLAG peptide และปริมาณ MSP1$_{19}$ ลดลงอย่างมาก อย่างไรก็ตามยังคงตรวจพบ MSP1$_{19}$ ใน Culture supernatant เมื่อผ่าน



รูปที่ 5 ผลการจับ FLAG-MSP1$_{19}$ เมื่อผ่านน้ำเลี้ยงเชื้อยีสต์ใน anti-FLAG M1 antibody gel column

Column ครั้งที่ 1, 2 และ 3 อีกทั้งยังมีระดับใกล้เคียงกัน (รูปที่ 5B) แสดงว่า ใน Culture supernatant มี MSP1$_{19}$ อิสระที่สร้างจากยีสต์ด้วย

หลังจากล้าง Column เอาส่วนที่ไม่จับกับ Anti-FLAG M1 antibody agarose gel ออก

หมดแล้ว จึง Elute เอา FLAG-$MSP1_{19}$ fusion protein ที่จับกับ Anti-FLAG M1 antibody agarose gel ออกด้วย Glycine buffer pH 3.0 และเก็บ 6 fraction ปริมาณ Fraction ละ 1 mL ผลปรากฏว่าโปรตีน FLAG-$MSP1_{19}$ จะหลุดออกมาใน Fraction ที่ 2 และ 3 (รูปที่ 5C)

จากการทดสอบใช้ Culture supernatant ในปริมาตรต่างๆ คือ 10, 20, 30 และ 40 mL ในการ Incubate กับ Anti-FLAG M1 antibody agarose gel พบว่า การใช้ Culture supernatant ปริมาตร 40 mL สามารถแยก FLAG-$MSP1_{19}$ ได้ดีที่สุดโดยมีค่าปริมาณโปรตีนดังกล่าว และค่า % yield สูงสุด (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบปริมาตรของ Yeast cultutre supernatant ต่อค่าปริมาณ $MSP1_{19}$ และ % yield ในการแยก $MSP1_{19}$ ให้บริสุทธิ์

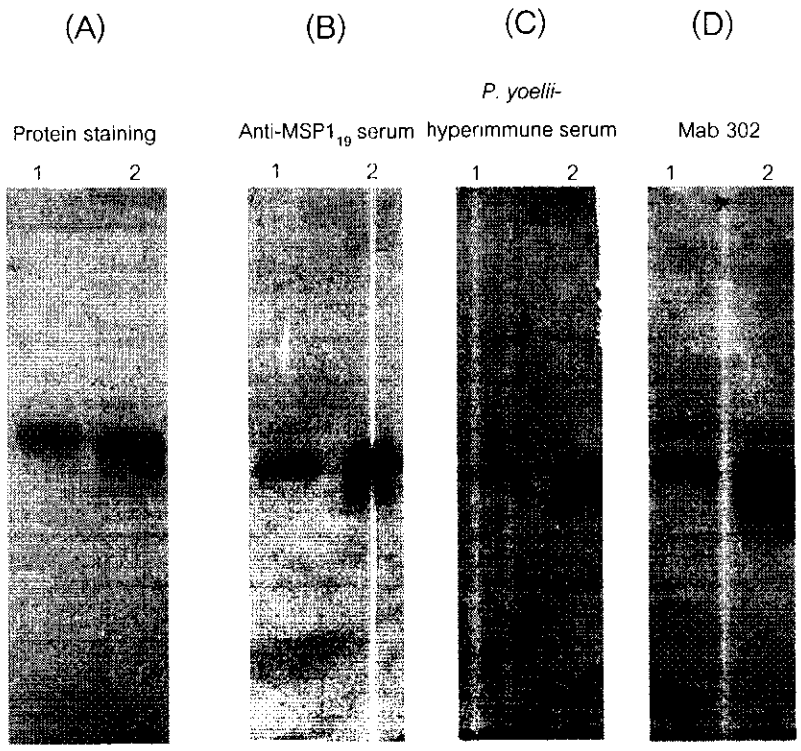
ปริมาตรของ Yeast culture supernatant	ปริมาณ $MSP1_{19}$ ที่ตรวจพบ (µg)			% Yield of $MSP1_{19}$
	ก่อนผ่าน Column	หลังผ่าน Column	หลัง Elution	
10 mL	43.5	0.0	16.5	38.0
20 mL	45.8	0.0	35.3	77.1
30 mL	74.1	0.0	58.4	78.8
40 mL	157.2	7.2	147.5	93.8

4. การทดสอบความบริสุทธิ์ และการเกิดปฏิกิริยากับแอนติบอดีต่อ $MSP1_{19}$

FLAG-$MSP1_{19}$ ที่เตรียมได้จากการผ่าน Anti-FLAG M1 antibody agarose gel column นำมาทดสอบความบริสุทธิ์ด้วยวิธี SDS-PAGE และทดสอบการเกิดปฏิกิริยากับ Anti-$MSP1_{19}$ serum ซึ่งได้จากหนูที่ฉีดด้วย His_6-$MSP1_{19}$[6] กับ anti-*P. yoelii* hyperimmune serum ซึ่งได้จากหนูที่ ติดเชื้อ *P. yoelii* และรักษาด้วยยา[11] และกับ Mab 302[12] โดยวิธี Western blot ผลการทดลองพบว่า เมื่อทดสอบด้วยวิธี SDS-PAGE มีแถบโปรตีนเกิดขึ้นเพียงแถบเดียว (รูปที่ 6) แสดงว่าโปรตีนที่เตรียมได้มีความบริสุทธิ์สูง จากการทดสอบด้วยวิธี Western blot เกิดแถบโปรตีนให้เห็นแถบเดียวเช่นกันกับแอนติบอดีทั้งสามชนิด แสดงให้เห็นว่า $MSP1_{19}$ ที่เตรียมได้จากยีสต์ในรูป FLAG-$MSP1_{19}$ fusion protein มีโครงสร้างที่เหมือนกับในธรรมชาติและประกอบด้วย Antigenic determinants เหมือนกับ His_6-$MSP1_{19}$ และที่มีในธรรมชาติด้วย

วิจารณ์

ในการศึกษานี้ได้แสดงให้เห็นว่า $MSP1_{19}$ สามารถเตรียมขึ้นในรูปของ Recombinant protein จากยีสต์ *S. cerevisiae* ในรูปของ FLAG fusion protein (FLAG-$MSP1_{19}$) นั่นคือมี FLAG peptide เชื่อมต่อกับ $MSP1_{19}$ ทางปลายด้าน Amino FLAG peptide นี้ประกอบด้วยกรดอะมิโน 8 ตัวคือ Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys ซึ่งเป็นส่วนที่สำคัญที่สามารถจับกับ Anti-FLAG M1 (IgG2b) หรือ Anti-FLAG M2 (IgG1) monoclonal antibody ได้ ซึ่งมีประโยชน์ในขั้นตอนการแยกบริสุทธิ์ (Affinity purification) โดยไม่จำเป็นต้องเตรียมแอนติบอดีต่อโปรตีนที่ต้องการผลิต และการตรวจหา



รูปที่ 6 ผลการทดสอบความบริสุทธิ์ของ FLAG-MSP$_{19}$ โดยวิธี SDS-PAGE และการทำปฏิกิริยากับ Anti-MSP1$_{19}$ antibodies โดยวิธี Western blot

FLAG fusion proteins ด้วยวิธีการทางภูมิคุ้มกัน (Immunological detection) นอกจากนี้ยังมีประโยชน์อื่น ๆ ได้แก่ FLAG peptide สามารถตัดออกได้ด้วย Enterokinase ทำให้สามารถเตรียมโปรตีนที่ต้องการโดยไม่มี FLAG peptide ติดอยู่ได้ โดยโปรตีนดังกล่าวยังคงมีโครงสร้างเหมือนเดิม เป็นต้น

การเลี้ยง Recombinant yeast ให้ได้ผลผลิตที่ดีมีประสิทธิภาพ จำเป็นต้องมีการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยง การศึกษานี้ได้ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ YPHSM ซึ่งประกอบด้วย Dextrose, Glycerol, Yeast extract, Peptone และ Calcium chloride ซึ่งให้ผลดีกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อ YPEM ซึ่งไม่มี Calcium chloride และมีปริมาณ Peptone น้อยกว่า 4 เท่า[10] นอกจากนี้ยังพบว่าการเลือกใช้ Peptone ก็มีผลต่อการผลผลิตที่ได้ด้วย กล่าวคือ การใช้ Water peptone ซึ่งมี Phosphate buffer อยู่ด้วยจะได้ผลผลิตที่ดีกว่า (ไม่ได้แสดงข้อมูล) ในด้านเทคนิคการเลี้ยงได้แสดงให้เห็นว่า การเลี้ยงเชื้อยีสต์เป็นเวลา 48 ชั่วโมงที่ 28°ซ โดยเขย่า 250 รอบต่อนาที จะให้ปริมาณผลผลิตของ MSP1$_{19}$ มากที่สุด (รูปที่4) และในช่วงเวลาดังกล่าวน้ำเลี้ยงเชื้อยีสต์ยังอยู่ใน สภาวะที่เป็นกลางเหมาะสมกับสภาพโปรตีนอีกด้วย

การแยก FLAG-MSP1$_{19}$ ให้บริสุทธิ์จากน้ำเลี้ยงเชื้อยีสต์มีข้อสำคัญที่ควรระวังคือ ก่อนการเตรียม MSP1$_{19}$ ให้บริสุทธิ์จะต้องนำน้ำเลี้ยงเชื้อไป Dialyse ใน 0.85% NaCl เพื่อกำจัด Phos-

phate ที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่อาจเกิดตะกอนของ Calcium phosphate ในขั้นตอนการทำ Affinity chromatography โดยใช้ Anti-FLAG M1 antibody agarose gel ซึ่งจะมี $CaCl_2$ อยู่ใน Buffer ด้วย ในการทำ Dialysis ยังช่วยลดความหนืดของน้ำเลี้ยงเชื้อยีสต์ลงไปได้มาก ก่อนที่จะนำไปผ่าน Affinity column สำหรับเตรียม $MSP1_{19}$ ให้บริสุทธิ์ และข้อสำคัญอีกประการหนึ่งคือ ในการทำปฏิกิริยาระหว่าง FLAG กับ Anti-FLAG antibody ต้องอยู่ในสภาวะที่มี Calcium chloride อย่างน้อย 1 mM

การศึกษานี้ได้ทดสอบหาปริมาตรของน้ำเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยากับ Anti-FLAG M1 antibody agarose gel 1 มล. พบว่าสามารถใช้น้ำเลี้ยงเชื้อยีสต์ได้ถึง 40 มล. ต่อ เจล 1 มล. (ตารางที่ 1) ซึ่งในปริมาตรนี้มี FLAG-$MSP1_{19}$ เหลือเพียงเล็กน้อยหลังจาก Incubate กับ เจล และให้ FLAG-$MSP1_{19}$ ในปริมาณที่สูงเมื่อถูก Elute จาก เจล นั่นคือ มีค่า Protein recovery สูง

คำถามที่สำคัญเมื่อได้โปรตีน FLAG-$MSP1_{19}$ ก็คือโปรตีนดังกล่าวมีความบริสุทธิ์มากน้อยเพียงใด และมีคุณสมบัติเหมือนกับที่มีอยู่ในธรรมชาติหรือไม่ ได้ทดสอบเปรียบเทียบกับ $MSP1_{19}$ ที่เตรียมในรูป His_6-tagged $MSP1_{19}$ ซึ่งสามารถกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันในการป้องกันการติดเชื้อมาลาเรียในหนูทดลอง พบว่าโปรตีนทั้งสองมีขนาดโมเลกุลใกล้เคียงกันมาก และปรากฏเพียงแถบเดียวหลังผ่าน Affinity column FLAG-$MSP1_{19}$ ที่เตรียมได้สามารถทำปฏิกิริยาได้กับ Anti- $MSP1_{19}$ serum[6], Anti-*P. yoelii YM* hyperimmune serum[11] และ Anti $MSP1_{19}$ mAb (Mab 302)[12] แสดงว่าโปรตีนดังกล่าวมีโครงสร้างและคุณสมบัติของแอนติเจนเหมือนกับ $MSP1_{19}$ ของตัวเชื้อที่อยู่ในธรรมชาติ

การศึกษานี้ได้ให้ข้อมูลที่สำคัญในการเตรียม $MSP1_{19}$ ที่เหมาะสมและพิสูจน์ทราบถึงคุณสมบัติความเป็นแอนติเจนของโปรตีนดังกล่าวที่สร้างออกมาในรูป FLAG-$MSP1_{19}$ ในอันที่จะนำโปรตีนดังกล่าวไปใช้ในการศึกษาภูมิคุ้มกัน และการพัฒนาวัคซีนป้องกันมาลาเรียต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับเงินสนับสนุนจาก UNDP/ World Bank/ WHO special Program

บรรณานุกรม

1. Blackman MJ, Holder AA. Secondary processing of *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 (MSP1) by calcium-dependent membrane-bound serine protease shedding of $MSP1_{33}$ as a noncovalent associated complex with other fragments of MSP1. Mol Biochem Parasitol 1992; 50: 307-16.
2. Miller LH, Robert T, Shahabuddin M, McCutchan TF. Analysis of sequence diversity in the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 (MSP-1). Mol Biochem Parasitol 1993; 59: 1-14.
3. Jongwutiwes S, Tanabe K, Kanbara H. Sequence conversion in the C-terminal part of the precursor to the major merozoite surface protein (MSP1) of *Plasmodium falciparum* from field isolates. 1993; 59: 95-100.
4. Daly TM, Long CA. A recombinant 15-kilodalton carboxyl-terminal fragment of *Plasmodium yoelii* 17XNL merozoite surface protein-1 induces a protective

immune response in mice. Infect Immun 1993; 61: 2462-7.

5. Ling IT, Ogun SA, Holder AA. Immunization against malaria with recombinant protein. Parasite Immunol 1994; 16: 63-7.
6. Hirunpetcharat C, Tian JH, Kaslow DC, *et al.* Complete protective immunity induced in mice by immunization with the 19-kilodalton carboxyl terminal fragment of the merozoite surface protein-1 ($MSP1_{19}$) of *Plasmodium yoelii* expressed in *Saccharomyces cerevisiae.* Correlation of protection with antigen-specific antibody titer, but not with effector CD4+ T cells. J Immunol 1997; 159: 3400-11.
7. Kumar S, Yadava A, Keister DB, *et al.* Immunogenicity and *in vivo* efficacy of recombinant *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 in Aotus monkeys. Mol Med 1995; 1: 325-32.
8. Tian JH, Miller LH, Kaslow DC, *et al.* Genetic regulation of protective immune response in congenic strains of mice vaccinated with a subunit malaria vaccine. J Immunol 1996; 157: 1176- 83.
9. Tian JH, Good MF, Hirunpetcharat C, *et al.* Definition of T cell epitopes within the 19 Kda carboxylterminal fragment of *Plasmodium yoelii* merozoite surface protein-1 ($MSP1_{19}$) and their roles in immunity in malaria. Parasite Immunol 1998; 20: 263-78.
10. User Manual. Yeast N-terminal FLAG expression system for expression, detection and purification of extracellular proteins in *S. cerevisiae.* Kodak Scientific Imaging Systems.
11. Freeman RR, Palish CR. *Plasmodium yoelii*: antibody and the maintenance of immunity in BALB/c mice. Exp Parasitol 1981; 52: -18-24.
12. Majarian WR, Daly TM, Weidanz WP, Long CA. Passive immunization against murine malaria with an IgG3 monoclonal antibody. J Immunol 1984; 132: 3131-37.

นิพนธ์ต้นฉบับ

การทดสอบหาแอนติบอดีต่อแอนติเจนของเชื้อรา เพนนิซิเลียม มาเนฟฟิไอ ของกลุ่มประชากรคนปกติที่อาศัยอยู่ในจังหวัดเชียงใหม่

ลดาวัลย์ สาริยา*, รสสุคนธ์ กลิ่นหอม*, ธารินี ไชยวงศ์*, สาคร พรประเสริฐ,**

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ : เพื่อทดสอบหาแอนติบอดีต่อแอนติเจนของเชื้อรา เพนิซิเลียม มาเนฟฟิไอ ในซีรัมคนปกติที่อาศัยอยู่ในเขตจังหวัดเชียงใหม่ โดยเปรียบเทียบกับซีรัมของผู้ป่วยติดเชื้อเอชไอวีที่เป็นโรคเพนนิซิลิโอซิส มาเนฟฟิไอ

วิธีการ : ใช้เทคนิค Indirect ELISA ตรวจหาแอนติบอดีต่อแอนติเจนของเชื้อราเพนนิซิเลียม มาเนฟฟิไอ ทั้งในรูปที่เตรียมได้จากการแตกเชื้อ และรูปที่เชื้อปล่อยออกมา โดยนำซีรัมคนปกติ 103 ราย และซีรัมผู้ป่วยติดเชื้อเอชไอวีที่เป็นโรคเพนนิซิลิโอซิส มาเนฟฟิไอ 9 ราย มาเจือจางด้วย 0.05% PBS-Tween ในอัตราส่วน 1:1,000 ก่อนทำปฏิกิริยากับแอนติเจนทั้งสองรูปที่ความเข้มข้น 0.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาด้วยเครื่อง สเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร

ผลการศึกษา : จากซีรั่มคนปกติทั้งหมด 103 รายพบว่า 41 ราย (39.81%) มีแอนติบอดีต่อแอนติเจนที่อยู่ในรูปที่เตรียมได้จากการแตกเชื้อ โดยมีค่าการดูดกลืนแสงสูงกว่าค่า cut-off (A > 0.60) ขณะที่ 73 ราย (70.88%) มีแอนติบอดีต่อแอนติเจนในรูปที่เชื้อปล่อยออกมา และจากจำนวนผู้ป่วยทั้งหมด 9 ราย พบว่า 3 ราย (33.33%) และ 5 ราย (55.55%) มีแอนติบอดีต่อแอนติเจนของเชื้อรา เพนิซิเลียม มาเนฟฟิไอ ทั้งในรูปที่ได้จากการแตกเชื้อและรูปที่เชื้อปล่อยออกมา ตามลำดับ

สรุป : ในกลุ่มประชากรคนปกติที่อาศัยอยู่ในเขตจังหวัดเชียงใหม่มีจำนวนคนที่มีแอนติบอดีต่อแอนติเจนของเชื้อรา เพนนิซิเลียม มาเนฟฟิไอ ทั้งในรูปที่เตรียมได้จากการแตกเชื้อ และรูปที่เชื้อปล่อยออกมา ในปริมาณที่ใกล้เคียงกันกับจำนวนผู้ติดเชื้อเอชไอวี และเป็นเพนนิซิลิโอซิส มาเนฟฟิไอ **วารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่ 2543; 33: 172-81.**

คำหัส : เพนนิซิเลียม มาเนฟฟิไอ, เพนนิซิลิโอซิส

---

* นักศึกษาชั้นปีที่ 4 คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ปีการศึกษา 2543-2544.

** ภาควิชาจุลทรรศนศาสตร์คลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Detection of Antibodies Against *Penicillium marneffei* Antigens in Chiang Mai Healthy Population

Sariya L*, Klinhom R*, Chaiwong T*, Pornprasert S**

Abstract

Object : To determine the antibodies against *P. marneffei* antigens in serum of Chiang Mai healthy population compared to HIV positive patients with penicilliosis marneffei.

Method : Antibodies to secreted and sonicated form of *P. marneffei* antigens were determined by indirect ELISA technique. 103 Normal healthy sera and 9 HIV-positive patients with penicilliosis marneffei sera that diluted into 1:1,000 with 0.05% PBS Tween were incubated with both forms of each 0.25 µg/mL antigens. Then absorbance of the reaction was measured by spectrophotometer at wavelenght of 490 nm.

Results : The results demonstrated that 41 of 103 normal healthy sera (39.81%) were positive to sonicated form of *P. marneffei* antigen (A > 0.60) and 73 of 103 (70.88%) were positive to the secreted form. Three (33.33%) and five (55.55%) of HIV positive patients with penicilliosis marneffei were positive to sonicated and secreted form of this fungi antigen, respectively.

Conclusion : The number of normal individuals having positive antibodies to both form of *P. marneffei* antigens in Chiang Mai population was not different from the HIV positive patients with penicilliosis marneffei. **Bull Chiang Mai Assoc Med Sci 2000; 33: 172-81.**

Key words : *Penicillium marneffei* , Penicilliosis

* 4 th Year Students, Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University (2000-2001).

** Department of Microscopy, Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University.

การทดสอบหาแอนติบอดีต่อแอนติเจนของเชื้อรา เพนนิซิเลียม มาเนฟฟิไอ ของกลุ่มประชากรคนปกติที่อาศัยอยู่ในจังหวัดเชียงใหม่

เชื้อรา *Penicillium marneffei* เป็นเชื้อราที่มีรูปร่าง 2 แบบ (Dimorphic fungus) ที่ก่อโรค Penicilliosis ได้ทั้งในคนและสัตว์ พบเชื้อครั้งแรก เมื่อปี ค.ศ. 1956 โดยแยกเชื้อได้จากตับของอัน (Bamboo rat: *Rhizomys sinensis*) ที่จับได้จากประเทศเวียตนาม[1] มีรายงานการติดเชื้อจากธรรมชาติเป็นครั้งแรกในคนอเมริกัน ซึ่งป่วยเป็นโรค Hodgkin's disease และผู้ป่วยรายนี้เคยเดินทางมาแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้[2] หลังจากนั้นมีรายงานการติดเชื้อรานี้เพิ่มขึ้นโดยในปีค.ศ. 1984 พบชาวอเมริกันติดเชื้อรา *P. marneffei* อีก 1 ราย[3]

ระหว่างปี ค.ศ. 1964 - 1983 พบผู้ติดเชื้อที่อาศัยอยู่ทางตอนใต้ของประเทศจีนจำนวน 8 ราย[4] และ ค.ศ.1985 ที่ฮ่องกงพบผู้ติดเชื้อจำนวน 6 ราย[5] และนับตั้งแต่ปีค.ศ. 1984 เป็นต้นมา ภายหลังที่มีการระบาดของเชื้อเอชไอวี (HIV, Human Immunodeficiency Virus) มีรายงานผู้ป่วยติดเชื้อ HIV ที่เป็น penicilliosis marneffei เพิ่มมากขึ้น โดยเฉพาะในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้และทางภาคใต้ของจีน ซึ่งเชื่อว่าเป็นแหล่งที่มีการระบาด (Endemic area) ของเชื้อราชนิดนี้ สำหรับประเทศไทยโดยเฉพาะในเขตภาคเหนือ พบว่าก่อนมีการแพร่ระบาดของเชื้อเอชไอวี พบผู้ป่วยติดเชื้อ *P. marneffei* จำนวน 5 รายที่โรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่[6] และภายหลังจากมีการระบาดของเชื้อ เอชไอวี พบว่าจำนวนผู้ป่วย Penicilliosis marneffei เพิ่มสูงขึ้นโดยในช่วงเดือนมิถุนายน ค.ศ.1990 ถึงสิงหาคม ค.ศ.1991 ที่โรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่พบผู้ป่วยติดเชื้อ HIV ที่เป็น Penicilliosis marneffei จำนวน 35 ราย[7] เดือน มิถุนายน ค.ศ.1992 เพิ่มขึ้นเป็น 86 ราย[8] เมื่อถึงปี ค.ศ. 1994 มีรายงานจำนวนผู้ป่วยทั้งสิ้น 550 ราย[9] และจนกระทั่งถึงปี ค.ศ. 1995 มีรายงานจำนวนผู้ป่วยเพิ่มขึ้นอีกเท่าตัวกว่า โดยคิดเป็นจำนวนทั้งหมด 1,300 ราย[10] จะเห็นได้ว่าในประเทศไทย โดยเฉพาะทางภาคเหนือการติดเชื้อรา *P. marneffei* กำลังมีความสำคัญเพิ่มมากขึ้นโดยเฉพาะในผู้ป่วยติดเชื้อ HIV การติดเชื้อฉวยโอกาสชนิด *P. marneffei* จะพบได้มากเป็นอันดับสี่รองจากวัณโรค, Cryptococcal meningitis และ Pneumocystic carinii pneumonia[11] จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าผู้ป่วย penicilliosis marneffei ส่วนใหญ่อาศัยอยู่ในเมืองและไม่เคยสัมผัสหรือบริโภคเนื้ออ้นมาก่อน ดังนั้นจึงมีการสันนิษฐานว่าผู้ป่วยน่าจะได้รับเชื้อ *P. marneffei* โดยผ่านทางการหายใจเอาสปอร์ของเชื้อที่มีอยู่ในอากาศเข้าไป ขณะเดียวกันคนปกติทั่วไปอาจเคยได้รับเชื้อราชนิดนี้ผ่านทางการหายใจเช่นกัน แต่ไม่แสดงอาการเพราะร่างกายมีระบบภูมิคุ้มกันต่อเชื้อทั้งทาง CMI และ HMI ส่วนในผู้ป่วยติดเชื้อ HIV ระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายถูกทำลายด้วยตัวเชื้อและผลิตภัณฑ์ของตัวเชื้อ HIV โดยเฉพาะการทำลาย T-cell และ B-cell ที่จดจำแอนติเจนของเชื้อ *P. marneffei* ดังนั้นจึงแสดงอาการของโรคได้[12]

การศึกษาใช้วิธี Indirect ELISA technique ตรวจหาแอนติบอดีต่อแอนติเจนของ *P. marneffei* ทั้งในรูปที่เตรียมได้จากการแตกเชื้อและรูปที่เชื้อปล่อยออกมา โดยเปรียบเทียบระหว่างคนปกติกับผู้ป่วยติดเชื้อ HIV ที่เป็น Penicilliosis marneffei ซึ่งผลการทดลองจะช่วยให้มีความเข้าใจกลไกของร่างกายในการป้องกันการติดเชื้อราชนิดนี้ ตลอดจนช่วยให้มีการคิดค้นหาวิธีตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อ *P. marneffei* ที่รวดเร็วและถูกต้องมากยิ่งขึ้น

วัสดุและวิธีการ

1. การเตรียมซีรัม

1.1 ซีรัมคนปกติ

คนปกติที่มีสุขภาพสมบูรณ์จำนวน 103 ราย โดยทุกรายอาศัยอยู่ในจังหวัดเชียงใหม่เป็นเวลาไม่น้อยกว่า 3 ปีนับจากวันที่เจาะเก็บซีรัม นอกจากนี้ซีรัมทุกรายต้องให้ผลลบกับการตรวจหา Anti-HIV antibody ซึ่งตรวจด้วยวิธี ELISA (Vironostika HIV MIXT, Organon Teknika B.V., Boxtel, Holland) และ Particle-agglutination test (Serodia-HIV, Fujirebio Inc, Tokyo) เก็บซีรัมรายละ 1.5 มล. และรักษาไว้ที่ -20 °ซ จนกว่าจะทำการทดสอบ

1.2 ซีรัมผู้ป่วย

ซีรัมผู้ป่วยติดเชื้อ HIV ที่เป็น penicilliosis marneffei จำนวน 9 ราย โดย 5 ราย

ได้รับจากโรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่ และ 4 รายได้รับจากโรงพยาบาลเชียงรายประชานุเคราะห์ ผู้ป่วยทุกรายได้รับการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อHIV ด้วยวิธี ELISA (Vironostika HIV MIXT) และ particle-agglutination test (Serodia-HIV) และได้ตรวจการติดเชื้อ *P. marneffei* โดยการย้อมสเมียร์เลือด หรือ น้ำไขสันหลัง ด้วยสี Wright-Giemsa stain ควบคู่กับการเพาะเลี้ยงหา Mycelium- และ Yeast-form ของเชื้อจากสิ่งส่งตรวจ

2. การเตรียมแอนติเจนของเชื้อ *P. marneffei*

2.1 แอนติเจนในรูปที่ได้จากการแตกเชื้อ (Sonicated form)

เพาะเลี้ยงเชื้อรา *P. marneffei* สายพันธ์ 673H ซึ่งแยกได้จากเลือดผู้ป่วยติดเชื้อ HIV ที่เป็น Penicilliosis marneffei ใน Brain Heart Infusion (BHI) agar slant ทำการถ่ายเชื้อทุกๆ 3 วันจนกระทั่งเชื้อในรูป Mycelium form เปลี่ยนเป็นรูป Yeast form เติม Steriled 0.85% NaCl (Normal saline solution, NSS) 5 มล. ลงไปในแต่ละหลอดที่ใช้เพาะเชื้อ จากนั้นใช้ Loop ขูดเชื้อเบาๆ จนหลุดจากผิวหน้า Slant นำ Yeast cell suspension ที่ได้ไป Inoculate ลงใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 มล. ที่มี BHI broth บรรจุอยู่ 50 มล. แล้ว Incubate ใน Water bath shaker ที่ 37 °ซ โดยเขย่าตลอดเวลาด้วยความเร็ว 150 rpm เป็นเวลา 3 วัน แยกเก็บตัวเชื้อ (Yeast cell) และ Culture supernatant โดยนำไปปั่นที่ 1,500 g นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นปั่นล้างตัวเชื้อ ด้วยของ Steriled NSS 10 มล. ที่ความเร็ว 1500 g นาน 10 นาที จำนวน 3 ครั้ง ครั้งสุดท้าย ดูด NSS ทิ้งให้หมด แล้ว Resuspend yeast cell ด้วย Steriled NSS 5 มล. พร้อมทั้งนำไปแตกเชื้อด้วยเครื่อง Ultrasonicator 200 วัตต์ นาน 30 วินาที โดยทำซ้ำกัน 6 ครั้ง บน Ice-bath แล้วนำไปปั่นที่ 1,500 g นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เก็บส่วน Supernatant มาเจือจางด้วย Steriled NSS ในอัตราส่วน 1:1 จากนั้นจึงนำไป Dialyse ด้วย NSS 1 ลิตร ที่ 4 °ซ นาน 24 ชั่วโมง โดยเปลี่ยน NSS ทุกๆ 8 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำ Supernatant มาวัดหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry's method[12]

2.2 การเตรียม Antigen ในรูปที่เชื้อปล่อยออกมา (Secreted form)

นำ Culture supernatant ที่แยกได้จากการเลี้ยงเชื้อ *P. marneffei* มากรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No. 1 จากนั้นตกตะกอนโปรตีนใน Filtrated culture supernatant ด้วย 70% Ammonium sulfate[13] พร้อมทั้งปั่นเก็บตะกอน โปรตีนที่ความเร็ว 1,500 g เป็นเวลา 10 นาที ละลายตะกอนโปรตีนที่เตรียมได้ด้วย steriled NSS 10 มล. นำไป Dialyse และวัดหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry's method

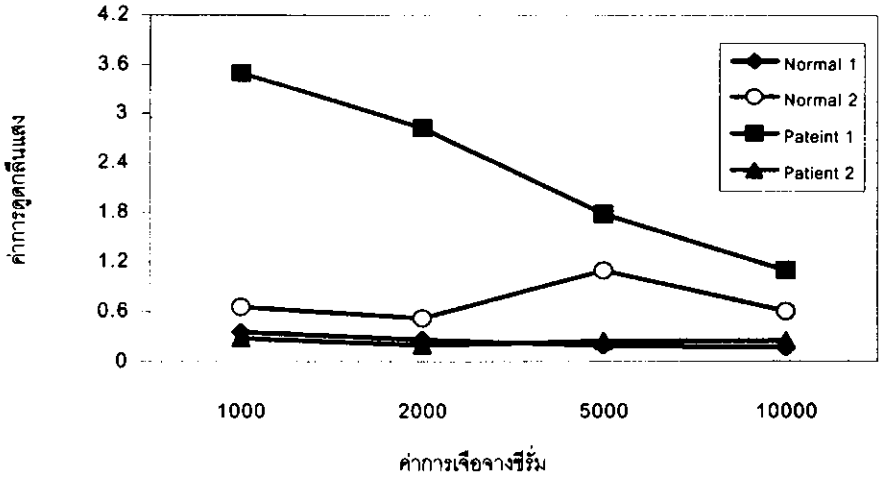
3. การตรวจหา Anti -*P. marneffei* antibodies โดยวิธี Indirect ELISA technique

เติม 100 µL ของซีรัมคนปกติหรือของผู้ป่วยติดเชื้อ HIV ที่เป็น Penicilliosis marneffei ที่ถูกเจือจางด้วย 0.05% PBS-Tween ในอัตราส่วน 1:1000 (ได้จากการทำ Titration curve) ลงใน 96-Well flat-bottomed microplate (Costar®, USA) ที่เคลือบด้วย 0.25 µg/mL Antigen ของเชื้อ *P. marneffei* ทั้งในรูป Sonicated หรือ Secreted form จากนั้น Incubate ที่ 37 °ซ นาน 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาจึงล้าง Plate ด้วย 0.05% PBS-Tween จำนวน 3 ครั้ง แล้วเติม 100 µL ของ Rabbit antihuman immunoglobulin conjugated peroxidase (Sigma, USA) ที่เจือจางด้วย 0.05% PBS-Tween ในอัตราส่วน 1:2,000 Incubate ที่ 37 °ซ นาน 1 ชั่วโมง ภายหลังจากล้าง Unbound conjugate ออกจนหมด จึงเติม 100 µL ของ OPD

(o-Phenylene diamine) substrate รอจนครบเวลา 30 นาทีจึงหยุดปฏิกริยาด้วย 2 N H_2SO_4 และวัดค่าการดูดกลืนแสง (A) ที่ 490 nm.

ผลการทดลอง

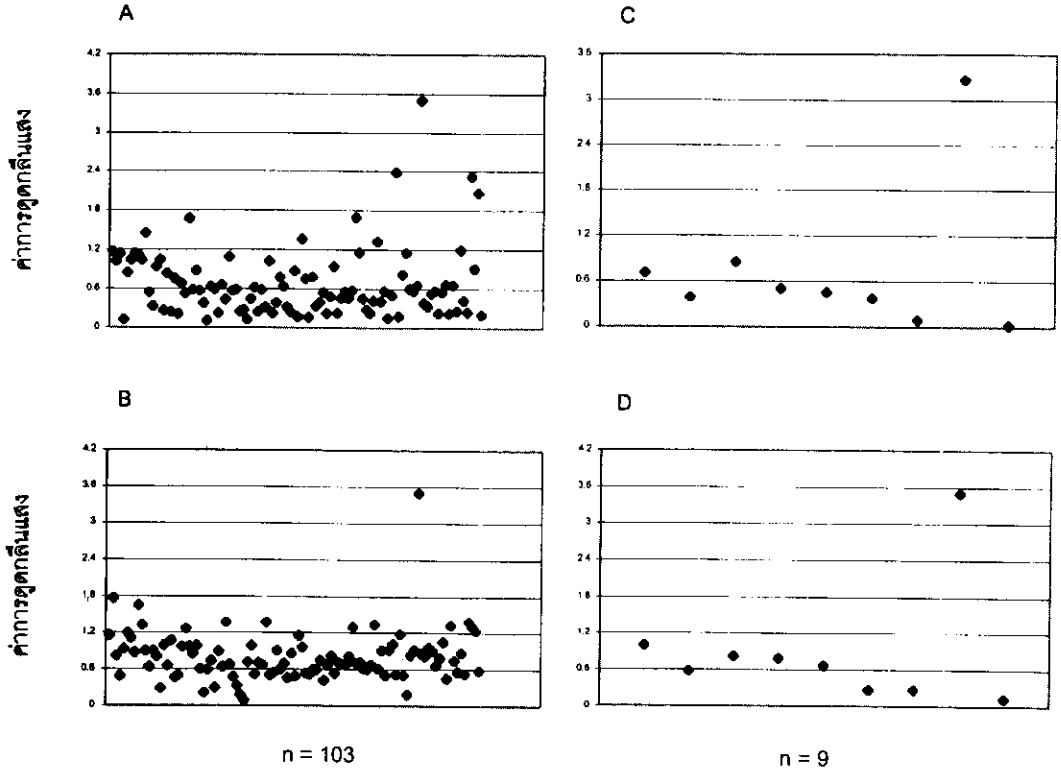
จากการทดสอบหา Dilution ที่เหมาะสมของซีรั่มคนปกติและผู้ป่วย Penicilliosis marneffei พบว่า Dilution ที่ 1:1000 เหมาะสมที่จะนำมาใช้ตลอดการทดลองนี้เพราะสามารถแยกความแรงของปฏิกิริยาระหว่างซีรัมคนปกติและผู้ป่วยได้อย่างชัดเจน (รูปที่ 1) ขณะเดียวกันที่ Dilution นี้ ซีรัมของทั้งคนปกติและของผู้ป่วยต่างให้ค่าการดูดกลืนแสงที่เกิดจาก non-specific binding ที่มีค่าต่ำโดยมีค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยเท่ากับ 0.42 (SD=0.018) และในการทดลองนี้ได้กำหนดค่า cut-off โดยการคำนวณจากค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยของ



รูปที่ 1 Dilution ของซีรัมคนปกติ และผู้ป่วยติดเชื้อ HIV ที่เป็น Penicilliosis marneffei ที่เหมาะสำหรับนำมาใช้ตลอดการทดลอง

Non-specific binding + 10SD ซึ่งจะมีค่าเท่ากับ 0.60 เมื่อใช้ซีรัม Dilution 1:1,000 มาทดสอบหาแอนติบอดีต่อแอนติเจนของเชื้อรา *P. marneffei* ทั้งในรูป Sonicated form และ Secreted form พบว่าในกลุ่มคนปกติจำนวน 103 ราย มี 62 ราย (60.19%), 19 ราย (18.45%) และ 22 ราย (21.36%) ที่ให้ปฏิกิริยากับแอนติเจนในรูป Sonicated form โดยมีการดูดกลืนแสง ≤ 0.6, 0.61-0.99 และ ≥ 1.0 ตามลำดับ (รูปที่ 2A) ขณะที่ซีรัมเหล่านี้ 30 ราย (29.13%), 52 ราย (50.49%) และ 21 ราย (20.39%) ให้ปฏิกิริยาต่อแอนติเจนในรูป Secreted form โดยมีค่าการดูดกลืนแสงที่ ≤ 0.6, 0.61-0.99 และ ≥ 1.0 ตามลำดับ (รูปที่ 2B) เมื่อพิจารณาค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาที่เกิดทั้งต่อแอนติเจนในรูป Sonicated form และ Secreted form พบว่าในซีรัมคนปกติทั้งหมด 103 ราย มี 51 ราย (49.51%) ที่ให้ค่าปฏิกิริยาการดูดกลืนแสงต่อแอนติเจนทั้งสองรูปที่อยู่ในช่วงเดียวกัน กล่าวคือมี 24 ราย (47.06%), 11 ราย (21.57%) และ 16 ราย (31.37%) ที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ ≤ 0.6, 0.61-0.99 และ ≥1.0 ตามลำดับ และเมื่อใช้ซีรัมผู้ป่วย Penicilliosis ที่ Dilution 1:1,000 มาทดสอบหาแอนติบอดีต่อแอนติเจนทั้งสองรูป ดังกล่าวพบว่าในจำนวนซีรัมผู้ป่วยทั้งหมด 9 ราย มี

6 ราย (66.67%), 2 ราย (22.22%) และ 1 ราย (11.11%) ที่ให้ปฏิกิริยากับแอนติเจนในรูป Sonicated form โดยมีค่าการดูดกลืนแสงที่ ≤ 0.6, 0.61-0.99 และ ≥ 1.0 ตามลำดับ (รูปที่ 2C) ขณะที่ทำการทดสอบกับแอนติเจนที่อยู่ในรูป Secreted form พบว่า 4 ราย (44.44%), 3 ราย (33.33%) และ 2 ราย (22.22%) ที่ให้ค่าการดูดกลืนแสง ≤ 0.6, 0.61-0.99 และ ≥ 1.0 ตามลำดับ (ดังแสดงในรูปที่ 2D) นอกจากนี้พบว่ามีซีรัมผู้ป่วยจำนวน 6 ราย (66.67%) เกิดปฏิกิริยาต่อแอนติเจนทั้งสองรูปโดยมีค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วงเดียวกัน กล่าวคือ 4 ราย (66.67%), 1 ราย (16.67%) และ 1 ราย (16.67%) ให้ค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง ≤ 0.6, 0.61-0.99 และ ≥ 1.0 ตามลำดับ



รูปที่ 2 ค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาระหว่างซีรัมคนปกติและผู้ป่วยติดเชื้อ HIV ที่เป็น penicilliosis marneffei ต่อแอนติเจนของเชื้อรา *P. marneffei* ในรูปที่เตรียมได้จากการแตกเชื้อ และรูปที่เชื้อปล่อยออกมา โดยรูป A: แสดงปฏิกิริยาระหว่างซีรัมคนปกติกับแอนติเจนที่อยู่ในรูปที่เตรียมได้จากการแตกเชื้อ B: แสดงปฏิกิริยาระหว่างซีรัมคนปกติ กับแอนติเจนที่อยู่ในรูปที่เชื้อปล่อยออกมา, C: แสดงปฏิกิริยาระหว่างซีรัมผู้ป่วยกับแอนติเจนที่อยู่ในรูปที่เตรียมได้จากการแตกเชื้อ, D: แสดงปฏิกิริยาระหว่างซีรัมผู้ป่วยกับแอนติเจนที่อยู่ในรูปที่เชื้อปล่อยออกมา

บทวิจารณ์

การใช้เทคนิค Indirect ELISA ตรวจหาแอนติบอดี ต่อแอนติเจนของเชื้อรา *P. marneffei* ทั้งในรูป Sonicated และ Secreted form เปรียบเทียบระหว่างซีรัมคนปกติที่อาศัยอยู่ในจังหวัดเชียงใหม่ กับซีรัมผู้ป่วยติดเชื้อ HIV ที่เป็น Penicilliosis marneffei จากผลการศึกษาพบว่าในจำนวนซีรัมคนปกติทั้งหมด 103 ราย มี 41ราย (39.81%) และ 73 ราย (70.88%) ที่มีแอนติบอดีต่อแอนติเจนที่อยู่ในรูป Sonicated และ Secreted form ตามลำดับ โดยให้ค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยามากกว่าค่า Cut-off (0.60) ส่วนซีรัมผู้ป่วยติดเชื้อ HIV ที่เป็น Penicilliosis marneffei 9 ราย พบ 3 ราย (33.33%) และ 5 ราย (55.55%) ที่มีแอนติบอดีต่อที่อยู่ในรูป Sonicated และ Secreted form ตามลำดับ จะเห็นว่าจำนวนคนปกติและผู้ป่วยที่มีแอนติบอดีต่อแอนติเจนทั้งสองรูปของเชื้อรา *P. marneffei* มีจำนวนไม่ต่างกันมากนัก ทั้งนี้อาจเป็นผลเนื่องมาจากจำนวนซีรัมผู้ป่วยที่นำมาทดสอบมีจำนวนน้อยรายจึงทำให้ข้อมูลที่ได้มีความแตกต่างที่ไม่ชัดเจน อย่างไรก็ตามพบว่าซีรัมรายเดียวกันไม่ว่าจะเป็นของคนปกติหรือของผู้ป่วย ต่างให้ปฏิกิริยากับแอนติเจนทั้งสองรูปในระดับที่ใกล้เคียงกันโดยให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ต่างกันไม่เกิน 0.5 แสดงให้เห็นว่าแอนติเจนทั้งสองรูปอาจเป็นชนิดเดียวกันหรือมีส่วนของ Antigenic determinant ที่คล้ายคลึงกัน แต่หากพิจารณาให้ละเอียดยิ่งขึ้นจะพบว่าจำนวน ซีรัมของทั้งคนปกติและผู้ป่วยต่างให้ปฏิกิริยากับแอนติเจนที่อยู่ในรูป Secreted form เป็นจำนวนที่มากกว่าแอนติเจนในรูป Sonicated form ดังนั้นการเป็น Antigenic determinant ของแอนติเจนในรูป Secreted form จึงน่าจะมีมากกว่าแอนติเจนที่อยู่ในรูป Sonicated form

การที่คนปกติมีแอนติบอดีต่อแอนติเจนของเชื้อรา *P. marneffei* แสดงให้เห็นว่าคนปกติเหล่านี้อาจเคยสัมผัสกับเชื้อรา *P. marneffei* มาก่อน และร่างกายมีการสร้างระบบภูมิคุ้มกันทั้งทาง HMI และ CMI ที่จดจำกับแอนติเจนของเชื้อดังนั้นจึงไม่แสดงอาการของโรค Penicilliosis marneffei ส่วนในผู้ป่วยติดเชื้อ HIV ระบบภูมิคุ้มกันทั้ง CMI และ HMI ที่จดจำกับแอนติเจนของเชื้อราชนิดนี้ถูกทำลายได้ด้วยเชื้อหรือผลิตภัณฑ์ของตัวเชื้อ HIV ดังนั้นเมื่อได้รับเชื้อ *P. marneffei* อีกครั้งจึงแสดงอาการของโรคขึ้นมาได้ การทดลองในครั้งนี้ให้ผลที่ขัดแย้งกับการทดลองของ Cao และคณะ[14] ที่พบว่าซีรัมของคนปกติที่ อาศัยอยู่ในประเทศฮ่องกงจำนวน 90 ราย ให้ผลลบกับการทดสอบหาแอนติบอดีต่อแอนติเจนของเชื้อรา *P. marneffei* ชนิด Purified Mp1 protein โดยมีค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาต่ำกว่าค่า Cut-off (0.5) ขณะที่ซีรัมของผู้ติดเชื้อ HIV และเป็นโรค Penicilliosis marneffei จำนวน 14 รายใน 17 ราย (82.35%) ให้ผลบวกกับแอนติเจนชนิดนี้ ขณะเดียวกันซีรัมผู้ป่วย Penicilliosis marneffei ที่ไม่ติดเชื้อ HIV ให้ผลบวกกับแอนติเจนชนิดนี้โดยให้ปฏิกริยาที่แรงกว่ากลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อ HIV และเป็นโรค Penicilliosis marneffei[14] จากผลการทดลองที่ไม่สอดคล้องนี้อาจเกิดขึ้นเนื่องมาจากซีรัมที่ใช้ตรวจได้จากกลุ่มประชากรที่อาศัยอยู่ในบริเวณที่ต่างกัน ดังนั้นโอกาสในการสัมผัสเชื้อรา *P. marneffei* จึงมีได้ไม่เท่ากัน นอกจากนี้แอนติเจนที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้เป็น Crude protein antigens ดังนั้นแอนติบอดีที่ตรวจได้อาจเป็นแอนติบอดีที่เกิดจากปฏิกิริยาข้ามกลุ่ม (Cross reaction) กับแอนติเจนของเชื้อราชนิดอื่นเช่น *Candida albicans, Cryptococcus neoformans, Histoplasma capsulatum* และ Aspergillus sp. ได้ เพราะ

จากการศึกษาของ Estrada และคณะพบว่า ผนังเซลล์ของเชื้อราทุกชนิดจะประกอบด้วย Polysaccharide เป็นส่วนใหญ่ และเชื้อที่อยู่ในกลุ่มใกล้เคียงกันมักมีส่วนประกอบบางอย่างคล้ายคลึงกัน สำหรับเชื้อ *P. marneffei* จะมีส่วนประกอบของผนังเซลล์เป็น สารจำพวก Galactomannan และมี Epitope บางส่วนที่คล้ายกับผนังเซลล์เชื้อ *A. fumigatus*[15] และจากการศึกษาของ Yuen ที่ได้ทำการตรวจหา แอนติบอดี ต่อเชื้อ *P. marneffei* ในซีรัมผู้ป่วย ติดเชื้อ HIV ที่เป็น Penicilliosis marneffei ด้วยวิธี Indirect immunofluorescent antibody test (IFAT) โดยใช้ Germinating conidia และ Yeast cell ของเชื้อ *P. marneffei* เป็นแอนติเจน พบว่าซีรัมผู้ป่วยจำนวน 8 รายใน 103 ราย (7.77%) มีแอนติบอดี ชนิด IgG ต่อแอนติเจนของเชื้อราชนิดนี้ใน Titer ที่สูงกว่า 160 ขณะซีรัมของคนปกติและผู้ป่วยโรค อื่นๆ (Tuberculosis, typhoid fever, melioidosis, disseminated cryptococcosis, candidaemia, intraabdominal sepsis, autoimmune disease และ lymphoreticular cancer) มี Titer ที่ 10-40[16] Vanittanakom และคณะ ได้ใช้ Crude extracellular protein ที่ปล่อยออกมาจากเชื้อรา *P. marneffei* ที่อยู่ในรูปยีสต์ มาตรวจหาแอนติบอดีในซีรัมผู้ป่วยติดเชื้อ HIV ที่เป็น Penicilliosis marneffei โดยวิธี Immunoblot assay พบว่า 45% ของซีรัมผู้ป่วยติดเชื้อ HIV ที่เป็น Penicilliosis marneffei มีแอนติบอดีชนิด IgG ที่ทำปฏิกิริยาได้แรงกับ โปรตีนแอนติเจนทั้งขนาด 54 และ 50 กิโลดัลตัน อย่างไรก็ตามซีรัมของคนปกติและของผู้ป่วยติดเชื้อ HIV ที่ไม่เป็น Penicilliosis marneffei บางรายสามารถเกิดปฏิกิริยาอย่างอ่อนกับโปรตีน แอนติเจนทั้งสองขนาดนี้[17] ถึงแม้ว่าแอนติบอดีที่ตรวจพบอาจเกิดจากปฏิกิริยาข้ามกลุ่ม แต่แอนติบอดีนี้อาจมีบทบาทที่จะช่วยทำลายเชื้อ *P. marneffei* ที่เข้าสู่ร่างกายได้ โดยจะทำหน้าที่เป็น Opsonin ซึ่งสามารถช่วยให้ Neutrophil และ Macrophage จับกินเชื้อได้ดียิ่งขึ้น เพราะจากการศึกษาของ Kudken พบว่า Neutrophil และ Macrophage มีบทบาทสำคัญในการทำลายเชื้อรา ชนิดนี้ โดยกลไกการทำลายเชื้อจะต้องมีการสัมผัสกันโดยตรงระหว่างตัวเชื้อกับ Neutrophil หรือ Macrophage[18-19] จากผลการทดลอง จะเห็นได้ว่าผู้ป่วยติดเชื้อ HIV ที่เป็น Penicilliosis marneffei ส่วนใหญ่จะมีแอนติบอดีที่ให้ปฏิกิริยาต่อแอนติเจนของเชื้อรา *P. marneffei* ทั้งในรูป Sonicated และ Secreted form ที่มีความแรงน้อยกว่าในกลุ่มคนปกติ ซึ่งแอนติบอดีที่อยู่ในระดับนี้อาจไม่สามารถทำลายเชื้อให้หมดไปจากร่างกายได้ ดังนั้นจึงแสดงอาการของโรค Penicilliosis marneffei ขึ้นมา จากผลการทดลองที่ได้ในครั้งจึงอาจมีส่วนช่วยให้มีความเข้าใจถึงกลไกของร่างกายในการป้องกันการติดเชื้อรา *P. marneffei* ได้เพิ่มขึ้น ตลอดจนช่วยให้มีการคิดค้นหาวิธีตรวจวินิจฉัยการดิดเชื้อ *P. marneffei* ที่ให้ผลรวดเร็วและมีความถูกต้องแม่นยำมากยิ่งขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์แพทย์หญิงประคอง วิทยาศัย คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ให้ความอนุเคราะห์ในด้านการเจาะเลือดเพื่อเก็บซีรัมผู้ป่วยติดเชื้อ HIV ที่เป็น Penicilliosis marneffei

ขอขอบคุณ คุณศิริชัย สิทธิประเสริฐ กลุ่มงานพยาธิวิทยาคลินิก โรงพยาบาลเชียงรายประชานุเคราะห์ ที่ให้ความช่วยเหลือด้านการจัดเก็บซีรัมผู้ป่วยติดเชื้อ HIV ที่เป็น Penicilliosis marneffei

ขอขอบคุณ ภาควิชาภูมิคุ้มกันวิทยาคลินิก

คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ได้อนุญาตให้ใช้เครื่อง ELISA Washer และ ELISA Reader

เอกสารอ้างอิง

1. Capponi M, Sureau P, Segretain G. Penicilliose de *Rhizomys sinensis*. Bull Soc Pathol Exot 1956; 49: 418-21.
2. Di Salvo AF, Fickling AM, Ajello L. Infection caused by *Penicillium marneffei*: description of first natural infection in man. Am J Clin Pathol 1973; 60: 259-63.
3. Pautler Kb, Pathye AA, Ajello L. Import penicilliosis marneffei in the United States: report of a second human infection. Sabouraudia. J Med Vet Mycol 1984; 29: 433-8.
4. Deng ZL, Yun M, Ajello L. Human penicilliosis marneffei and its relation to the bamboo rat *(Rhizomys pruinosus)*. J Med Vet Mycol 1986; 24: 383-9.
5. So SY, Chau PY, Jones BM, *et al.* A case of invasive pencilliosis in Hong Kong with immunologic evaluation. Am Rev Respir Dis 1985; 131: 662-5.
6. Supparatpinyo K, Chiewchanvit S, Hirunsri P, Uthammachai C, Nelson KE, Sirisanthana T. *Penicillium marneffei* infection in patients infected with human immunodeficiency virus. Clin Infect Dis 1992; 14: 871-4.
7. Vithayasai P, Vithayasai V. HIV infection in clinical practice. Bangkok: Support The Children Foundation, 1992: 1-7.
8. Supparatpinyo K, Khamwan C, Baosoung V, Nelson KE, Sirisanthana T. Disseminated *Penicillium marneffei* infection in Southeast Asia. Lancet 1994; 344: 110-3.
9. Chariyalertsak S, Sirisanthana T, Supparatpinyo K, Nelson KE. Seasonal variation of disseminated *Penicillium marneffei* infections in Northern Thailand. Clin Infect Dis 1996; 173: 1490-3.
10. Phillips P. *Penicillium marneffei* part of Southeast Asian AIDS. JAMA 1996; 276: 86-7.
11. Drouhet E. Penicilliosis due to *Penicillium marneffei:* a new emerging systemic mycosis in AIDS patients travelling or living in Southeast Asia. J Mycol Med 1993; 4: 195-224.
12. Pornprasert S. Cell mediated immune response to *Penicillium marneffei* antigen and mitogen in AIDS patients [Thesis] - Chiang Mai: Chiang Mai University, 1997.
13. Mekaprateep M. Immunoblot analysis of extracellular protiens secreted from mold and yeast forms of *Penicillium marneffei* [Thesis] - Chiang Mai: Chiang Mai University, 1995.
14. Cao L, Chen DL, Lee C, *et al.* Detection of specific antibodies mannoprotein for diagnosis of *Pennicillium marreffei* penicilliosis. J Clin Microb 1998; 36: 3028-31.
15. Estrada JA, Stynen D, van Cusse J, Pierard FC, Pierard GE. Immunohistochemical

identification of *Penicillium marneffei* by monoclonal antibody. Intern J Dermatol 1992; 31: 410-2

16. Yuen K, Wong SS, Tsang DN, Chan P. Serodiagnosis of *Penicillium marneffei* infection. Lancet 1994; 344: 444-5.
17. Vanittanakom N, Mekaprateep M, Sittisombut N, *et al.* Western immunoblot analysis of protein antigens of *Penicillium marneffei.* J Med Vet Mycol 1997; 35: 123-31.
18. Kudeken N, Kawakami K, Saito A. Different susceptibilities of yeasts and conidia of *Penicillium marneffei* to nitric oxide (NO)-mediated fungicidal activity of murine macrophages. Clin Exp Immunol 1998; 112: 287-93.
19. Kudeken N , Kawakami K , Saito A. Mechanisms of the *in vitro* fungicidal effects of human neutrophil against *Penicillium marneffei* induced by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF). Clin Exp Immunol 2000;119: 472-8.

นิพนธ์ต้นฉบับ

การกดการแบ่งตัวของลิมโฟซัยท์คนปกติโดยพลาสมาของผู้ป่วยเอดส์ที่ติดเชื้อเพนนิซิเลียม มาเนฟฟิไอ*

ธิดาดาว แหล่งอุโมงค์**, สาคร พรประเสริฐ**

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์: เพื่อศึกษาอิทธิพลของพลาสมาของผู้ป่วยเอดส์ที่ติดเชื้อรา เพนนิซิเลียม มาเนฟฟิไอ ต่อการแบ่งเซลล์ของลิมโฟซัยท์ ของคนปกติที่ถูกกระตุ้นด้วย ฟัยโตฮีแมกกลูตินิน

วิธีการ: นำโมโนนิวเคลียร์เซลล์ ของคนปกติมากระตุ้นด้วย ฟัยโตฮีแมกกลูตินินที่ความเข้มข้นซับออพติมัม (0.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ในสภาวะที่มีพลาสมาของผู้ป่วยเอดส์ที่ติดเชื้อรา เพนนิซิเลียม มาเนฟฟิไอ และวัดการแบ่งเซลล์ด้วยวิธี ลิมโฟซัยท์ทรานสฟอร์เมชันเทคนิค คำนวณค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการแบ่งเซลล์โดยเทียบกับการกระตุ้นในสภาวะที่มีพลาสมาของตนเองและเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การยับยั้งที่ได้จากการกระตุ้นในสภาวะที่มีพลาสมาของคนปกติรายอื่น (โฮโมโลกัส-พลาสมา) หรือพลาสมาของผู้ป่วยติดเชื้อเอชไอวี ระยะไม่แสดงอาการ หรือพลาสมาของผู้ป่วยเอดส์ที่ไม่ติดเชื้อรา เพนนิซิเลียม มาเนฟฟิไอ

ผลการทดลอง: พลาสมาผู้ป่วยเอดส์ที่ติดเชื้อรา เพนนิซิเลียม มาเนฟฟิไอ สามารถกดการแบ่งเซลล์ของลิมโฟซัยท์คนปกติได้มากกว่า โฮโมโลกัส-พลาสมา และพลาสมาของผู้ป่วยติดเชื้อเอชไอวีระยะไม่แสดงอาการได้อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) และให้ค่าเปอร์เซ็นต์เฉลี่ยของการยับยั้งการแบ่งเซลล์ที่สูงกว่าการกระตุ้นในสภาวะที่มีพลาสมาของผู้ป่วยเอดส์ ที่ไม่ติดเชื้อราชนิดนี้

สรุป: พลาสมาผู้ป่วยเอดส์ที่ติดเชื้อรา เพนนิซิเลียม มาเนฟฟิไอ มีสารที่สามารถกดการแบ่งเซลล์ของลิมโฟซัยท์ได้ โดยสารนี้อาจเป็นตัวเชื้อหรือผลิตภัณฑ์ของเชื้อ เพนนิซิเลียม มาเนฟฟิไอ อย่างใดอย่างหนึ่งหรือร่วมกันทั้งสองอย่าง ซึ่งจะต้องทำการศึกษาต่อไป **วารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่ 2543; 33: 182-9.**

คำหัส : พลาสมาผู้ป่วยเอดส์, เพนนิซิเลียม มาเนฟฟิไอ

---

* เป็นส่วนหนึ่งของภาคนิพนธ์ วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคนิคการแพทย์) มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ปีการศึกษา 2542-2543

** ภาควิชาจุลทรรศนศาสตร์คลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Abstract: Inhibitory Effect of Plasma from *Penicillium marneffei* Infected AIDS Patient on Proliferation of Normal Lymphocytes*

Lang-umong T, Pornprasert S****

Objective: To study the effect of plasma from *P. marneffei* infected AIDS patient on proliferation of normal lymphocytes stimulated with phytohemagglutinin.

Methods: Peripheral blood mononuclear cells from healthy donors were stimulated with suboptimum dose of phytohemagglutinin in the presence of autologous plasma, homologous plasma, plasma from *P. marneffei* infected AIDS patient, plasma from AIDS patient without *P. marneffei* infection or plasma from asymptomatic HIV infected persons. Cell proliferation was measured by lymphocyte transformation technique. The percentage of proliferative inhibition was calculated by comparison with cell proliferation in the presence of autologous plasma.

Results: Plasma from *P. marneffei* infected AIDS patient has obviously inhibitory effect, $p < 0.05$, when compared to homologous plasma and plasma from asymptomatic HIV infected person. The mean of suppression percentage in plasma of *P. marneffei* infected AIDS patients was higher than in plasma of *P. marneffei* non-infected AIDS patients.

Conclusion: Inhibition of lymphocyte proliferation may be due to *P. marneffei* or it's products in plasma from *P. marneffei* infected AIDS patient or both. Further studies are needed to identify the inhibitory factors. **Bull Chiang Mai Assoc Med Sci 2000; 33: 182-9.**

Key words: AIDS patient's plasma, *Penicillium marneffei*

---

* Term paper in partial fulfillment of the requirements for the degree of Bachelor of Science in Medical Technology (1999-2000)

** Department of Microscopy, Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University

บทนำ

เชื้อรา *Penicillium marneffei* เป็นเชื้อราที่มีรูปร่าง 2 แบบ (Dimorphic fungus) ที่ก่อโรค Penicilliosis ได้ทั้งในคนและสัตว์ พบเชื้อครั้งแรกเมื่อปี ค.ศ. 1956 โดยแยกเชื้อได้จากตับของอ้น (Bamboo rat: *Rhizomys sinensis*) ที่จับได้จากประเทศเวียตนาม[1]

ก่อนการแพร่ระบาดของเชื้อเอชไอวีพบว่ามีรายงานผู้ป่วยที่เป็นโรค Penicilliosis marneffei ทั่วโลกเพียง 44 ราย ในจำนวนนี้ เป็นผู้ป่วยคนไทย 13 ราย[2] ภายหลังจากมีการระบาดของเชื้อเอชไอวี พบว่าจำนวนผู้ป่วยเอดส์ที่ติดเชื้อ *P. marneffei* เพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว โดยเฉพาะอย่างยิ่งทางภาคเหนือของประเทศไทย การติดเชื้อราฉวยโอกาสชนิดนี้จะพบได้มากเป็นอันดับสามรองจากวัณโรคและโรคติดเชื้อรา Cryptococcosis[3] ในผู้ติดเชื้อเอชไอวี เมื่อมีการดำเนินโรคไปเป็นเอดส์พบว่าจำนวน T-lymphocytes จะลดลงเป็นจำนวนมาก ขณะเดียวกับที่มีการสูญเสียการตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วย Phytohemagglutinin, Pokeweed mitogen และ Recall antigens (*C. albicans* antigens และ Cytomegalovirus antigens)[4-5] Kudeken พบว่าระบบภูมิคุ้มกันชนิดเซลล์ (Cell-mediated immunity) มีบทบาทสำคัญในการป้องกันการติดเชื้อ *P. marneffei*[6] และจากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า การตอบสนองของ PBMCs ของผู้ป่วยติดเชื้อ เอชไอวี ระยะไม่แสดงอาการ และผู้ป่วยเอดส์ที่ติดและไม่ติดเชื้อ *P. marneffei* ต่อการกระตุ้นด้วย แอนติเจนที่ได้จากการแตกเชื้อรา *P. marneffei* ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับการตอบสนองของ PBMCs คนปกติ[7] จากประวัติผู้ป่วยเอดส์ที่ติดเชื้อ *P. marneffei* พบว่าส่วนใหญ่จะอาศัยอยู่ในเมืองและไม่เคยสัมผัสหรือบริโภคเนื้ออ้นมาก่อน ดังนั้นจึงสันนิษฐานว่าผู้ป่วยน่าจะได้รับเชื้อโดยการหายใจเอาสปอร์ของเชื้อที่มีอยู่ในอากาศเข้าไป[8] ขณะเดียวกันคนปกติทั่วไปอาจเคยได้รับเชื้อราชนิดนี้ผ่านทางการหายใจเช่นกันแต่ไม่แสดงอาการเพราะร่างกายมีการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันต่อเชื้อทั้งทาง HMI และ CMI ส่วนในผู้ป่วยติดเชื้อเอชไอวี ระดับภูมิคุ้มกันของร่างกายจะถูกทำลายด้วยตัวเชื้อและผลิตภัณฑ์ของเชื้อเอชไอวี หรือแม้กระทั่งผลิตภัณฑ์ที่เชื้อ *P. marneffei* ปล่อยออกมา โดยเฉพาะการทำลาย Memory $CD4^+$ T cells ที่จดจำกับแอนติเจนของเชื้อราชนิดนี้ ดังนั้นจึงมีโอกาสแสดงอาการของโรค Penicilliosis ได้ง่ายกว่าคนปกติ การศึกษาครั้งนี้จะได้ทำการทดสอบถึงอิทธิพลของพลาสมาผู้ป่วยเอดส์ ที่ติดเชื้อ *P. marneffei* ในการกดการแบ่งเซลล์ของ Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) คนปกติที่ถูกกระตุ้นด้วย Phytohemagglutinin (PHA) โดยเปรียบเทียบกับ พลาสมาผู้ป่วยเอดส์ที่ไม่ติดเชื้อ *P. marneffei* พลาสมาผู้ป่วยติดเชื้อเอชไอวีระยะไม่แสดงอาการ และพลาสมาคนปกติ (โฮโมโลกัส-พลาสมา)

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

1. การเตรียมพลาสมา

ทำการเก็บเลือดจากหลอดเลือดดำจำนวน 10 มล. โดยใช้ Heparin เป็นสารกันเลือดแข็ง จากคนปกติที่มีสุขภาพดีจำนวน 15 ราย (ผู้ชาย 5 ราย ผู้หญิง 10 ราย) และจากผู้ป่วยติดเชื้อเอชไอวี แบ่งเป็นกลุ่มที่ไม่แสดงอาการจำนวน 5 ราย กลุ่มผู้ป่วยเอดส์ที่ติดเชื้อรา *P. marneffei* จำนวน 5 ราย และกลุ่มผู้ป่วยเอดส์ที่ไม่ติดเชื้อรา *P. marneffei* จำนวน 5 ราย (ผู้ป่วยเหล่านี้เป็นโรคติดเชื้อฉวยโอกาสชนิด *Pneumocystis carinii* จำนวน 2 ราย *Mycobacterium tuberculosis* จำนวน 1 ราย Cytomegalovirus จำนวน 1 ราย

และ *Cryptococcus neoformans* จำนวน 1 ราย) โดยแต่ละกลุ่มเป็นเพศชาย 3 ราย และเพศหญิง 2 ราย ผู้ป่วยทั้งหมดมารับการตรวจรักษาที่โรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่ และได้รับการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อเอชไอวีด้วยวิธี Enzyme-linked immunosorbent assay (Vironostika HIV MIXT, Organon Teknika BV, Boxtel, Holland) และ Gelatin particle agglutination test (Serodia-HIV, Fujirebi Inc, Tokyo) สำหรับการติดเชื้อ *P. marneffei* ตรวจโดยวิธีเพาะเลี้ยงหาเชื้อราจากสิ่งส่งตรวจพร้อมทั้งดูลักษณะ Yeast cell โดยการย้อมสเมียร์เลือดหรือไขกระดูกด้วยสี Wright's stain และย้อม Tissue section ด้วย Grocott-Gomori methanamine-silver nitrate (GGMS) หรือ Periodic Acid Schiff (PAS) นำ Heparinized blood ที่เตรียมได้แต่ละราย มาปั่นที่ความเร็ว 400 g นาน 5 นาที จากนั้นดูดเก็บพลาสมาใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 12 x 75 มม. แล้วเก็บที่ -20 °ซ ก่อนทำการทดลองนำพลาสมาที่เตรียมได้มาทำลายคอมพลีเมนท์โดยนำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 56 °ซ นาน 30 นาที

2. ทดสอบอิทธิพลของพลาสมาผู้ป่วยต่อการแบ่งเซลล์ลิมโฟซัยท์

เตรียม 1.5 x 10^6 cells/mL ของ Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) จากคนปกติที่มีสุขภาพดี โดยการปั่นแยกด้วยสารละลาย Ficoll-Hypaque ที่ความเร็ว 400 g เป็นเวลานาน 30 นาที แล้วนำมาเลี้ยงใน Flat plate 96 หลุม พร้อมทั้งกระตุ้นด้วย PHA (Seromed® Berlin) ที่ความเข้มข้นซับออพติมัม (0.5 µg/mL) ในสภาวะที่มี 10 เปอร์เซ็นต์ของ Fetal calf serum (FCS), Autologous plasma, Homologous plasma และพลาสมาผู้ป่วยในแต่ละกลุ่ม เลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 °ซ 5% CO_2 เป็นเวลา 3 วัน ก่อนเก็บเซลล์ 18 ชั่วโมงจะเติม [^{3}H]-thymidine (5.0 Ci/mmoL; Amersham) ความเข้มข้น 0.2 µCi/well เมื่อครบกำหนด 3 วันจะเก็บเซลล์ด้วยเครื่อง Cell Harvester (TOMTEC) แล้วทิ้ง Glass filter ให้แห้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาประมาณ 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวัดปริมาณสารรังสีด้วยเครื่อง Liquid scintillation counter (LKB, WALLAC)

3. การเปรียบเทียบค่าทางสถิติ

คำนวณค่าเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการแบ่งเซลล์ (% Inhibition) ของ FCS, Homologous plasma และพลาสมาผู้ป่วยในแต่ละกลุ่มเทียบกับการกระตุ้นในสภาวะที่มี Autologous plasma โดยใช้สูตรคือ

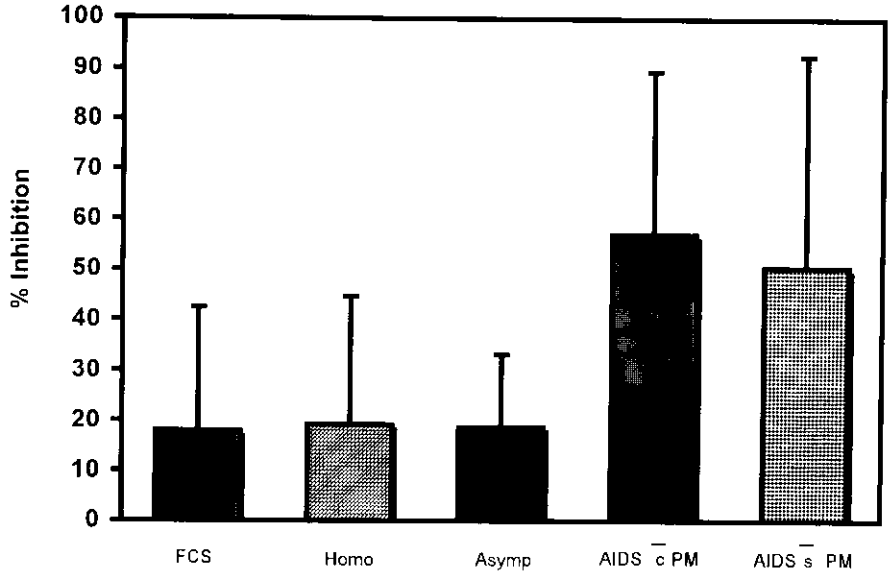
$$\% \text{ Inhibition} = \frac{(\Delta \text{ cpm ในสภาวะ Autologous plasma} - \Delta \text{ cpm ในสภาวะต่างๆ}) \times 100}{\Delta \text{ cpm ในสภาวะ Autologous plasma}}$$

การเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการแบ่งเซลล์ของการกระตุ้นในแต่ละสภาวะใช้ Student t-test

ผลการทดลอง

จากการทดลองกระตุ้น PBMCs คนปกติด้วย PHA ในสภาวะต่างๆ พบว่าให้ค่าเปอร์เซ็นต์การ

ยับยั้ง การแบ่งเซลล์ที่ต่างกันคือ ในสภาวะที่มี FCS จะให้ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเฉลี่ยเท่ากับ 17.77 (Mean ± SD = 17.77 ± 24.60) และ ในสภาวะที่มี Homologous plasma เท่ากับ 19.24 (Mean ± SD = 19.24 ± 25.30) ส่วนในสภาวะที่มีพลาสมาผู้ป่วยติดเชื้อเอชไอวีระยะไม่แสดงอาการ พลาสมาผู้ป่วยเอดส์ที่ติดเชื้อรา *P. marneffei* และพลาสมาผู้ป่วยเอดส์ที่ไม่ติดเชื้อรา *P. marneffei* จะให้ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเฉลี่ยเท่ากับ 18.62 (Mean ± SD = 18.62 ± 14.51), 57.02 (Mean ± SD = 57.02 ± 32.50) และ 50.42 (Mean ± SD = 50.42 ± 42.13) ตามลำดับ (รูปที่ 1) จะเห็นได้ว่าพลาสมาผู้ป่วยเอดส์ที่ติดเชื้อ *P. marneffei* ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการแบ่งเซลล์เฉลี่ยสูงกว่า



รูปที่ 1: เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการแบ่งตัวของ PBMCs คนปกติที่กระตุ้นด้วย PHA ความเข้มข้น 0.5 µg/mL ในสภาวะที่มี FCS, Homologous plasma (Homo), Asymptomatic HIV infected patient's plasma (Asymp), AIDS with (AIDS $\bar{c}$ PM) and without (AIDS $\bar{s}$ PM) *P. marneffei* infected patient's plasma เทียบกับการกระตุ้นในสภาวะที่มี Autologous plasma

พลาสมาผู้ป่วยเอดส์ที่ไม่ติดเชื้อราชนิดนี้ นอกจากนี้ยังให้ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการแบ่งเซลล์เฉลี่ยสูงกว่าการกระตุ้นในสภาวะที่มี FCS, Homologous plasma และพลาสมาผู้ป่วยติดเชื้อเอชไอวีระยะไม่แสดงอาการ อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) หากกำหนดให้ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งที่มากกว่า 50% เป็นที่ยอมรับว่ามีการยับยั้งการแบ่งเซลล์จริง จะพบว่าไม่มีพลาสมาผู้ป่วยติดเชื้อเอชไอวีระยะไม่แสดงอาการรายใดที่ให้ผลการยับยั้งการแบ่งเซลล์ขณะที่พลาสมาผู้ป่วยเอดส์ที่ติด และไม่ติดเชื้อรา *P. marneffei* จำนวน 4 ใน 5 ราย และ 2 ใน 5 ราย ตามลำดับให้ผลการยับยั้งการแบ่งเซลล์ที่มากกว่า 50% (ตารางที่ 1)

วิจารณ์ผล

จากการทดลองในครั้งนี้จะเห็นว่าพลาสมาจากผู้ป่วยเอดส์ที่ติดเชื้อ *P. marneffei* มีความสามารถในการกดการแบ่งเซลล์ได้สูงกว่าพลาสมากลุ่มอื่นๆ และ FCS ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากตัวเชื้อและ/หรือผลิตภัณฑ์ของเชื้อ *P. marneffei* ซึ่งผลที่ได้

ตารางที่ 1: เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการแบ่งเซลล์ PBMCs คนปกติที่ถูกกระตุ้นด้วย PHA ความเข้มข้น 0.5 µg/mL ในสภาวะที่มี FCS, Homologous plasma, Asymptomatic HIV infected patient's plasma, AIDS with and without *P. marneffei* infected patient's plasma โดยเทียบกับการกระตุ้นในสภาวะที่มี Autologous plasma

No. of donor	% Inhibition				
	FCS	Homologous	Asymp	AIDS with PM	AIDS without PM
1	0	79.6	-	67.0	-
2	0	0	0	0	-
3	0	0	-	-	-
4	21.5	21.4	-	-	90.5*
5	0	31.5	-	-	19.1
6	0	0	-	-	46.5
7	76.9	31.4	-	63.4*	-
8	55.4	0	10.6	-	-
9	30.2	0	-	-	95.2*
10	38.8	0.4	25.2	-	-
11	35.8	51.7	-	79.3	-
12	0	0	-	-	0
13	0	0	19.0	-	-
14	0	22.1	-	75.4	-
15	7.9	50.5	38.3	-	-
Mean	17.77	19.24	18.62	57.02	50.42
SD	24.60	25.30	14.51	32.50	42.13
n	15	15	5	5	5

* พลาสมาผู้ป่วยที่ให้ค่า % Inhibition > 50%

สอดคล้องกับรายงานก่อนหน้านี้ โดยพบว่าผู้ป่วยเอดส์ที่ติดเชื้อ *C. neoformans* หรือ *C. albicans* จะมีปริมาณของ Mannan หรือ Glucurono-xylomannan ซึ่งเป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่ของผนังเซลล์เชื้อราที่อยู่ในรูปยีสต์ในกระแสโลหิตผู้ป่วยเป็นปริมาณสูงมากและสารเหล่านี้สามารถกดการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันทั้งด้าน CMI และ HMI พร้อมกันนี้ยังสามารถกระตุ้นให้ Ts cell ของผู้ป่วยทำงานมากขึ้น อีกทั้งซีรัมของผู้ป่วยยังสามารถกดการทำงานของ Th และ B cells ของคนปกติได้ และระดับความรุนแรงของการกดจะลดลงสัมพันธ์กับปริมาณการลดลงของ Mannan หรือ

Glucuronoxylomannan ที่มีในซีรัมผู้ป่วยภายหลังจากได้รับการรักษาด้วย Kotoconazole[9,10] เชื้อรา *P. marneffei* เมื่ออยู่ในร่างกายจะอยู่ในรูปยีสต์เช่นเดียวกับ *C. neoformans* และ *C. albicans* ดังนั้นเชื้ออาจผลิต Mannan และ/หรือ Glucurono-xylomannan ซึ่งมีคุณสมบัติในการกดระบบภูมิคุ้มกันชนิดเซลล์ ได้เช่นกัน อย่างไรก็ตามจากการทดลองนี้พบว่าพลาสมาผู้ป่วยเอดส์ที่ติดเชื้อ *C. neoformans* ไม่มีคุณสมบัติกดการแบ่งเซลล์ PBMCs ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากได้เจาะเก็บพลาสมาของผู้ป่วยภายหลังจากที่ได้รับการรักษามาเป็นเวลานาน นอกจากนี้จำนวนพลาสมาที่ใช้ทดสอบมีเพียง 1 ราย ซึ่งทำให้ผลการทดลองที่ได้ไม่ชัดเจนเท่าที่ควร บทบาทในการกดการแบ่งเซลล์ PBMCs ของพลาสมาผู้ป่วยเอดส์ที่ติดเชื้อ *P. marneffei* อาจเป็นผลมาจาก Metabolite ของเชื้อ P. marneffei ได้ เพราะ Gammon และคณะพบว่า Metabolite ของเชื้อรา *P. glabrum* สามารถยับยั้งไม่ให้ $CD4^+$ T cell แบ่งตัวหลังจากถูกกระตุ้นด้วย Tetanus toxoid antigen[11] อย่างไรก็ตามจากการทดลองนี้ยังพบว่ามีพลาสมาผู้ป่วยเอดส์ที่ไม่ติดเชื้อรา *P. marneffei* จำนวน 2 ใน 5 ราย (40%) สามารถยับยั้งการแบ่งเซลล์ของ PBMCs คนปกติได้มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ จากประวัติผู้ป่วยเอดส์ทั้งสองรายนี้พบว่ามี 1 รายที่ติดเชื้อฉวยโอกาสชนิด *P. carinii* และอีก 1 รายติดเชื้อ Cytomegalovirus ดังนั้นจึงสันนิษฐานว่าสารที่แสดงคุณสมบัติในการกดการแบ่งเซลล์อาจเป็นผลิตภัณฑ์ที่เชื้อเอชไอวีสร้างขึ้นมา เนื่องจากมีรายงานก่อนหน้านี้พบว่า ทั้ง gp120 และ p29 ที่สร้างจาก Adherent cell ที่ติดเชื้อเอชไอวี สามารถกดการสร้าง IL-2 และกดการแบ่งเซลล์ของ T lymphocyte คนปกติเมื่อกระตุ้นด้วย PHA ได้[12,13] นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า Nef protein ที่สังเคราะห์โดยเชื้อเอชไอวีสามารถยับยั้ง $CD4^+$ T cell ที่ถูกกระตุ้นด้วย PHA ไม่ให้สร้าง IL-2 ได้[14] จากการวิเคราะห์ถึงสารที่มีคุณสมบัติในการยับยั้ง Lymphocyte คนปกติไม่ให้สร้าง IL-2 ที่มีอยู่ในซีรัมผู้ป่วยติดเอดส์ พบว่าสารชนิดนี้ไม่ใช่ Interferon, Cortisol, Immune complex และ Free immunoglobulin G หรือ M เพราะคุณสมบัติในการกดนี้ยังคงเดิมไม่ว่าซีรัมจะอยู่ในสภาวะเป็นกรดหรือด่าง นอกจากนี้การอุ่นที่อุณหภูมิ 60 °ซ หรือการ แช่แข็งและละลายหลายๆ ครั้งไม่อาจทำให้คุณสมบัติในการกดลดลงได้[15] สำหรับสารต่างๆ ที่อยู่ในพลาสมาของผู้ป่วยเอดส์ที่ติดเชื้อ *P. marneffei* ซึ่งมีคุณสมบัติในการกดการแบ่งเซลล์ของ PBMCs ที่ถูกกระตุ้นด้วย PHA นั้น หากต้องการทราบว่าเป็นสารชนิดใด ต้องทำการแยกและศึกษาต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. Capponi M, Sureau P, Segretain G. Penicilliose de *Rhizomys sinensis*. Bull Soc Pathol Exot 1956; 49: 418-21.
2. Drouhet E. Penicilliosis due to *Pencillium marneffei*: a new emerging systemic mycosis in AIDS patients travelling or living in Southeast Asia. J Mycol Med 1993; 4: 195-224.
3. Vithayasai P, Vithayasai V. Clinical manifestations of 174 AIDS cases in Maharaj Nakorn Chiang Mai Hospital. J Dermatol 1993; 20: 389-93.
4. Rosenberg ZF, Fauci AS. The immunopathogenesis of HIV infection. Adv Immunol 1989; 47: 377-431.
5. Hofmann B, Lindhardt BO, Gerstoft J, *et al.* Lymphocyte transformation reponse

to pokeweed mitogen as a predictive marker for development of AIDS and AIDS related symptoms in homosexual men with HIV antibodies. Br Med J Clin Res Ed. 1987; 295: 293-6.

6. Kudeken N, Kawakami K, Kusano N, Saito A. Cell-mediated immunity in host resistance against infection causes by *Penicillium marneffei*. J Med Vet Mycol. 1996; 34: 371-8.
7. Pornprasert S. Cell mediated immune response to *Penicillium marneffei* antigen and mitogen in AIDS patients. [Thesis]-Chiang Mai: Chiang Mai University, 1997. Deng ZL, Yun M, Ajello L. Human penicilliosis marneffei and its relation to the bamboo rat *(Rhizomys pruinosus)*. J Med Vet Mycol 1986; 24:383-9.
8. Drouhet E, Dupont B. Laboratory and clinical assessment of ketoconazole in deep-seated mycoses. Am J Med 1983; 74:30-47.
9. Durandy A, Fishher A, Le Deist F, Drouhet E, Griscelli C. Mannan-specific and mannan-induced T-cell supressive activity in patient with chronic mucocutaneous candidiasis. J Clin Immunol 1987; 7: 400-9.
10. Gammon G, Chandler G, Depledge P, Elcock C. A fungal metabolite which inhibits the interaction of CD4 with major histocompatibility complex-encoded class II molecules. Eur J Immunol 1994; 24: 991-8.
12. Mann DL, Lasane F, Popovic M, *et al.* HTLV-III large envelope protein (gp120) suppresses PHA-induced lymphocyte blastogenesis. J Immunol 1987; 138: 2640-4.
13 Ammar A, Sahraoui Y, Tsapis A, *et al.* Human immunodeficiency virus-infected adherent cell-derived inhibitory factor (p29) inhibits normal T cell proliferation through decreased expression of high affinity interleukin-2 receptors and production of interleukin-2. J Clin Invest 1992; 90: 8-14.
14. Collete Y, Chang HL, Cerdan C, *et al.* Specific Th1 cytokine down-regulation associated with primary clinically derived human immunodeficiency virus type 1 Nef gene-induced expression. J Immunol 1996; 156: 360-70.
15. Siegel JP, Djen JY, Stocks NI, *et al.* Sera from patients with the acquired immunodeficiency syndrome inhibit production of interleukin-2 by normal lymphocytes. J Clin Invest 1985; 75: 1957-64.

บทความทั่วไป

การดำเนินงานจัดทำห้องปฏิบัติการสะอาด
Clean Laboratory Set Up

สุชาดา ไชยสวัสดิ์*

สภาวะการณ์ของโลกยุคปัจจุบันได้มีความตื่นตัว โดยให้ความสนใจความสำคัญของสิ่งแวดล้อมที่มีผลกระทบต่อมนุษย์และสิ่งมีชีวิต ประกอบกับสภาวะเศรษฐกิจถดถอย การเพิ่มคุณภาพและประสิทธิภาพของหน่วยงานจึงมีความสำคัญอย่างมากโดยเน้นถึงการใช้ทรัพยากรอย่างคุ้มค่า การลดต้นทุนและที่สำคัญที่สุดคือการลดมลพิษทุกกระบวนการโดยรักษาคุณภาพของงาน รวมถึงคุณภาพชีวิตของบุคลากรที่ปฏิบัติงานในหน่วยงานด้วย ห้องปฏิบัติการวิเคราะห์เป็นหน่วยงานหนึ่ง ซึ่งต้องการการเพิ่มคุณภาพและประสิทธิภาพ และต้องการลดมลพิษ โดยเหตุที่ห้องปฏิบัติการวิเคราะห์เป็นแหล่งกำเนิดของเสียซึ่งอาจก่อให้เกิดอันตรายต่างๆ อันจะมีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมและชุมชน จึงควรมีการจัดการที่ถูกต้องและเหมาะสม การดำเนินงานจัดทำห้องปฏิบัติการสะอาด (Clean laboratory) เป็นแนวทางหนึ่งที่นำมาใช้บริหารจัดการเพื่อป้องกันมลพิษ (Pollution prevention) โดยเฉพาะอันตรายต่อสิ่งแวดล้อมทั้งนี้เพื่อปลูกจิตสำนึกให้กับบุคลากรทุกระดับว่าการป้องกันอันตรายต่อสิ่งแวดล้อมเป็นหน้าที่รับผิดชอบของทุกคน นอกจากนั้นแล้ว การดำเนินการจัดทำห้องปฏิบัติการสะอาด ยังเป็นการเพิ่มคุณภาพและประสิทธิภาพของห้องปฏิบัติการโดยรวมได้อีกทางหนึ่ง

ห้องปฏิบัติการสะอาด

ห้องปฏิบัติการสะอาด หมายถึงห้องปฏิบัติการที่ใช้เทคโนโลยีสะอาด (Clean technology) เข้ามาบริหารจัดการเพื่อเพิ่มคุณภาพและประสิทธิภาพในการวิเคราะห์และบริการ โดยใช้เทคนิคการจัดการสิ่งแวดล้อมที่ดี ด้วยการป้องกันและควบคุมการเกิดมลพิษ ลดปริมาณของเสียตั้งแต่การลดแหล่งกำเนิดที่ทำให้เกิดของเสีย เป็นการลดอันตรายต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อม ยกระดับมาตรฐานสิ่งแวดล้อมให้ดีขึ้นและทำให้เกิดการพัฒนาที่ยั่งยืนต่อไป

การบริหารจัดการ/จัดระบบห้องปฏิบัติการ

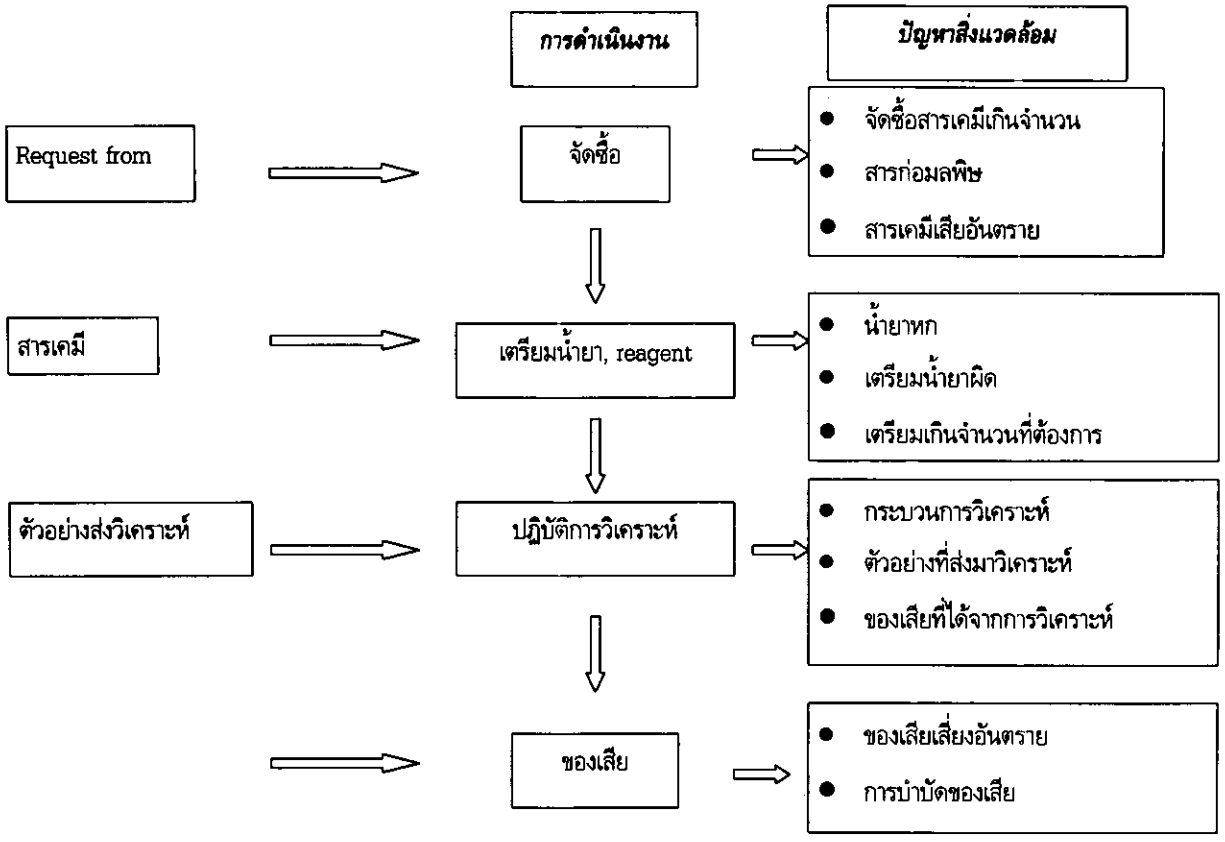
การดำเนินงานจัดทำห้องปฏิบัติการสะอาดประกอบด้วยขั้นตอนสำคัญ 7 ขั้นตอน ดังนี้

1. พิจารณาปัญหาสิ่งแวดล้อมในการดำเนินงานของห้องปฏิบัติการ

การพิจารณาปัญหาสิ่งแวดล้อมในการดำเนินงานของห้องปฏิบัติการเป็นขั้นตอนแรกที่สำคัญยิ่งในการบริหารจัดการ/จัดระบบเพื่อจัดทำ

* สถาบันพัฒนาและฝึกอบรมโรงงานต้นแบบ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

ห้องปฏิบัติการสะอาด เพราะปัญหาสิ่งแวดล้อมที่พบจากการดำเนินงานจะทำให้เกิดการปรับเปลี่ยนระบบหรือรูปแบบการบริหารจัดการ และปัญหาที่พิจารณาไม่ได้มีอยู่เฉพาะภายในห้องปฏิบัติการเท่านั้น แต่จะเกี่ยวข้องกับทุกส่วนของการดำเนินงาน โดยห้องปฏิบัติการมีเป้าหมายชัดเจนที่จะใช้มาตรการป้องกันมลพิษเข้าไปบริหารจัดการ เริ่มจากการพิจารณาถึงแหล่งกำเนิดของเสียอันตรายหรือมลพิษไปจนถึงการจัดการของเสียอันตรายและไม่เสี่ยงอันตราย ซึ่งเป้าหมายเหล่านี้หมายรวมถึงการลดปริมาณการใช้สารเคมีเสี่ยงอันตราย การลดการก่อให้เกิดของเสียเสี่ยงอันตราย และลดการทิ้งสารเคมี/วัสดุอันตราย การปรับปรุงสภาพแวดล้อมภายในห้องปฏิบัติการให้ลดการเผชิญกับสารหรือวัสดุเสี่ยงอันตราย และกระตุ้นให้เกิดมาตรการเผยแพร่ความรู้และวิธีการตลอดจนนโยบายป้องกันมลพิษภายในห้องปฏิบัติการ นอกจากนั้นยังรวมไปถึงแผนลดการจัดซื้อจัดหาวัสดุอุปกรณ์สารเคมีที่เสี่ยงอันตรายอีกด้วย จากการพิจารณาการดำเนินงานทุกส่วนเหล่านี้สามารถระบุลักษณะปัญหาสิ่งแวดล้อมได้ว่าการดำเนินงานในห้องปฏิบัติการนั้นแหล่งกำเนิดของเสียเสี่ยงอันตรายและสารก่อมลพิษอยู่ในขั้นตอนใดบ้าง ซึ่งควรระบุถึงการใช้สารเคมีในกระบวนการต่างๆภายในห้องปฏิบัติการเพื่อให้ทราบว่ากิจการใดก่อให้เกิดมลพิษชนิดใดได้บ้าง ตัวอย่างของการพิจารณาและการระบุปัญหาสิ่งแวดล้อมได้แสดงไว้ในรูปที่ 1



รูปที่ 1 ตัวอย่างการพิจารณาปัญหาสิ่งแวดล้อมในการดำเนินงานของห้องปฏิบัติการ

2. จัดรูปแบบ/และปรับปรุงสภาพแวดล้อมของห้องปฏิบัติการ

การจัดรูปแบบและการปรับปรุงสภาพแวดล้อมในการดำเนินการจัดทำห้องปฏิบัติการสะอาดนั้น หมายถึง การปรับปรุงสภาพแวดล้อมภายในห้องปฏิบัติการให้ลดการเผชิญกับสารหรือวัสดุเสี่ยงอันตราย ซึ่งต้องจัดทำระบบเพื่อความปลอดภัย เช่น การจัดระบบการจัดเก็บสารเคมี, การจัดระบบการจัดเก็บของเสีย, การจัดระบบการปฏิบัติงาน โดยใช้เครื่องมือหรืออุปกรณ์เพื่อความปลอดภัย เช่น การปฏิบัติงานโดยใช้ตู้ควัน (Fume hood) ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar flow cabinet) การจัดหาอุปกรณ์เพื่อความปลอดภัยที่จำเป็นประจำห้องปฏิบัติการ เช่น อ่างล้างตา (Eye wash), Emergency shower; การจัดหาอุปกรณ์ป้องกันเฉพาะบุคคล (Personal protective equipment, PPE) ที่จำเป็นเช่น แว่นตา, หน้ากาก, Respirator, ถุงมือ, ชุดปฐมพยาบาลเบื้องต้น และควรมีระบบสัญญาณเตือนภัย เช่น Emergency alarm, Smoke alarm, Heat detector พร้อมระบบ Sprinkle และระบบดับเพลิงในกรณีฉุกเฉิน นอกจากนี้แล้วยังรวมถึงการจัดระบบสาธารณูปโภคภายในห้องปฏิบัติการ ซึ่งมีการแยกท่อน้ำทิ้งจากกิจกรรมในห้องปฏิบัติการออกจากท่อน้ำทิ้งธรรมดาให้เข้าสู่ระบบบำบัดน้ำเสียเฉพาะกิจกรรม การจัดรูปแบบและการปรับสภาพแวดล้อมของห้องปฏิบัติการเหล่านี้ต้องคำนึงถึงการจัดการด้านสิ่งแวดล้อมที่ดีเป็นหลัก

3. จัดระบบองค์กรภายในห้องปฏิบัติการ

การจัดระบบองค์กรภายในเพื่อจัดทำห้องปฏิบัติการสะอาดนั้น เป็นการจัดระบบการบริหารจัดการโดยกำหนดภาระหน้าที่ปฏิบัติงานของบุคลากรทุกคนไว้อย่างชัดเจน นอกจากนั้นยังหมายถึงการเข้ารับการฝึกอบรมและพัฒนาความรู้ด้านวิชาการและการจัดการสิ่งแวดล้อมภายในห้องปฏิบัติการ รวมถึงการลดปริมาณของเสีย การป้องกันและควบคุมมลพิษด้วย ส่วนที่สำคัญในการจัดระบบองค์กรคือการกำหนดภาระหน้าที่ให้ทุกคนมีบทบาทและมีความรับผิดชอบเพื่อลดการก่อมลพิษ, ลดการจัดทิ้งสารเคมีอันตรายหรือสารเคมีที่เป็นพิษ และการจัดการของเสียภายในห้องปฏิบัติการ ตัวอย่างการจัดระบบองค์กรพร้อมการกำหนดภาระหน้าที่ปฏิบัติงานของห้องปฏิบัติการกลางเพื่อการวิเคราะห์และบริการ สถาบันพัฒนาและฝึกอบรมโรงงานต้นแบบ แสดงไว้ในรูปที่ 2 และรูปที่ 3

4. จัดระบบปฏิบัติงานภายในห้องปฏิบัติการ

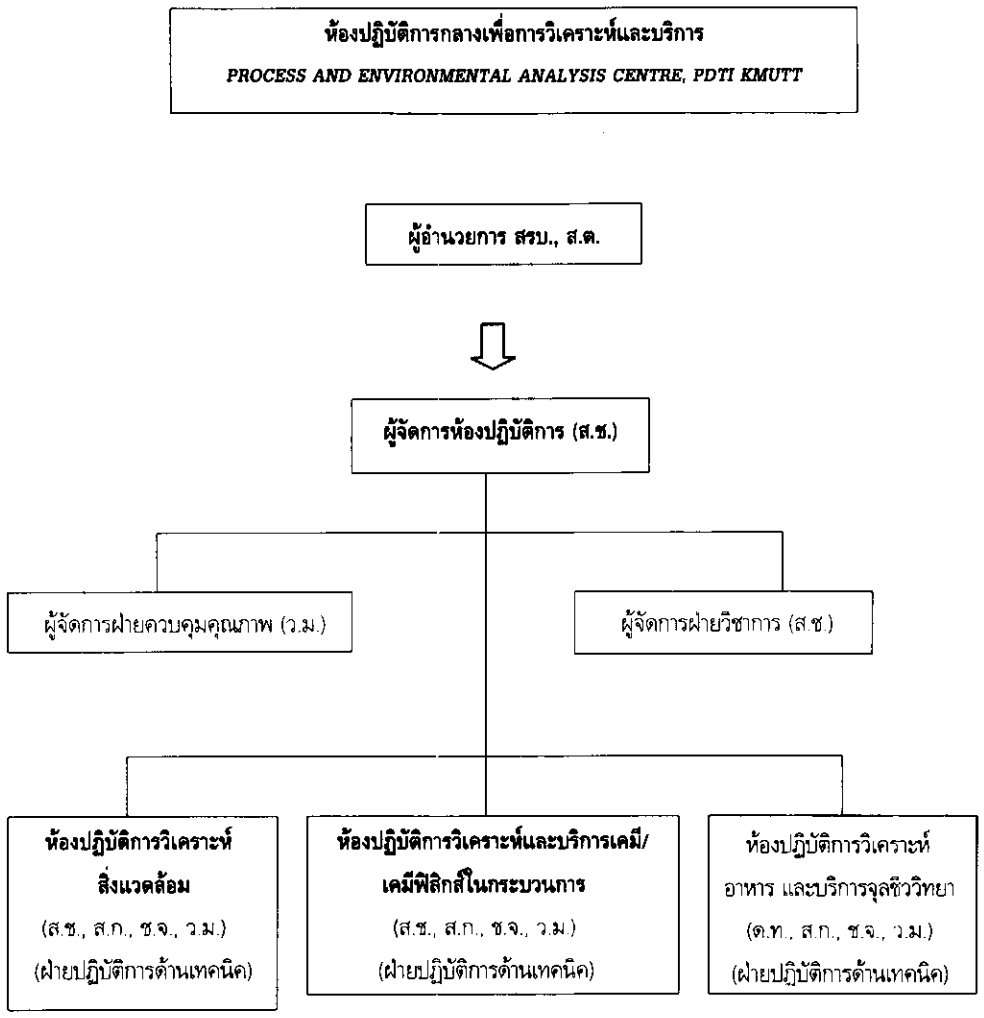
การจัดระบบปฏิบัติงานภายในเพื่อจัดทำห้องปฏิบัติการสะอาดนั้น มีจุดประสงค์หลักเพื่อกำหนดระเบียบการปฏิบัติงานให้สามารถประเมิน/พิจารณาลักษณะปัญหาสิ่งแวดล้อม ทั้งในด้านของการก่อมลพิษ, การป้องกันและควบคุมการเกิดมลพิษ สามารถแยกได้เป็น

4.1 การจัดเอกสารในรูปคู่มือ สมุดบันทึก และแผน เพื่อกำหนดระเบียบการปฏิบัติงานเพื่อให้สามารถตรวจสอบ ทบทวน หรือแก้ไขได้

4.1.1 คู่มือ ประกอบด้วย

ก. คู่มือการปฏิบัติงานภายในห้องปฏิบัติการ ซึ่งผู้เข้าปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการทุกคนต้องอ่านและทำความเข้าใจในระเบียบปฏิบัติงานภายในห้องปฏิบัติการ ซึ่งจะรวมถึงข้อควรปฏิบัติ Good Laboratory Practice, วิธีการเพื่อความปลอดภัย การจัดเก็บและรวบรวมของเสียและขั้นตอนการดำเนินงานของห้องปฏิบัติการ

ข. คู่มือการจัดแยกประเภทและจัดเก็บสารเคมีภายในห้องปฏิบัติการ



รูปที่ 2 แผนผังองค์กร ในวงเล็บคือผู้รับผิดชอบงาน

ค. คู่มือการจัดแยกประเภทและจัดเก็บของเสียภายในห้องปฏิบัติการ

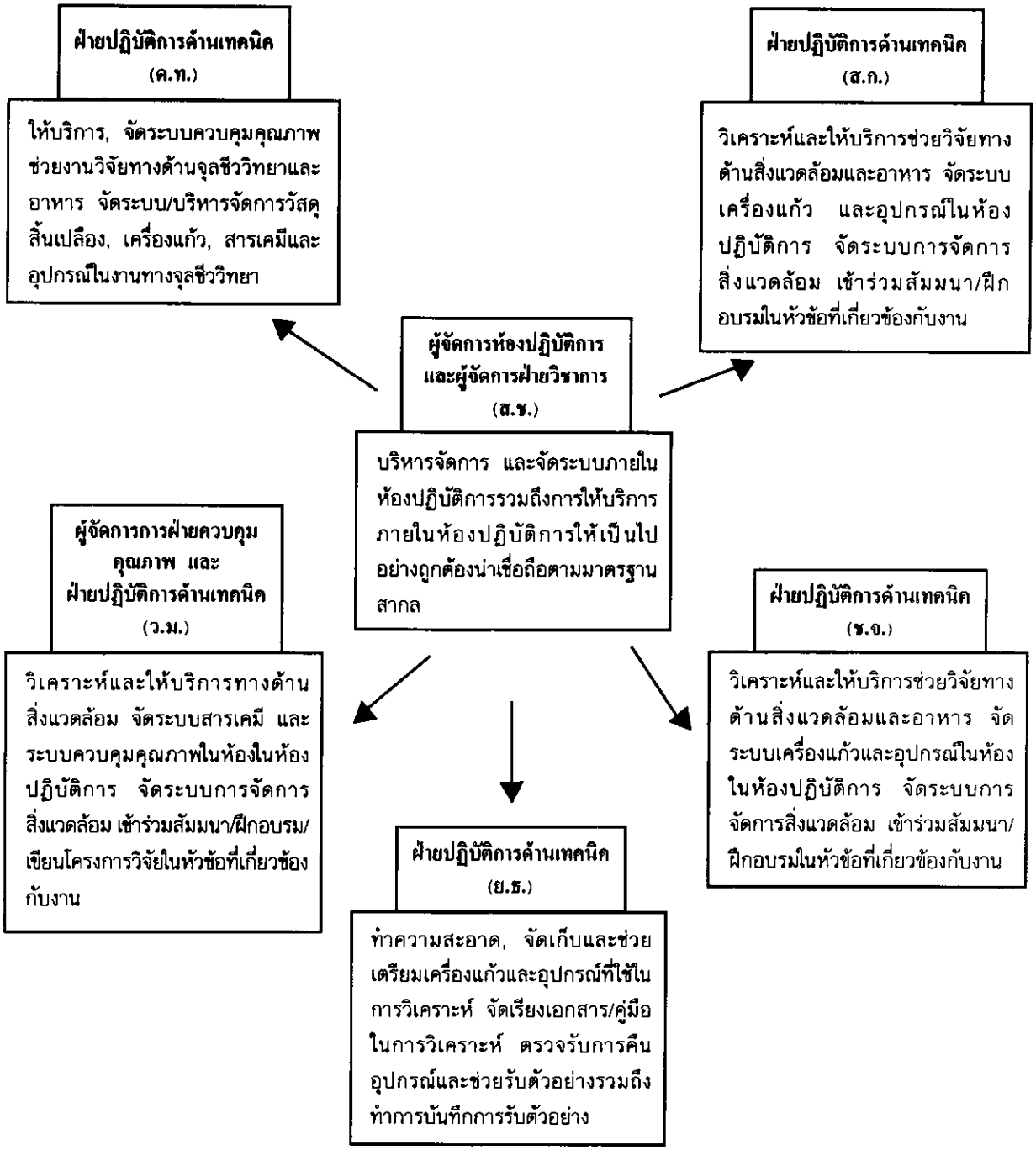
ง. คู่มือการบำบัดของเสียภายในห้องปฏิบัติการ : การบำบัดของเสียประเภทโลหะหนักและสารพิษ

จ. คู่มือการใช้ฐานข้อมูลในการบริหารจัดการสารเคมีภายในองค์กร

ฉ. คู่มือการทดสอบ ระบุถึงสารเคมีและวิธีการหรือกระบวนการที่ใช้ในการวิเคราะห์ ซึ่งจะทำให้ทราบถึงมลพิษที่เกิดขึ้นในกระบวนการ

ช. คู่มือ Chemical hygiene plan ระบุถึงแนวทางปฏิบัติเพื่อความปลอดภัย, วิธีปฏิบัติการในภาวะฉุกเฉิน การจัดการอันตรายจากสารเคมี วิธีปฏิบัติการมาตรฐาน การฝึกอบรมเรื่องความปลอดภัย การจัดการอันตรายจากสารชีวภาพและรังสี

4.1.2 สมุดบันทึก เพื่อบันทึกข้อมูลต่างๆ ซึ่งสามารถประเมินถึงการก่อมลพิษและการป้องกันควบคุมการเกิดมลพิษต่างๆ ภายในห้องปฏิบัติการ ตัวอย่างได้แก่ สมุดบันทึก Request form สมุดบันทึกการรับตัวอย่าง สมุดบันทึกการนำส่ง



รูปที่ 3 Job Description ในวงเล็บคือผู้รับผิดชอบงาน

การจัดเก็บตัวอย่าง สมุดบันทึกการเกิดอุบัติเหตุภายในห้องปฏิบัติการ สมุดบันทึกการใช้อุปกรณ์ความปลอดภัย สมุดบันทึกการยืมอุปกรณ์/สารเคมี สมุดบันทึกการเตรียมสารเคมี สมุดบันทึกรายชื่อผู้เข้าปฏิบัติงาน สมุดบันทึกการใช้เครื่องมือ/อุปกรณ์ สมุดบันทึกการซ่อมบำรุง เครื่องมือ/อุปกรณ์ สมุดบันทึกชนิดและปริมาณของเสีย สมุดบันทึกการเข้ารับการฝึกอบรม/สัมมนา/พัฒนาบุคลากร เป็นต้น

4.1.3 แผน ได้แก่ แผนป้องกันและควบคุมภาวะฉุกเฉินจากสารเคมี (Emergency response plan) ในแผนจะระบุถึงขั้นตอนการดำเนินการตอบโต้ภาวะฉุกเฉินจากสารเคมี การแจ้งภาวะฉุกเฉินจากสารเคมี การจัดองค์กรเพื่อตอบโต้ภาวะฉุกเฉินจากสารเคมี ข้อมูลสนับสนุนการตอบโต้ภาวะฉุกเฉินและการเตรียมความพร้อมบุคลากรสำหรับการตอบโต้สภาวะฉุกเฉินจากสารเคมี

4.2 การปรับเปลี่ยนหรือเลือกใช้กระบวนการเพื่อลดการเกิดมลพิษ เริ่มด้วยการเลือกกระบวนการวิเคราะห์ซึ่งสามารถลดมลพิษมาพิจารณาก่อน แล้วเลือกใช้กระบวนการวิเคราะห์ใหม่หรือทำการปรับปรุงกระบวนการวิเคราะห์เดิม โดยคำนึงถึงการลดสารก่อมลพิษ ต้นทุน ประสิทธิภาพ รวมถึงผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม สุขภาพของบุคลากรผู้ปฏิบัติการ แล้วทำการเปรียบเทียบ Unit cost ของกระบวนการวิเคราะห์แต่ละวิธี เพื่อประเมินประสิทธิภาพและประสิทธิผล ดังตัวอย่างที่แสดงไว้ในรูปที่ 4

4.3 การใช้นโยบายจัดซื้อโดยวิธีรวมศูนย์ มาตรการจัดซื้อเพื่อลดของเสียโดยเฉพาะของเสียเสี่ยงอันตรายและลดการจัดซื้อเกินจำนวนที่ต้องการใช้จริง หลีกเลี่ยงการทิ้งของเสียเหลือใช้นั้น ทางห้องปฏิบัติการได้ใช้นโยบายจัดซื้อโดยวิธีรวมศูนย์ ห้องปฏิบัติการและกลุ่มวิจัยต่างๆ ได้วางแผนการปฏิบัติงานให้สอดคล้องกับแผนการจัดซื้อ การบริหารจัดการทรัพยากรโดยเฉพาะอย่างยิ่งสารเคมีร่วมกัน ทำให้การใช้สารเคมีของแต่ละหน่วยงานเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพและเกิดผลพลอยได้ในด้านการไม่ทำให้เกิดสารเคมีที่หมดอายุกลายเป็นของเสียอันตรายที่ต้องใช้วิธีการจัดการที่ต้องเสียค่าใช้จ่ายในราคาที่แพงขึ้น

การปรับเปลี่ยนกระบวนการเพื่อลดของเสียจากห้องปฏิบัติการ โดยการเปลี่ยนวิธีการวิเคราะห์ CDO จาก Open reflux เป็น Closed refleux

ชื่อหน่วยงาน ห้องปฏิบัติการกลางเพื่อการวิเคราะห์และบริการ สถาบันพัฒนาและฝึกอบรมโรงงานต้นแบบ

ของเสียที่เกิดขึ้น ของเสียอันตรายประกอบด้วย Sulfuric acid, Chromium, Mercuric sulfate

ปริมาณของเสีย พ.ศ. 2541 จำนวน 144 ลิตร

ขั้นตอนที่ทำให้เกิดของเสียใช้ Reagent ในการออกซิไดซ์สารอินทรีย์และกำจัดสารรบกวน

ข้อเสนอแนะเพื่อการลดปริมาณของเสีย ปรับเปลี่ยนวิธีการวิเคราะห์

วิธีการปฏิบัติโดยย่อ

1. จากวิธีการเดิม (Open reflux) ต้องใช้ตัวอย่างในการวิเคราะห์ 20 มล. และใช้ Sulfuric acid reagent 30 มล. Dichromate 10 มล. และ Mercuric sulfate 0.4 กรัม
2. วิธีการใหม่ (Closed reflux) ต้องใช้ตัวอย่างในการวิเคราะห์ 2.5 มล. และใช้ Sulfuric acid reagent 3.5 มล. Dichromate และ Mercuric sulfate 1.5 มล.

ระยะเวลาดำเนินการ 1 มกราคม 2542 - 31 ธันวาคม 2542

การประเมินทางเศรษฐศาสตร์

- ค่าใช้จ่ายในการลงทุนเพิ่ม ไม่มี
- ค่าใช้จ่ายในการดูแลรักษาเพิ่มเติม ไม่มี
- การลดต้นทุน
  - ลดค่าสารเคมี 20,497 บาท/ปี
  - ลดค่าบำบัดของเสีย 6,040 บาท/ปี

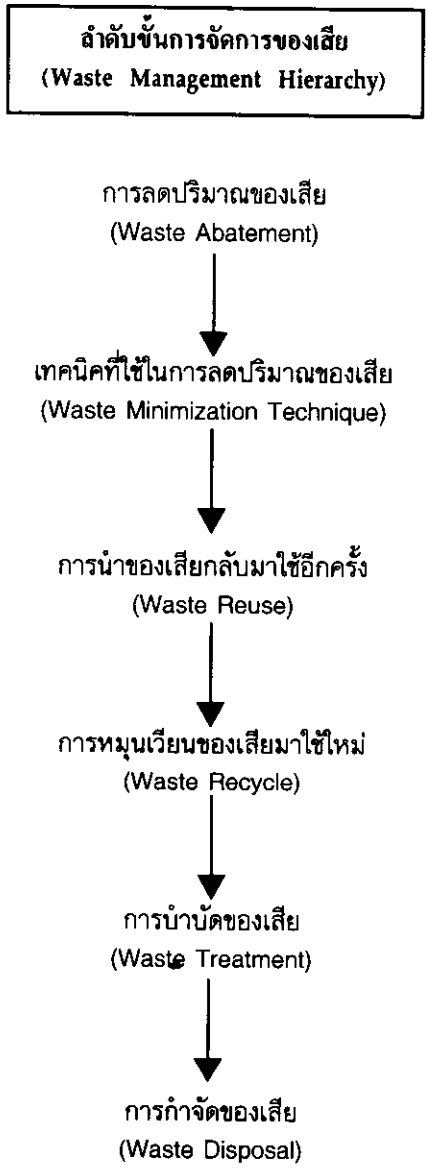
สรุป

ลดปริมาณของเสีย	800%
ลดค่าสารเคมี	877%
ลดค่าบำบัดของเสีย	800%

รูปที่ 4 ตัวอย่างการปรับเปลี่ยนกระบวนการเพื่อลดปริมาณมลพิษ

4.4 การใช้เทคนิคในการป้องกันมลพิษ

เทคนิคที่ใช้ในการป้องกันมลพิษเพื่อลดหรือขจัดการเกิดมลพิษภายในห้องปฏิบัติการนั้นทำได้หลายวิธี เช่นการลดหรือหยุดใช้ตัวทำละลาย (Solvent) การลดขนาดการวิเคราะห์หรือการปรับเปลี่ยนวิธีเคราะห์ให้ใช้ปริมาณตัวอย่างและสารเคมีน้อยลงโดยไม่ทำให้ประสิทธิภาพการวิเคราะห์เสียไป การพัฒนาวิธีการวิเคราะห์โดยใช้สารเคมีทดแทนสารเคมีอันตรายและการนำตัวทำละลายที่ใช้แล้วกลับมาใช้ใหม่ ลำดับขั้นของการจัดการของเสียตามมาตรฐานสากลได้แสดงไว้ดังรูปที่ 5 และมีขั้นตอนของการปฏิบัติดังนี้ คือ



รูปที่ 5 แสดงลำดับขั้นของการจัดการของเสีย

4.4.1 การลดปริมาณของเสียแหล่งกำเนิด (Waste source reduction or waste abatement) การลดปริมาณของเสียชนิดที่เป็นของเสียเสี่ยงอันตรายและของเสียไม่อันตรายรวมถึงของเสียที่เป็นตัวอย่างหรือสิ่งส่งตรวจด้วย โดยลดจากแหล่งกำเนิดของเสียโดยตรง สามารถทำได้ด้วยการวางแผนการทำงาน ทำงานด้วยความรอบคอบ/ระมัดระวังในการควบคุมการกำหนดปริมาณของตัวอย่างหรือสิ่งส่งตรวจที่ต้องใช้ในการวิเคราะห์/ทดสอบ การเตรียมน้ำยาทดสอบหรือใช้สารเคมีตัวทำละลายในปริมาณที่พอดีกับงานที่ต้องใช้ ไม่ทิ้งน้ำยาทดสอบ สารเคมีหรือตัวทำละลายลงในท่อน้ำทิ้งโดยตรงเป็นต้น

4.4.2 การใช้เทคนิคในการลดปริมาณของเสีย (Waste minimization techniques) สามารถทำได้โดยการปรับเปลี่ยนหรือประยุกต์วิธีการ/กระบวนการในการวิเคราะห์ (Process modification) ทำให้มีการใช้ปริมาณสารอันตรายและเกิดของเสียเสี่ยงอันตรายน้อยลง การใช้เทคนิค Microanalysis การใช้เครื่องวิเคราะห์ซึ่งใช้ตัวอย่างและน้ำยาทดสอบปริมาณน้อย จะช่วยลดปริมาณของเสียที่เกิดขึ้นได้อย่างมาก นอกจากนั้นยังควรที่จะทำการเสาะหาวิธีการหรือเทคนิคใหม่ๆ จากหน่วยงานมาตรฐานสากลเพื่อเรียนรู้เทคนิคที่ใช้ในการลดปริมาณของเสีย เช่น การใช้วิธีหาค่าของ COD โดยใช้วิธี Closed reflux แทนวิธี Open reflux ซึ่งช่วยลดปริมาณของเสียได้

4.4.3 การนำของเสียกลับมาใช้อีกครั้ง (Reuse) เป็นการใช้ประโยชน์จากของเสียในห้องปฏิบัติการ โดยพิจารณาว่าของเสียที่เกิดขึ้นในกระบวนการหนึ่ง สามารถนำกลับมาใช้ใน

กระบวนการเดิมหรืออีกกระบวนการหนึ่งได้โดยใช้ในรูปเดิม เช่น การนำ Acetonitrile และ Methanol ซึ่งเป็นของเสียจากกระบวนการใน HPLC นำกลับมาใช้ในกระบวนการกลั่นเป็นต้น

4.4.4 การหมุนเวียนของเสียกลับมาใช้ใหม่ (Recycle) เป็นวิธีการใช้ประโยชน์จากของเสียในห้องปฏิบัติการวิธีหนึ่ง แล้วนำกลับมาใช้ในกระบวนการอื่น หรือนำของเสียนั้นผ่านกระบวนการให้ได้สารตัวเดิมแล้วจึงนำกลับมาใช้ใหม่อีกครั้งหนึ่ง เช่นตัวทำละลายต่างๆ ได้แก่ Alcohol, Acetone, Aldehyde, Formalin, Xylene ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับกระบวนการที่ใช้ด้วย

4.4.5 การบำบัดของเสีย (Waste treatment) ของเสียที่ปล่อยทิ้งลงสู่ชุมชนแล้วทำให้เกิดอันตรายต่อสิ่งแวดล้อมและชุมชน ซึ่งหมายรวมถึงสุขภาพ ชีวิตของบุคลากรในชุมชนและสิ่งแวดล้อมด้วยนั้น จำเป็นต้องได้รับการบำบัดให้ปราศจากอันตรายก่อน แต่ละห้องปฏิบัติการอาจทำการบำบัดของเสียบางประเภทที่จัดแยกไว้ได้เอง และนำของเสียที่ผ่านการบำบัดแล้วนั้นทิ้งลงสู่ท่อน้ำทิ้งชุมชนได้โดยไม่เกิดอันตรายใดๆ แต่ของเสียบางประเภทที่ผ่านการบำบัดแล้วก็ยังไม่สามารถปล่อยลงสู่ท่อน้ำทิ้งชุมชนได้โดยตรง และการบำบัดของเสียบางประเภทก็ไม่สามารถที่จะทำได้เองในห้องปฏิบัติการ ของเสียประเภทที่ไม่สามารถบำบัดได้เองอาจดำเนินการบางขั้นตอนเพื่อลดปริมาณของเสียลงบางส่วนก่อน แล้วเก็บรวบรวมไว้ส่งบำบัดที่หน่วยบำบัดกลางต่อไป

4.4.6 การกำจัดของเสีย (Waste disposal) หมายถึงการใช้วิธีการทำให้ของเสียที่ไม่สามารถบำบัดให้หมดไปได้นั้น สลายตัวหรือเปลี่ยนรูปเป็นสิ่งที่ไม่ก่อให้เกิดอันตรายต่อสิ่งแวดล้อมและชุมชนต่อไป ซึ่งมีอยู่ 2 วิธี คือ การฝังกลบ (Land fill) ใช้กับของเสียที่เป็นตัวอย่างส่งตรวจและขยะ/ของเสียติดเชื้อ ซึ่งต้องมีการลดปริมาณของเสียลงด้วยการระเหยน้ำออก จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°ซ นาน 90 นาที แล้วจึงนำไปฝังกลบในสถานที่เหมาะสมต่อไป อีกวิธีหนึ่งคือ การเผาในเตาเผา (Incineration) วิธีการนี้จะใช้กับขยะหรือของเสียจากห้องปฏิบัติการสิ่งแวดล้อมชนิดที่เป็นสารอินทรีย์หรือโลหะหนัก/สารพิษบางประเภท เตาเผาที่ใช้เผาขยะหรือของเสียจากห้องปฏิบัติการสิ่งแวดล้อมชนิดที่เป็นสารอินทรีย์หรือโลหะหนัก/สารพิษบางประเภทต้องมีการควบคุมก๊าซพิษ และสารอื่นที่เป็นผลผลิตผลอันเกิดเนื่องจากการเผานั้นด้วย

5. จัดระบบบริหารจัดการสารเคมี

การดำเนินงานจัดทำห้องปฏิบัติการสะอาดนั้น ได้มีการจัดระบบบริหารจัดการสารเคมีโดยจัดแยกประเภทไว้เป็นกลุ่มต่างๆ ตามชนิดของอันตรายที่เกิดขึ้น ซึ่งตามคู่มือที่ทางมหาวิทยาลัยจัดทำขึ้นภายใต้โครงการจัดตั้งเครือข่ายศูนย์วิจัยร่วมอุตสาหกรรม-มหาวิทยาลัยด้านการจัดการสิ่งแวดล้อมและวัตถุมีพิษ (IUCRC) โดยการสนับสนุนจากสำนักกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ประกอบไปด้วยคู่มือ 4 เล่ม คือ 1) คู่มือการจัดแยกประเภทและจัดเก็บสารเคมีภายในห้องปฏิบัติการ 2) คู่มือการจัดแยกประเภทและจัดเก็บของเสียภายในห้องปฏิบัติการ 3) คู่มือการบำบัดของเสียภายในห้องปฏิบัติการ : การบำบัดของเสียประเภทโลหะหนักและสารพิษ 4) คู่มือการใช้ฐานข้อมูลในการบริหารจัดการสารเคมีภายในมจธ. ซึ่งการจัดแยกประเภทและจัดเก็บสารเคมีในแต่ละห้องปฏิบัติการนั้น ได้ดำเนินการจัดทำตามคู่มือการจัดแยกประเภทและจัดเก็บสารเคมีภายในห้องปฏิบัติการ และสามารถที่จะเก็บรวบรวมข้อมูลเข้าสู่ระบบฐานข้อมูลในการบริหารจัดการสารเคมีของ

ทางมหาวิทยาลัยตามคู่มือการใช้ฐานข้อมูลในการบริหารจัดการสารเคมีภายในมจธ. จากระบบฐานข้อมูลดังกล่าว ทุกหน่วยงานในมหาวิทยาลัยสามารถที่จะทราบถึงชนิดและปริมาณของสารเคมีของหน่วยงานต่างๆภายในมหาวิทยาลัย และสามารถที่จะใช้ระบบการใช้สารเคมีร่วมกัน หรือการบริหาร/จัดการสารเคมีร่วมกับหน่วยงานได้ นอกจากนั้นแล้วในการจัดระบบสารเคมีในห้องปฏิบัติการจะมี Material Safety Data Sheet (MSDS) ของสารเคมีแต่ละตัว ซึ่งจัดทำในรูปเอกสารไว้ประจำห้องปฏิบัติการเพื่อประโยชน์ในการค้นหาข้อมูลเพื่อความปลอดภัยของสารเคมีเหล่านั้น และ MSDS ของสารเคมีแต่ละตัวนั้นทุกหน่วยงานสามารถสืบค้นได้จากฐานข้อมูลเช่นกัน การใช้ฐานข้อมูลเข้ามาช่วยบริหารจัดการสารเคมีนั้นทุกหน่วยงานสามารถปฏิบัติตามคู่มือการใช้ฐานข้อมูลในการบริหารจัดการสารเคมีภายในมจธ. ซึ่งทุกห้องปฏิบัติการสามารถเปิดเข้าใช้และเพิ่มหรือเปลี่ยนแปลงข้อมูลได้โดยบุคลากรประจำห้องปฏิบัติการที่ได้รับมอบหมายให้ทำหน้าที่ดูแล/รับผิดชอบการบริหารจัดการสารเคมีประจำหน่วยงานนั้น การบริหารจัดการโดยอาศัยฐานข้อมูลเข้ามาช่วย ทำให้สามารถแยกได้ถึงอันตรายหรือมลพิษของสารเคมีชนิดต่างๆ ภายในมหาวิทยาลัย แต่อย่างไรก็ตามการจัดระบบการบริหารจัดการสารเคมีของมหาวิทยาลัย ก็ยังสามารถพัฒนาปรับปรุงและเปลี่ยนแปลงให้เหมาะสมกับการใช้งานและความต้องการของห้องปฏิบัติการต่างๆ ได้ต่อไปในอนาคต

6. จัดระบบการจัดการของเสีย

การจัดระบบการจัดการของเสียในการดำเนินงานจัดทำห้องปฏิบัติการสะอาดนั้น ถือเป็นสิ่งสำคัญอย่างยิ่งต่อสิ่งแวดล้อมและชุมชน โดยเริ่มด้วยการจำแนกของเสียอันเกิดจากกิจกรรมต่างๆ ของห้องปฏิบัติการออกเป็นประเภทต่างๆ เพื่อให้ทราบถึงต้นเหตุหรือจุดกำเนิดของของเสียก่อนแล้วจึงดำเนินการเป็นขั้นตอนในการจัดการกับของเสียประเภทเหล่านั้น การจัดการของเสียจากห้องปฏิบัติการ ได้ดำเนินการตามคู่มือที่ทางมหาวิทยาลัยโดยการสนับสนุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) จัดทำขึ้นคือ คู่มือการจัดแยกประเภทและจัดเก็บของเสียภายในห้องปฏิบัติการ ซึ่งจัดแยกประเภทของของเสียตามวิธีบำบัดของเสียโดยตัวอย่างการจัดแยกประเภทของเสียได้แสดงไว้ในตารางที่ 1 อันเป็นตัวอย่างจากมหาวิทยาลัยโตเกียว ประเทศญี่ปุ่น และตารางที่ 2 เป็นตัวอย่างของการจัดแยกประเภทของของเสียของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี (มจธ.) จะเห็นว่า มจธ.ได้จัดแยกประเภทของเสียย่อยออกไปเป็น 23 ประเภท ตามที่แสดงไว้ในรูปที่ 6 ทั้งนี้เนื่องจากของเสีย 14 ประเภทนั้น สามารถบำบัดได้เองภายในห้องปฏิบัติการ โดยทางมจธ. ได้จัดทำคู่มือบำบัดของเสียภายในห้องปฏิบัติการ : การบำบัดของเสียประเภทโลหะหนักและสารพิษ เพื่อให้ห้องปฏิบัติการที่มีศักยภาพสามารถดำเนินการบำบัดของเสียได้เอง โดยระบบการจัดการของเสียของมจธ. ได้แสดงไว้ดังรูปที่ 7

ระบบการจัดการของเสียภายในมจธ. มีขั้นตอนการเก็บรวบรวมของเสียอย่างเป็นระบบ โดยเริ่มจากการแยกประเภทของเสียภายในห้องปฏิบัติการก่อน ต่อจากนั้นห้องปฏิบัติการสามารถที่จะบำบัดของเสียบางประเภทด้วยตนเองได้ แล้วจึงรวบรวมของเสียภายในห้องปฏิบัติการเพื่อนำไปจัดเก็บในสถานที่จัดเก็บของเสียในห้องปฏิบัติการทุกสองสัปดาห์จะย้ายไปจัดเก็บในสถานที่จัดเก็บของเสียประจำอาคาร และทุกหนึ่งเดือนจะมี

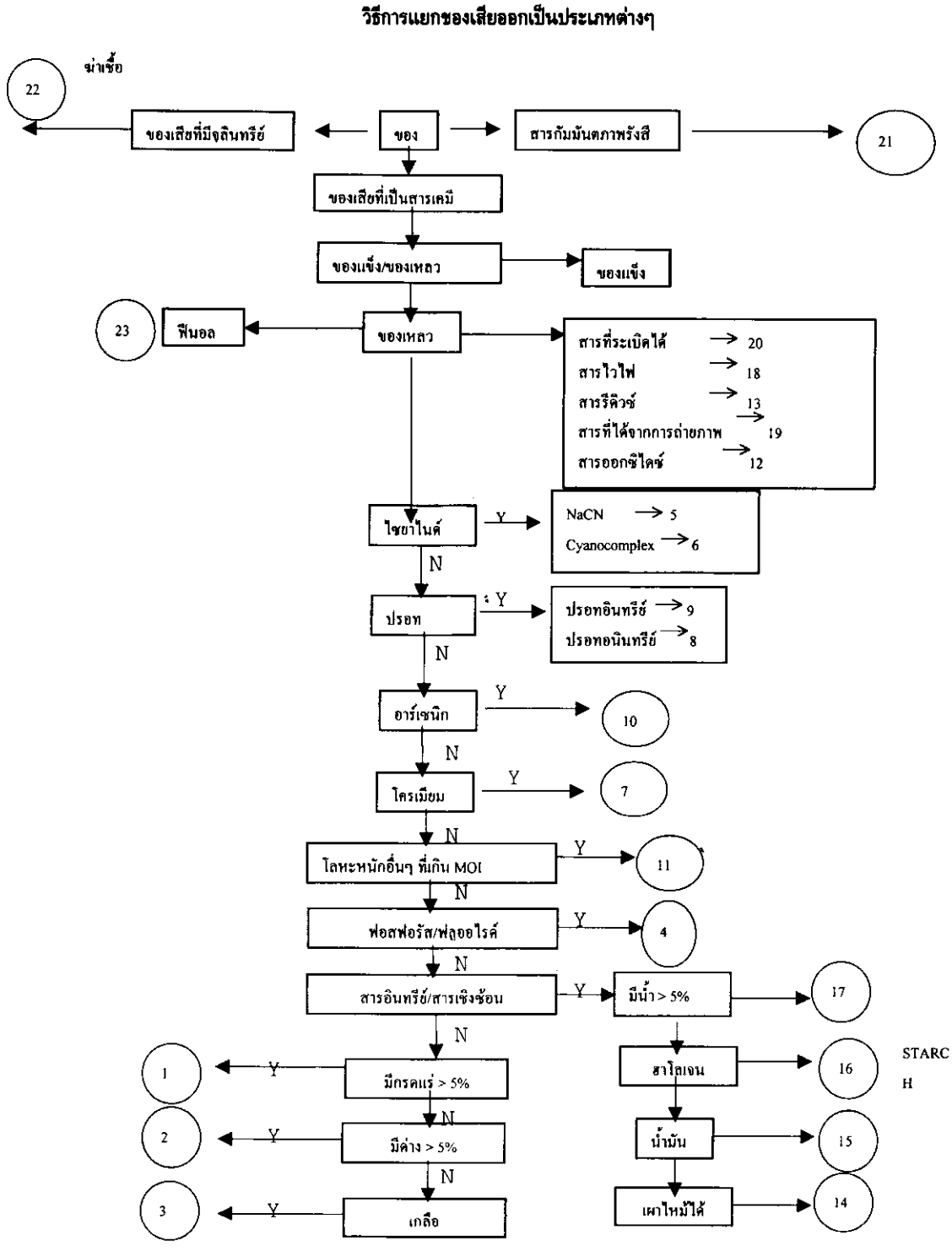
ตารางที่ 1 แสดงการแยกประเภทของของเสียจากห้องปฏิบัติการ มหาวิทยาลัยโตเกียว ประเทศญี่ปุ่น โดยแยกของเสียเป็น 12 ประเภทตามรายละเอียดดังนี้

Category	ชนิดของของเสีย	วิธีบำบัด/กำจัดของเสีย
A	Mercury	Adsorption by Chelate resin
B	Cyanide	Oxidative decomposition
C	Fluorine * Phosphorus compounds	Calcification
D	Acid : Dichromate acid	Ferrite
E	Alkali	Ferrite
F	Heavy metals	Ferrite
G	Photographic solutions	Incineration
H	Combustible liquids	Incineration
I	Oil	Incineration
J	Halogen	Incineration
K	Incombustible liquids	Incineration
L	Toxic solids	Incineration

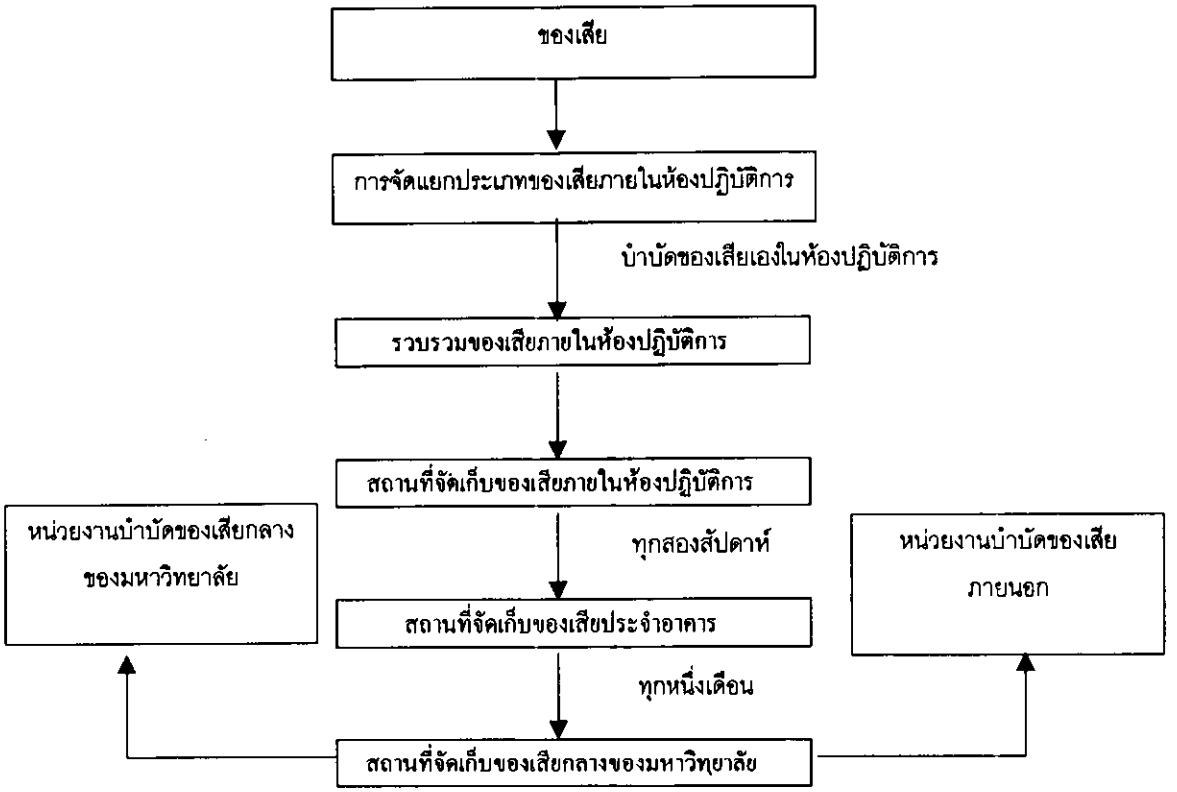
ตารางที่ 2 ของเสียในห้องปฏิบัติการมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี แบ่งเป็น 23 ประเภท

ประเภทของเสีย	
1. ของเสียที่เป็นกรด	12. ของเสียประเภทสารออกซิไดซ์
2. ของเสียที่เป็นเบส	13. ของเสียประเภทสารรีดิวซ์
3. ของเสียที่เป็นเกลือ	14. ของเสียที่เป็นของเหลวที่สามารถเผาไหม้ได้ เช่น ตัวทำละลายอินทรีย์
4. ของเสียที่เป็นของเหลวที่ประกอบด้วยฟลูออไรด์	15. ของเสียที่เป็นน้ำมัน
5. ของเสียที่เป็นของเหลวที่ประกอบไปด้วยไซยาไนด์	16. ของเสียที่เผาไหม้ยากและไม่สามารถเผาไหม้ได้ เช่น สารประกอบอินทรีย์ของธาตุฮาโลเจน
6. ของเสียที่เป็นของเหลวที่ประกอบไปด้วยไซยาไนด์ที่สลายตัวยาก	17. ของเสียที่เป็นของเหลวอินทรีย์ที่ประกอบด้วยน้ำ
7. ของเสียที่เป็นของเหลวที่ประกอบไปด้วย Cr^{6+} รวมถึงของเสียผสมของกรดโครมิก และกรดซัลฟูริก	18. สารไวไฟพิเศษ
8. ของเสียประเภทสารปรอทอินทรีย์	19. ของเสียที่ได้จากกิจกรรมการถ่ายภาพ
9. ของเสียประเภทสารปรอทอินทรีย์	20. สารระเบิดได้
10. ของเสียประเภทอาร์เซนิก	21. สารกัมมันตภาพรังสี
11. ของเสียที่เป็นไอออนของโลหะหนัก	22. ของเสียที่มีจุลินทรีย์
	23. ของเสียที่ประกอบด้วยฟีนอล

หน่วยงานกลางทำการย้ายของเสียแต่ละประเภทไปรวบรวมและจัดเก็บในสถานที่จัดเก็บของเสียกลาง เพื่อที่จะนำไปบำบัดแยกตามประเภทต่อไป โดยบางประเภทอาจทำได้เองในหน่วยงานบำบัดของเสียกลางของมหาวิทยาลัย บางประเภทอาจต้องส่งไปบำบัดในหน่วยงานบำบัดของเสียภายนอก



รูปที่ 6 แสดงวิธีการแยกของเสียออกเป็นประเภทต่างๆ ภายในห้องปฏิบัติการมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี



รูปที่ 7 แสดงระบบการจัดการของเสียภายในมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

7. จัดระบบประเมิน/ทบทวน/ตรวจสอบ

ในการดำเนินงานจัดทำห้องปฏิบัติการสะอาด ได้มีการจัดระบบประเมินผล ทบทวน และตรวจสอบการดำเนินงานโดยคณะกรรมการกลางของทางมหาวิทยาลัย ซึ่งในการดำเนินงานจัดทำห้องปฏิบัติการสะอาดของห้องปฏิบัติการกลางเพื่อการวิเคราะห์และบริการ สถาบันพัฒนาและฝึกอบรมโรงงานต้นแบบ มจธ. นี้ เป็นการดำเนินงานห้องปฏิบัติการนำร่อง ซึ่งได้เริ่มจัดทำมาประมาณหนึ่งปี ต้องมีการประเมินและตรวจสอบและรับฟังข้อเสนอแนะเพื่อแก้ไขจากคณะกรรมการกลางของมหาวิทยาลัย ห้องปฏิบัติการได้ดำเนินการแก้ไขปรับปรุงและทบทวน ซึ่งคาดว่าต้องใช้เวลาไม่น้อยกว่า 6 เดือน จึงจะสามารถเผยแพร่เพื่อให้ห้องปฏิบัติการอื่นๆ ของทางมหาวิทยาลัย ได้ดำเนินงานจัดทำห้องปฏิบัติการสะอาดในระยะต่อไป ตัวอย่างของแบบประเมินผลและตรวจสอบการดำเนินงานได้แสดงไว้ดังตารางที่ 3

จะเห็นได้ว่าการดำเนินการจัดทำห้องปฏิบัติการสะอาดนั้น ต้องอาศัยความรู้ความเข้าใจและความร่วมมือของบุคลากรในห้องปฏิบัติการเป็นหลัก ดังนั้นการให้ความรู้เกี่ยวกับเทคโนโลยีสะอาด, ข้อมูลแหล่งกำเนิดของเสียที่เกิดขึ้นในห้องปฏิบัติการ อันตรายของของเสีย/สารเคมีที่อยู่ในห้องปฏิบัติการ การแยกประเภทสารเคมีของเสีย การจัดการของเสียในห้องปฏิบัติการ รวมทั้งการสร้างและปลูกฝังจิตสำนึกในการป้องกันรักษาสิ่งแวดล้อมและตระหนักถึงอันตรายของสิ่งแวดล้อมและชุมชนอันเกิดเนื่องจากการปล่อยทิ้งของเสียเสี่ยงอันตรายเหล่านั้นสู่ชุมชน จึงเป็นสิ่งที่สำคัญ

ตารางที่ 3 ตัวอย่างแบบประเมินและตรวจสอบการดำเนินงานห้องปฏิบัติการ

แบบตรวจสอบการประเมินห้องปฏิบัติการ

หน่วยงาน..... วันที่.....

ผู้รับการตรวจสอบ..... หมายเลข.....

ผู้ตรวจสอบ.....ครั้งที่.....

รายการตรวจสอบ	สิ่งที่พบ/หลักฐาน	เอกสารอ้างอิง	ข้อเสนอแนะ
แผนงาน ● มีการพิจารณาลักษณะปัญหาสิ่งแวดล้อมในการดำเนินงานทั้งด้านการใช้ทรัพยากรและมลพิษที่เกิดขึ้น ● มีมลพิษเกิดขึ้นในการดำเนินงาน ● มีการใช้ทรัพยากรที่อาจก่อมลพิษ ● มีระเบียบปฏิบัติงานในการระบุลักษณะปัญหาสิ่งแวดล้อม **วัตถุประสงค์/เป้าหมาย** ● มีการกำหนดวัตถุประสงค์และเป้าหมายในสิ่งแวดล้อมที่สอดคล้องกับลักษณะปัญหาสิ่งแวดล้อม **การจัดการด้านสิ่งแวดล้อม** ● มีแผนงานที่จะทำให้บรรลุวัตถุประสงค์ เป้าหมาย ● มีการมอบหมายความรับผิดชอบแต่ละหน้าที่ที่เกี่ยวข้องภายในองค์กร **การฝึกอบรม** ● มีการจัดฝึกอบรมและให้ความรู้ด้านสิ่งแวดล้อม			

อย่างยิ่ง การบริหารจัดการและการจัดระบบภายในห้องปฏิบัติการจึงเป็นสิ่งที่ผู้รับผิดชอบห้องปฏิบัติการนั้นๆ ควรที่จะคำนึงถึงและดำเนินการปฏิบัติอย่างเร่งด่วน ทั้งนี้เพื่อประโยชน์ในการลดต้นทุน ลดมลพิษและเน้นการใช้ทรัพยากรอย่างคุ้มค่าแล้วยังเป็นการป้องกันมลพิษอันเกิดขึ้นต่อชุมชนและสิ่งแวดล้อม และเพื่อให้การดำรงชีวิตของมนุษย์ทุกคนในสถานที่ทำงานและชุมชนเป็นไปอย่างปลอดภัย และใส่ใจต่อสิ่งแวดล้อม รวมถึงการเตรียมห้องปฏิบัติการให้เข้าสู่มาตรฐานสากล ISO 14000 และ ISO 18000 ได้ต่อไปในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

1. California Environmental Protection Agency : Pollution Prevention Guide For Hospitals. (excluding medical wastes). Dept. of Toxic Substances Control. EPA USA, 1988
2. Hazardous Chemical Waste Management Guidebook.Department of Environmental Health and Safety. University of Minnesota. USA, 1999. http://www.dehs.umnedu/guidebook/guidebook1.html
3. Research and Educational Laboratory Waste Reduction, P2, 1999. Http://www.epa.state.oh.us/opp/fact16.html
4. The University of Tokyo Environmental Science Center. University of Tokyo, Japan, 1993
5. http:/www.kmutt.ac.th
6. คู่มือระบบการจัดการสิ่งแวดล้อม ISO 14001. สถาบันเพิ่มผลผลิตแห่งชาติ พ.ศ. 2541
7. คู่มือการจัดแยกประเภทและจัดเก็บสารเคมีภายในห้องปฏิบัติการ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี ภายใต้โครงการจัดตั้งเครือข่ายศูนย์วิจัยร่วมอุตสาหกรรม-มหาวิทยาลัยด้านการจัดการสิ่งแวดล้อมและวัตถุมีพิษ (IUCRC) โดยการสนับสนุนจากสำนักกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) พ.ศ. 2542
8. คู่มือการจัดแยกประเภทและจัดเก็บของเสียภายในห้องปฏิบัติการ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี ภายใต้โครงการจัดตั้งเครือข่ายศูนย์วิจัยร่วมอุตสาหกรรม-มหาวิทยาลัยด้านการจัดการสิ่งแวดล้อมและวัตถุมีพิษ (IUCRC) โดยการสนับสนุนจากสำนักกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) พ.ศ. 2542
9. คู่มือการบำบัดของเสียภายในห้องปฏิบัติการ : การบำบัดของเสียประเภทโลหะหนักและสารพิษ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี ภายใต้โครงการจัดตั้งเครือข่ายศูนย์วิจัยร่วมอุตสาหกรรม-มหาวิทยาลัยด้านการจัดการสิ่งแวดล้อมและวัตถุมีพิษ (IUCRC) โดยการสนับสนุนจากสำนักกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) พ.ศ. 2542
10. คู่มือการใช้ฐานข้อมูลในการบริหารจัดการสารเคมีภายใน มจธ. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี ภายใต้โครงการจัดตั้งเครือข่ายศูนย์วิจัยร่วมอุตสาหกรรม-มหาวิทยาลัยด้านการจัดการสิ่งแวดล้อมและวัตถุมีพิษ (IUCRC) โดยการสนับสนุนจากสำนักกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) พ.ศ. 2542

บทความทั่วไป

รังสีโปรตอนคืออะไร ?
What is Proton Beam ?

สุมาลัย วังวรรณรัตน์*

เมื่อวันที่ 22 มิถุนายน 2543 หนังสือพิมพ์เดลินิวส์ลงข่าวเกี่ยวกับ "หมอรังสีต้านซื้อเครื่องโปรตอนฉายรังสี"[1] ซึ่งโครงการดังกล่าวตั้งงบประมาณไว้หลายพันล้านบาท ทำให้หลายๆ ท่าน รวมถึงผู้อยู่ในวิชาชีพที่เกี่ยวข้องตกใจกับจำนวนเงินดังกล่าว เนื่องจากขณะนี้ภาวะเศรษฐกิจของประเทศยังไม่เอื้ออำนวยมากนัก จึงทำให้มีเสียงวิพากษ์วิจารณ์ต่างๆ นานา ผู้เขียนเองรู้สึกกังวล จึงพยายามค้นคว้าหาความรู้ และได้เขียนบทความนี้ เพื่อให้ท่านที่สนใจมีข้อมูลไว้ใช้ศึกษาต่อไป

รังสีบำบัดเป็นวิธีการหนึ่งในหลายๆ วิธี เช่น การผ่าตัด เคมีบำบัด ภูมิคุ้มกันบำบัด สำหรับรักษาเนื้องอก อาจเป็นเนื้องอกธรรมดา (Benign tumor) หรือ มะเร็ง (Malignant tumor) จุดประสงค์หลักของการใช้รังสี คือ ต้องการทำลายเฉพาะเนื้องอกและหลีกเลี่ยงเนื้อเยื่อปกติ เพื่อไม่ให้เกิดอาการแทรกซ้อนต่างๆ ตั้งแต่แรกเริ่มจนถึงปัจจุบัน รังสีบำบัดที่ใช้ส่วนใหญ่เป็นรังสีโฟตอน (Photon) ได้แก่ รังสีเอกซ์และรังสีแกมมา เมื่อฉายรังสีดังกล่าวผ่านร่างกาย ปริมาณรังสีจะลดลงแบบ Exponential ตามความลึก[2] คือ ทุกๆ ส่วนของร่างกายตามระยะทางที่รังสีผ่านจะได้รับรังสีตลอด ส่วนที่อยู่ตื้นกว่าก้อนเนื้องอกจะได้รับรังสีสูงกว่าและเนื้อเยื่อที่อยู่ลึกกว่าก็ยังคงได้รับรังสีอยู่ นอกจากนี้การเกิด Internal scatter ของรังสีโฟตอนมีค่อนข้างมาก ทำให้เนื้อเยื่อปกติที่อยู่รอบๆ ก้อนมะเร็งได้รับรังสีไปด้วย[2] ต่อมามีการนำเอารังสีอิเล็กตรอนมาใช้ จาก Depth dose curve จะเห็นว่าตรงบริเวณผิวหรือส่วนที่ตื้นกว่าเนื้องอก คงได้รับปริมาณรังสีสูงแต่ส่วนที่ลึกกว่าได้รับรังสีน้อยมาก อย่างไรก็ตามอาการแทรกซ้อนเนื่องจากการใช้รังสีทั้งสองชนิดยังคงเป็นปัญหาอยู่ นอกจากนี้รังสีดังกล่าวเป็นชนิด Linear Energy Transfer ต่ำ (Low LET) ซึ่งใช้รักษาเนื้องอกที่เป็น Hypoxic cell ไม่ได้ผลดี จึงมีการนำเอารังสีที่มี LET สูง เช่น อนุภาคนิวตรอนมาใช้ แต่เนื่องจากการใช้นิวตรอนยังคงมีปัญหาเกี่ยวกับปริมาณรังสีที่ผิวและวิธีการควบคุมปริมาณรังสีค่อนข้างยุ่งยาก จึงไม่เป็นที่นิยมเท่าที่ควร ต่อมามีการนำเอารังสีโปรตอนมาใช้ ซึ่งจากลักษณะของ BRAGG Peak ใน Depth dose curve (รูปที่ 1) ทำให้มองเห็นแนวทางการรักษาและสามารถแก้ปัญหาอาการแทรกซ้อน อันไม่พึงประสงค์นั้นได้ทำให้ผู้ป่วยมีอัตรารอดชีวิตสูงขึ้น คุณภาพชีวิตที่ดีขึ้น รวมถึงไม่ต้องเสี่ยงกับการผ่าตัด จึงเป็นที่มาของความต้องการเครื่องฉายรังสีโปรตอนดังกล่าว

ประวัติความเป็นมา

หลังสงครามโลกครั้งที่ 2 กลุ่มนักวิทยาศาสตร์และนักฟิสิกส์ในโครงการแมนฮัตตัน

* ภาควิชารังสีเทคนิค คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

(Manhattan Project) ได้พัฒนาเครื่องเร่งอนุภาคให้มีพลังงานสูงขึ้น เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ทางด้านเวชศาสตร์นิวเคลียร์ทั้งการวินิจฉัยและการบำบัด[3]

ในปี ค.ศ. 1946 Dr. Robert R Wilson นักฟิสิกส์ที่ทำงานเกี่ยวกับการพัฒนาเครื่องเร่งอนุภาค หลังจากศึกษาคุณสมบัติของโปรตอนแล้ว ได้คาดการณ์และรายงานไว้ว่า ลักษณะการกระจายปริมาณรังสีโปรตอนเหมาะสำหรับนำไปใช้รักษามะเร็ง[3] ต่อมาใน ปี ค.ศ. 1954 ที่ห้องปฏิบัติการ Lawrence Berkeley เริ่มมีการติดตั้งเครื่องฉายรังสีโปรตอนเครื่องแรก เพื่อจุดประสงค์ทางคลินิกโดยเฉพาะ แต่ยังไม่ได้ใช้กับผู้ป่วย และในระยะเวลาต่อมา จึงมีการรักษาผู้ป่วยและผลการรักษาค่อนข้างดี จึงเป็นที่นิยมมากขึ้น ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 สถานที่ติดตั้งเครื่องกำเนิดรังสีโปรตอนชนิดต่างๆ ในที่ใช้รักษาผู้ป่วยของแต่ละประเทศ[4]

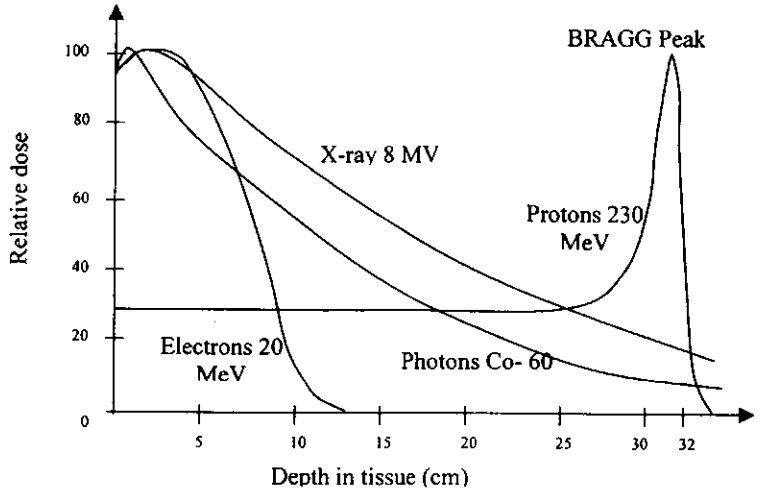
สถานที่	ประเทศ	พลังงานสูงสุดที่ใช้ในการรักษา (MeV)	ระยะความลึกในกล้ามเนื้อตาม ICRU (ซม.)	ทิศทางของลำรังสี	ปีที่ติดตั้ง	จำนวนผู้ป่วยเมื่อเดือนกรกฎาคม 1999
Chiba	Japan	70	4.1	Vertical	1979	96
Nice	France	65	3.6	Horizontal	1989	1,350
Clatter Bridge	UK	62	3.3	Horizontal	1989	817
Villigen	Switzerland	72	4.4	Horizontal	1991	2,753
Vancouver	Canada	72	4.4	Horizontal	1991	47
Louvain - la- Neuve	Belgium	90	6.5	Horizontal	1991	21
Davis CA	USA	60	3.1	Horizontal	1994	214
Berlin	Germany	72	4.4	Horizontal	1998	30
Berkeley CA	USA	340	63.9	Horizontal	1954	30
Uppsala	Sweden	200	26.2	Horizontal	1957	220
Cambridge MA	USA	160	17.9	Horizontal	1961	8,160
Dubna	Russia	200	26.2	Horizontal	1967	125
Moscow	Russia	200	26.2	Horizontal	1969	3,100
St.Petersburg	Russia	1000	328.3	Horizontal	1975	1,029
Tsukuba	Japan	250	38.3	Vertical & Horizontal	1983	606
Loma Linda, CA	USA	250	28.3	Isocentric & Horizontal	1980	4,330
Faure	South Africa	200	26.2	Horizontal	1993	310
Bloomington	USA	200	26.2	Horizontal	1993	9
Orsay	France	200	26.2	Horizontal	1994	1,219
Viligen	Switzerland	230	33.3	Isocentric	1996	20
Kashiwa	Japan	235	34.5	Isocentric & Horizontal	1998	8
Boston MA	USA	235	34.5	Isocentric & Horizontal	2000	*

* ยังไม่ได้เปิดดำเนินการ

จากตารางที่ 1 แสดงแหล่งติดตั้งเครื่องกำเนิดรังสีโปรตอน ในแต่ละประเทศ ปีที่ติดตั้งครั้งแรก พลังงานของโปรตอนซึ่งให้ BRAGG Peak ที่ความลึกต่างๆ และจำนวนผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาด้วยเครื่องฉายรังสีดังกล่าว

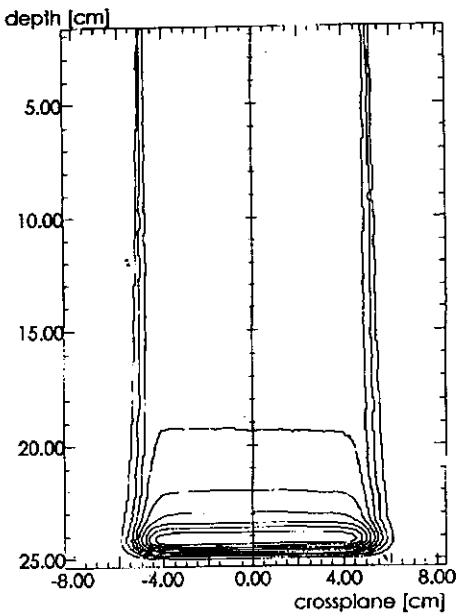
คุณลักษณะของรังสีโปรตอน

โปรตอนเป็นอนุภาคประจุบวกซึ่งเป็นส่วนประกอบของอะตอมไฮโดรเจน และมีมวลประมาณ 1,836 เท่าของอิเล็กตรอน[5] เมื่อถูกเร่งให้มีพลังงานสูงขึ้นในเครื่องเร่งอนุภาค พลังงานสูงจะกลายเป็นรังสีที่ทำให้เกิดการแตกตัว (Ionizing radiation) ซึ่งสามารถทะลุทะลวงเข้าไปในเนื้อเยื่อหรือตัวกลางอื่นๆ ประจุบวกของโปรตอนจะถูกดูดโดยอิเล็กตรอนที่อยู่ในวงโคจรของอะตอมต่างๆ ในร่างกายแล้วทำให้เกิดภาวะกระตุ้น (Excitation) หรือการแตกตัว (Ionization) ขณะเคลื่อนที่ โปรตอนดังกล่าวจะปล่อยพลังงานออกมาตามระยะทางที่ผ่าน แรงดึงดูดระหว่างโปรตอนและอิเล็กตรอนจะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว แต่เนื่องจากโปรตอนดังกล่าวมีพลังงานจลน์มากและวิ่งด้วยความเร็วสูง ขณะที่วิ่งผ่านอะตอม ระยะเวลาที่โปรตอนทำอันตรกิริยากับอิเล็กตรอนในอะตอมสั้นมาก จึงทำให้เกิดการแตกตัวเพียงเบาบาง แต่ก่อนที่จะหยุดเวลาในการทำอันตรกิริยาจะนานขึ้น และเพิ่มการแตกตัวอย่างมากจนถึงจุดที่เรียกว่า BRAGG peak ดังแสดงในรูปที่ 1

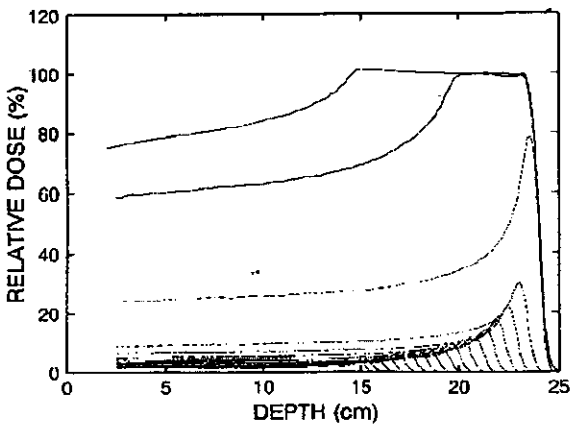


รูปที่ 1 Depth dose curve ของรังสีชนิดต่างๆ[6]

จากรูปที่ 1 จะเห็นว่ารังสีโปรตอนทำอันตรกิริยาน้อยมาก จนกระทั่งใกล้หยุด จะปล่อยพลังงานออกมาอย่างมาก จึงมีการแตกตัวอย่างหนาแน่น จากผลดังกล่าวจะเห็นว่า บริเวณที่อยู่ตื้นกว่าก้อนเนื้องอกจะได้รับปริมาณรังสีน้อยกว่า แต่ถ้ากำหนดให้พลังงานของโปรตอนดังกล่าว มาหยุดตรงเนื้องอกซึ่งเป็นบริเวณเกิดการแตกตัวสูงสุด ก็จะทำให้ได้รับปริมาณรังสีสูงตามต้องการ และเนื้อเยื่อที่อยู่ลึกลงไปได้รับรังสีน้อยมาก ดังแสดงในรูปที่ 2 และ 3[7]



รูปที่ 2 เส้น Isodose ที่ 10% - 90% ของรังสีโปรตอนที่ยังไม่ได้ปรับการกระจายของรังสีจากตัว Modulator



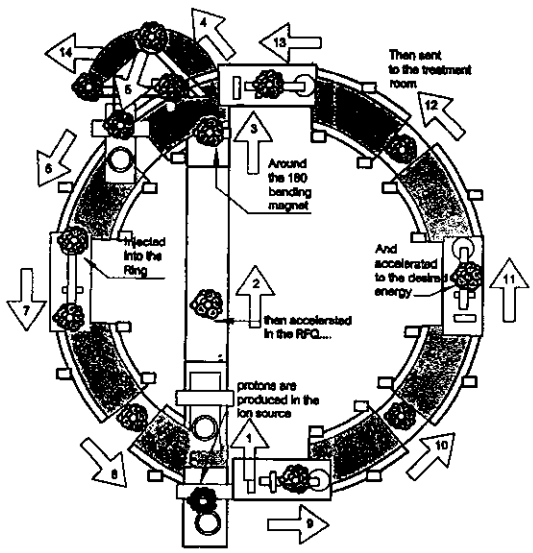
รูปที่ 3 Depth dose curve ของรังสีโปรตอนที่ผ่านการปรับการกระจายของรังสีจากตัว Modulatar แล้ว

จากรูปที่ 3 จะเห็นว่ารังสีโปรตอนที่ผ่านการปรับ (Modulated) แล้ว ทำให้บริเวณของพีคกว้างขึ้น ขณะเดียวกันบริเวณที่ตื้นก็ได้รับรังสีมากขึ้น แต่ส่วนที่ลึกกว่ายังคงไม่เปลี่ยนแปลง

ผลของรังสีโปรตอนจะทำให้เกิดการ Excitation หรือ Ionization ทำนองเดียวกับรังสีโฟตอน กระบวนการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นต่อไปเรื่อยๆ จนเกิดอนุมูลอิสระ (Free radicals) ในที่สุดก็เข้าสู่กระบวนการทำลายเซลล์

เครื่องกำเนิดรังสีโปรตอน

เครื่องกำเนิดรังสีโปรตอนชนิด Synchrotron Accelerator ดังแสดงในรูปที่ 4[8]

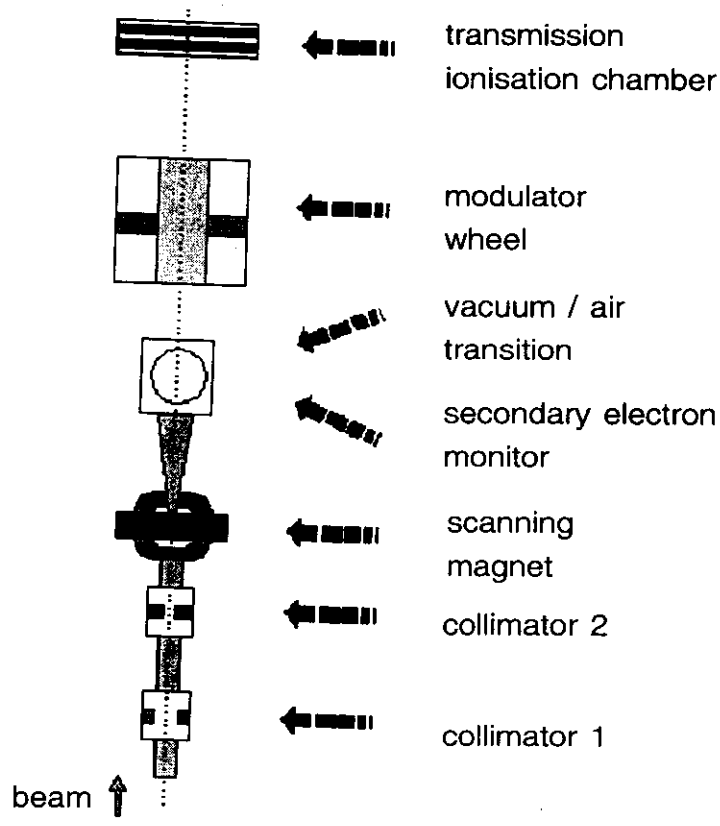


รูปที่ 4 เครื่องกำเนิดรังสีโปรตอนชนิด Synchrotron accelerator

อนุภาคโปรตอนเกิดจากก๊าซไฮโดรเจนในแหล่งกำเนิดอิออน (Ion source) เกิดการแตกตัวให้ไฮโดรเจนอิออนและอนุภาคประจุบวกของโปรตอน อนุภาคโปรตอนถูกบังคับให้เข้าไปในเครื่องเร่งอนุภาคพลังงานสูง (Linear accelerator) โดยมี Radio Frequency Quadrupole (RFQ) เป็นตัวเร่งให้มีพลังงานมากขึ้น แต่ยังคงเป็นโปรตอนพลังงานต่ำมีค่าประมาณ 2 MeV หลังจากผ่านกระบวนการ RFQ แล้วโปรตอนพลังงานต่ำนี้จะถูกยิงเข้าไปใน Synchrotron ซึ่งเป็นเครื่องเร่งอนุภาคแบบวงแหวนโดยมีสนามแม่เหล็กเป็นตัวบังคับ ณ จุดนี้โปรตอนจะถูกเร่งให้มีพลังงานเพิ่มขึ้นอย่างมาก จนกระทั่งประจุดังกล่าวหมุนด้วยความเร็วใกล้เคียงกับความเร็วแสงและมีพลังงานตามที่ต้องการ

และค่อยๆ เบนออกไปจากวงแหวนแม่เหล็ก เข้าสู่ระบบการขนส่งลำรังสี (Beam transport system) ระบบดังกล่าวประกอบด้วยท่อแกนแม่เหล็ก ทำหน้าที่บังคับให้โปรตอนคงมีพลังงานเท่าเดิมและมีความเข้มมากพอที่จะส่งไปตามห้องฉายรังสี จำนวนห้องฉายขึ้นอยู่กับความต้องการใช้งานและงบประมาณ ดังนั้นเครื่องกำเนิดรังสีโปรตอนเพียงเครื่องเดียว สามารถออกแบบให้เลือกใช้ได้หลายๆ ช่วงพลังงานที่ต้องการใช้งาน เพื่อให้เกิด BRAGG Peak ตามความลึกของรอยโรค ขณะเดียวกันจะมีตัว Modulator เป็นตัวกระจายพีค ทำให้ได้รับปริมาณสูงตามพื้นที่ที่กว้างขึ้นดังแสดงในรูปที่ 3

เมื่อลำรังสี (Beam line) จากเครื่องกำเนิดรังสีโปรตอนแยกเข้าตามห้องฉายรังสีจะมีอุปกรณ์ต่างๆ เพื่อช่วยให้ขนาดของรังสีไปยังผู้ป่วยได้ตามที่ต้องการ ดังแสดงในรูปที่ 5[9]



รูปที่ 5 อุปกรณ์ต่างๆ ที่ช่วยปรับลำรังสีในห้องฉายเพื่อให้ได้ลักษณะตามต้องการ

การประยุกต์ใช้ในทางรังสีบำบัด

จุดประสงค์ของรังสีรักษาเพื่อให้ทำลายเซลล์เนื้องอก ดังนั้นปริมาณรังสีที่ให้ต้องสูงถึงขนาดทำลายเซลล์มะเร็งได้ (Cancerocidal dose) ขณะเดียวกัน เนื้อเยื่อปกติต้องได้รับความปลอดภัยด้วย สำหรับรังสีโปรตอนโดยเฉพาะโปรตอนพลังงานเดียวจะมี BRAGG Peak ในบริเวณแคบๆ ซึ่งไม่ครอบคลุมขนาดก้อนเนื้องอก จึงจำเป็นต้องมีตัว Modulator สำหรับปรับกระจายตำแหน่ง BRAGG Peak ทั้งในด้านลึกและกว้าง ขณะเดียวกันโปรตอน

ที่ใช้อาจต้องใช้หลายช่วงพลังงาน พลังงานของโปรตอนที่เหมาะสำหรับในการรักษาโรคอยู่ในช่วง 50-200 MeV[3]

รังสีโปรตอนเหมาะสำหรับก้อนเนื้องอกที่อยู่เฉพาะที่และรู้ขอบเขตแน่ชัด ดังนั้นในการฉายรังสีโปรตอน ต้องคำนึงว่า

- รังสีที่ใช้ต้องกระจายสม่ำเสมอทุกส่วนของก้อนเนื้องอก
- การเลือกช่วงพลังงานของโปรตอนต้องให้เหมาะกับความลึกของเนื้องอก
- ต้องเพิ่มพลังงานของโปรตอนเพื่อให้รังสีกระจายสม่ำเสมอในก้อนเนื้องอกที่มีขนาดใหญ่
- ต้องสามารถกำหนดขอบเขตรอยโรคและเนื้อเยื่อปกติได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ

จากคุณสมบัติของโปรตอน จะเห็นว่ารังสีดังกล่าวเหมาะสำหรับรักษาพวกเนื้องอกชนิดไม่ร้ายแรง มากกว่าพวกมะเร็ง เนื่องจากพวกหลังมักมีการกระจายของโรคค่อนข้างสูง ต้องการการรักษาร่วมกับวิธีอื่นจึงจะได้ผลดี ในการให้ปริมาณรังสีส่วนใหญ่จะเป็นการให้แบบ Fractionation ในระยะแรกการให้ปริมาณรังสีแต่ละครั้งประมาณ 4-5 Gy พบว่า ผู้ป่วยมีอาการแทรกซ้อนค่อนข้างมาก จึงลดปริมาณรังสีลงเป็น 2.5 Gy[5, 10]

รังสีโปรตอนเพิ่งนำมาใช้รักษาผู้ป่วยอย่างจริงจังในช่วงประมาณ 10 ปี นี้เท่านั้น โรคที่นิยมใช้ได้แก่

เนื้องอกธรรมดาขนาดเล็ก (Small benign lesion)

เนื้องอกของตา (Choroid melanoma)

Arteriovenous malformation

มะเร็งต่อมลูกหมากระยะแรก (Prostate cancer in early stage)

มะเร็งที่อยู่ในตำแหน่งลึกๆ เช่น ศีรษะและคอ ปอด ตับและหลอดอาหาร

สรุป

รังสีโปรตอนเหมาะสำหรับใช้รักษาผู้ป่วย โดยเฉพาะพวก Solid tumor สามารถให้ปริมาณรังสีสูงตรงบริเวณรอยโรค และหลีกเลี่ยงอันตรายอันจะเกิดกับเนื้อเยื่อปกติ จึงได้ผลค่อนข้างดีกับเนื้องอกธรรมดา ส่วนพวกมะเร็ง ควรใช้ร่วมกับการรักษาด้วยวิธีอื่น หรือใช้เป็น Booster dose แต่เนื่องจากเครื่องกำเนิดรังสีโปรตอนเป็นอุปกรณ์ที่ต้องใช้เทคโนโลยีชั้นสูง ราคาค่อนข้างแพง ต้องใช้บุคลากรที่มีความรู้ ความสามารถ ดังนั้น ในการนำรังสีโปรตอน เพื่อมาใช้รักษาผู้ป่วย จำเป็นต้องเตรียมความพร้อมทุกๆ ด้าน รวมถึงงบประมาณสำหรับการดูแลรักษาเครื่องมือดังกล่าว

วิจารณ์และเสนอแนะ

ลักษณะ BRAGG Peak ใน Depth dose curve ของรังสีโปรตอน เหมาะสำหรับรักษาโรคที่อยู่เฉพาะพวกเนื้องอกธรรมดามากกว่าพวกมะเร็ง ดังนั้นควรมีการสำรวจจำนวนผู้ป่วยและความคุ้มค่าของการใช้งบประมาณ

เครื่องกำเนิดรังสีโปรตอนส่วนใหญ่มีกำเนิดจากศูนย์วิจัยนิวเคลียร์ฟิสิกส์รังสี มีจำนวนน้อยที่ติดตั้งในโรงพยาบาล ในปี ค.ศ. 1980 ที่ Loma Linda University Medical Center ใน Southern California ได้มีการติดเครื่องฉายรังสีโปรตอนเป็นครื่องแรก หลังติดตั้งเสร็จยังไม่ได้รักษาผู้ป่วย คงอยู่ในระหว่างการศึกษาค้นคว้าวิจัยจนกระทั่งปลายปี ค.ศ. 1990 จึงเริ่มรักษาผู้ป่วย[3] ผลการรักษายังคงอยู่ในระหว่างการติดตาม

งบประมาณที่ใช้ในโครงการสำหรับติดตั้งเครื่องกำเนิดรังสีโปรตอน ต้องคำนึงถึงด้านต่างๆ เช่น ความพร้อมของบุคลากร พื้นที่ และการออกแบบโครงสร้าง เป็นต้น ที่ Texas National Reseach Laboratory Commission for Construction of the

Regional Medial Technology Center (RMTC) ได้รับทุนสำหรับโครงการดังกล่าวประมาณ 65 ล้านดอลลาร์สหรัฐ[11] สำหรับ University of Florida College of Medicine ได้รับเงินอุดหนุนโครงการเป็นเงิน 80 ล้านดอลลาร์สหรัฐ โดยเริ่มติดตั้งในเดือนมกราคม ปี ค.ศ. 2000 คาดว่าอีกประมาณ 3-4 ปี คงใช้งานได้ ในการเริ่มต้นโครงการ ได้ตั้งงบประมาณไว้ 5 ล้านดอลลาร์สหรัฐและระยะต่อมาอีก 6 ล้านดอลลาร์สหรัฐ สำหรับการศึกษาความคุ้มค่าทางเศรษฐกิจ การออกแบบโครงสร้างและการส่งบุคลากรประมาณ 50 คน ไปฝึกอบรมที่ Loma Linda เพื่อให้มีความรู้ความสามารถกลับมารองรับโครงการดังกล่าว[12]

สำหรับประเทศไทย เนื่องจากยังอยู่ในภาวะวิกฤตทางเศรษฐกิจ ขณะเดียวกันผลการรักษาผู้ป่วยยังอยู่ในขั้นตอนการศึกษาวิจัย จึงน่าจะชะลอโครงการไว้ก่อน ขณะเดียวกันน่าจะมีการศึกษาหาข้อมูล และส่งเสริมพัฒนาบุคลากร ให้มีความรู้ความสามารถทันต่อเทคโนโลยีชั้นสูง เพื่อรองรับโครงการในอนาคตเมื่อประเทศพ้นภาวะวิกฤตแล้ว

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณท่านที่ได้ช่วยเหลือด้านต่างๆ จนกระทั่งการเขียนบทความนี้สำเร็จเรียบร้อย ได้แก่ อาจารย์พิรุณ ไชยเชียงพิณ รองคณบดีฯ ที่ได้แนะนำการใช้คอมพิวเตอร์ การจัดแต่งรูปภาพ ต่างๆ คุณนรินทร์ จันทรังศรี วิศวกรประจำคณะฯ ที่ได้ช่วยแต่งภาพ Synchrotron accelerator คุณสร้อยเพชร จรัสศรี ธุรการภาควิชาฯ ที่ได้ช่วยพิมพ์และแนะนำการจัดเรียงจนสำเร็จเรียบร้อย

เอกสารอ้างอิง

1. "หมอรังสีด้านซื้อเครื่องโปรตอนฉายรังสี". 2543. เดลินิวส์. 22 มิถุนายน: 18.
2. Indiana University (Midwest Proton Radiation Institute). 2000. "Proton Therapy." (online). 3 January. Available http://www.iucf.indiana.edu/MPRI/about.htm (10 October 2000).
3. The National Association for Proton Therapy (NAPT). 2000. "Background of Proton Therapy. "(online). 22 March. Available http://www.proton-therapy.org/ (7 November 2000).
4. The National Accelerator Center (NAC) Medical Radiation Group in Africa. 2000. "Proton Therapy Beam Characteristics." (online). 7 February. Available http://www.medrad.nac.ac.za/beam.htm (10 September 2000).
5. University of Tsukuba-Proton Medical Research Center (PMRC). 2000. "What is proton beam?" (online). 22 July. Available http://www-medical.kek.jp/what is Proton E.html (1 October 2000).
6. IBA. "Proton Therapy. "(online). Available http://www.iba.be/product/proton.htm (9 October 2000)
7. The National Accelerator Center (NAC) Medical Radiation Group in Africa. 2000. "Proton Therapy Beam Characteristics. "(online). 7 February. Available http://www.medard.nac.ac.za/beam.htm (10 September 2000).

8. Optivus Technology, Inc. 2000. "The Synchrotron Accelerator." (online). Available http://www.optivus.com/technology/accelerator.html (6 October 2000).
9. Kernfysisch Versneller Institut. 2000. "Description beamline." (online). Available http:///www.kvi.nl/disk$1/protonlib/www/homepage.html (15 October 2000).
10. Tsujii H, Tsuji H, Inada T, *et al.* Clinical results of fractionated proton therapy. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1992; 25: 49-60.
11. Texas Regional Medical Technology Center (RMTC). 1995. "Cancer therapy with a proton beam" (online). July. Available http://www.hep.net/ssc/new/rmtc/ (1 November 2000).
12. Miller C. SunONE (The New York Times Company.) 1999. "Targeting cancer." online). 6 September. Available http://www.sunone.com/news/articles/09-06-99a.shtml (4 November 2000).

บทความทั่วไป

ผลของอนุมูลอิสระต่อความทนทานในการออกกำลังกายในโรคปอดอุดกั้นเรื้อรัง

Free Radicals and Exercise Tolerance in Chronic Obstructive Pulmonary Diseases : COPD

นัฏฐกาล ลีลารุ่งระยับ *

บทนำ

อนุมูลอิสระ (Free radicals) มีส่วนสำคัญทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในระดับใยกล้ามเนื้อลายของผู้ป่วยโรคปอดอุดกั้นเรื้อรัง (Chronic Obstructive Pulmonary Disease: COPD) อนุมูลอิสระเป็นจำนวนมาก เกิดได้จากหลายสาเหตุ ได้แก่ ภาวะขาดออกซิเจน (Hypoxia) การทำงานของระบบหายใจและหัวใจล้มเหลว (Respiratory and Cardiac failure) รวมทั้งการจะทำให้ทราบผลกระทบจากการออกกำลังกายในระดับสารชีวเคมี การฟื้นฟูสมรรถภาพผู้ป่วย (Rehabilitation program) เพื่อจะได้ปรับประยุกต์การออกกำลังกายให้ความเหมาะสม ป้องกันการเกิดอนุมูลอิสระมากเกินไปและส่งเสริมสมรรถภาพความแข็งแรงและทนทานของร่างกาย โดยสามารถติดตามการเปลี่ยนแปลงผู้ป่วยได้อย่างต่อเนื่องและปลอดภัย

โปรแกรมการฟื้นฟูสมรรถภาพผู้ป่วยโรคปอดอุดกั้นเรื้อรัง ประกอบด้วย การออกกำลังกายเป็นสำคัญ ทั้งในระยะที่ผู้ป่วยกำลังหย่าเครื่องช่วยหายใจ หรือช่วงหลังหย่าเครื่องช่วยหายใจและกำลังฟื้นสภาพร่างกาย โดยนักกายภาพบำบัด ปัญหาส่วนใหญ่คือ ผู้ป่วยมีความทนทานน้อย (Exercise intolerance) ทำให้ผู้ป่วยไม่สามารถหยุดใช้เครื่องช่วยหายใจหรือเดินได้ไม่ไกล มีสาเหตุหลายปัจจัย แต่ที่พบบ่อยคือ เกิดจากปัญหาของอวัยวะสำคัญ ได้แก่ ปอด หลอดเลือด ส่วนปลายหรือหัวใจทำงานล้มเหลว ดังนี้ [1]

1. ระบบการทำงานของหัวใจล้มเหลว (Cardiac failure) ได้มีการพบว่าผู้ป่วยปอดอุดกั้นเรื้อรัง (COPD) จะมีภาวะความดันโลหิตสูง อันเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อที่ผนังถุงลมและหลอดเลือดฝอยภายในปอด

2. ระบบการทำงานของปอดล้มเหลว (Respiratory failure) เกิดจากความบกพร่องในการแลกเปลี่ยนก๊าซระหว่างถุงลมกับผนังหลอดเลือดฝอย

3. การเปลี่ยนแปลงของกล้ามเนื้อหายใจและกล้ามเนื้อลายอื่นๆ เกิดจากภาวะการขาดออกซิเจน มีสารอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้น ขาดสาร

* ภาควิชากายภาพบำบัด คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

อาหารจำเป็น ติดเชื้อในร่างกาย ได้รับยา หรือการนอนนานๆ ใยกล้ามเนื้อจะมีการเปลี่ยนแปลงทำให้หดตัวและคลายตัวไม่มีประสิทธิภาพ นอกจากนี้ ภาวะแทรกซ้อนต่างๆ ได้แก่ เบาหวาน ไตเรื้อรัง หรือตับอักเสบ จะมีผลให้ความทนทานในการออกกำลังกายลดลง พบว่าประสิทธิภาพในการหดตัวและคลายตัวของกล้ามเนื้อ ทั้งกล้ามเนื้อหายใจ กล้ามเนื้อหัวใจหรือกล้ามเนื้อลายส่วนปลายลดลง เนื่องจากผู้ป่วยมีการเปลี่ยนแปลงของใยกล้ามเนื้อต่างๆ และกระบวนการเมตาบอลิสมของกล้ามเนื้อ โดยเฉพาะการเปลี่ยนแปลงของระดับสารที่เป็นอนุมูลอิสระและความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระบกพร่อง ซึ่งมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อความทนทานหรือต่อการทำงานของเซลล์กล้ามเนื้อ

การเปลี่ยนแปลงของกล้ามเนื้อ
(Muscular alternation)

ใยกล้ามเนื้อประกอบด้วย Fiber type I, IIa, IIb และ Type IIb/x ในภาวะปกติ แต่ละชนิดมีคุณสมบัติและลักษณะแตกต่างกันไปดังนี้คือ

- Fiber type I เป็นชนิดหดตัวช้า (Slow twitch) ทนต่อแรงตึงน้อยและสามารถสลายสารต่างๆ เพื่อให้ได้พลังงานโดยอาศัยออกซิเจน(Aerobic pathway) เป็นหลัก ส่วนกระบวนการสลายโดยไม่อาศัยออกซิเจน (Anaserobic pathway) เกิดน้อยมาก ทำให้มีการคั่งของกรดแลคติกน้อย จึงเกิดการล้าได้ช้ากว่า

- Fiber type IIb/x เป็นชนิดหดตัวได้เร็ว (Fast twitch) แต่ทำให้เกิดการล้าได้ง่ายมาก จากการคั่งของกรดแลคติกในกระบวนการสลายพลังงานแบบไม่ใช้ออกซิเจน

- Fiber type IIa เป็นใยกล้ามเนื้อมีคุณสมบัติในการหดตัวไม่เร็วหรือช้าเกินไป สามารถสลายพลังงานทั้งแบบใช้ออกซิเจนและไม่ใช้ออกซิเจน

ส่วนใยกล้ามเนื้อในผู้ป่วยโรคปอดอุดกั้นเรื้อรังจะมีการเปลี่ยนแปลงหลายอย่างด้วยกันได้แก่

- มีปริมาณของ Fiber type I น้อยและมีชนิด type II มากกว่าในคนปกติ เกิดจากมีการเปลี่ยนแปลง Fiber type I ไปเป็นชนิด type II การศึกษาปริมาณของใยกล้ามเนื้อดังกล่าวในกล้ามเนื้อกะบังลม (diaphragm) พบว่ามีสัดส่วนดังนี้

Fiber type I	50 %
Fiber type IIa	25 %
Fiber type IIb/x	25 %

รวมทั้งใยกล้ามเนื้อในกล้ามเนื้อ External และ Internal intercostal muscle จะมีสัดส่วนของใยกล้ามเนื้อชนิดแรก (Type I) ในปริมาณน้อยลงประมาณ 46-48% แต่มีงานวิจัยในผู้ป่วย COPD ที่มีภาวะหัวใจวายเรื้อรัง (Chronic heart failure) จะมีการเปลี่ยนของใยกล้ามเนื้อจาก Type IIb/x ไปเป็น Type I มากขึ้นที่กล้ามเนื้อกะบังลม และที่กล้ามเนื้อลายจะมีการเปลี่ยนของใยกล้ามเนื้อtype I ไปเป็น Type IIb/x มากขึ้น

ดังนั้นในกล้ามเนื้อลายทั่วไปที่มีใยกล้ามเนื้อ Type IIb/x มากขึ้น จะทำให้มีการเกิดกระบวนการ Glycolytic pathway และ Oxidative capacity ลดลง ทำให้กล้ามเนื้อล้าได้ง่ายขึ้น ในขณะเดียวกันการที่กล้ามเนื้อกะบังลมมีปริมาณใยกล้ามเนื้อ Type I มากขึ้นจะทำให้กล้ามเนื้อมีการล้าได้ยาก แต่ความแข็งแรงของกล้ามเนื้อลดลง

เมตาบอลิสมในกล้ามเนื้อ
(Muscle metabolism)

ในการศึกษาเมตาบอลิสมในกล้ามเนื้อสามารถศึกษาจากการเปลี่ยนแปลงสารต่างๆ ตั้งแต่สารตั้งต้น ได้แก่ Glycogen หรือ Glucose

หรือสารตัวอย่างที่เกิดขึ้นที่มีคุณสมบัติในการให้พลังงานต่างๆได้แก่ Adenosine triphosphate (ATP), Creatine phosphate (CrP), Nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) หรือผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการสลายสารดังกล่าวได้แก่ Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD^+), Adenine monophosphate (AMP), Inorganic phosphate (Pi) หรือกรดแลคติกที่เกิดขึ้น

นอกจากสารนี้ ยังศึกษาได้จากการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในขบวนการเมตาบอลิสมในวงจรสำคัญต่างๆของกล้ามเนื้อ เช่น Glycolysis, Kreb's cycle หรือ Beta-oxidation ได้แก่

- Hexokinase, Phosphofructokinase ในกระบวนการ Glycolysis
- Citrate synthase, Succinate dehydrogenase ในกระบวนการ Kreb's cycle
- Hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (HAD) ในกระบวนการ Beta-oxidation

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของปริมาณสารดังกล่าวในผู้ป่วย COPD ในขณะออกกำลังกาย[2-3] พบว่าสัดส่วนของ Inorganic phosphate (Pi) ต่อ Creatine phosphate (CrP) เพิ่มขึ้นในกล้ามเนื้อน่องเช่นเดียวกับในกล้ามเนื้อแขน[4-5] และระยะเวลาในการสร้าง Creatine Phosphate ให้เพิ่มขึ้นเท่าเดิมหลังการออกกำลังกายในผู้ป่วย COPD ใช้ระยะเวลานานกว่าคนปกติ [2,4-6]

ส่วนการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์ พบว่าในขณะออกกำลังกายจะมีการเพิ่มการทำงานของ Citrate syntahse (CS), Beta-hydroxyacyl CoA dehydrogenase[7-8], Succinate dehydrogenase, Lactate dehydrogenase (LDH)[8], Hexokinase[9] ลดลง และส่วนการทำงานของ Cytochrome-c oxidase (COX)[10], Phosphofructokinase (PFK) เพิ่มขึ้น

ปัจจัยที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของใยกล้ามเนื้อ

มีปัจจัยหลายประการ ที่เป็นภาวะแทรกซ้อนของโรคปอดโดยตรงมีผลทำให้ใยกล้ามเนื้อมีการเปลี่ยนแปลงได้ในผู้ป่วยโรค COPD สรุปปัจจัยหลักได้ดังนี้

1. การขาดออกซิเจน (Hypoxia)

เนื่องจากในผู้ป่วย COPD จะมีการนำออกซิเจนไปยังกล้ามเนื้อต่างๆ ลดลง ทำให้มีการปรับสภาพของกล้ามเนื้อ โดยทำให้มีจำนวนไมโต ดอนเดรียและเอนไซม์ต่างๆ รวมทั้งการสังเคราะห์โปรตีนภายในกล้ามเนื้อลดลง[11-13] นอกจากนี้แล้วยังพบว่าการขาดออกซิเจนจะทำให้มีการเปลี่ยนแปลงของ Glycolytic pathway[14] เช่น ทำให้การทำงานของเอนไซม์ Malate dehydrogenase และ Citric acid cycle enzyme ลดลง เช่นเดียวกันพบว่าการขาดออกซิเจนทำให้มีการเพิ่มการขนส่งน้ำตาลเข้าสู่ภายในเซลล์เพิ่มขึ้น โดยผ่าน Glucose transporter-1 (GLUT1) และ Glucose transporter-4 (GLUT4)[15]

2. การเกิดภาวะออกซิเดชั่น (Oxidative Stress)

อนุมูลอิสระ (Free radicals) มีผลไปทำลายเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อได้โดยตรง โดยเกิดไปสลายไขมันบริเวณเซลล์ที่เรียกว่า Lipid peroxidation[16] แหล่งสำคัญในการผลิตอนุมูลอิสระคือไมโตคอนเดรียร่วมกับมี Electron transport ที่เยื่อไมโตคอนเดรีย[17] หรืออาจเกิดจาก Monocytes และ Macrophage มีการปล่อย สารที่เรียกว่า Tumor necrotic factor (TNF-α)[18] เพิ่มขึ้นในผู้ป่วย COPD[19-20] มีผลต่อกระบวนการทำลายเซลล์ที่เรียกว่า Apoptosis ได้ รวมทั้งภาวะในร่างกายมีสารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidants) ลดลง[17] ได้แก่ Superoxide dismutase (SOD), Glutathione peroxidase , Catalase ทำงานไม่มีประสิทธิภาพหรือสารต้านอนุมูลอิสระได้แก่ Glutathione, Vitamin E, Caro-

tene หรือ Vitamin C มีปริมาณลดลง ทำให้กลไกการลดปริมาณอนุมูลอิสระในเซลล์ลดลง แต่มีหลักฐานแสดงผลของการออกกำลังกายจะช่วยทำให้เซลล์มีการปรับตัว เพื่อลดอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นได้ [17,21]

อนุมูลอิสระจากอะตอมของออกซิเจน (Reactive oxygen species) สามารถทำลายไขมันและโปรตีน[17,21-22] โดยเฉพาะที่เยื่อไมโตคอนเดรีย ทำให้เสียสภาพการผ่านเข้าออกของสารต่างๆ ผนังเซลล์ รวมทั้งไปทำลายโปรตีนที่ผนังเซลล์ หรือเกิด Protein oxidation ที่ Carbonyl group ของกรดอะมิโนในโปรตีน ทำให้รูปร่างและการทำงานผิดปกติไป[23] โดยเฉพาะโปรตีนที่ไมโตคอนเดรีย[24] ทำให้มีการคั่งของแคลเซียม (Calclium) ทำให้ขบวนการ Uncouple oxidative phosphorylation บกพร่อง ไปไม่สามารถผลิตพลังงานได้ และส่งสัญญาณทำให้เกิดการตาย (Apoptosis) ได้[25]

3. การไม่ได้ใช้ (Disuse)

การที่ผู้ป่วย COPD ไม่ได้มีการเคลื่อนไหว จะทำการทำงานของเซลล์ประสาท (Motor neuron) และกล้ามเนื้อลีบเล็ก (Wasting)[26] และทำให้จะมีการลดจำนวนของใยกล้ามเนื้อชนิด Type I และมีปริมาณชนิด Type IIb/x มากขึ้น รวมทั้งขนาดของกล้ามเนื้อเล็กลง รวมทั้งเอนไซม์เกี่ยวกับ Oxidative pathway ทำงานลดลง

4. การได้รับยา (Medication)

การได้รับยาชนิด Steroid นานๆ จะมีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเมตาบอลิสมภายในกล้ามเนื้อลาย ได้แก่ การสังเคราะห์โปรตีนลดลง รวมทั้งยาที่เป็น Corticosteoid จะกระตุ้นให้มีการขนส่งกรดอะมิโนออกนอกกล้ามเนื้อมากขึ้น[27] จากการศึกษาในหนูทดลอง[28] ที่ได้รับยา Steroid พบว่าในกล้ามเนื้อกะบังลมจะมีปริมาณใยกล้ามเนื้อชนิด Type IIb/x มากขึ้น

5. ภาวะขาดสารอาหารและการอักเสบ (Nutrition depletion & inflammation)

การขาดสารอาหารจะพบได้บ่อยมากในผู้ป่วย COPD[29] สามารถวัดได้จากปริมาณไขมัน Fat mass (FM) ที่ลดลง ส่วนหนึ่งเกิดจากการที่ได้รับอาหารได้น้อย แต่ร่างกายต้องการพลังงาน เพื่อใช้ในการหายใจมากขึ้น[31-32] ทำให้ร่างกายมีการสลายโปรตีนในกล้ามเนื้อ เพื่อนำมา สลายเป็นพลังงานให้มากขึ้น ผลทำให้มีน้ำหนักลด และกล้ามเนื้อฝ่อลีบ เช่นเดียวกับการทำงานของเอนไซม์ Succinate dehydrogenase, Hydroxy-acyl Co-A dehydrogenase[32-33] และ Phosphofructokinase[33] ลดลง โดยที่กลไกการทำลายของโปรตีนในสัตว์ทดลองเกิดจากการกระตุ้นโดย TNF-(34 ทำให้เกิด Apoptosis

การออกกำลังกาย (Exercise training)

โดยทั่วไปแล้ว การออกกำลังกายช่วยทำให้กล้ามเนื้อมีการหดตัวและคลายตัวได้ดีขึ้น ทำให้เพิ่มความแข็งแรงและทนทานได้ โดยเฉพาะในกลุ่มผู้ป่วย COPD[35-36] โดยมีการเปลี่ยนแปลงในระดับสารชีวโมเลกุลดังนี้

- ขนาดของใยกล้ามเนื้อเพิ่มขึ้น เอนไซม์ต่างๆทำงานเพิ่มขึ้น เช่นการกำลังกายแบบใช้ออกซิเจน กระตุ้นให้ร่างกายมีการเพิ่มปริมาณเอนไซม์ที่ช่วยต้านอนุมูลอิสระเช่น Superoxide dismutase (SOD)[37] และช่วยทำให้มีปริมาณกรดแลคติกคั่งในเลือดลดลง[38]
- ปริมาณ Creatine phosphate เพิ่มขึ้นและปริมาณ Inorganic phosphate ลดลง[39]
- ทำให้ร่างกายมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้น เช่นทำให้ Lipid Peroxidation ลดลงได้[40] โดยสามารถประเมินได้จาก Ethane จากลมหายใจออกหรือวัดจากปริมาณของ Malon-

dialdehyde (MDA) ในพลาสมา โดยพบว่าในผู้ป่วยประเภทอื่นๆ เช่นโรคหัวใจ การฟื้นฟูสมรรถภาพร่างกายด้วยการออกกำลังกายเบาๆ เพื่อป้องกันการเกิดอนุมูลอิสระมากเกินไป ทำให้เพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของร่างกายได้ โดยที่ไม่พบสาร Ethane และ Pentane รวมทั้งมีปริมาณของ Malondialdehyde ลดลง

สำหรับผลการฝึกต่อการเปลี่ยนแปลงของกล้ามเนื้อกะบังลม ยังไม่มีข้อมูลเพียงพอ เนื่องจากมีการศึกษาน้อยมาก แต่จากชนิดของใยกล้ามเนื้อชนิด type IIb/x ที่มีความแข็งแรงน้อย จึงควรเน้นการฝึกเพื่อเพิ่มความแข็งแรง มากกว่าการฝึกเพิ่มความทนทาน และ การออกกำลังกายจะเป็นส่วนช่วยในการควบคุม[41] เอนไซม์เพื่อต้านอนุมูลอิสระได้ แต่ขึ้นอยู่กับระดับการเกิด Oxidative stress, ภาวะอ่อนล้า, ระดับ Glutathione และอายุ

การให้สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidants)

ในการออกกำลังกายหลายแบบ ได้มีการแนะนำให้รับประทานสารอาหารเสริมที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ[42] เพื่อทำให้สมดุลของปฏิกิริยารีดอกซ์โดยในกล้ามเนื้ออาจใช้เป็นกลไกการป้องกันเสริมในร่างกาย โดยที่ปกติแล้วในร่างกายมีสารต้านอนุมูลอิสระในระดับหนึ่ง ทั้งสารที่เป็นเอนไซม์และไม่ใช่เอนไซม์ที่สำคัญ ได้แก่ GSH peroxidase (GPX), และ Catalase จะช่วยในการขจัดอนุมูลอิสระ Superoxide radicals, H_2O_2 และ Organic hydroperoxides ส่วนชนิดที่ไม่ใช่เอนไซม์ได้แก่ วิตามินอี วิตามินซี กลูตาไธโอน หรือ Ubiquinone ส่วนอาหารเสริม เช่น น้ำนมถั่วเหลือง มีฤทธิ์ในต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidants) เพราะมีสารประกอบของ Isofavonoids หรือ Phytochemicals นั่นเอง[43]

แม้ว่าการออกกำลังกายแบบใช้ออกซิเจน[37] จะกระตุ้นให้ร่างกายมีการเพิ่มปริมาณเอนไซม์ที่ช่วยต้านอนุมูลอิสระเช่น SOD ก็ตาม แต่การได้รับวิตามินซี และวิตามินอี จะมีส่วนช่วยลดการเกิด Lipid peroxidation จากการออกกำลังกายได้ และยังพบว่าวิตามินอี ยังช่วยลดปริมาณ Neutrophils ได้ และยังเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ Creatine kinase โดยเฉพาะได้มีการศึกษาในผู้ที่ฝึกอย่างหนักติดต่อกันนาน 2 สัปดาห์[44] พบว่าการทำงานของเอนไซม์ Crea tine kinase สูงขึ้น ภายหลังออกกำลังกาย 6, 24, 48 ชั่วโมง และยังช่วยซ่อมแซมกล้ามเนื้อได้

การให้ออกซิเจน (Oxygen therapy) ในปริมาณต่ำ ขณะให้การออกกำลังกายสำคัญ ช่วยทำให้ผู้ป่วยออกกำลังกายได้นานขึ้น[45-46] โดยที่จะมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงในระดับสารชีวโมเลกุล มีข้อมูลจากการศึกษาน้อยมาก เช่น ช่วยทำให้อาการหอบเหนื่อย (Dyspnea) ลดลง[45] ลดอาการหายใจลำบาก (Breathlessness)[47] และยังสามารถปรับ Oxidative metabolism ให้มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น[3] จากปริมาณของ Creatine phosphate ที่เพิ่มขึ้นและปริมาณ Inorganic phosphate ลดลง[48] ภายหลังให้ออกซิเจนเป็นเวลา 6 เดือน ร่วมกับการออกกำลังกาย พิษของออกซิเจน (Oxygen toxicity) ที่เนื้อเยื่อปอด ในขณะที่ผู้ป่วยได้รับยังไม่มีข้อมูลที่ชัดเจน

ดังนั้นจะเห็นว่าการออกกำลังกาย ถึงแม้จะมีข้อมูลที่แสดงถึงการส่งเสริมให้เกิดอนุมูลอิสระ แต่พบว่ามีประโยชน์ทั้งในระดับสารชีวโมเลกุลและในระดับการทำงานของเอนไซม์ แต่เนื่องจากโปรแกรมในการออกกำลังกายต่อการเปลี่ยนแปลงนี้ส่วนใหญ่เป็นการศึกษาในคนปกติและผู้ป่วยโรคหัวใจ ความหนัก-เบาในการออกกำลังกายเฉพาะบุคคลจึงเป็นปัญหาสำคัญ โดยเฉพาะในกลุ่มผู้ป่วยโรค COPD ซึ่งมีปัจจัยส่งเสริมให้เกิดอนุมูลอิสระมาก

ทั้งการขาดออกซิเจน การขาดสารอาหารหรือการได้รับยาต่างๆ ดังนั้นความหนัก-เบาในการออกกำลังกายจึงควรเหมาะสมและถูกต้องสำหรับผู้ป่วยแต่ละราย เพื่อป้องกันไม่ให้ร่างกายมีการสร้างอนุมูลอิสระมากเกินไป ซึ่งต้องการงานวิจัยหรือรายงานถึงความหนัก-เบากับการเปลี่ยนแปลงของภาวะออกซิเดชั่นในร่างกายในระดับสารชีวเคมีอย่างมาก อย่างไรก็ผู้เขียนเอง มีความคิดเห็นว่า " โปรแกรมการออกกำลังกาย ไม่ควรหนักเกินไป แต่ไม่น้อยเกิน เพื่อให้มีการกระตุ้นการผลิตเอนไซม์ การนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์ ตลอดจนทำให้กล้ามเนื้อมีการปรับโครงสร้างเซลล์ใหม่ เพื่อให้มีสภาพต้านอนุมูลอิสระได้มากขึ้น ซึ่งอาจทำให้ผู้ป่วยมีความทนทานต่อการออกกำลังกายได้นานขึ้น โดยเฉพาะกล้ามเนื้อหายใจและกล้ามเนื้อลายทั่วไปและควรมีการศึกษาวิจัยเพิ่มเติม"

เอกสารอ้างอิง

1. Wood PH. Appreciating the consequences of disease: the international classification of impairments, disabilities, and handicaps. WHO Chron 1980; 34: 376-8.
2. Wuyam B, Payen JF, Levy P, et al. Metabolism and aerobic capacity of skeletal muscle in chronic respiratory failure related to chronic obstructive pulmonary disease. Eur Respir J 1992; 5: 157-62.
3. Payen JF, Wuyam B, Levy P, et al. Muscular metabolism during oxygen supplementation in patients with chronic hypoxemia. Am Rev Respir Dis 1993; 147: 592-73.
4. Kutsuzawa T, Shioya S, Kurita D, Haida M, Ohta T, Yamabayashi H. ^{31}P NMR study of skeletal muscle metabolism in patients with chronic respiratory impairment. Am Rev Respir Dis 1992; 146: 1019-24.
5. Tada H, Kato H, Misawa T, et al. ^{31}P-nuclear megnetic resonance wvidnece of abnormal skeletal metabolism in patients with chronic lung disease and congestive heart failure. Eur Respir J 1992; 5: 163-9.
6. Mancini DM, Coyle E, Coggan A, et al. Contribution of intrinsic skeletal muscle changes to 31P-NMR skeletal muscle metabolic abnormalities in patients with chronic heart failure. Circulation 1989; 80: 1338-46.
7. Maltais F, Simard AA, Simard C, Jobin J, Desgagners P, LeBlanc P. Oxidative capacity of the skeletal muscle and lactic acid kinetics during exercise in normal subjects and in patients with COPD. Am J Respir Crit Care Med 1996; 153: 288-93.
8. Jakobsson R, Jorfeldt L, Henrisksson J. Meabolic enzyme activity in the quadriceps femoris muscle in patients with severe chronic obstructive pulmonary disease. Am J Respir Crit Care Med 1995; 151: 374-7.
9. Sanchez J, Bastien C, Medrano G, Riquet M, Derenne JP. Metabolic enzymatic activities in the diaphragm of normal men and patients with moderate chronic obstruvtive pulmonary disease. Bull Eur Physiopathol Respir 1984; 20: 535-40.

10. Sauleda J, Garcia-Palmer F, Wiesner RJ, et al. Cytochrome oxidase activity and mitochondrial gene expression in skeletal muscle of patients with chronic obstructive pulmonary disease. Am J Respir Crit Care Med 1998; 157: 1413-7.
11. Peedy VR, Smith Dm, Sugden PH. The effects of 6 mon hours of hypoxia on protein synthesis in rat tissues in vivo and in vitro. Biochem J 1985; 228: 179-85.
12. Miley JR. Protein synthesis during hypoxia in fetal lambs. Am J Physiol 1987; 252: E519-24.
13. Kwast KE, Hand SC. Acute depression of mitchrondrial protein synthesis during anoxia: contributions of oxygen sensing, matrix acidification, and redox state. J Biol chem 1996; 271: 7313-9.
14. Takahashi H, Kikuchi K, Nakayama H. Effect of chronic hypoxia on oxidative enzyme activity in rat skeletal muscle. Ann Physiol Anthropol 1993; 12: 363-9.
15. Jone Jared P, Edward B, Lynis Louise, et al. Regulation of glucose transporters glut4 and glut1 gene transcription in denervated skeletal muscle. Oklahoma, 1998.
16. Rahman I, Morriou D, Donaldson K, MacNee W. Systemic oxidative stress in asthma, COPD, and smokers. Am J Respir Crit Care Med 1996; 154: 1055-60.
17. Ji LL. Exercise, oxidative stress, and antioxidants. Am J Sport Med 1996; 24: S20-4.
18. Buck M, Chojkier M. Muscle wasting and dedifferentiation induced by oxidative stress in a murine of cachexia is prevented by inhibitors of nitric oxide synthesis and antioxidants. EMBO J 1996; 15: 1753-65.
19. de Godoy I, Donahoe M, Calhoun WJ, Mancino J, Rogers RM. Elevated TNF-α production by peripheral blood monocytes of weight-losing COPD patients. Am J Respir Crit Care Med 1996; 153: 633-7.
20. Di Francia M, Barbier D, Mege JL, Orehek J. Tumor necrosis factor-α levels and weight loss in chronic obstructive pulmonary disease.Am J Respir Crit Care Med 1994; 150: 1453-5.
21. Clarkson PM. Antioxidants and physical performance. Crit Rev Food Sci Nutr 1995; 35: 131-41.
22. Haramaki N, Packer L. Oxidative stress indices in exercise. In: Sen KC, Packer L, Hanninen O (eds). Exercise and oxygen toxicity. Amsterdam: Elsevier Science BV, 1994: 77-87.
23. Dean RT, Fu SL, Stocker R, Davies MJ. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. Biochem J 1997; 324: 1-18.
24. Haycock JW, Jones P, Harris JB, Mantle D. Differential susceptibility of human skeletal proteins to free redicals induced oxidative damage: a histochemical, immunocytochemical and electron microscopical study in vitro. Acta Neuropathol (Berl) 1996; 92: 331-40.

25. Stangel M, Zettl UK, Mix E, et al. H_2O_2 and nitric oxide-mediated oxidative stress induce apoptosis in rat skeletal muscle myoblasts. J Neuropathol Exp Neurol 1996: 55: 36-43.
26. Terjung RL, Dudley GA, Meyer RA. Metabolic and circulatory limitations to muscular performance at the organ level. J Exp Biol 1985; 115: 307-18.
27. LaPier TK. Glucocorticoid-induced muscle atrophy. The role of exercise in treatemnt and prevention. J Cardiopulm Rehabil 1997; 17: 76-84.
28. Dekhuijzen PN, Decramer M. Sterioid-induced myopathy and its significance to respiratory disease: a known disease rediscovered. Eur Respir J 1992; 5: 997-1003.
29. Efthimiou J, Fleming J, Gomes C, Spiro SG. The effect of supplementary oral nutrition in poorly nourished patietns with chronic obstructive pulmonary disease. AM Rev Respir Dis 1988; 137: 1075-83.
30. Vermeeren MAP, Schols A, Wouters EFM. Effects of an acute exacerbation on nutritional and metabolic profile of patients with COPD. Eur Respir J 1997; 10: 2264-9.
31. Sridhar MK, Carter R, Len ME, Banham SW. Resting energy expenditure and nutritional state of patients with increased oxygen cost of breathing due to emphysema, scoliosis and thoracoplasty. Thorax 1994; 49 : 781-91.
32. Sieck GC, Lewis MI, Blanco CE. Effects of undernutrition on diaphragm fiber size, SDH activity, and fatigue resistance. J Apply Physiol 1989; 66: 2196-205.
33. Russell DM, Atwood HL, Whittaker JS, et al. The effects of fasting and hypocaloric diets on the functional and metabolism characteristics of rat gastrocnemius muscle. Clin Sci 1984; 67: 185-94.
34. Argiles JM, Lopez-Soriano J. Catabolic proinflammatory cytokines. Curr Opin Clin Nutr Metab Care 1998; 1: 241-4.
35. Serres I, Varray A, Vallet G, Micallef JP, Prefaut C. Improved skeletal muscle performance after individualized exercise training in patients with chronic obstructive pulmonary disease. J Cardipulm Rehabil 1997; 17: 232-8.
36. O' Donnell DE, McGuire M, Samis L, Webb KA.General exericse training improves ventilatory and peripheral muscle strength and endurance in chronic airflow limitation. Am J Respir Crit Care Med 1998; 157: 1489-97.
37. Evans WJ . Vitamin E, vitamin C, and exercise. Am J Clin Nutr 2000; 72: 647S-52S.
38. Maltais F, LeBlanc P, Smiard C, et al. Skeletal muscle adaptation to endurance training in patients with chronic obstructive pulmonary disease. Am J Respir Crit Care Med 1996; 154: 442-7.
39. Adamopoulos S, Coats S. Peripheral abnormalities in chronic heart failure, Postgrad Med J 1991; 67: S74-80.

40. Leaf DA, Kleinman MT, Hamilton M, Deitrick RW . The exercise-induced oxidative stress paradox: the effects of physical exercise training. Am J Med Sci 1999; 317: 295-300.

41. Lawler JM, Powers SK . Oxidative stress, antioxidant status, and the ontracting diaphragm. Can J Appl Physiol 1998 ; 23: 23-55.

42. Powers SK, Lennon SL . Analysis of cellular responses to free radicals: focus on exercise and skeletal muscle. Proc Nutr Soc 1999 ; 58: 1025-33.

43. Goldfarb AH. Nutritional antioxidants as therapeutic and preventive modalities in exercise-induced muscle damage. Can J Appl Physiol 1999; 24: 249-66

44. McBride JM, Kraemer WJ, Triplett-McBride T, Sebastianelli W . Effect of resistance exercise on free radical production. Med Sci Sports Exerc 1998; 30.

45. O' Donnell DE, Bain DJ, Webb KA. Factors contributing to relief of exertional breathlessness during hyperoxia in chronic airflow limitation. Am J Respir Crit Care Med 1997; 155: 530-5.

46. Rooyackers JM, Dekhuijzen PN, Van Herwaarden CL, Folgering HT. Training with supplemental oxygen in patients with COPD and hypoxaemia at peak exercise. Eur Respir J 1997; 10: 1278-84.

47. Woodcock A. Geddes DM, Gross ER. Oxygen relieves breathlessness in "pick puffers" Lancet 1981; 1: 907-9.

48. Jakobsson P, Jorfeldt L.Long-term oxygen therapy may improve skeletal muscle metabolism in advanced chronic obstructive pulmonary disease patients with chronic hypoxemia. Respir Med 1995; 89: 471-6.

บันทึก

ชิ้นส่วนชีวภาพกำซาบด้วยสารพลาสติก
Plastination

รณิดา ชมสูง* ผาสุก มหรรมานุเคราะห์*

บทคัดย่อ

ชิ้นส่วนชีวภาพกำซาบด้วยสารพลาสติก (Plastination) เป็นวิธีการหนึ่งในการรักษาชิ้นส่วนชีวภาพให้คงสภาพเหมือนกับขณะยังมีชีวิต ริเริ่มโดย Professor Dr. Gunther von Hagens ที่ Heidelberg University ในปี ค.ศ. 1977 ตั้งแต่นั้นมาก็มีการประยุกต์และพัฒนาเทคนิคใหม่ๆ ตามมามากมาย ซึ่งเป็นที่ยอมรับในสถาบันต่างๆ ทั่วโลกกว่า 150 แห่ง ซึ่งประกอบด้วย ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ พยาธิวิทยา นิติเวชศาสตร์ และชีววิทยาในมหาวิทยาลัยต่างๆ ทั่วโลก ด้วยกระบวนการนี้เนื้อเยื่อจะถูกกำซาบด้วยสารพลาสติกชนิดต่างๆ ได้แก่ Silicone rubber, Epoxy และ Polyester resin เป็นต้น สำหรับชื่อเทคนิคการทำ Plastination จะเรียกตามอักษรนำของชื่อชนิดพลาสติกและตัวเลขอีก 2 หลัก ได้แก่ S10, E12 และ P35 หรือ P40 ตามลำดับ การเลือกเทคนิคการทำ Plastination ขึ้นกับลักษณะชิ้นส่วนชีวภาพดังนี้

S10 เหมาะสำหรับชิ้นส่วนชีวภาพชนิดกล้ามเนื้อ, ข้อต่อ, อวัยวะภายในและสมอง เป็นต้น ชิ้นส่วนชีวภาพที่กำซาบด้วยพลาสติกชนิดนี้จะมีลักษณะนุ่มและมีความยืดหยุ่น

E12 เหมาะสำหรับชิ้นส่วนชีวภาพที่ตัดเป็นแผ่นบางๆ เช่น แผ่นร่างกายมนุษย์ส่วนลำตัว แขน หรือ ขา เป็นต้น แผ่นชิ้นส่วนชีวภาพที่กำซาบด้วยพลาสติกชนิดนี้จะมีลักษณะแข็งและโปร่งใส

P35 หรือ P40 (เป็นเทคนิคที่พัฒนาจาก P35) เหมาะสำหรับแผ่นสมองบางๆ ประมาณ 4-6 มิลลิเมตร แผ่นสมองที่กำซาบด้วยพลาสติกชนิดนี้ชิ้นส่วนชีวภาพจะมีลักษณะแข็งและโปร่งใส สามารถแยกเนื้อสมองส่วน Gray matter ออกจาก White matter ได้อย่างชัดเจน

ดังนั้นชิ้นส่วนชีวภาพที่ผ่านการกำซาบด้วยพลาสติกทั้งสามชนิดจึงมีลักษณะแห้ง ไม่มีกลิ่นเหม็น มีความทนทาน อายุการใช้งานนานและจับต้องได้สะดวก นอกจากนี้บริเวณพื้นผิวของชิ้นส่วนยังคงสภาพเดิมสามารถศึกษาความหนาแน่นของเซลล์โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ได้ กระบวนการ Plastination ประกอบด้วย 4 ขั้นตอน ได้แก่

1. Fixation หมายถึง การคงสภาพเนื้อเยื่อชิ้นส่วนชีวภาพที่จะนำมาทำต้องเริ่มต้นจากขั้นตอน

* ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

นี้ก่อนเสมอ โดยนำชิ้นส่วนชีวภาพไปแช่ในน้ำยาฟอร์มาลิน ความเข้มข้น 5-20 % และต้องระมัดระวังไม่ให้ชิ้นส่วนต่างๆ ผิดรูปร่างไปจากเดิม ขณะที่แช่อยู่ในน้ำยาฟอร์มาลิน

2. Dehydration และ Degreasing (Defatting) หมายถึง การไล่น้ำและไขมันออกจากเนื้อเยื่อ ทำโดยแช่ชิ้นส่วนชีวภาพในอะซีโตน ที่ -25 °ซ ในตู้แช่แข็ง ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมในการป้องกันการเหี่ยวของชิ้นส่วนชีวภาพ ด้วยขั้นตอนนี้อะซีโตนจะเข้าไปแทนที่น้ำและไขมันในเนื้อเยื่อ

การทำ Defatting จะทำเฉพาะชิ้นส่วนที่มีไขมันมากๆ เช่น ชิ้นส่วนที่มีองค์ประกอบเป็นกระดูกหรือเนื้อเยื่อไขมัน โดยการนำไปแช่ในอะซีโตนที่อุณหภูมิห้อง

3. Forced Impregnation เป็นขั้นตอนช่วงกลางและมีความสำคัญที่สุดในกระบวนการ Plastination เนื่องจากเป็นการแทนที่สารตัวกลางหรือ อะซีโตนซึ่งอยู่ภายในช่องว่างเดิมของน้ำ และไขมันในเนื้อเยื่อด้วยพลาสติกชนิดต่างๆ ขึ้นอยู่กับเทคนิคและลักษณะชิ้นส่วนชีวภาพที่นำมาทำภายใต้การอัดด้วยความดันในถังสูญญากาศ

Forced Impregnation ทำได้ทั้งที่อุณหภูมิห้อง เมื่อใช้พลาสติก ชนิด Epoxy หรือ Polyester resin หรือที่อุณหภูมิ -25 °ซ ในตู้แช่แข็ง เมื่อใช้ Silicone rubber

4. Curing เป็นขั้นตอนการทำให้ชิ้นส่วนชีวภาพแข็ง ภายหลังขั้นตอน Forced impregnation เทคนิคนี้ มี 2 แบบ คือ Gas curing และ Heat curing ซึ่งจะเลือกใช้ตามชนิดของพลาสติก

4.1 Gas Curing เป็นวิธีที่เหมาะสำหรับชิ้นส่วนชีวภาพที่กำซาบด้วย Silicone rubber หรือเทคนิค S10 โดยการอบด้วยไอของสารทำให้แข็งซึ่งระเหยออกมาจากสถานะของเหลวภายในตู้ที่ปิดสนิท

4.2 Heat curing เป็นวิธีที่เหมาะกับชิ้นส่วนที่กำซาบด้วย Polymer-copolymer เช่น Brain slice plastination ด้วย P35 และ P40 โดยจะเริ่มด้วยการนำชิ้นส่วนชีวภาพที่ผ่านการ Forced impregnation แล้วไปอาบด้วยแสงอัลตราไวโอเลต หรือแสงแดดก่อน แล้วจึงนำมาเข้าตู้อบที่อุณภูมิ 50 °ซ

คุณสมบัติของพลาสติกสำหรับ Plastination มีดังนี้

1. มีความหนืดต่ำ เพื่อให้แทรกเข้าสู่เนื้อเยื่อได้ง่าย
2. มีช่วงอายุที่อยู่ในสถานะของเหลวนานสามารถนำกลับมาใช้อีกได้
3. มีค่าความดันไอสูง
4. แข็งตัวได้ เมื่อยู่ภายในเนื้อเยื่อชนิดต่างๆ
5. ไม่เปลี่ยนสีง่าย ทนทานต่อแรงกระแทกและขูดขีด
6. ไม่ทำให้เนื้อเยื่อต่างชนิดกันแยกออกจากกัน

ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ได้นำวิธีการเก็บรักษาชิ้นเนื้อชีวภาพโดยวิธี Plastination มาใช้เพื่อผลิตสื่อการสอนในกระบวนวิชาประสาทภายวิภาคศาสตร์และกายวิภาคศาสตร์ทั่วไป ขณะนี้ใช้เทคนิค S10 สำหรับชิ้นส่วนชีวภาพต่างๆ ได้แก่ สมองแกะที่แสดงโครงสร้างภายใน (Dissected brain), แผ่นสมองตัดในแนว Coronal, Horizontal และ Sagittal (Brain slices), กระดูก, หัวใจ, กะโหลกศีรษะแสดงเส้นประสาทบริเวณใบหน้าและทารกที่เสียชีวิต เป็นต้น ในอนาคตเราคงจะได้มีการพัฒนาทักษะและความชำนาญในการผลิตชิ้นส่วนชีวภาพได้กับทุกอวัยวะของร่างกายหรือกับร่างอาจารย์ใหญ่ทั้งร่างด้วยวิธี Plastination นอกจากนี้ยังหวังว่าจะเป็นแหล่งผลิตชิ้นส่วนชีวภาพ

กำซาบด้วยสารพลาสติกให้กับภาควิชาต่างๆ ของมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และสถาบันอุดมศึกษาทางภาคเหนือ

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์นายแพทย์บุญเสริม วิทยชำนาญกุล หัวหน้าโครงการ Plastination ของภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดลที่ให้โอกาสเรียนรู้ และฝึกปฏิบัติงานด้าน Plastination อาจารย์ลลิตา สุริยะประภาดิลกในการให้คำแนะนำช่วยเหลือ และอำนวยความสะดวกในระหว่างการปฏิบัติงาน รองศาสตราจารย์นายแพทย์เตชะทัต เตชะเสน ที่สนับสนุนให้เดินทางไปรับการฝึกอบรม Plastination ณ ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล และผู้ช่วยศาสตราจารย์วิชิต สมทรัพย์ หัวหน้าภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่สนับสนุนค่าใช้จ่ายให้ไปศึกษาดูงานการจัดตั้งห้อง Plastination ของภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล และ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

เอกสารอ้างอิง

1. von Hagen G. The current potential of plastination. Anat Embryol 1987; 175: 411-421.
2. von Hagen G. Preservation by Plastination. การประชุมสัมมนาวิชาการและการอบรมเทคนิคการเก็บรักษาอวัยวะและชิ้นส่วนทางชีวภาพโดยวิธีกำซาบด้วยสารพลาสติก (Plastination Technique) โดย Prof. Dr. Gunther von Hagens ร่วมกับภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ 1996; 1: 8.
3. von Hagen G. Plastination of brain slice with BIODUR$_{TM}$ P35. Heidelberg. Unpublished. 1990.
4. วรรศิยา ศิริเอี้ยวพิกูล. The Plastination of Brain Slices with BIODUR^{TM} P35 Technique. ภาคนิพนธ์ วิทยาศาสตรบัณฑิต (รังสีเทคนิค) คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ 2537.
5. von Hagen G. Introduction to Plastination. Heidelberg Plastination. Heidelberg Plastination Folder 1985: 1-9.
6. Alston RZ. A batch staining method for brain slices allowing volume measurements of gray and white matter using an Image Analyzing Computer (Quantimet 720). Stain Technol 1981; 56: 207-13.
7. Suriyaprapadilok L, Withyachumnarkul B. Plastination of stained sections of the human brain: comparison between different staining methods. J Int Soc Plastination. 197; 12: 27-32.

ปกิณกะ

แผนกลยุทธ์การประกันคุณภาพการศึกษา
Strategic Planning of Quality Assurance in Education

ประสิทธิ์ ชนะรัตน์*
ชมนาด วัณณสุทธางกูร**

บทนำ

ด้วยทบวงมหาวิทยาลัย ได้ประกาศนโยบายและแนวปฏิบัติในการประกันคุณภาพการศึกษาระดับอุดมศึกษา เมื่อวันที่ 8 กรกฎาคม พ.ศ. 2539 และมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ประกาศนโยบายและแนวปฏิบัติในการประกันคุณภาพการศึกษาของมหาวิทยาลัย เมื่อวันที่ 12 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2541 และคณะเทคนิคการแพทย์ได้เริ่มงานประกันคุณภาพโดยคณะกรรมการประกันคุณภาพของคณะฯ ขึ้นตั้งแต่วันที่ 2 มิถุนายน พ.ศ. 2540 ประกอบกับรัฐธรรมนูญแห่งราชอาณาจักรไทย พ.ศ. 2540 และ พรบ. การศึกษาแห่งชาติ พ.ศ. 2542 เล็งเห็นความสำคัญของการประกันคุณภาพการศึกษา ด้วยเหตุดังกล่าวทางภาควิชาจุลทรรศนศาสตร์คลินิกจึงมีความจำเป็นที่จัดทำแผนกลยุทธ์ประกอบคู่มือประกันคุณภาพของภาควิชาฯ ขึ้นเพื่อให้งานประกันคุณภาพการศึกษาสัมฤทธิ์ผลตามแนวทางที่ได้วางไว้

การวิเคราะห์สภาพแวดล้อม

ด้านประชากร

ประชากรของประเทศปี พ.ศ. 2542 มีประมาณ 61.6 ล้านคน ประชากรวัย 18-24 ปี คาดว่าจะมี 7.726, 7.422 และ 7.047 ล้านในปี พ.ศ. 2544, 2546 และ 2548 ตามลำดับ

ด้านเศรษฐกิจ

ภาวะเศรษฐกิจอยู่ในภาวะชลอตัว สถานะหนี้ต่างประเทศเป็นประมาณ 36,177.76, 41,237.68 45,848.28 ล้านเหรียญสหรัฐในปี พ.ศ. 2544, 2545, 2546 คาดว่างบประมาณอุดมศึกษา 34,270 พันล้านบาท ในปี 2545-2549 ซึ่งเป็นร้อยละ 3.766 ของงบประมาณแผ่นดิน

ด้านเทคโนโลยี

เทคโนโลยีทางด้านสารสนเทศ (Information technology) จะมีบทบาทสูง เทคโนโลยีด้านห้องปฏิบัติการ Point of care technology (POCT) จะมีบทบาทเพิ่มขึ้น, Bioinformation technology, การวัดปริมาณสารระดับ Nanotechnology จะมีการพัฒนาขึ้นมาก Molecular technology, Bioengineering จะมีบทบาทเพิ่มขึ้นในห้องปฏิบัติการ

ด้านการเมือง

ในปี พ.ศ. 2544 จะมีการเลือกตั้งสมาชิกสภาผู้แทนราษฎร ซึ่งเป็นการเลือกตั้งใหม่ตาม

* อาจารย์, หัวหน้าภาควิชาจุลทรรศนศาสตร์คลินิก,
** เจ้าหน้าที่บริหารงานทั่วไป 6 ภาควิชาจุลทรรศนศาสตร์คลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

รัฐธรรมนูญแห่งราชอาณาจักรไทย พ.ศ. 2540 สมาชิกวุฒิสภาได้มาจากการเลือกตั้ง การเมืองระบบใหม่ การปฏิรูปการเมือง จะมีผลต่อสภาทั้งสองมากขึ้น และจะมีผลต่อการตราพระราชบัญญัติ รวมถึง พรบ.งบประมาณและการออกนอกระบบของมหาวิทยาลัย

ด้านสังคม

ตามรัฐธรรมนูญฉบับใหม่ ทำให้ประชาชนมีสิทธิในการรับการศึกษาอบรมขั้นพื้นฐานไม่น้อยกว่าสิบสองปี ที่รัฐจะต้องจัดให้อย่างทั่วถึง พรบ.การศึกษาแห่งชาติ พ.ศ. 2542 ยึดหลักให้ผู้เรียนทุกคนมีความสามารถเรียนรู้และพัฒนาตนเอง เป็นการศึกษาเพื่อปวงชน รัฐส่งเสริมให้เกิดการเรียนรู้ตลอดชีวิต

ด้านวัฒนธรรม

วัฒนธรรมไทย วัฒนธรรมท้องถิ่นจะได้รับผลกระทบจากวัฒนธรรมภายนอก ด้วยความเร็วของข้อมูลข่าวสารและเทคโนโลยี วิทยุ โทรทัศน์ต่างๆ วัฒนธรรมของสังคมเมือง สังคมชนบท อาจจะมีการเปลี่ยนแปลงหากไม่สามารถหยุดยั้งกระแสวัฒนธรรมตะวันตก

สภาวะการณ์ปัจจุบัน

จุดแข็ง

ภาควิชาจุลทรรศนศาสตร์คลินิก มีประวัติอันยาวนาน เริ่มก่อตั้งในปี พ.ศ. 2512 ในโครงการจัดตั้งคณะเทคนิคการแพทย์ สังกัดคณะแพทยศาสตร์ จากประสบการณ์อันยาวนานของภาควิชาฯ เป็นจุดแข็งในการถ่ายทอดด้านการเรียนการสอนทางโลหิตวิทยาและจุลทรรศนศาสตร์คลินิกเป็นอย่างมาก

จุดอ่อน

ภาควิชามีอัตรากำลังและครุภัณฑ์ที่จำเป็นสำหรับการเรียนการสอนในระดับปริญญาตรี กับจำนวนนักศึกษาที่เพิ่มขึ้น ไม่สมดุลกัน

โอกาส

คณะเทคนิคการแพทย์ ได้รับการจัดสรรงบประมาณให้สร้างตึกใหม่ คาดว่าจะเสร็จสมบูรณ์ในปี พ.ศ. 2544 จัดทำให้พื้นที่ของภาควิชามีเพิ่มขึ้น และนักศึกษาไม่แออัดจนเกินไป

อุปสรรค

ภยันตรายที่อาจจะเกิดขึ้น หากอัตราการเพิ่มของนักเรียนที่สำเร็จการศึกษา ม.6 มากขึ้นเรื่อยๆ จนมีผลกระทบต่อยอดรับของนักศึกษา หากจำนวน นักศึกษาเพิ่มขึ้นไม่สมดุลกับพื้นที่ จำนวนอาจารย์และครุภัณฑ์ คุณภาพการศึกษาก็อาจลดลงได้

พันธกิจ

1. พัฒนาระบบและกลไกการประกันคุณภาพให้มีประสิทธิภาพอย่างต่อเนื่อง
2. ส่งเสริมและพัฒนาระบบการเรียนการสอน
3. พัฒนางานวิจัยและงานบริการวิชาการ
4. จัดระบบบริหารการจัดการงบประมาณให้มีประสิทธิภาพ

วิสัยทัศน์

จัดการเรียนการสอน การวิจัย และการให้บริการเทคนิคการแพทย์ด้านโลหิตวิทยา และจุลทรรศนศาสตร์คลินิก เพื่อก่อให้เกิดภาควิชาแห่งภูมิปัญญา และเป็นหน่วยงานระดับศูนย์ของความเชี่ยวชาญ (Center of Knowledge and Wisdom Excellencce in Laboratory Hematology and Clinical Microscopy) ของประเทศ

นโยบาย

ภาควิชาจุลทรรศศาสตร์คลินิก คณะเทคนิค

การแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ มีอุดมการณ์และมุ่งเน้นให้การศึกษา วิจัย บริการวิชาการแก่สังคมทางเทคนิคการแพทย์ ด้านโลหิตวิทยา และจุลทรรศนศาสตร์คลินิก อีกทั้งยังส่งเสริม อนุรักษ์ศิลปวัฒนธรรมท้องถิ่นและของไทยอย่างมีคุณภาพ และพัฒนาคุณภาพอย่างต่อเนื่อง รักษาและเพิ่มมาตรฐานแห่งวิชาการและวิชาชีพ โดยยึดหลักการบริหารคุณภาพที่ทุกคนมีส่วนร่วม เคารพในความเป็นมนุษย์ มีจิตใจที่เปิดกว้าง ยอมรับความจริง และอุทิศตนเพื่อการพัฒนางานกันประกันคุณภาพการศึกษา อันจะเป็นประโยชน์ต่อวิชาชีพและสังคมต่อไป

วัตถุประสงค์

1. พัฒนาระบบการและกลไกในการประกันคุณภาพการศึกษาภายในภาควิชาให้มีประสิทธิภาพ
2. ควบคุมปัจจัยที่มีผลต่อคุณภาพการศึกษาให้มีมาตรฐาน
3. ติดตามตรวจสอบและประเมินผลการดำเนินงาน การควบคุมคุณภาพ อย่างเป็นระบบและต่อเนื่อง
4. นำผลการประเมินมาใช้ปรับปรุงพัฒนาภาควิชา ให้บรรลุตามเป้าหมายที่กำหนด

เป้าหมาย

1. พัฒนาระบบประกันคุณภาพและดำเนินการประกันคุณภาพตามระบบที่ได้วางไว้ และให้บุคลากรภายในภาควิชาฯ เข้าใจและยินยอมพร้อมใจ (Consensus) เป็นเบื้องต้น
2. ดัชนีคุณภาพที่มีลำดับความสำคัญมากที่สุดให้อยู่ในระดับดี ภายใน 2 ปี (ได้แก่ การเรียนการสอน, การวิจัย, การบริการวิชาการ)
3. ดัชนีคุณภาพที่มีลำดับความสำคัญมาก คือ การบริหารจัดการ, ระบบและกลไกการประกันคุณภาพ, ปณิธาน และนโยบาย ให้อยู่ในระดับที่ยอมรับได้ ภายใน 2 ปี
4. ดัชนีคุณภาพที่มีลำดับความสำคัญปานกลาง คือ การเงินและงบประมาณ, การพัฒนานักศึกษา ให้อยู่ในระดับพอยอมรับได้ ภายใน 2 ปี

แผนกลยุทธ์

แผนจัดการเรียนการสอนและการวิจัย

ยุทธศาสตร์ที่สำคัญในการพัฒนาการเรียนการสอน คือการวิจัย วิจัยเป็นกระบวนการพัฒนาวิธีการแก้ปัญหา วิธีการเรียนรู้ กระบวนการของการวิจัยจะทำให้คณาจารย์ได้ประสบการณ์และเพิ่มพูนความรู้ ผลลัพธ์ของการวิจัย ก็จะได้นำมาใช้ในการปรับปรุงเนื้อหาการสอน ฉะนั้นภาควิชาฯ ตระหนักในเรื่องนี้เป็นประเด็นสำคัญ การพัฒนาการเรียนการสอน จะต้องพัฒนาการวิจัยควบคู่กันไป โดยมีแผนกลยุทธ์ดังนี้

1. ส่งเสริมให้มีอิสระทางวิชาการ (Academic freedom) และเสริมสร้างบรรยากาศวิชาการในภาควิชาฯ
2. ส่งเสริมการหาแหล่งทุนและอุปกรณ์การวิจัย เพื่อพัฒนาระดับบัณฑิตศึกษา
3. ส่งเสริมการพัฒนาการปรับปรุงการเรียนการสอนและสร้างนวัตกรรมทางการสอน เพื่อให้นักศึกษาสามารถแก้ปัญหา (Problem solving) เรียนด้วยตนเอง (Self learning), นำความรู้เชื่อมโยงผสมผสานประยุกต์วิชาการแขนงอื่นๆ ได้, เป็นผู้ใฝ่รู้ มีวินัย, รับผิดชอบ, มีเจตคติที่ดีต่อวิชาชีพ เพื่อเสริมความแข็งแกร่งระดับปริญญาตรี
4. ส่งเสริมให้คณาจารย์ได้เข้าใจวิธีวัดและการประเมินผลนักศึกษาด้านทฤษฎี ความสามารถในการปฏิบัติ ทั้งด้านความจำ, การแปลผล,
5. สนับสนุนการเขียนเอกสารทางวิชาการ

และการเผยแพร่ผลงานวิจัย

6. สนับสนุนการเรียนการสอนที่ได้ประโยชน์มากและใช้ต้นทุนต่ำ (Cost effectiveness)

7. สร้างความแข็งแกร่งทางวิชาการ สามารถพึ่งตนเองและเกื้อกูลสังคม

8. ส่งเสริมการจัดการเรียนการสอนที่ให้อาจารย์และนักศึกษาเพิ่มพูนความแข็งแกร่งต่อชุมชน

แผนลดค่าใช้จ่าย

การประกันคุณภาพจะสัมฤทธิ์ผลได้ดี การลดค่าใช้จ่ายนับว่าเป็นสิ่งจำเป็นอย่างยิ่ง เพราะในภาวะปัจจุบันสถานการณ์ของการมีทรัพยากรทางด้านงบประมาณมีจำกัด ภาควิชาฯ มีแผนกลยุทธ์ดังนี้

1. วิเคราะห์ต้นทุน โดยวิเคราะห์ต้นทุนแต่ละชั่วโมงสอนปฏิบัติการ โดยวิเคราะห์ต้นทุนค่าแรง, ต้นทุนค่าวัสดุ, ต้นทุนค่าลงทุน (Capital cost) และต้นทุนรวม (Full cost)

2. วิเคราะห์ความคุ้มค่าในค่าใช้จ่าย (Cost effectiveness)

3. ลดต้นทุน/ลดค่าใช้จ่าย/ประหยัด

4. เตรียมของขึ้นใช้เอง (Simulate) เช่น FVIII deficient plasma, Thrombin, APTT reagent ฯลฯ เป็นต้น

5. จัดเก็บรักษาวัสดุให้ถูกต้อง ลดการเสียสภาพโดยไม่จำเป็น

6. บำรุงรักษาเครื่องมือให้มีอายุการใช้งานยาวนานขึ้น

7. ลดความผิดพลาดในการฝึกทำงานของนักศึกษา

8. ศึกษาการใช้น้ำยาแบบลดปริมาณตามสัดส่วนเพียงเพื่อให้เข้าใจในหลักการเกิดปฏิกริยาของการทดสอบบางรายการ

9. ควบคุมการเบิกจ่ายพัสดุให้รัดกุม

10. ให้นักศึกษาตระหนักและประหยัดในค่าใช้จ่ายในการทำงาน

แผนพัฒนาสภาพแวดล้อม

วัตถุประสงค์ เพื่อสนับสนุนกิจกรรมการเรียนการสอน และการปฏิบัติงานของบุคลากรให้เกิดประสิทธิภาพ มีกลยุทธ์ ดังนี้

1. จัดห้องทำงานและบริเวณรอบๆ พื้นที่ทั้งหมดของภาควิชาฯ ให้สะอาดเรียบร้อย

2. ปรับปรุงห้องสมุดภาควิชาฯ และระบบสืบค้นข้อมูลให้ทันสมัย

3. การจัดห้องเรียนและห้องปฏิบัติการเสริมให้นักศึกษาได้เรียนรู้ด้วยตนเองโดยใช้คอมพิวเตอร์ เนื่องจากข้อมูลข่าวสารและเทคโนโลยีสารสนเทศ เป็นโครงสร้างพื้นฐานที่สำคัญและเป็นส่วนที่ส่งเสริมให้เกิดศักยภาพมากขึ้น

4. พัฒนาบุคลากร ให้เข้าใจการพัฒนาสิ่งแวดล้อมเป็นเรื่องสำคัญ ให้ปฏิบัติงานร่วมกัน แก้ไขปัญหาร่วมกัน มีวัตถุประสงค์ร่วมกัน ยินยอมพร้อมใจร่วมกัน ยอมรับร่วมกัน เมื่อพัฒนาสิ่งดังกล่าวได้แล้ว ทุกคนในภาควิชาฯ จะปฏิบัติงานในสิ่งแวดล้อมที่ดีที่สุด

แผนให้ความปลอดภัยแก่นักศึกษาและบุคลากร

วัตถุประสงค์ เพื่อสร้างความปลอดภัยจากโรคติดเชื้อและพิษจากสารเคมีในขณะปฏิบัติงานของบุคลากร และระหว่างการฝึกปฏิบัติงานของนักศึกษา มีกลยุทธ์ ดังนี้

1. ฝึกอบรมและ/หรือประชุมชี้แจงให้บุคลากรและนักศึกษาได้เรียนรู้ว่าจะปฏิบัติอย่างไรจึงจะปลอดภัยในขณะทำงาน

2. เตรียมคู่มือการใช้ การบำรุงรักษาเครื่องมืออุปกรณ์ อย่างถูกต้อง โดยคู่มือเครื่องที่ใช้ในห้องปฏิบัติการจะต้องจัดไว้ประจำสำหรับเครื่องมือนั้นๆ

3. อบรมวิธีป้องกันอุบัติภัยต่างๆ ในห้อง

ปฏิบัติการ

4. อบรมการปฐมพยาบาลเบื้องต้นหากได้รับบาดเจ็บจากการปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการ

5. มีวิธีจัดการของเสีย (Waste management) ที่ถูกต้อง

แผนพัฒนาบุคลการด้านการศึกษา/อบรม

วัตถุประสงค์ เพื่อส่งเสริมให้บุคลากรของภาควิชาฯ ได้รับความรู้จากการศึกษา/ฝึกอบรม เพื่อนำมาพัฒนาให้เป็นกิจกรรมที่เกิดคุณค่าแก่ภาควิชาฯ มีกลยุทธ์ ดังนี้

1. ส่งเสริมให้ได้รับความรู้เพิ่มเติม โดยสนับสนุนให้ได้รับทุนการศึกษา/ฝึกอบรม ทั้งภายในประเทศ และต่างประเทศ

2. ส่งเสริมสนับสนุนให้เข้ารับการฝึกอบรม-สัมมนา ตามตำแหน่งสายงาน

3. พัฒนาทักษะและความสามารถ โดยพัฒนาให้สอดคล้องกับสายงานแต่ละหน้าที่งาน ด้วยการลงมือปฏิบัติกิจกรรม เพื่อให้มีศักยภาพที่สูงขึ้น

4. พัฒนาสู่องค์กรเรียนรู้ โดยให้บุคลากรภาควิชาฯ ได้ร่วมกันเรียนรู้ ร่วมกันแสวงหาภูมิปัญญา เพื่อพัฒนาทรัพยากรมนุษย์ร่วมกัน เพื่อให้เกิดทุนทางมนุษย์ (Human capitals)

แผนพัฒนาขวัญและกำลังใจ

วัตถุประสงค์ของการพัฒนาขวัญและกำลังใจ เพื่อจูงใจให้บุคคลในภาควิชาฯ เข้ามาร่วมกันทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพและบรรลุวัตถุประสงค์ร่วมกัน และเป็นการระดมพลังของบุคคลให้ทำสิ่งหนึ่งสิ่งใดให้บรรลุวัตถุประสงค์ของภาควิชาฯ กลยุทธ์มีดังนี้

1. ยกย่องสรรเสริญในโอกาสอันควร ประกาศเกียรติคุณยกย่องเพื่อเพิ่มขวัญและกำลังใจให้มีมากขึ้น

2. ให้มีส่วนร่วมคิด ร่วมทำในกิจกรรมต่างๆ การมีส่วนร่วม จะทำให้ทุกคนในภาควิชามีความรู้สึกภูมิใจที่ได้มีส่วนร่วมและเกิดความรู้สึกเป็นเจ้าของ

3. มอบหมายงานให้เหมาะสมกับบุคคลทั้งชนิดและปริมาณงาน ให้ทำงานตามที่ตนเองถนัด จะทำให้เกิดการทำงานที่มีความสุขและไม่เบื่อหน่าย

4. จัดอุปกรณ์ที่เอื้ออำนวยในการทำงาน เป็นปัจจัยที่สำคัญมากในการพัฒนาขวัญและกำลังใจให้บุคคลอยากทำงาน

5. สร้างบรรยากาศในที่ทำงาน โดยให้บรรยากาศในที่ทำงานดีทั้งทางกายและใจ เช่น ห้องทำงานสะอาด ห้องเรียนห้องปฏิบัติการสะอาดและเพียงพอสำหรับนักศึกษา

6. ประเมินผลการปฏิบัติงานเป็นระยะๆ อยู่เสมอ

แผนพัฒนาภาพลักษณ์และความเป็นผู้นำของภาควิชาฯ

ภาพลักษณ์ (Image) และความเป็นผู้นำ (Leadership) ของภาควิชา เป็นสิ่งจำเป็นอย่างยิ่งในการประกันคุณภาพ เพราะในปัจจุบัน คณะเทคนิคการแพทย์ ที่ทำการสอนอยู่ทั้งภาครัฐ และภาคเอกชนในประเทศไทย มีอยู่ถึง 10 แห่งด้วยกัน กลยุทธ์ในการพัฒนาภาพลักษณ์และความเป็นผู้นำมีดังนี้

1. พัฒนาภาพลักษณ์ของบุคลากรของภาควิชาฯ ให้มีความเป็นเลิศในเชิงวิชาการ (Academic excellence) ความเป็นเลิศในงานอาชีพ (Professional excellence) ความเป็นเลิศในชีวิต (Life excellence) โดยตั้งอยู่บนพื้นฐานเชาวน์อารมณ์ที่ดี (Emotional quotient)

2. พัฒนาภาพลักษณ์สู่สังคมภูมิปัญญา (Knowledge society) โดยบุคลากรของภาควิชามีวัฒนธรรมแห่งการเรียนรู้ (Learning culture),

การเรียนรู้ร่วมกันเป็นทีม, วัฒนธรรมแห่งการพัฒนาศักยภาพของการสร้างองค์ความรู้ใหม่ และถ่ายโอนความรู้ สู่การเรียนการสอนและการบริการวิชาการแก่นักเทคนิคการแพทย์ทั่วประเทศด้านโลหิตวิทยาและจุลทรรศนศาสตร์คลินิก

3. กลยุทธ์ชี้นำ/ปลูกฝัง/ปรับเปลี่ยน/ปรับตัว เพื่อเพิ่มศักยภาพและขีดความสามารถในการดำรงอยู่ภายใต้สภาวการณ์ที่มีทรัพยากรอันจำกัด, ที่มีการเปลี่ยนแปลงอยู่ตลอดเวลา, มีคู่แข่งเพิ่มขึ้น

4. กลยุทธ์เทียบเคียง (Benchmarking) กับมหาวิทยาลัยในต่างประเทศ ที่ทำการสอนด้านโลหิตวิทยาและจุลทรรศนศาสตร์คลินิกของคณะที่ทำการสอน Clinical Laboratory Science Proramme เช่น University of Tennessee, Kitasato University เป็นต้น

5. กลยุทธ์พัฒนาภาพลักษณ์ด้าน Knowledge-based system

6. สร้างเครือข่ายและความร่วมมือด้านโลหิตวิทยาและจุลทรรศนศาสตร์คลินิก กับหน่วยงานอื่น ทั้งภายในและภายนอกประเทศ

แผนคำนึงผู้รับบริการ

การประกันคุณภาพพยายามใช้หลักพลังขับจากผู้รับบริการ (Customer driven) ทั้งผู้รับบริการภายในและภายนอก โดยมีกลยุทธ์ ดังนี้

1. ประเมินความต้องการของผู้รับบริการอยู่เสมอ

2. สร้างความสัมพันธ์กับผู้รับบริการ

3. ติดต่อประชาสัมพันธ์กับผู้รับบริการ

4. สร้างนักศึกษาให้มีความรู้ความสามารถด้านโลหิตวิทยาและจุลทรรศนศาสตร์คลินิก ตรงตามผู้รับบริการพึงพอใจ และสร้างคุณค่าเพิ่ม (Value added) แก่นักศึกษา

บทสรุป

การนำแผนกลยุทธ์ไปสู่การปฏิบัติ จะต้องสร้างและทำความเข้าใจให้บุคลากรภายในภาควิชาฯ ได้เข้าใจ บทบาท หน้าที่ และความรับผิดชอบ กำหนดแผนปฏิบัติการ (Action plan) และหมั่นประเมินผลติดตามและปรับแผน และให้ขวัญกำลังใจบุคลากร ก็จะทำให้งานประกันคุณภาพของภาควิชาประสบความสำเร็จ

บทส่งท้าย

ในสถานะการณ์ปัจจุบัน สภาวะการณ์ด้านทรัพยากรอันจำกัด การเพิ่มขึ้นของประชากร การชลอตัวทางเศรษฐกิจ การมีรัฐธรรมนูญฉบับใหม่ พ.ศ. 2540 การมีพระราชบัญญัติการศึกษาแห่งชาติ พ.ศ. 2542 การประกันคุณภาพเป็นงานที่ท้าทายความสามารถของทุกองค์กรทางการศึกษา การพัฒนาทรัพยากรมนุษย์ให้เป็นผู้มีความรู้ความสามารถ ควบคู่ไปกับจริยธรรมและคุณธรรม การวางแผนกลยุทธ์เพื่อประกอบการประกันคุณภาพทางการศึกษา นับว่าเป็นสิ่งสำคัญอย่างหนึ่ง ภาควิชาฯ เป็นหน่วยงานต้นและหน่วยงานหลักทางด้านวิชาการ ภาวะแห่งความรับผิดชอบทางวิชาการมีมาก ด้วยเหตุดังกล่าวทางภาควิชาฯ จึงได้กำหนดแผนกลยุทธ์ประกอบการประกันคุณภาพนี้ขึ้น ด้วยเหตุแห่งระยะเวลาอันจำกัด แผนกลยุทธ์นี้อาจจะยังไม่ครอบคลุม หากท่านมีข้อคิดเห็นเพิ่มเติมกรุณาให้ข้อคิดเห็นมายังภาควิชาฯ ซึ่งจักขอบพระคุณยิ่ง

เอกสารอ้างอิง

1. วิสัยทัศน์การพัฒนาอุดมศึกษาตามแผนพัฒนาการศึกษาระดับอุดมศึกษา ฉบับที่ 9 (พ.ศ. 2545-2549), สำนักนโยบายและแผนอุดมศึกษา, สำนักงานปลัดทบวงมหาวิทยาลัย, 22 กันยายน 2543.

ย่อเอกสาร

เปรียบเทียบการคัดเลือกสารที่มีประสิทธิภาพสูงในการต่อต้าน *Mycobacterium tuberculosis* กับ *Mycobacterium avium* โดยวิธี Microplate Alumar Blue Assay กับ BACTEC 460 system

Collin LA,Franzblau SG.Microplate Alamar Blue assay versus BACTEC 460 system for high - throughput screening of compounds against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium.* Antimicrob Agents Chemother 1997; 41: 1004-9.

ความต้องการใช้ยาสำหรับต่อต้านเชื้อ Tuberculosis (TB) เพิ่มขึ้นมาก จึงมีความจำเป็นเร่งด่วนในการหาวิธีคัดเลือกตัวยาที่มีความสะดวก รวดเร็ว ต้นทุนต่ำ และมีประสิทธิภาพสูง ซึ่งวิธี Microplate Alumar Blue Assay (MABA) จะอาศัยปฏิกิริยา Oxidation - Reduction ของสาร Alamar Blue มาใช้วัดอัตราการเจริญเติบโตของ *Mycobacterium tuberculosis* $H_{37}Ra$ ATCC 25177 *Mycobacterium tuberculosis* $H_{37}Rv$ ATCC 27294 และ *Mycobacterium avium* ATCC 25291 โดยเปลี่ยนจากสีน้ำเงินเป็นสีชมพูและสภาวะ Nonfluorescent จะเกิดการ Oxidation-Reduction เป็นสภาวะ Fluorescent ซึ่งสามารถวัดค่าการเจริญเติบโตได้โดยใช้เครื่องมือ Fluorometer หรือ Spectrophotometer หรือจากการสังเกตการเปลี่ยนแปลงของสี และจากการทดสอบความไวของยาต่อ Mycobacterium ทั้ง 3 สายพันธุ์ พบว่าค่า MICs ต่อเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์มีระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน ≤ 1 dilution โดยวิธี MABA และ BACTEC 460 system ในการทดสอบกับยา 25-27 ชนิดจากจำนวนสารต้านจุลชีพทั้งหมด 30 ชนิด และพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของค่า MICs ระหว่างวิธี MABA และ BACTEC 460 system จากการทดลองกับสารต้านจุลชีพทั้งหมด 30 ชนิด ได้ค่า MICs ที่แตกต่างกัน 0, 2 และ 5 ชนิดของสารต้านจุลชีพต่อ $H_{37}Rv$, $H_{37}Ra$, *M. avium* ตามลำดับ ค่า MICs ที่ได้จากการสังเกตด้วยตา หรือ Fluorometry ในวิธี MABA จะมีความสัมพันธ์กันอย่างสูงกับวิธี BACTEC 460 system และค่า MICs ที่ได้จากการสังเกตด้วยตา และ fluorometry ก็มีความสัมพันธ์กันเองอย่างสูงด้วย ในการทดสอบยา Rifampin, Rifabutin, Minocycline และ Clarithromycin พบว่าค่า MICs ของ $H_{37}Ra$ มีค่าต่ำกว่า $H_{37}Rv$ ซึ่งได้ผลเหมือนกันกับการทดลองยาชนิดอื่น ๆ $H_{37}Ra$ สามารถใช้ตรวจคัดกรองสารที่ใช้ในการต่อต้าน Tuberculosis (TB) เบื้องต้นแทนสายพันธุ์ $H_{37}Rv$ ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีความรุนแรงในการก่อโรค ระยะเวลาที่สามารถตรวจหาค่า MICs ได้โดยวิธี MABA มีระยะเวลาที่สั้นกว่า BACTEC 460 system ประมาณ 2 วัน และการเปรียบเทียบค่า MICs ของสารต้านแบคทีเรียทั้ง 30 ชนิด โดยวิธี MABA และ BACTEC 460 system พบว่าใกล้เคียงกันทั้งจากเชื้อที่มีความรุนแรงในการก่อโรคอย่าง $H_{37}Rv$ และจากเชื้อที่ไม่ค่อยมีความรุนแรงในการก่อโรคอย่าง $H_{37}Ra$ ดังนั้น วิธี MABA จึงเหมาะสมที่จะในการตรวจคัดกรองหาสารต้านเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis*

เกษรา จันทรสิทธิผล

ผลของเวลาในการทดสอบ Prothrombin time [PT] และ Activated Partial Thromboplastin Time [APTT] เมื่อเก็บสิ่งส่งตรวจในสภาวะที่แตกต่างกัน

Rao LV, Okorodudu AO, Petersen JR, Elghetany MT. Stability of prothrombin time and activated partial thromboplastin time test under different storage. Clin Chimica Acta 2000; 300: 13-21.

PT และ APTT เป็นการทดสอบพื้นฐานในห้องปฏิบัติการเพื่อวินิจฉัยโรคเกี่ยวกับระบบการแข็งตัวของเลือด และเป็นการตรวจวัดผลการรักษาโรคที่เกี่ยวกับการใช้ยาต่อต้านการแข็งตัวของเลือด รายงานนี้ศึกษาเกี่ยวกับการทดสอบที่ผิดพลาดที่เกิดจากการเก็บตัวอย่างสิ่งส่งตรวจในสภาวะที่แตกต่างกัน และเวลาที่นำมาทำการทดสอบ PT และ APTT ของพลาสมา และเลือดรวม 32 ตัวอย่าง ผลการทดสอบพบว่าการนำสิ่งส่งตรวจที่เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส และ -20 องศาเซลเซียส มาทำการทดสอบ PT ในเวลาชั่วโมงที่ 12 ค่าที่แตกต่างในการทดสอบไม่มีผลในทางคลินิก แต่การเก็บสิ่งส่งตรวจไว้ที่อุณหภูมิห้อง และ 4 องศาเซลเซียส การทดสอบ APTT ชั่วโมงที่ 24 พบว่าค่าที่ได้มีผลทางคลินิก โดย สิ่งส่งตรวจที่เก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส จะให้ผลการทดสอบที่สูงกว่าค่าปกติเมื่อเปรียบเทียบกับที่เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้องเมื่อทำการทดสอบชั่วโมงที่ 6 ซึ่งให้ค่าเหมือนกันกับการทดสอบในเลือดที่ปกติ จึงสรุปได้ว่า สิ่งส่งตรวจที่เป็นพลาสมาและเลือดรวมที่ใช้ในการทดสอบ PT และ APTT จะให้ค่าที่ถูกต้องแม่นยำได้ต้องทำการทดสอบภายใน 12 ชั่วโมง หลังการเก็บสิ่งส่งตรวจและต้องนำส่งและเก็บที่อุณหภูมิห้องหรือ 4 องศาเซลเซียส

จตุรัส สุนุรัตน์

การตรวจพบ Alkaline Phosphatase Isoenzyme ชนิดผิดปกติในผู้ป่วยที่เป็นโรคมะเร็งของกระเพาะอาหาร

Jenkins MA, Steer CB, Cheng LWH, Ratnaike S. An unusual alkaline phosphatase associated with gastric carcinoma. Ann Clin Biochem 1999; 36: 743-8.

การตรวจหา Alkaline phosphatase (ALP) isoenzyme ในซีรัมสามารถนำไปใช้วินิจฉัยภาวะการแพร่ไปของโรคมะเร็งได้ ในผู้ป่วยชายอายุ 50 ปี ซึ่งได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคมะเร็งของกระเพาะอาหารโดย Gastroscopy หลังจากการตรวจ Thoracolumbar spine ด้วยการ X-rays พบว่ามีการแพร่ของมะเร็งไปยังอวัยวะอื่น จากการตรวจดูของเหลวที่ดูดออกมาจากไขกระดูกพบ Adenocarcinoma cells สำหรับการตรวจทางห้องปฏิบัติการ ผู้วิจัยได้ใช้ Polyacrylamide gel electrophoresis ที่เติม Wheat germ lectin ลงไปใน Gel เพื่อแยก ALP isoenzyme พบว่ามีการเพิ่มปริมาณของ Bone ALP, มี Liver ALP เป็นปกติ และมี Intestinal-like ALP ปรากฏอยู่ในบริเวณของ Bone ALP isoenzyme นอกจากนี้ยังพบว่ามี Immunoglobulin complex ALP ด้วย ซึ่งเมื่อนำไปย่อยด้วย Trypsin แล้วจะ

พบว่ามีปริมาณ Intestinal-like ALP มากขึ้น ALP isoenzyme ที่พบนี้อาจได้มาจาก Non-specific ALP gene ซึ่งถ่ายทอดออกไปเป็น Bone, Kidney หรือ Liver isoforms ของเอนไซม์ชนิดนี้

ชุติมา พิสิฐพงศกร

การตรวจสอบการปนเปื้อนของเลือดแม่ด้วยวิธี Alkaline Denaturation Test เพื่อใช้ทดสอบเลือดจากสะดือทารกเพื่อการวินิจฉัยก่อนคลอด

Sepulveda W, Be C, Youlton R, Gutierrez J, Carstens E. Accuracy of haemoglobin alkaline denaturation test for detecting maternal blood contamination of fetal blood sample for prenatal karyotyping. Prenat Diag 1999; 19: 927-9.

วัตถุประสงค์ เพื่อแสดงให้เห็นว่าวิธี Alkaline denaturation test สามารถทดสอบการปนเปื้อนของเลือดแม่จากการเจาะสายสะดือ

ความสำคัญ ต้องได้เลือดที่บริสุทธิ์ 100 % ของทารกเท่านั้นถึงจะสามารถวินิจฉัย Karyotype ได้

วัสดุและวิธีการ เติมเลือดในหลอดทดลอง 0.1 มล. แล้วเติมน้ำ 5 มล. จากนั้นเติม 10 % KOH 0.3 มล. ผสมให้เข้ากันโดยการปั่นเบา ๆ ทิ้งไว้ 2 นาที แล้วดูการเปลี่ยนแปลงของสี โดยการรายงานผลจะทำควบคู่กับ Cytogenetic techniques

ผลการทดลอง จากการทดสอบทารกเพศชาย 97 ราย พบว่ามี 2 ราย (2.1%) ที่มีเลือดแม่ปนอยู่ (ตรวจพบ Chromosome 46, XX) และอีก 95 รายไม่พบว่ามีเลือดแม่ปนเปื้อนอยู่

สรุป วิธีที่เสนอนี้เป็นวิธีที่ทำง่าย ประหยัด และให้ผลรวดเร็ว สามารถเจาะเลือดผู้ป่วยแล้วตรวจวัดที่ข้างเตียงได้ เป็นวิธีที่เหมาะสำหรับการตรวจอย่างคร่าว ๆ ว่าไม่มีการปนเปื้อนก่อนทำ Karyotype.

กนกวรรณ ปันวารี

ผลของ Serum-Clot Contact Time ที่มีต่อผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการเคมีคลินิก

Zhang DJ, Elswick RK, Miller WG, Bailey JL. Effect of serum-clot contact time on clinical chemistry laboratory result. Clin Chem 1998; 44: 1325-33.

ระยะเวลาที่ตั้งเลือดทิ้งไว้เพื่อให้เกิดการแข็งตัว (Serum clot contact time) ก่อนทำการแยกซีรัมเป็นสาเหตุหนึ่งของ Preanalytical variation ซึ่งมีผลทำให้ได้ค่าไม่ถูกต้อง ดังนั้นจึงได้ทำการทดลองเพื่อหาช่วงระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการปล่อยให้เลือดเกิดการแข็งตัว เพื่อความถูกต้องในการตรวจทางห้องปฏิบัติการ โดยแบ่งเลือดตัวอย่างออกเป็น 4 ส่วน ส่วนแรกเป็นหลอดควบคุมโดยทิ้งให้แข็งตัว ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที หลังจากเจาะเลือด 3 ส่วนที่เหลือนำไปอุ่นที่ 32° C นาน 3, 6, 24 ชม.ตามลำดับ แล้วจึงแยกซีรัมแล้วนำซีรัมทั้งหมดมาทดสอบในเวลาเดียวกัน ความถูกต้อง

หรือเสถียรภาพของการทดลอง กำหนดโดยการนำผลการทดลองของซีรัมที่ปั่นแยกที่ 3, 6, 24 ชม. มาเปรียบเทียบกับซีรัมที่แยกที่ 30 นาที ซึ่งเป็นการรวมความแปรปรวนต่าง ๆ ไว้แล้วคือ ความแปรปรวนจากการวิเคราะห์ และความแปรปรวนภายในของร่างกายผู้ป่วย ซึ่งสามารถยอมรับได้ จากการศึกษาทั้งหมด 63 การทดลอง พบว่า Potassium, Phosphorus, Glucose ค่ายังคงยอมรับได้เมื่อเวลาที่ปล่อยให้เลือดเกิดการแข็งตัวนานไม่เกิน 3 ชม. ส่วน Total protein, Albumin, Bicarbonate, Chloride, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol, Iron เวลาที่ยอมรับได้ไม่เกิน 6 ชม. ส่วนการทดลองที่เหลือพบว่ายอมรับได้แม้นานถึง 24 ชม.

ธีรพงศ์ บุญเฟือง

การตรวจหาผู้ป่วย Chronic Myeloid Leukemia ในระยะแรกหลังการปลูกถ่ายไขกระดูก ด้วยวิธี Hypermetaphase Fluorescence *In situ* Hybridization

Seong CM, Giralt S, Kantarjian H, *et al.* Early detection of relapse by hypermetaphase fluorescence *in situ* hybridization after allogeneic bone marrow transplantation for chronic myeloid leukemia. J Clin Oncol 2000; 18: 1831-6

วัตถุประสงค์ เพื่อเปรียบเทียบการตรวจหา Philadelphia chromosome ด้วยวิธี Hypermetaphase Fluorescence *In situ* Hybridization (HMF) และ G-band cytogenetic analysis (standard CG analysis)

ความสำคัญ ในผู้ป่วย Chronic myeloid leukemia (CML) มีความผิดปกติของโครโมโซมแบบ Reciprocal translocation ระหว่างโครโมโซมคู่ที่ 9 กับคู่ที่ 22 t(9,22)(q34;q11) ที่เรียกว่า Philadelphia chromosome

วัสดุและวิธีการ เจาะไขกระดูกผู้ป่วย CML จำนวน 51 ราย ภายหลังจากได้รับการรักษาโดยการปลูกถ่ายไขกระดูก ที่ระยะเวลาต่างๆ ทำการตรวจหา Philadelphia chromosone positive (Ph+) cell ด้วยวิธี HMF และ CG analysis วิธี HMF เป็นการเพาะเลี้ยงเซลล์ไขกระดูกด้วย Cocemid นาน 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นตรวจหา Ph+ cell ด้วย Fluorescence *In situ* Hybridization (FISH) สำหรับ CG analysis เป็นการเพาะเลี้ยง โครโมโซมจากไขกระดูกและย้อมแถบโครโมโซมแบบ G-band ด้วย Trysin-Giemsa techniques

ผลการทดลอง พบว่าผู้ป่วย CML จำนวน 51 ราย หลังจากปลูกถ่ายไขกระดูก แล้วพบว่า ผู้ป่วย 12 รายกลับมาเป็นโรคอีก โดยการตรวจในระยะแรกด้วยวิธี HMF สามารถตรวจพบ Ph+ cell ในผู้ป่วยทั้ง 12 รายได้ ในขณะที่ตรวจด้วย CG analysis ตรวจพบเพียง 4 ราย และพบว่าระยะเวลา (Median time) ที่ตรวจพบ Ph+ cell ด้วยวิธี CG analysis หลังจากตรวจด้วย HMF เท่ากับ 101 วัน

สรุป วิธี HMF มีความไวในการตรวจหา Ph+ cell มากกว่า CG analysis ในผู้ป่วยหลังการปลูกถ่ายไขกระดูก ดังนั้นวิธี HMF จึงได้นำมาตรวจติดตามผู้ป่วย CML หลังทำการปลูกถ่ายไขกระดูกทำให้ทราบสภาวะของโรคเพื่อที่จะวางแผนติดตามรักษาผู้ป่วยต่อไป

นฤมล แก้วมา

ผลของ Essential Oils ต่อการยับยั้งกระบวนการสร้างสปอร์และการหายใจของ Filamentous Fungi

Inouye S, Watanabe M, Nishiyama Y, Takeo K, Akao M, Kamaguchi H. Antisporulating and respiration-inhibitory effect of essential oils on filamentous fungi. Mycoses 1998; 41: 403-10.

กระบวนการสร้างสปอร์ของ Filamentous fungi 4 ชนิด ได้แก่ *Aspergillus fumigatus, Fusarium solani, Penicillium expansum* และ *Rhizopus oryzae* ถูกยับยั้ง เมื่อสัมผัสกับไอระเหยจากส่วนประกอบของ Citron, Lavender และ Thyme oil ที่แยกโดยวิธี Gas Chromatography (GC) ในขณะที่ ไอระเหยของ Perilla, Tea tree oils, Lemongrass และ Cinnamon bark oils ที่แยกด้วยวิธีเดียวกันแทบจะไม่มีผลต่อการยับยั้งการสร้างสปอร์ นอกจากนี้ยังพบว่า Essential oils ในรูปของสารละลายจะไม่มีผลต่อการยับยั้งกระบวนการสร้างสปอร์ ในขณะที่ไอระเหยของ Essential oils สามารถทำให้ปลาย Hyphae ของ *Rhizopus oryzae* หงิกงอ และทำให้ Conidiophore ใน *Aspergillus fumigatus* สร้างไม่สมบูรณ์ ผลของ Essential oils ต่อการยับยั้งกระบวนการสร้างสปอร์จะสัมพันธ์กับการยับยั้งกระบวนการหายใจ ซึ่งวัดจากความเข้มข้นของ Essential oils ที่ทำให้อัตราการใช้ออกซิเจนของเชื้อลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ (IC50) ด้วยเครื่องวัด YSI Model 353 biological oxygen monitor ผลของ Essential oils ที่สามารถยับยั้งกระบวนการสร้างสปอร์และการหายใจของ Filamentous fungi น่าจะนำไปประยุกต์ใช้เพื่อลดปริมาณของเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคในผู้ป่วย

กชกร หลีเจริญ

Reduction of Diagnostic Window by New Fourth-Generation Human Immunodeficiency Virus Screening Assays

Weber B, Fall EHM, Berger A, Doerr WH. Reduction of diagnostic window by new fourth - generation Human Immunodeficiency Virus screening assays. J Clin Microbiol 1998; 36: 2235-9.

วัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาวิธีการตรวจกรองการติดเชื้อ HIV แบบใหม่ ที่สามารถตรวจหาผู้ติดเชื้อ HIV ได้เร็วขึ้น

ความสำคัญ วิธีการตรวจกรองการติดเชื้อ HIV รุ่นใหม่ (Fourth-generation assays) ที่สามารถตรวจแอนติเจนและแอนติบอดีได้พร้อมกัน สามารถลดระยะตรวจพบการติดเชื้อก่อนที่จะสร้างแอนติบอดี (Window peroid) ได้สั้นลง ทำให้ตรวจหาการติดเชื้อได้เร็วกว่าวิธีตรวจรุ่นที่ 3 (Third-generation assays) ที่ใช้ในปัจจุบัน

วัสดุและวิธีการ วิธีตรวจกรองการติดเชื้อ HIV รุ่นที่ 4 มี 2 ชนิดคือ HIV DUO และ HIV Combi ทำการศึกษาเปรียบเทียบกับวิธี HIV-1/HIV-2 3rd Generation Plus ELISA และวิธี HIV-1 Ag monoclonal ซึ่งใช้ตรวจหา HIV-1 p24 Ag โดยทำการศึกษาในชุดตัวอย่างซีรัมผู้ติดเชื้อระยะแรกที่เริ่มมีการสร้างแอนติบอดี (Seroconversion panels) 17 ชุด และน้ำเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ติดเชื้อ HIV subtype ต่าง ๆ 15 ตัวอย่าง และซีรัมที่อาจเกิดปฏิกิริยาข้ามได้ง่าย 255 ตัวอย่าง

ผลการทดลอง พบว่าใน Seroconversions panels 10 ชุด วิธี HIV DUO และ HIV Combi ตรวจการ

ติดเชื้อ HIV ได้เร็วกว่า Third-generation ELISA เฉลี่ย 8.1 และ 7.5 วันตามลำดับ และเมื่อตรวจ Seroconversion panels ทั้ง 17 ชุด วิธี HIV DUO และ HIV Combi สามารถตรวจการติดเชื้อ HIV ได้เร็วกว่า Third-generation ELISA เฉลี่ย 4.8 และ 4.4 วันตามลำดับ วิธี HIV DUO และ HIV Combi ตรวจพบ p24 Ag ในน้ำเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ติดเชื้อ HIV subtype ต่าง ๆ รวมถึง Subtype O ทั้ง 15 ตัวอย่าง วิธี HIV DUO และ HIV Combi ตรวจตัวอย่างซีรัมที่จะเกิดปฏิกิริยาข้ามได้ง่าย ให้ผลบวกปลอม 4-6 ตัวอย่าง ในขณะที่วิธี Third-generation ELISA ให้ผลบวกปลอม 18 ตัวอย่าง

สรุป วิธีการตรวจกรองการติดเชื้อ HIV รุ่นใหม่สามารถตรวจหาผู้ติดเชื้อได้เร็วกว่าวิธีที่ใช้ตรวจกรองหาแอนติบอดี ในปัจจุบัน เนื่องจากสามารถตรวจ p24 Ag ได้ก่อนในระยะที่ยังตรวจไม่พบแอนติบอดี

คู่ฤทัย พระเอก

กลไกของ Neutrophil ในการฆ่าเชื้อรา *(Penicillium marneffei)* โดยการเหนี่ยวนำของ Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF)

Kudeken N, Kawarami K, Saito A. Machanism of the *in vitro* fungicidal effects of human neutrophils against *Penicillium marneffei* induced by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF). Clin Exp Immunol 2000; 119: 472-8.

วัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาผลของ GM-CSF ต่อ Neutrophil และ Granular lysate ในการฆ่าเชื้อ *P. marneffei* รวมทั้งศึกษาผลกระทบของ Colchicine และ Superoxide dismutase (SOD) ต่อ GM-CSF stimulated neutrophil

ความสำคัญ GM-CSF มีความสำคัญในการเสริมฤทธิ์ของ Neutrophil โดยการ Contact กับ *P. marneffei* ทำให้ฆ่าเชื้อได้มากขึ้น แต่ GM-CSF จะถูกยับยั้งโดย Colchicine

วัสดุและวิธีการ ทำการเพาะเลี้ยง Neutrophils กับ *P. marneffei* ร่วมกันแล้วเติม GM-CSF อย่างเดียวหรือร่วมกับ Colchicine หลังจากนั้น 24 ชั่วโมง นำเชื้อมาเพาะเลี้ยงบน Potato dextrose agar (PDA) แล้วนับจำนวนโคโลนีเปรียบเทียบกับเมื่อใช้เชื้อและ Neutrophils ที่ไม่ได้เติม GM-CSF ส่วนในการทดสอบ Granular lysate ได้เติม GM-CSF เพื่อกระตุ้น Neutrophils ก่อน แล้วจึงทำการสกัดเอา Granular lysate มาทำการทดสอบกับ *P. marneffei*

ผลการทดลอง จากการเพาะเลี้ยง Neutrophils ร่วมกับ *P. marneffei* และ GM-CSF ปรากฏว่า GM-CSF เสริมฤทธิ์ในการฆ่า *P. marneffei* ซึ่งนับปริมาณเชื้อลดลงเหลือ 568±138 x 10^3 CFU/well จากเดิมที่ไม่ได้เติม GM-CSF นับได้ 1,280±196 x 10^3 CFU/well แต่เมื่อเติม Colchicine ลงไปในการเพาะเลี้ยงด้วย ปรากฏว่า Colchicine ไปยับยั้ง GM-CSF ทำให้ปริมาณเชื้อราสูงขึ้นตามระดับของ Colchicine ที่เพิ่มขึ้น แต่ก็ยังมีปริมาณที่ต่ำกว่าการเพาะเลี้ยงเฉพาะ Neutrophils กับ *P. marneffei* แต่เมื่อทำการเติม SOD ลงไปแทน Colchicine ปรากฏว่า SOD ไม่ได้มีอิทธิพลต่อ GM-CSF เลย และในการใช้ Granular lysate ของ GM-CSF stimulated neutrophils ในการฆ่า *P. marneffei* พบว่า GM-CSF เสริมฤทธิ์ของ Granular lysate ด้วย

สรุป การใช้ GM-CSF มีผลในการเสริมฤทธิ์ของ Neutrophil และ Granular lysate ในการฆ่าเชื้อ *P. marneffei* แต่ Colchicine มีผลในการยับยั้ง GM-CSF ทำให้ Neutrophil ฆ่า *P. marneffei* ได้น้อยลง ส่วน SOD ไม่ทำลายฤทธิ์ของ GM-CSF

จิราพร สันกลกิจ

อิทธิพลของความชื้นสัมพัทธ์ต่อการควบคุมไรฝุ่นบ้าน *Dermatophagoides farinae*

Arlian LG, Neal JS, Vyszenski-Moher DL. Reducing relative humidity to control the house dust mite *Dermatophagoides farinae*. J Allergy Clin Immunol 1999; 104: 852-6.

วัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาอิทธิพลของความชื้นสัมพัทธ์ต่อระดับประชากรในการดำรงชีวิตอยู่ของไรฝุ่นบ้าน *D. farinae* โดยการลดระยะเวลาของความชื้นในบรรยากาศสลับกับการแทนด้วยความชื้นสัมพัทธ์ที่ 0% หรือ 35%

ความสำคัญ ความชื้นสัมพัทธ์ (Relative humidity; RH) เป็นปัจจัยสำคัญอย่างหนึ่งที่กำหนดจำนวนประชากรและการดำรงชีวิตของ *D. farinae* การรักษาระดับความชื้นสัมพัทธ์ 50% เป็นค่าหนึ่งที่มีการรับรองว่าสามารถลดจำนวนไรฝุ่นบ้านและระดับการเกิดภูมิแพ้ภายในบ้านได้ แม้ว่าแต่ละวันระดับความชื้นสัมพัทธ์จะมีค่าขึ้นลง เนื่องจากกิจกรรมภายในบ้าน เช่น การทำครัว อาบน้ำ การระบายอากาศ

วิธีการ การเจริญเติบโตของประชากร *D. farinae* ในแต่ละวันควบคุมโดยระดับความชื้นสัมพัทธ์ 75% หรือ 85% ที่เวลา 2, 4, 6, 8 ชั่วโมง สลับกับระดับความชื้นสัมพัทธ์ 0% หรือ 35% ที่เวลา 16, 18, 20, 22 ชั่วโมง

ผลการทดลอง ประชากรของ *D. farinae* ลดลงอย่างเห็นได้ชัดที่ระดับความชื้นสัมพัทธ์ 75% หรือ 85% ที่เวลา 2 ชั่วโมง กับระดับความชื้นสัมพัทธ์ 0% หรือ 35% ที่เวลา 22 ชั่วโมง สำหรับระดับความชื้นสัมพัทธ์ 75% ที่เวลา 4, 6, 8 ชั่วโมง กับ 35% ที่เวลา 16, 18, 20 ชั่วโมง พบว่าไรฝุ่นบ้านมีการเจริญเติบโตได้เพียงเล็กน้อย แต่เมื่อเวลาผ่านไป 10 สัปดาห์ จะพบว่าในระดับความชื้นสัมพัทธ์ 75% ที่เวลา 4, 6, 8 ชั่วโมง อัตราการเจริญเติบโตดังกล่าวยังลดลงได้อีกเป็น 98.2%, 98.0% และ 97.3% ตามลำดับ การควบคุมระดับความชื้นสัมพัทธ์ 85% อย่างต่อเนื่องสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตไรฝุ่นบ้านได้ แต่ระดับความชื้นสัมพัทธ์ 35% ที่เวลา16,18,20 ชั่วโมงนั้น พบว่าประชากรไรฝุ่นบ้านได้ลดอัตราการเจริญเติบโตลงเพียงเล็กน้อยเท่านั้น คิดเป็น 99.4%, 99.1% และ 98.8% ตามลำดับ เมื่อเทียบกับอัตราการเจริญเติบโตที่ระดับความชื้น สัมพัทธ์ 75%

สรุป การรักษาระดับความชื้นสัมพัทธ์ 50% ในแต่ละวันหรือแม้แต่มากกว่า 50% ในช่วงเวลา 2-8 ชั่วโมงในแต่ละวัน สามารถลดการเจริญเติบโตของประชากรไรฝุ่นบ้านและสารที่ก่อให้เกิดภูมิแพ้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ และการป้องกันการเจริญเติบโตของประชากร *D. farinae* ที่ได้ผลอย่างสมบูรณ์จะต้องรักษาระดับความชื้นสัมพัทธ์ ที่ 35% เป็นเวลาอย่างน้อย 22 ชั่วโมงต่อวัน และให้มีระดับ 75% หรือ 85% สำหรับเวลาที่เหลืออยู่ในแต่ละวัน

กาญจนา เตชะประเสริฐ

การยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย PHA โดย โพลีโคลนอล แอนติบอดีต่อ CD4 โมเลกุลที่ผลิตโดยวิธี DNA Immunization

Kasinrerk W, Tokrasinwit N. Inhibition of PHA-induced cell proliferation by CD4 antibodies generated by DNA immunization. Immunol Letters 1999; 67: 237-42.

ถึงแม้ว่าจะมีรายงานที่บอกถึงหน้าที่ของCD4 โมเลกุลในการจับกับ MHC class II โมเลกุล แต่หน้าที่ของ CD4 โมเลกุลในการกระตุ้น T cell นั้นยังไม่ทราบแน่ชัด ในรายงานนี้ ผู้วิจัยได้นำวิธี DNA immunization มาใช้ในการผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะกับ CD4 โมเลกุล จากนั้นนำแอนติบอดีที่ผลิตได้ไปศึกษาหน้าที่ของ CD4 โมเลกุล ในการศึกษานี้ ผู้วิจัยได้ทำการฉีดกระต่ายด้วย Bupivacaine hydrochloride จากนั้น 24 ชั่วโมง จึงฉีด DNA ที่กำหนดการสร้าง CD4 โปรตีน (CD4-DNA) เข้าทางกล้ามเนื้อทุก ๆ สัปดาห์ โดยวิธีนี้พบว่ากระต่ายสามารถสร้างแอนติบอดีต่อ CD4 โมเลกุลขึ้นในซีรัม โดยจะขึ้นสูงถึง 1:800 หลังการฉีด DNA เข้าไป 5 ครั้ง โพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อ CD4 โมเลกุลที่ผลิตขึ้นนี้สามารถจับกับ CD4 โปรตีนบน Cos cell ที่ถูก Transfect ด้วย CD4-DNA และสามารถจับกับ CD4 โปรตีนที่พบบน Peripheral blood lymphocyte และ CD4 cell line ได้ แอนติบอดีต่อ CD4 โมเลกุลที่ได้นี้สามารถยับยั้งการจับของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ CD4 โมเลกุล มาตรฐาน คือ Leu 3a และ 13B8.2 กับ CD4 โมเลกุลได้ ในการศึกษาหน้าที่ของ CD4 โมเลกุลนั้น ผู้วิจัยได้นำ Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) มากระตุ้นด้วย Phytohemeagglutinin (PHA) ที่ความเข้มข้นที่เหมาะสมในสภาวะที่มีโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อ CD4 โมเลกุลที่ผลิตได้ ผลการทดลองพบว่า โพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อ CD4 โมเลกุลสามารถยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์ที่กระตุ้นด้วย PHA ได้ การยับยั้งโดย โพลีโคลนอลแอนติบอดี ต่อ CD4 โมเลคุลนี้ อาจเกิดจากการที่แอนติบอดีต่อ CD4 โมเลกุลไปยับยั้งการรวมกันของ CD4-TCR/CD3 โมเลกุล หรืออาจรบกวนการจับของ CD4 โมเลกุลกับ IL-16 ผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นถึงความเป็นไปได้ของการนำเอาวิธี DNA immunization ไปใช้ในการผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อโมเลกุลบนผิวเซลล์

เกรียงไกร ชวาลสันตติ

การใช้ชนิด และช่วงอายุของระยะต่าง ๆ ของแมลงวันที่พบได้จากศพมาประมาณระยะเวลาหลังการตายเพื่อช่วยในการวินิจฉัยทางนิติเวช

Greenberg B, Wells JD. Forensic use of *Megaselia abdita* and *M. scalaris* (Phoridae: Diptera): case studies, development rate and egg structure. J Med Entomol 1998; 35: 205-9.

การวินิจฉัยชนิดของแมลงและอัตราการเจริญเติบโตของแมลงมีประโยชน์ในทางนิติเวชศาสตร์ในด้านการประมาณระยะเวลาหลังการตาย (Post-mortem interval; PMI) ของศพได้ โดยเฉพาะ

อย่างยิ่งกรณีที่ศพนั้นไม่มีหลักฐานอื่น แมลงวันเป็นกลุ่มแรกที่มาวางไข่ที่ศพ แมลงชนิดอื่นเช่นด้วงก็พบมีความสำคัญเช่นกันเมื่อศพนั้นล่วงเลยมาระยะเวลาหนึ่ง การวินิจฉัยแมลงกระทำได้ทั้งในระยะไข่, ตัวอ่อน, ดักแด้และตัวเต็มวัย รายงานนี้แสดงถึงประโยชน์ของแมลงวันและด้วงที่พบในศพในการประมาณ PMI ได้ในกรณีศึกษาจาก 2 ศพ; ศพที่ 1 PMI 90-98 วัน โดยแมลงที่พบเป็นหลักฐานสำคัญคือตัวเต็มวัยของแมลงวันหัวเขียว *Calliphora vicina* (ระยะเวลาตั้งแต่ไข่ถึงตัวเต็มวัยที่พบประมาณ 30 วัน), ตัวอ่อนระยะที่ 5 ของด้วง *Dermestes haemorrhoidalis* และ *D. peruvianus* (ระยะเวลาตั้งแต่ไข่ถึงระยะตัวอ่อนที่พบประมาณ 60-68 วัน) และพบ *Megaselia abdita* และ *M. scalaris* ด้วย; ศพที่ 2 PMI ประมาณ 2 เดือน แมลงที่เป็นหลักฐานสำคัญคือตัวอ่อนและดักแด้ของ *C. vicina* และตัวอ่อนของ *M. abdita* ซึ่งรายงานนี้ได้แสดงถึงอัตราการเจริญเติบตของ *M. abdita* และ *M. scalaris* เมื่อนำมาเลี้ยงด้วยอาหาร (น้ำผสมน้ำตาลและเนื้อบด) ที่อุณหภูมิต่าง ๆ และแสดงภาพถ่ายไข่ของแมลงทั้งสองชนิดนี้ที่ได้จากศพที่ 2 ด้วยกล้อง Scanning electron microscope เพื่อเป็นข้อมูลในการวินิจฉัยแมลง จากรายงานนี้แสดงให้เห็นว่า ชนิดและช่วงอายุของระยะต่างๆ ของแมลงวันที่ได้จากศพ สามารถนำมาใช้ในการประมาณ PMI เพื่อช่วยในการวินิจฉัยทางนิติเวชศาสตร์ได้

จีระนันท์ ทิพนันท์

ดรรชนีผู้แต่ง : ปีที่ 33, พ.ศ. 2543

(Subject Index : Volume 33, 2000)

กิตติพงษ์ เจิมชุนทด ; 69
กมลรัตน์ อุปนันไชย ; 138
เกษรา จันทรสิทธิผล ; 230
กนกวรรณ ปันวารี ; 232
กชกร หลีเจริญ ; 234
กาญจนา เตชะประเสริฐ ; 236
เกรียงไกร ชวาลสันตติ ; 237
ขวัญชัย รัตนเสถียร ; 20
คู่ฤทัย พระเอก ; 234
จารุณี ลอยธง ; 56
เจษฎา ลิ้มภักดี ; 60
จิรวัฒนา คำตุ้ย ; 63
จารุวรรณ วิริยะหิรัญไพบูลย์ ; 89
จิรพรรณ บุญสูง ; 89
จักร์กริช หิรัญเพชรรัตน์ ; 161
จตุรัส สุนุรัตน์ ; 231
จิราพร สันกลกิจ ; 235
จิระนันท์ ทิพนันท์ ; 237
เฉลิมศรี อินทะชาติ ; 140
ไชยวัฒน์ ไชยสมบูรณ์ ; 142
ชมนาด วัณณสุทธางกูร ; 224
ชุติมา พิสิฐพงศกร ; 231
ทัศนีย์ สุวรรณยอด ; 6
ทัศพร อัมภวา ; 20
ทิพย์สุดา คงเมือง ; 58
ธารินี ไชยวงศ์ ; 172
ธิดาดาว แหล่งอุโมงค์ ; 182
ธีรพงศ์ บุญเฟือง ; 232
นัฏฐกาล ลีลารุ่งระยับ ; 29, 124, 212
นพวรรณ บุญชู ; 63
นวพรรณ จารุรักษ์ ; 98
เนาวรัตน์ กันยานนท์ ; 128
นฤมล แก้วมา ; 233
บัณฑิต เกล้าสุวรรณ ; 111
ปิยรัตน์ สุรพฤกษ์ ; 41
ประสิทธิ์ ชนะรัตน์ ; 49, 132, 224
ผาสุก มหรรฆานุเคราะห์ ; 221
พัชราภรณ์ สินธุบุญ ; 69
รุ่งนภา เหมือนฟู ; 60
รุจาภา นิ่มสังข์ ; 76
รัตนา ฉัตรศานติกุล ; 98
รสสุคนธ์ กลิ่นหอม ; 172
รณิดา ชมสูง ; 221
ฤดี พิมพาภรณ์ ; 61
ลดาวัลย์ สาริยา ; 172
วรวรรณ วัชระสัมพันธ์กุล ; 56
วาสนา ศิริรังษี ; 128
วิชชุดา ชูสินธ์ ; 142
วัฒนา ศรีพันนาม ; 143
ศักดิ์ศรี อภิวงค์ ; 62
ศนิ โชนงนุช ; 64
ศุภชัย ศักดิ์ขจรภพ ; 161
สุวัฒศิล กิตติคุณธรรม ; 58
สุพรรณี พรมเทพ ; 61
สกุลตรา บุญธิมา ; 65
สิทธิพล สายสวัสดิ์ ; 76
สุมลพรรณ พลอยมอญ ; 138
สันติ มณีวัชระรังษี ; 139
เสาวภา โพนทอง ; 141
สาธิต พิชยางกูร ; 161
สาคร พรประเสริฐ ; 172, 182
สุชาดา ไชยสวัสดิ์ ; 190
สุมาลัย วังวรรณรัตน์ ; 204
อนุชา ศรีอรุณ ; 13
อุทุมมา มัฆะเนมี ; 20
อัจฉรา เกิดดี ; 57
อัญชลี ดีจิตกาศ ; 59
อรวรรณ ประศาสน์วุฒิ ; 69
อดิศักดิ์ ส่งแจ้ง ; 140
อำพัน สุขคำ ; 144

ดรรชนีหัวเรื่อง : ปีที่ 33, พ.ศ. 2543

(Subject Index : Volume 33, 2000)

CLINICAL CHEMISTRY / FORENSIC SCIENCES

Antioxidant Activity of *Tinospora cordifolia* Roots in Experimental Diabetes ; 56

Amphetamines in Hair by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay ; 61

An Unusual Alkaline Phosphatase Associated with Gastric Carcinoma ; 231

Carcinoembryonic Antigen (CEA) and CA 19-9 Levels in Patients Attended at Lerd-Sin Hospital, Bangkok ; 6

Calcium Levels in Maternal Milk: Relationships with Calcium Intake During the Third Trimester of Pregnancy ; 58

Determination of Ethanol in Blood by Gas Chromatograph-SPME ; 89

Decrease Response to Phototherapy for Neonatal Jaundice in Breast-Fed Infant ; 140

Effect of Serum-Clot Contact Time on Clinical Chemistry Laboratory Result ; 232

Forensic Use of *Megaselia abdita* and *M. scalaris* (Phoridae: Diptera): Case Studies, Development Rate and Egg Structure ; 237

The Determination of Bilirubin Fractions in Serum by Enzymatic Method Using a Microplate Reader I. A Computer-Interfaced Program ; 76

CLINICAL IMMUNOLOGY / BLOOD BANKING

An Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Quantitation of IgG Anti-D and IgG Subclasses in the Sera of Alloimmunized Patients ; 138

Comparison Between a Whole Blood Interferon-γ Release Assay and Tuberculin Skin Testing for the Detection of Tuberculosis Infection Among Patients at Risk for Tuberculosis Exposure ; 144

Diagnostic Value of an Antibody Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Using Affinity-Purified Antigen in an Area Endemic for Melioidosis ; 63

Detection of Antibodies Against *Penicillium marneffei* Antigens in Chiang Mai Healthy Population ; 172

Immunohistochemistry: An Important Tool in Oncology ; 98

Impact of Various Red Cell Concentrate Preparation Methods on the Efficiency of Pre-Storage White Cell Filtration and on Red Cells During Storage for 42 Days ; 142

Inhibitory Effect of Plasma from *Penicillium marneffei* Infected AIDS Patient on Proliferation of Normal Lymphocytes ; 182

ดรรชนีหัวเรื่อง : ปีที่ 33, พ.ศ. 2543

(Subject Index : Volume 33, 2000)

Inhibition of PHA-Induced Cell Proliferation by CD4 Antibodies Generated by DNA Immunization ; 237

Machanism of the *in vitro* Fungicidal Effects of Human Neutrophils Against *Penicillium marneffei* Induced by Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF) ; 235

Monoclonal Antibodies to Quinine ; 140

Production and Purification of the 19-kDa Carboxyl-terminal Fragment of *Plasmodium yoelii* Merozoite Surface Protein-1 ($MSP1_{19}$) as a FLAG Fusion Protein Expressed in *Saccharomyces cerevisiae* ; 161

Reduction of Diagnostic Window by New Fourth-Generation Human Immunodeficiency Virus Screening Assays ; 234

The Nature of the Principal Type 1 Interferon Producing Cells in Human Blood ; 63

CLINICAL MICROBIOLOGY / PARASITOLOGY

Antisporulating and Respiration-Inhibitory Effect of Essential Oils on Filamentous Fungi ; 234

Bacterial Used for the Production of Yogurt Inactivate Carcinogens and Prevent DNA Damage in the Colon of Rats ; 139

Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis Using PCR Assays on Sputum Collected within 24 Hours of Hospital Admission ; 56

Detection of Uninary Tract Infection by Reduction of Nitroblue Tetrazolium ; 59

Detection of Salmonella Contamination in Food Sample by Dot-ELSA, DNA Amplification and Bacterial Culture ; 62

Growth of Virulent and Avirulent *Mycobacterium tuberculosis* Strains in Human Macrophages ; 61

Misdiagnoses of Tuberculosis Resulting from Laboratory Cross-Contamination of *Mycobacterium tuberculosis* Cultures; 128

Microplate Alamar Blue Assay Versus BACTEC 460 System for High-Throughput Screening of Compounds Against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*; 230

Reducing Relative Humidity to Control the House Dust Mite *Dermatophagoides farinae* ; 236

Shedding of Cytomegalovirus and Herpesviruses 6, 7, and 8 in Saliva of Human Immunodeficiency Virus Type 1-Infected Patients and Healthy Control ; 58

ดรรชนีหัวเรื่อง : ปีที่ 33, พ.ศ. 2543
(Subject Index : Volume 33, 2000)

Use of Delipidized Antigen of *Taenia Solium* Metacestode in IgG-ELISA for Detection of Neurocysticercosis ; 60

CLINICAL MICROSCOPY / CYTOLOGY / CYTOGENETIC

Accuracy of Haemoglobin Alkaline Denaturation Test for Detecting Maternal Blood Contamination of Fetal Blood Sample for Prenatal Karyotyping ; 232

Deep Vein Thrombosis ; 41

Determination of HbF Levels ; the Routine Methods ; 60

Early Detection of Relapse by Hypermetaphase Fluorescence *in situ* Hybridization after Allogeneic Bone Marrow Transplantation for Chronic Myeloid Leukemia ; 233

Influence of Aspirin on Platelet Count and Volume in Human ; 57

Influence of Hemoglobin E Trait on Severity of Falciparum Malaria ; 65

Misdiagnosis of Homozygous Alpha-Thalassemia 1 may Occur if Polymerase Chain Reaction Alone is Used in Prenatal Diagnosis ; 138

Molecular Genetics of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency in Mexico ; 143

Prenatal and Postnatal Diagnoses of Thalassemias and Hemoglobinopathies by HPLC ; 64

Stability of Prothrombin Time and Activated Partial Thromboplastin Time Test under Different Storage ; 231

Visual Inspection with Acetic Acid for Cervical-Cancer Screening : Test Quality in a Primary-Care Setting ; 141

100% Rapid (Partial) Rescreening for Quality Assurance ; 142

MANAGEMENT

Clean Laboratory Set Up; 190

Qualified Graduates by His Majesty the King's Addresses ; 132

Strategic Planning of Quality Assurance in Education ; 224

The Suitable Method of Budgeting for Graduate Production ; 13

The Way to be Quality Organization ; 49

PHYSICAL THERAPY

Chest Physical Therapy Techniques ; 29

Concept for Development of Medical Rehabilitation in Thailand ; 111

Chest Physical Therapy and Biochemical Changes ; 124

ดรรชนีหัวเรื่อง : ปีที่ 33, พ.ศ. 2543

(Subject Index : Volume 33, 2000)

Free Radical and Exercise Tolerance in Chroni Obstructive Pulmonary Diseases: COPD ; 212

Types of Pain Afferent Nerve Fibers for Mechanical, Heat and Cold Stimuli ; 69

RADIOLOGIC TECHNOLOGY

Production of Tissue Equivalent Phantom for Radiographic Exposure Technique Chart Establishment ; 20

What is Proton Beam ? ; 204

MISCELLANY

Plastination ; 221

คำแนะนำสำหรับผู้เขียน

วารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่ เป็นวารสารทางวิชาการของคณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ยินดีพิจารณาบทความด้านเทคนิคการแพทย์ รังสีเทคนิค กิจกรรมบำบัด กายภาพบำบัด และด้านอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับงานด้านวิทยาศาสตร์สุขภาพ ซึ่งไม่เคยตีพิมพ์ในวารสารอื่นใดมาก่อน เพื่อลงตีพิมพ์ในวารสารนี้ สำหรับบทความที่ตีพิมพ์ในวารสารนี้แล้ว ถือว่าเป็นลิขสิทธิ์ของวารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่ ดังนั้นเพื่อให้การตีพิมพ์ ดำเนินการไปได้อย่างรวดเร็วถูกต้อง ขอให้ผู้เขียนปฏิบัติ ดังนี้

ประเภทของบทความที่ลงตีพิมพ์ แบ่งเป็น 8 ประเภท คือ :-

1. **บทบรรณาธิการ (EDITORIAL)** เป็นบทความซึ่งวิเคราะห์ผลงานทางวิทยาศาสตร์ใหม่ๆ ที่มีความสำคัญในวิชาชีพเทคนิคการแพทย์ รังสีเทคนิค กิจกรรมบำบัด กายภาพบำบัด หรือวิทยาศาสตร์ที่เกี่ยวข้องหรืออาจเป็นบทความซึ่งมิใช่เรื่องทางวิชาการโดยตรง แต่เป็นความคิดเห็นเพื่อประโยชน์ของการยกระดับวิชาชีพให้สูงขึ้น

2. **นิพนธ์ต้นฉบับ (RESEARCH ARTICLE)** เป็นรายงานผลงานวิจัยทางด้านที่เกี่ยวข้องโดยที่บทความนั้นยังไม่เคยตีพิมพ์ หรืออยู่ในระหว่างการตีพิมพ์ในวารสารอื่นใด

3. **รายงานเทคนิคทางห้องปฏิบัติการ กายภาพบำบัด กิจกรรมบำบัด และรังสีเทคนิค (SHORT TECHNICAL REPORT)** เป็นรายงานการประยุกต์ใช้เทคนิคการตรวจในห้องปฏิบัติการ หรือเทคนิคทางกายภาพบำบัด กิจกรรมบำบัด และรังสีเทคนิค โดยแสดงรายละเอียดทั้งวิธีการ และผลการใช้เทคนิคนั้นๆ เปรียบเทียบกับวิธีเดิม รวมถึงการวิจารณ์และสรุปผล

4. **นิพนธ์ปริทัศน์ (REVIEW ARTICLE)** เป็นบทความที่รวบรวมเอาผลงานในเรื่องใดเรื่องหนึ่งโดยเฉพาะ ซึ่งเคยลงตีพิมพ์แล้ว นำมาวิเคราะห์ วิจารณ์ เปรียบเทียบเพื่อให้เกิดความกระจ่างในเรื่องนั้นยิ่งขึ้น

5. **บทความทั่วไป (GENERAL ARTICLE)** เป็นบทความที่มีวิชาการเฉพาะทางรวมอยู่ค่อนข้างน้อย เขียนเพื่อให้บุคคลทั่วไปสามารถอ่านเข้าใจตลอด

6. **บันทึก (NOTE)** เป็นบทความ หรือรายงานผลงานวิจัยคล้ายข้อ 1 และข้อ 2 แต่มีความกะทัดรัดกว่าทั้งในเนื้อหาและรายละเอียด

7. **ปกิณกะ (MISCELLANY)** เป็นบทความทั่วไปที่เกี่ยวข้องกับกิจกรรมทางด้านวิทยาศาสตร์สุขภาพ เช่น การวิจารณ์ผลเวชศาสตร์ชันสูตร การตอบปัญหาทางด้านเวชศาสตร์ชันสูตร เป็นต้น

8. **จดหมายถึงบรรณาธิการ (LETTER TO THE EDITOR)** เป็นบทความทางวิชาการ หรืออื่นๆ ที่เป็นบันทึกสั้นๆ ในรูปของจดหมายถึงบรรณาธิการ เพื่อแสดงความคิดเห็น และประสบการณ์ในทางวิชาการ

9. **ย่อเอกสาร (ABSTRACT)** เป็นเรื่องย่อของบทความที่น่าสนใจและได้รับการตีพิมพ์แล้วในวารสารต่างๆ

คำแนะนำสำหรับการเตรียมต้นฉบับ

1. ภาษาที่ใช้ มี 2 ภาษาคือ ภาษาไทยและ/หรือภาษาอังกฤษ ต้นฉบับภาษาไทย ควรใช้ถ้อยคำและศัพท์ภาษาไทยให้มากที่สุดเท่าที่จะทำได้ โดยใช้ตามพจนานุกรมศัพท์แพทย์อังกฤษ-ไทยฉบับราชบัณฑิตยสถานเป็นบรรทัดฐาน คำศัพท์ภาษาอังกฤษที่บัญญัติเป็นภาษาไทยแล้วแต่ยังไม่เป็นที่ทราบกันอย่างแพร่หลาย หรือแปลแล้วเข้าใจยาก ให้ใส่ภาษาเดิมกำกับไว้ในวงเล็บหรืออนุโลมให้ใช้ภาษาอังกฤษได้

2. ต้นฉบับ ใช้กระดาษสีขาวสะอาดค่อนข้างหนา ขนาด 8.5x11 นิ้ว พิมพ์หน้าเดียว เว้นระยะห่างระหว่างบรรทัด 2 ช่วง (2 spaces) ใช้โปรแกรมและตัวพิมพ์มาตรฐาน มีเลขที่หน้ากำกับทุกหน้า

3. ชื่อเรื่อง ให้มีทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษเป็นข้อความสั้นๆ และสื่อความหมาย บ่งชี้ให้เห็นสาระสำคัญของเนื้อหาในตัวบทความ ไม่ควรใช้คำย่อนอกจากคำย่อนั้นเป็นที่ทราบกันโดยทั่วไป

4. ชื่อผู้แต่ง ให้ใส่ชื่อตัวและชื่อสกุลเต็มทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ กรณีที่ผู้แต่งหลายคนให้เรียงตามลำดับความสำคัญในงานนั้นๆ และให้ชื่อและสถานที่ติดต่อพร้อมหมายเลขโทรศัพท์, โทรสาร, หรือ E-mail address ของผู้รับผิดชอบบทความเพื่อการติดต่อได้สะดวก

5. นิพนธ์ต้นฉบับ ให้มีบทคัดย่อ (Abstract) ทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ ความยาวไม่เกิน 200 คำ โดยแบ่งเป็น 5 หัวข้อดังนี้ วัตถุประสงค์ ตัวอย่างทดสอบ วิธีการ ผลการทดสอบ และสรุป ทั้งนี้ให้มีคำหัส (Key word) ไม่เกิน 5 คำ

6. การจัดลำดับเนื้อเรื่องสำหรับนิพนธ์ต้นฉบับให้เรียงตามลำดับตามหัวข้อ ดังนี้ :-
   * **บทนำ** (Introduction) ซึ่งรวมถึงวัตถุประสงค์หรือสมมติฐานในการศึกษา
   * **วัสดุและวิธีการ** (Materials and Methods)
   * **ผล** (Results)
   * **วิจารณ์ผล** (Discussion)
   * **กิตติกรรมประกาศ** (Acknowledgement)
   * **เอกสารอ้างอิง** (References)

7. กรณีที่งานวิจัยนั้น ได้รับทุนวิจัย ให้ระบุแหล่งที่มาของทุนวิจัยนั้นด้วย

8. การอ้างอิงเอกสารในเนื้อเรื่อง ให้อ้างอิงเรียงตามลำดับเลขที่ ของเอกสารอ้างอิงซึ่งอยู่ท้ายเรื่อง โดยใส่ตัวเลขแบบ superscript ต่อท้ายข้อความนั้นๆ

9. การเตรียมตาราง แผนภูมิ รูปภาพประกอบ
   * ตาราง แผนภูมิ รูปภาพประกอบ ให้แยกไว้ต่างหาก โดยใช้กระดาษ 1 แผ่น ต่อ 1 ตาราง หรือ 1 แผนภูมิหรือ 1 รูปภาพ

- รูปถ่าย ให้ใช้ภาพถ่ายขาวดำ ขนาดโปสการ์ด (3"x5") ผิวหน้าเรียบ
- ภาพเขียน ให้เขียนด้วยหมึกดำอินเดียน (Indian ink) บนกระดาษอาร์ตที่หนาพอสมควร
- คำอธิบายรูป ให้พิมพ์แยกไว้ต่างหาก ไม่พิมพ์ลงในรูปนั้นๆ และให้เขียนหมายเลขกำกับ ไว้ด้านหลังรูปด้วยดินสอ เบาๆ

10. การส่งบทความต้นฉบับ ให้ส่งต้นฉบับจำนวน 2 ชุดพร้อมดิสเกตต์ที่ระบุโปรแกรมที่ใช้พิมพ์มายัง

บรรณาธิการวารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่
คณะเทคนิคการแพทย์
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เชียงใหม่ 50200
โทรศัพท์ : (053) 945086 หรือ 945068
โทรสาร : (053) 221890
E-mail : asmbi001@cmu.chiangmai.ac.th

สำนาพิมพ์ (Reprint)

บทความที่ได้รับการตีพิมพ์ในวารสารนี้ ผู้เขียนบทความจะได้รับวารสาร 1 เล่ม พร้อมสำเนาพิมพ์ (Reprint) จำนวน 5 ชุด

การเขียนเอกสารอ้างอิง

การเขียนเอกสารอ้างอิง ให้ใช้ตามระบบของที่ประชุมแวนคูเวอร์ (Vancouver) ดังต่อไปนี้ :-

เอกสารที่เป็นวารสาร

- เอกสารที่เป็นวารสาร ถ้าผู้นิพนธ์น้อยกว่า 6 คน ให้ใส่ชื่อผู้นิพนธ์ทุกคน ถ้าผู้นิพนธ์มากกว่า 6 คน ให้ใส่ชื่อ 3 คนแรกแล้วตามด้วย *et al (ตัวเอียง)* การเขียนชื่อผู้นิพนธ์ และเครื่องหมายวรรคตอน เป็นดังตัวอย่าง

Sorter NA, Wasterman TI, Austen KF. Cold urticaria : release into the circulation of histamine and eosinophil chemotactic factor of anaphylaxis during cold challenge. N Engl J Med 1976; 294: 687-90.

- เอกสารที่เป็นวารสาร และมีผู้นิพนธ์เป็นกลุ่ม ให้เขียนดังตัวอย่าง

The Committee on Enzymes of the Scandinavian Society for Clinical Chemistry and Clinical Physiology. Recommended method for the determination of gamma-glutamyl transferase in blood. Scand J Clin Lab Invest 1976; 36: 119-25.

เอกสารที่เป็นหนังสือ

- สำหรับหนังสือที่มีผู้นิพนธ์คนเดียว ให้เขียนตัวอย่าง

Oaler AG. Complement Mechanisms and Functions. Englewood Cliffs : Prentice Hall, 1976.

- หนังสือที่มีผู้นิพนธ์หลายคน และมีบรรณาธิการ หรือหัวหน้าในการเขียน ให้เขียนดังตัวอย่างนี้

Rhodes AJ, van Rooyan CE (eds). Textbook of Virology for Students and Practitioners of Medicine and Their Health Sciences. 5th ed, Baltimore : Williams and Wilkins, 1967.

- หนังสือที่มีผู้นิพนธ์เป็นกลุ่มในหน่วยงาน ให้เขียนดังตัวอย่าง

American Medical Association Department of Drugs. AMA Drug Evaluations. 3rd ed, Littleton : Publishing Sciences Group, 1977.

- การอ้างเฉพาะบทใดบทหนึ่งในหนังสือ ให้เขียนดังตัวอย่าง

Weinstein L, Swartz MN. Pathogenic properties of invading microorganisms. In : Sodeman WA Jr, Sodeman WA (eds), Pathologic Physiology: Mechanisms of Disease. Philadelphia : WB Saunders, 1974: 457-72.

- รายงานของหน่วยงานที่ตีพิมพ์เป็นปกติ ให้เขียนดังตัวอย่าง

National Center of Health Statistics. Acute conditions : Incidence and associated disability, United States, July 1968-June 1969. National Center for Health Statistics. 1972. (Vital and health statistics. Series: 10: Data from the National Health Survey No. 69) (DHEW publication No (HSM) 72-1037).

- หนังสือรายเดือน รายปักษ์ ให้เขียนดังตัวอย่าง

Roueche B. Annals of Medicine : The Santa Claus culture. The New Yorker 1971. Sept 4: 66-81.

- หนังสือพิมพ์รายวัน ให้เขียนดังตัวอย่าง

Shaffer RA. Advances in chemistry are starting to unlock mysteries of the brain : discoveries could help cure alcoholism and insomnia, explain mental illness. How the messengers works. Wall Street Journal 1977. Aug 12: 1(col 1), 10 (col 1).

****

ข้อคิดเห็นใดๆ ในบทความ หรือเรื่องที่ตีพิมพ์ในวารสารนี้ เป็นข้อคิดเห็นส่วนตัวของผู้เขียนมิได้เกิดจาก บรรณาธิการ หรือผู้จัดทำ แต่อย่างใด

****