นิพนธ์ต้นฉบับ

การประเมินกรรมวิธีฉายแสงผลิตภัณฑ์โลหิตด้วย Cobalt-60 เพื่อยับยั้ง T Lymphocyte ในโรงพยาบาลส่วนภูมิภาค

รวิสุต เดียวอิศเรศ[1] สุธาทิพย์ พงษ์เจริญ[2] ฉัตรวุฒิ พัทธวีรกุล[3] นันทวัฒน์ อู่ดี[4] เอกอมร เทพพรหม[1] สมบัติ บุญขวาง[5] กุลนิษฐ์ แพงวังทอง[6] สัจจพงษ์ แต้ดุลยกุล[1] ขวัญสุดา สุภลาภ[7] และ พีระพล วอง[1]

[1]หน่วยปลูกถ่ายไขกระดูก โรงพยาบาลมหาวิทยาลัยนเรศวร [2]ภาควิชาอายุรศาสตร์ [3]ภาควิชารังสีวิทยา คณะแพทยศาสตร์ [4]ภาควิชารังสีเทคนิค คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร [5]หน่วยรังสีรักษา กลุ่มงานรังสีวิทยา โรงพยาบาลพุทธชินราช [6]งานธนาคารเลือด ฝ่ายพยาธิวิทยาคลินิก [7]หน่วยวิจัยด้านวิทยาศาสตร์การแพทย์พื้นฐาน งานวิจัย คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

บทคัดย่อ

บทนำ *การดูแลรักษาผู้ป่วยที่เข้ารับการปลูกถ่ายไขกระดูกในช่วงที่ผู้ป่วยมีเม็ดเลือดขาวต่ำจำเป็นต้องใช้ผลิตภัณฑ์โลหิตที่ผ่านการยับยั้ง T lymphocyte ด้วยรังสีแกมมาเพื่อป้องกันภาวะ transfusion associated graft versus host disease อย่างไรก็ดี ในการเตรียมการเพื่อให้สามารถจัดหาผลิตภัณฑ์โลหิตดังกล่าวในโรงพยาบาลส่วนภูมิภาคซึ่งมีทรัพยากรจำกัด อาจจำเป็นต้องใช้เครื่องฉายแสงที่มีอยู่แล้วในงานบริการ ได้แก่ cobalt-60* ***วัตถุประสงค์*** *การศึกษานี้ต้องการประเมินกรรมวิธีฉายแสงผลิตภัณฑ์โลหิตด้วย cobalt-60 เพื่อยับยั้ง T lymphocyte* ***วัสดุและวิธีการ*** *รับบริจาคโลหิตจากอาสาสมัครที่มีสุขภาพแข็งแรงระหว่าง มิถุนายน 2554 ถึง กุมภาพันธ์ 2555 ณ ธนาคารเลือด โรงพยาบาลมหาวิทยาลัยนเรศวร จำนวน 10 ราย ได้เป็นผลิตภัณฑ์โลหิตชนิด packed red cell และนำไปฉายแสงด้วย cobalt-60 คำนวณปริมาณรังสีที่ใช้จากโปรแกรมการคำนวณของเครื่องฉายแสง ให้ได้ความเข้มข้นรวม 25 Gy จากนั้นนำผลิตภัณฑ์โลหิตที่ได้มาทำการประเมินผลการยับยั้ง T lymphocyte โดยใช้เทคนิค mixed lymphocyte reaction (MLR) และ mitogen induced T lymphocyte proliferation เปรียบเทียบค่าการเพิ่มจำนวนของเซลล์ lymphocyte ก่อนและหลังฉายแสง* ***ผลการวิจัย*** *จาก MLR พบว่า T lymphocyte ถูกยับยั้งหน้าที่โดยสมบูรณ์เช่นเดียวกับเกณฑ์มาตรฐานและจาก mitogen induced T lymphocyte proliferation พบว่ามีการลดลงของค่าการเพิ่มจำนวนของ lymphocyte เปรียบเทียบก่อนและหลังฉายแสงเฉลี่ยร้อยละ 34.1* ***สรุป*** *ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพในการยับยั้ง T lymphocyte จากกรรมวิธีฉายแสงผลิตภัณฑ์โลหิตด้วย cobalt-60 ซึ่งช่วยเพิ่มความมั่นใจในการใช้ผลิตภัณฑ์โลหิตดังกล่าวในการรักษาผู้ป่วยโดยวิธีปลูกถ่ายไขกระดูกในโรงพยาบาลส่วนภูมิภาค*

คำสำคัญ : ● *Irradiated blood product* ● *Cobalt-60* ● *Bone marrow transplantation*

วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต 2559;26:357-64.

ได้รับต้นฉบับ 3 มิถุนายน 2559 รับลงตีพิมพ์ 8 สิงหาคม 2559

ต้องการสำเนาต้นฉบับติดต่อ นพ.รวิสุต เดียวอิศเรศ หน่วยปลูกถ่ายไขกระดูก โรงพยาบาลมหาวิทยาลัยนเรศวร ถนนพิษณุโลก-นครสวรรค์ ตำบลท่าโพธิ์ อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก 65000

Original Article

Assessment of Blood Product Irradiation with Cobalt-60 for T Lymphocyte Inhibition in a Provincial Hospital

Rawisut Deoisares[1], Sutatip Pongcharoen[2], ChatrawutPattaweerakul[3], NuntawatUdee[4], Akamon Tapprom[1], Sombat Boonkhwang[5], Kullanit Pangwangthong[6], Satchapong Taedunyagun[1], Kwansuda Supalap[7] and Peerapon Wong[1]

[1]Bone Marrow Transplant Unit, Naresuan University Hospital; [2]Department of Medicine; [3]Department of Radiology, Faculty of Medicine; [4]Department of Radiological Technology, Faculty of Allied Health Sciences; [5]Radiotherapy Section, Radiology Department, Buddhachinnaraj Hospital; [6]Blood Bank, Clinical Pathology; [7]Basic Medical Science Research Unit, Office of Research, Faculty of Medicine, Naresuan University

Abstract:

Background: *To prevent transfusion associated graft versus host disease, inhibition of T lymphocyte proliferation by gamma irradiation of blood products is essential in neutropenic patients during bone marrow transplantation. However, with limited resources, providing blood products with irradiation may be feasible with cobalt-60, which is basically available for routine radiotherapy in upcountry hospitals.* ***Objective:*** *This study aimed to evaluate T lymphocyte inhibition by cobalt-60 irradiation of blood products.* ***Materials and Methods:*** *Between June 2011 and February 2012, ten packed red cell products were processed from healthy volunteers in routine blood donations at the Blood Bank, Naresuan University Hospital. Each product was then irradiated with cobalt-60, for 25-Gy dose calculated by computer software. Mixed lymphocyte reaction (MLR) and mitogen induced T lymphocyte proliferation were used to evaluate T cell inhibition determined by lymphocyte proliferation value before and after irradiation.* ***Results:*** *With MLR technique, the results showed complete inhibition of T cells, compatible with standard criteria for qualified irradiated blood product. Lymphocyte proliferation values decreased by 34.1% on average with mitogen induced T lymphocyte proliferation.* ***Conclusion:*** *Irradiation of blood products with cobalt-60 showed distinct efficacy of T lymphocyte inhibition. With these results, bone marrow transplantations in provincial hospitals can be conducted with more confidence.*

Keywords : ● *Irradiated blood product* ● *Cobalt-60* ● *Bone marrow transplantation*

J Hematol Transfus Med 2016;26:357-64.

บทนำ

Transfusion associated graft versus host disease (TA-GVHD) เป็นภาวะแทรกซ้อนสำคัญในการรักษาผู้ป่วยด้วยกระบวนการปลูกถ่ายไขกระดูก ภาวะดังกล่าวเกิดจาก T lymphocyte ที่ยังมีชีวิตในผลิตภัณฑ์โลหิตเหนี่ยวนำให้เกิดการทำลายเซลล์และเนื้อเยื่อต่างๆ ของผู้รับ จากการที่มีความแตกต่างของ histocompatibility antigen ระหว่างผู้ให้และผู้รับ โดยเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันของผู้รับไม่สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของ T lymphocyte ดังกล่าวของผู้ให้ได้ เนื่องจากระบบภูมิคุ้มกันถูกทำลายไปก่อนหน้านั้นโดยเคมีบำบัดขนาดสูง หรือการฉายรังสี ในกระบวนการรักษาโดยวิธีปลูกถ่ายไขกระดูก[1] การป้องกันภาวะแทรกซ้อนดังกล่าวทำได้โดยการทำให้ T lymphocyte ของผู้ให้สูญเสียความสามารถในการเพิ่มจำนวน และยับยั้งหน้าที่ปกติของ T lymphocyte โดยวิธีฉายรังสีแกมมาในผลิตภัณฑ์โลหิตก่อนให้แก่ผู้ป่วยปลูกถ่ายไขกระดูก การกรอง T lymphocyte โดยใช้ชุดกรองแม้จะช่วยลดจำนวน T lymphocyte ลง แต่ไม่สามารถป้องกัน TA-GVHD ได้โดยสมบูรณ์[2] ดังนั้นกรรมวิธีในการฉายรังสีแกมมาในผลิตภัณฑ์โลหิตจึงเป็นส่วนประกอบสำคัญในการรักษาผู้ป่วยโดยวิธีปลูกถ่ายไขกระดูก

แหล่งพลังงานสำหรับการฉายรังสีแกมมาโดยทั่วไปได้มาจาก cesium-137 (^{137}Cs) และ cobalt-60 (^{60}Co) ซึ่งเครื่องฉายแสงผลิตภัณฑ์โลหิตที่ใช้อยู่ในปัจจุบันเกือบทั้งหมดใช้ cesium-137 เป็นแหล่งพลังงาน อย่างไรก็ดีเครื่องฉายแสงผลิตภัณฑ์โลหิตที่ผลิตขึ้นโดยเฉพาะเป็นเครื่องมือที่มีราคาสูง หากต้องการใช้ให้คุ้มค่าจำเป็นต้องใช้ในศูนย์บริการโลหิตที่มีการสั่งใช้ผลิตภัณฑ์โลหิตพิเศษดังกล่าวในปริมาณมาก เช่นศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ การลงทุนจัดซื้อเครื่องฉายแสงผลิตภัณฑ์โลหิตมาใช้ในโรงพยาบาลต่างจังหวัดอาจไม่คุ้มค่าเพียงพอ และถึงแม้ว่าโรงพยาบาลในส่วนภูมิภาคจะสามารถสั่งใช้ผลิตภัณฑ์โลหิตดังกล่าวซึ่งผ่านการฉายแสงจากศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ กรุงเทพฯ ได้อยู่แล้วก็ตาม ในทางปฏิบัติยังมีปัญหาเรื่องของความล่าช้าในการจัดส่ง ทำให้โรงพยาบาลในส่วนภูมิภาคซึ่งต้องการใช้ผลิตภัณฑ์โลหิตดังกล่าว โดยเฉพาะในการรักษาผู้ป่วยโดยวิธีปลูกถ่ายไขกระดูก จำเป็นต้องหากรรมวิธีฉายแสงผลิตภัณฑ์โลหิตด้วยตัวเองเพื่อเตรียมผลิตภัณฑ์โลหิตไว้ใช้ได้อย่างทันท่วงที ในทางปฏิบัติเนื่องจากงานรังสีรักษาของโรงพยาบาลในส่วนภูมิภาคมักใช้ cobalt-60 เป็นเครื่องมือในการให้บริการทางรังสีรักษาอยู่แล้วดังนั้นการใช้ cobalt-60 เป็นแหล่งพลังงานสำหรับการฉายแสงผลิตภัณฑ์โลหิตจึงมีความเป็นไปได้ในการดำเนินงานในต่างจังหวัด โดยหลักการสำคัญในการฉายแสงผลิตภัณฑ์โลหิต เพื่อยับยั้ง T lymphocyte คือการทำให้ทุกส่วนของถุงบรรจุผลิตภัณฑ์ได้รับรังสีอย่างทั่วถึง เท่ากับขนาดรังสี 25 Gy โดย Food and Drug Administration (FDA) ของสหรัฐอเมริการะบุขนาดรังสีในตำแหน่งส่วนกลางของถุงผลิตภัณฑ์เท่ากับ 25 Gy และอนุโลมให้ขนาดรังสีในส่วนอื่นๆ ไม่น้อยกว่า 15 Gy แต่ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติของอังกฤษแนะนำให้ทุกส่วนของถุงผลิตภัณฑ์ได้รับรังสีไม่ต่ำกว่าขนาด 25 Gy[2] การฉายแสงผลิตภัณฑ์โลหิตโดยใช้เครื่องฉายแสงที่ผลิตขึ้นมาสำหรับการฉายแสงผลิตภัณฑ์โลหิตโดยเฉพาะมีข้อได้เปรียบตรงที่เครื่องออกแบบให้มีแท่นหมุนในส่วนของช่องวางผลิตภัณฑ์โลหิตเพื่อหมุนให้ถุงผลิตภัณฑ์โลหิตได้รับรังสีอย่างทั่วถึง โดยมีตัวกำเนิดรังสีอยู่ติดกับช่องวางผลิตภัณฑ์ แต่ในการฉายแสงโดยใช้ cobalt-60 ในงานบริการรังสีรักษาทั่วไป ออกแบบขึ้นมาสำหรับฉายแสงผู้ป่วย จึงจำเป็นต้องวางผลิตภัณฑ์โลหิตบนแท่นวางที่อยู่นิ่ง และมีระยะห่างจากตัวกำเนิดรังสีมากกว่า

จังหวัดพิษณุโลกเป็นศูนย์กลางการรับผู้ป่วยโรคมะเร็งจากจังหวัดต่างๆ ในเขตภาคเหนือตอนล่าง โดยมีโรงพยาบาลพุทธชินราชเป็นโรงพยาบาลศูนย์ หากจังหวัดพิษณุโลกสามารถจัดตั้งหน่วยปลูกถ่ายไขกระดูกขึ้นเองได้ จะสามารถช่วยเหลือผู้ป่วยจำนวนไม่น้อยในเขตภาคเหนือตอนล่าง จึงเป็นที่มาที่ทำให้คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร พิจารณาจัดตั้งหน่วยปลูกถ่ายไขกระดูก โรงพยาบาลมหาวิทยาลัยนเรศวร ขึ้นเมื่อปี พ.ศ. 2551 และเริ่มให้การรักษาผู้ป่วยรายแรกเมื่อ มิถุนายน พ.ศ. 2552[3] การศึกษานี้ต้องการประเมินกรรมวิธีฉายแสงผลิตภัณฑ์โลหิตด้วย cobalt-60 ซึ่งเป็นเครื่องที่มีใช้อยู่แล้วในจังหวัดพิษณุโลก เพื่อยับยั้ง T lymphocyte เพื่อจัดเตรียมผลิตภัณฑ์โลหิตดังกล่าวไว้ใช้สำหรับผู้ป่วยปลูกถ่ายไขกระดูกของโรงพยาบาลมหาวิทยาลัยนเรศวร

วัสดุและวิธีการ

รวบรวมอาสาสมัครสุขภาพดีจำนวน 10 ราย ระหว่าง มิถุนายน 2554 ถึง กุมภาพันธ์ 2555 ณ ธนาคารเลือด โรงพยาบาลมหาวิทยาลัยนเรศวร ทำการเก็บเลือดของอาสาสมัครในรูปของ packed red cell (PRC) ตามขั้นตอนการบริจาคโลหิตปกติ พร้อมกับแยกเก็บเลือดในหลอดทดลองปริมาตร 20 มล.ต่างหากในแต่ละราย (ตัวอย่างเลือดก่อนฉายแสง) เจาะเก็บเลือดคราวละ 2 ราย (รวม 5 คู่) เพื่อนำมาทำปฏิกิริยากันในขั้นตอนทดสอบทางระบบภูมิคุ้มกัน นำถุง PRC ที่ได้ ไปฉายแสงด้วย cobalt-60 จากนั้นนำ PRC ที่ฉายแสงแล้วมาทำการประเมินผลการยับยั้ง T lymphocyte โดยใช้เทคนิค mixed lymphocyte reaction (MLR) และ mitogen induced T lymphocyte proliferation

วิธีการฉายแสงผลิตภัณฑ์โลหิตด้วย cobalt-60

จัดวาง PRC บนวัสดุสมมูลเนื้อเยื่อ (tissue equivalent material) ชนิด solid water phantom ที่มีความหนา 15 ซม. เพื่อป้องกันอิทธิพลจากรังสีกระเจิงกลับ เปิดพื้นที่ลำรังสีสำหรับการฉายแสงขนาด 20x20 ซม. เพื่อให้ครอบคลุมทั่วทั้งถุงบรรจุผลิตภัณฑ์โลหิต กำหนดให้ระยะจากต้นกำเนิดรังสีถึงผิวด้านบนของถุง PRC (source to surface distance) เท่ากับ 80 ซม. วางแผ่นวัสดุสมมูลเนื้อเยื่อชนิด solid water phantom ที่มีความหนา 1 ซม. ไว้ด้านบนของถุงเพื่อกำหนดปริมาณรังสีสูงสุดที่ระดับความลึก 1.5 ซม.คำนวณปริมาณรังสีโดยปรับแก้ค่าอัตราการปลดปล่อยรังสีในอากาศ (dose rate in free space) ของ cobalt-60 ณ วันที่ทำการฉายรังสี ด้วยโปรแกรมการคำนวณค่าปริมาณรังสีเพื่อให้ได้ค่าปริมาณรังสีที่กำหนดไว้ (prescription dose) เท่ากับ 25 Gy โดยค่าระดับความลึกในการคำนวณปริมาณรังสีกำหนดจากค่ากึ่งกลางความหนาของถุงบรรจุผลิตภัณฑ์โลหิตเพื่อให้ปริมาณรังสีกระจายตัวอย่างทั่วถึงได้ผลลัพธ์เป็นระยะเวลาในการฉายแสง

การทดสอบ MLR

ทำการคัดแยกเซลล์เม็ดเลือดขาวโดยวิธี density gradient centrifugation ด้วยน้ำยา Lymphoprep (Axis-Shield PoC AS, Oslo, Norway) ให้ได้เซลล์ชนิด peripheral blood mononuclear cell (PBMC) จากเลือดของอาสาสมัคร ปริมาตร 20 มล. ที่เจาะเก็บไว้ก่อนฉายแสง (non-irradiated sample) และจากถุง PRC ที่ได้รับการฉายแสงมาแล้ว (irradiated sample) โดยทำการเลี้ยงเซลล์ในน้ำยา RPMI-16740 ที่มี 1% Streptomycin/Penicillin, 1% L-glutamine, และ 10% fetal bovine serum (Sigma, Missouri, USA) เรียกน้ำยานี้ว่า RF10 ผสม PBMC ของอาสาสมัครคราวละ 2 ราย (อาสาสมัคร x และ y) เข้าด้วยกันในถาดหลุมทดลองชนิด 96-well flat bottom plate รายละ $1x10^5$ เซลล์ต่อหลุม (รวม $2x10^5$ เซลล์ต่อหลุม) โดยมีหลักการผสมดังนี้

- กลุ่มควบคุมที่ต้องมีการเพิ่มจำนวนของเซลล์ เป็นเซลล์ที่ไม่ได้รับการฉายแสงทั้ง x และ y (หลุมทดลองที่ 1)
- กลุ่มทดลองที่เซลล์ x หรือเซลล์ y ได้รับการฉายแสงเพียงฝ่ายใดฝ่ายหนึ่ง (หลุมทดลองที่ 2 และ 3)
- กลุ่มทดลองที่เซลล์ x และ y ได้รับการฉายแสงทั้งคู่ (หลุมทดลองที่ 4)

โดยทุกกลุ่มทำซ้ำแบบ triplicates นำไปบ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 37°ซ. เป็นเวลา 5 วัน แล้วตรวจวัดจำนวน lymphocyte ที่เพิ่มขึ้นโดยเทคนิค ELISA BrdU[4] (Roche Applied Science, Indiana, USA) เพื่อประเมินการเพิ่มจำนวนของ DNA ของ lymphocyte ตรวจวัดด้วย spectrophotometer วัดค่าความเข้มแสง (optical density) ที่ 450 nm เพื่อประเมินความหนาแน่นของเซลล์ที่เพิ่มขึ้นในแต่ละหลุมทดลองเป็นค่าการเพิ่มจำนวนของเซลล์ lymphocyte (lymphocyte proliferation value)

การทดสอบ mitogen induced T lymphocyte proliferation

นำเซลล์ PBMC จากอาสาสมัครแต่ละรายที่แยกได้ก่อนและหลังฉายแสงมาทำการคัดเลือกเอา T lymphocyte โดยใช้ชุดน้ำยา human pan T cell isolation kit II (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) ใส่ในถาดหลุมทดลองชนิด 96-well flat bottom plate รายละ $1x10^5$ เซลล์ต่อหลุม จากนั้นทำการกระตุ้นด้วยสาร mitogen คือ phytohemagglutinin (PHA) ที่ความเข้มข้นสุดท้ายของ PHA เป็น 10 μg/mL โดยมีแบบแผนการเติม PHA ดังนี้

- กลุ่มควบคุมที่ต้องไม่มีการเพิ่มจำนวนของเซลล์ เป็นกลุ่ม T lymphocyte ที่ไม่ได้รับการฉายแสง และกลุ่มที่ถูกฉายแสงแล้ว ในอาหารเลี้ยงเซลล์ RF10 อย่างเดียว (หลุมทดลองที่ 1 และ 2)
- กลุ่มทดลองคือกลุ่มที่ไม่ได้รับการฉายแสง และกลุ่มที่ได้รับการฉายแสงมาแล้ว (หลุมทดลองที่ 3 และ 4) ทั้งสองกลุ่มถูกกระตุ้นให้เพิ่มจำนวนโดยการเติมสาร PHA ลงใน RF10

โดยทุกกลุ่มทำซ้ำแบบ triplicates นำไปบ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 37°ซ. เป็นเวลา 5 วัน แล้วตรวจวัดจำนวน lymphocyte ที่เพิ่มขึ้นโดยเทคนิค ELISA BrdU เปรียบเทียบค่าการเพิ่มจำนวนของเซลล์ lymphocyte ที่ได้ของแต่ละหลุมทดลอง

สถิติที่ใช้ในการวิจัย

เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าการเพิ่มจำนวนของเซลล์ lymphocyte ที่ได้ในแต่ละหลุมทดลอง (หลุมที่ 1 ถึง 4) ของการทดสอบ MLR จาก PBMC ของอาสาสมัครแต่ละคู่ โดยใช้ค่าสถิติ repeated ANOVA เปรียบเทียบค่าการเพิ่มจำนวนของเซลล์ T lymphocyte ภายหลังถูกกระตุ้นด้วย PHA ในการทดสอบ mitogen induced T lymphocyte proliferation ระหว่างตัวอย่างก่อนและหลังฉายแสง (หลุมทดลองที่ 3 และ 4) ของอาสาสมัครแต่ละราย โดยใช้ค่าสถิติ paired t-test และคำนวณค่าเฉลี่ยของค่าร้อยละความแตกต่างของค่าการเพิ่มจำนวนของเซลล์ lymphocyte ก่อนและหลังฉายแสงของตัวอย่างแต่ละรายภายหลังถูกกระตุ้นด้วย PHA ทำการประมวลผลโดยใช้โปรแกรม SPSS

Table 1 Lymphocyte proliferation values from mixed lymphocyte reaction

	Sample 1+2	Sample 3+4	Sample 5+6	Sample 7+8	Sample 9+10	Average
Non-irradiated PBMC-x + Non-irradiated PBMC-y (1st well)	1.806 ± 0.041	2.739 ± 0.155	2.099 ± 0.115	3.029 ± 0.290	2.701 ± 0.173	2.475 ± 0.490
Non-irradiated PBMC-x + Irradiated PBMC-y (2nd well)	1.700 ± 0.027	2.325 ± 0.006	2.280 ± 0.056	3.222 ± 0.157	2.821 ± 0.068	2.469 ± 0.540
Irradiated PBMC-x + Non-irradiated PBMC-y (3rd well)	1.779 ± 0.023	2.711 ± 0.224	2.482 ± 0.159	3.017 ± 0.319	2.866 ± 0.054	2.571 ± 0.477
Irradiated PBMC-x + Irradiated PBMC-y (4th well)	0.362 ± 0.042	0.220 ± 0.006	0.346 ± 0.047	0.364 ± 0.057	0.373 ± 0.051	0.333 ± 0.070*

Values shown as mean ± SD (3 duplicates per well); PBMC, peripheral blood mononuclear cell

* $p < 0.0005$

Table 2 Lymphocyte proliferation values from mitogen induced T lymphocyte proliferation

	Non-irradiated T cell (1st well)	Irradiated T cell (2nd well)	Non-irradiated T cell + PHA (3rd well)	Irradiated T cell + PHA (4th well)	% reduction (between 3rd and 4th well)
Sample 1	0.256 ± 0.002	0.218 ± 0.022	1.301 ± 0.118	0.838 ± 0.052	35.4
Sample 2	0.225 ± 0.006	0.223 ± 0.008	1.189 ± 0.047	0.888 ± 0.046	25.2
Sample 3	0.197 ± 0.016	0.161 ± 0.002	1.025 ± 0.093	0.915 ± 0.059	10.7
Sample 4	0.188 ± 0.015	0.192 ± 0.031	0.983 ± 0.033	0.669 ± 0.090	31.5
Sample 5	0.484 ± 0.081	0.245 ± 0.018	1.274 ± 0.048	1.012 ± 0.026	20.4
Sample 6	0.275 ± 0.010	0.274 ± 0.005	1.452 ± 0.046	1.114 ± 0.185	22.7
Sample 7	0.237 ± 0.032	0.235 ± 0.013	1.426 ± 0.117	0.638 ± 0.089	54.7
Sample 8	0.239 ± 0.005	0.238 ± 0.009	1.815 ± 0.069	0.968 ± 0.123	46.3
Sample 9	0.158 ± 0.009	0.183 ± 0.003	1.864 ± 0.072	0.943 ± 0.040	49.4
Sample 10	0.186 ± 0.003	0.170 ± 0.013	2.057 ± 0.100	1.141 ± 0.136	44.2
Average	0.245 ± 0.091	0.214 ± 0.037	1.438 ± 0.357*	0.912 ± 0.179*	34.1

Values shown as mean ± SD (3 duplicates per well); PHA, phytohemagglutinin

* $p < 0.0005$ (p value comparing between third and fourth well)

ผลการวิจัย

จากเลือดของอาสาสมัครจำนวน 10 ราย ทำการจับคู่ทดสอบ MLR คราวละ 2 ราย ทั้งหมด 5 คู่ พบว่า PBMC หลังฉายแสงที่ถูกผสมกันของตัวอย่างแต่ละคู่ (หลุมที่ 4) จะไม่มีการเพิ่มจำนวน แสดงให้เห็นจากค่าการเพิ่มจำนวนของ lymphocyte ที่ไม่เพิ่มขึ้น (ค่าการเพิ่มจำนวนของเซลล์ lymphocyte ของหลุมทดลองที่ 4 เฉลี่ย 0.333 ± 0.070) ภายหลังบ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิ เมื่อเทียบกับหลุมอื่นๆ ที่มี PBMC ก่อนฉายแสงผสมอยู่ด้วยในแต่ละคู่ (ค่าการเพิ่มจำนวนของเซลล์ lymphocyte ของหลุมทดลองที่ 1 ถึง 3 เฉลี่ย 2.475 ± 0.490, 2.469 ± 0.540 และ 2.571 ± 0.477 ตามลำดับ) ($p < 0.0005$) (Table 1)

จากการทดสอบการกระตุ้น T lymphocyte ด้วย mitogen ก่อนและหลังฉายแสง พบว่า T lymphocyte ที่ผ่านการฉายแสง (หลุมทดลองที่ 4) จะเพิ่มจำนวนได้น้อยกว่า T lymphocyte ที่ไม่ฉายแสง (หลุมทดลองที่ 3) แสดงให้เห็นจากค่าการเพิ่มจำนวนของ lymphocyte ที่น้อยกว่า ในกลุ่ม T lymphocyte ที่ผ่านการฉายแสง (การเพิ่มจำนวนของ lymphocyte ของหลุมทดลองที่ 3 และ 4 เฉลี่ย 1.438 ± 0.357 และ 0.912 ± 0.170 ตามลำดับ)($p < 0.0005$) (Table 2)

วิจารณ์

MLR และ mitogen induced T lymphocyte proliferation เป็นการทดสอบที่เป็นมาตรฐานในการประเมินความสามารถในการเพิ่มจำนวนของ T lymphocyte หลักการของ MLR คือการ

กระตุ้น T lymphocyte ของตัวอย่าง x ด้วย human leukocyte antigen (HLA) จาก lymphocyte ของตัวอย่าง y และกระตุ้น T lymphocyte ของตัวอย่าง y ด้วย HLA จาก lymphocyte ของตัวอย่าง x ในเวลาเดียวกัน T cell receptor ของบุคคลหนึ่งจะจับกับ HLA ที่แตกต่างของอีกบุคคลหนึ่ง และส่งสัญญาณกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของ T lymphocyte เพื่อเตรียมพร้อมในการทำลายเซลล์ของฝ่ายตรงข้าม หาก T lymphocyte ถูกยับยั้งหน้าที่นี้ด้วย gamma irradiation อย่างได้ผล จะไม่เห็นการเพิ่มจำนวนของ T lymphocyte ที่ผ่านการฉายแสงแล้วทั้งคู่ในหลุมทดลองที่ 4 ในขณะที่ T lymphocyte ที่ไม่ผ่านการฉายแสงของหลุมทดลองที่ 2 และ 3 ยังสามารถเพิ่มจำนวนได้ จากการถูกกระตุ้นด้วย HLA ของ lymphocyte ที่ผ่านการฉายแสงแล้วของอีกบุคคลหนึ่ง โดยมีหลุมทดลองที่ 1 เป็นหลุมควบคุม และเช่นเดียวกับหลักการกระตุ้น T lymphocyte ของบุคคลหนึ่งด้วย HLA ที่แตกต่างของอีกบุคคลหนึ่งในการทดสอบ MLR หน้าที่การเพิ่มจำนวนของ T lymphocyte จากการกระตุ้นด้วย mitogen สามารถถูกยับยั้งด้วย gamma irradiation ได้เช่นกัน โดยแสดงให้เห็นจากการทดสอบ mitogen induced T lymphocyte proliferation หลักการทดสอบ mitogen induced T lymphocyte proliferation เป็นการทดสอบการเพิ่มจำนวนของ lymphocyte ผ่านการกระตุ้นด้วย mitogen อย่างไรก็ดีเนื่องจากโดยทั่วไปในร่างกายของมนุษย์ไม่มี mitogen ดังกล่าว ดังนั้นผลการยับยั้ง proliferation ของ T lymphocyte โดยการกระตุ้นผ่าน mitogen จึงอาจจะมีความสำคัญทางคลินิกรองลงมาจากผลการยับยั้ง proliferation ของ T lymphocyte โดยการกระตุ้นผ่าน HLA ที่แตกต่างของเซลล์ ซึ่งเป็นกระบวนการหลักที่เกิดขึ้นจริงในร่างกาย[5] และเป็นกลไกสำคัญของพยาธิกำเนิดใน TA-GVHD[1] ที่เป็นเป้าหมายในการป้องกันด้วย gamma irradiation จากผลการทดสอบ MLR ของการศึกษานี้พบว่า T lymphocyte ของตัวอย่างทุกคู่ถูกยับยั้งหน้าที่โดยสมบูรณ์ด้วย gamma irradiation จาก cobalt-60 และจากการทดสอบ mitogen induced T lymphocyte proliferation พบการลดลงของค่าการเพิ่มจำนวนของ lymphocyte เปรียบเทียบก่อนและหลังฉายแสงของตัวอย่างทุกรายเฉลี่ยร้อยละ 34.1 ซึ่งแสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพในการยับยั้ง T lymphocyte จากกรรมวิธีฉายแสงผลิตภัณฑ์โลหิตด้วย cobalt-60 ทั้งนี้แม้ว่าจากการทดสอบ mitogen induced T lymphocyte proliferation ยังพบการเพิ่มจำนวนของ T lymphocyte หลังการฉายแสง แต่อัตราการเพิ่มจำนวนลดลง แสดงให้เห็นว่า gamma irradiation มีผลยับยั้งความสามารถของ T lymphocyte ในการเพิ่มจำนวนหลังผ่านกระบวนการกระตุ้นด้วย mitogen แม้ว่าจะไม่สามารถยับยั้งกระบวนการนี้ได้โดยสมบูรณ์ก็ตาม อย่างไรก็ดีในปี พ.ศ. 2536 FDA สหรัฐอเมริกา แนะนำว่าการฉายแสงผลิตภัณฑ์โลหิตด้วยขนาดรังสี 25 Gy ดังกล่าว ควรจะสามารถยับยั้งหน้าที่ของ T lymphocyte ได้โดยสมบูรณ์จากผลการทดสอบ MLR และลดการตอบสนองของ T lymphocyte ต่อ mitogen มากกว่าร้อยละ 90 (5-6 log reduction)[6] แม้ว่าการใช้ cobalt-60 เพื่อเตรียมผลิตภัณฑ์โลหิตในการศึกษานี้อาจจะให้ผลแตกต่างจากระดับที่ FDA แนะนำในส่วนของ mitogen induced T lymphocyte proliferation แต่ผลการทดสอบหลักด้วย MLR ยังคงเป็นไปตามข้อกำหนดทั้งนี้อาจมีสาเหตุมาจากความแตกต่างของขั้นตอนการกระตุ้น T lymphocyte ด้วย mitogen และเทคนิคที่ใช้วัดการตอบสนองของ T lymphocyte ต่อ mitogen โดยการศึกษาในอดีตที่ FDA ใช้อ้างอิง[7] ซึ่งใช้ cesium-137 ในการฉายแสงนั้นใช้ความเข้มข้นของ mitogen เพียง 2.5 μg/mL และวัดการตอบสนองของ T lymphocyte โดยใช้วิธี limiting dilution analysis(validated clonal T-cell proliferation assay) โดยนับจำนวนหลุมทดลองที่มีการเพิ่มจำนวนเซลล์ด้วยตาผ่านกล้องจุลทรรศน์และคำนวณคะแนนที่ได้ ต่างกับการวัดการเพิ่มจำนวนของ DNA ด้วยการเปรียบเทียบความเข้มแสงโดยใช้ spectrophotometer ซึ่งน่าจะไม่สามารถเปรียบเทียบกันได้ทั้งหมดกับเทคนิค ELISA BrdU ที่เลือกใช้ในการศึกษานี้อย่างไรก็ดีมีข้อมูลเปรียบเทียบเทคนิค ELISA BrdU กับ tritiated thymidine [(^{3}H)-T] ซึ่งเป็นเทคนิคมาตรฐานในการวัดการเพิ่มจำนวนของ DNA พบว่าไม่มีความแตกต่างกัน[8,9] และเทคนิค ELISA BrdU ยังมีความไวสูงในการวัดการเพิ่มจำนวนเซลล์[10] ดังนั้นการเลือกใช้ทั้งสองเทคนิคจึงขึ้นอยู่กับประสบการณ์และความเหมาะสมของแต่ละสถาบัน การตัดสินใจเพิ่มขนาดรังสีให้มากกว่า 25 Gy อาจทำให้ผลการวัดการตอบสนองของ T lymphocyte ต่อ mitogen โดยใช้เทคนิค ELISA BrdU ลดลงเป็นไปตามคำแนะนำของ FDA แต่ย่อมทำให้เกิดผลกระทบต่อผลิตภัณฑ์โลหิตโดยเฉพาะการลดลงของระยะเวลาการใช้งาน (shelf-life) ทั้งหมดนี้เป็นส่วนที่ผู้เตรียมผลิตภัณฑ์โลหิตต้องคำนึงถึง

การศึกษานี้มีข้อจำกัดในเรื่องของจำนวนตัวอย่างที่ทำการศึกษาซึ่งมีไม่มากนัก นอกจากนี้ยังทำการทดสอบผลิตภัณฑ์โลหิตเฉพาะ PRC เท่านั้น ไม่ได้ทำการทดสอบ single-donor platelet ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์โลหิตที่ใช้บ่อยกว่าในกระบวนการรักษาด้วยวิธีปลูกถ่ายไขกระดูกทั้งนี้เนื่องจากเหตุผลด้านงบประมาณ อีกทั้งจุดประสงค์ของการศึกษานี้ต้องการเพียงแสดงให้เห็นประสิทธิภาพของ cobalt-60 ซึ่งเป็นเครื่องมือที่มีใช้อยู่แล้วในโรงพยาบาลส่วนภูมิภาค ในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของ T lymphocyte จึงไม่ได้

ออกแบบการศึกษาให้เปรียบเทียบกับ cesium-137 ซึ่งปัจจุบันเป็น gamma irradiator มาตรฐานที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย ทั้งนี้เพื่อแสดงให้เห็นความเป็นไปได้ในการจัดตั้งหน่วยปลูกถ่ายไขกระดูกในโรงพยาบาลส่วนภูมิภาค โดยใช้ทรัพยากรที่มีอยู่แล้วให้เกิดประโยชน์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ได้ริเริ่มจัดตั้งหน่วยปลูกถ่ายไขกระดูก โรงพยาบาลมหาวิทยาลัยนเรศวรขึ้นเมื่อปี พ.ศ. 2551 และเริ่มให้การรักษาผู้ป่วยรายแรกเมื่อ มิถุนายน พ.ศ. 2552 จนถึงปัจจุบันทำการรักษาผู้ป่วยแล้วจำนวน 35 ราย เริ่มใช้กรรมวิธีฉายแสงผลิตภัณฑ์โลหิตโดยใช้ cobalt-60 เพื่อเตรียมผลิตภัณฑ์โลหิตไว้ใช้ด้วยตัวเองตั้งแต่ปี พ.ศ. 2554 จนถึงปัจจุบันมีผลิตภัณฑ์โลหิต (PRC และ platelet) กว่า 300 ถุง ผ่านการฉายแสงด้วยกรรมวิธีดังกล่าว ซึ่งยังไม่พบปัญหาที่เกิดขึ้นจากการใช้ผลิตภัณฑ์โลหิตและไม่พบ TA-GVHD เกิดขึ้น การวางแผนปรับปรุงกระบวนการเตรียมผลิตภัณฑ์โลหิตในขั้นต่อไปจะใช้การติดฉลากรังสี (radiation-sensitive film) บนถุงผลิตภัณฑ์เพื่อตรวจสอบขนาดรังสีที่ได้รับในทุกถุงให้เป็นไปตามขนาดรังสีที่กำหนดไว้

สรุป

ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพในการยับยั้ง T lymphocyte จากกรรมวิธีฉายแสงผลิตภัณฑ์โลหิตด้วย cobalt-60 ซึ่งช่วยเพิ่มความมั่นใจในการใช้ผลิตภัณฑ์โลหิตดังกล่าวในการรักษาผู้ป่วยโดยวิธีปลูกถ่ายไขกระดูกในโรงพยาบาลส่วนภูมิภาค

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณอาสาสมัครทั้ง 10 ราย ที่ได้บริจาคเลือดเพื่อใช้ในการศึกษาครั้งนี้ การศึกษานี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากมหาวิทยาลัยนเรศวร ปีงบประมาณ 2553

เอกสารอ้างอิง

1. *Dwyre DM, Holland PV. Transfusion associated graft-versus-host disease. Vox Sang 2008;95:85-93.*
2. *BCSH Blood Transfusion Task Force. Guideline on gamma irradiation of blood components for the prevention of transfusion-associated graft-versus-host disease. Transfus Med 1996;6:261-71.*
3. *Wong P, Deoisares R, Tapprom A, Taedunyagun S, Pangwangthong K, Kaewkwamkrun U, et al. Treatment outcomes of high dose chemotherapy and autologous hematopoietic stem cell transplantation for lymphoma and myeloma in a regional hospital. J Hematol Transfus Med 2015;25:123-9.*
4. *Roche Applied Science. Cell proliferation ELISA, BrdU (colorimetric). Instruction manual; November 2004.*
5. *Murphy K. Responses to alloantigen and transplant rejection. In: Janeway'sImmunobiology. 8th ed. New York: Garland Science, 2012:659-61.*
6. *FDA Memorandum: License amendments and procedures for gamma irradiation of blood products. June 22, 1993.*
7. *Palszynski MM, Moroff G, Luban NL, Taylor BJ, Quinones RR. Effect of gamma irradiation of red blood cell units on T-cell inactivation as assessed by limiting dilution analysis: implications for preventing transfusion-associated graft-versus-host disease. Blood 1994;83:1683-9.*
8. *Lin P, Allison DC. Measurement of DNA content and of tritiated thymidine and bromodeoxyuridine incorporation by the same cells. J Histo Chem Cytochem 1993;41:1435-9.*
9. *Martinon F, Rabian C, Loiseau P, Ternynck T, Avrameas S, Colombani J. In vitro proliferation of human lymphocyte measured by an enzyme immunoassay using an anti-5-bromo-2-deoxyuridine monoclonal antibody. J Clin Lab Immunol 1987;23:153-9.*
10. *Maghni K, Nicolescu OM, Martin JG. Suitability of cell metabolic colorimetric assays for assessment of CD4+ T cell proliferation: comparison to 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU) ELISA. J Immunol Methods 1999;223:185-94.*