

ความสัมพันธ์ระหว่างปฏิกิริยาเคมีไฟฟ้าก่อนการปลูกถ่ายไตกับผลลัพธ์ที่ได้หลังการปลูกถ่ายไต



นาง อรชума สุขลิม

ศูนย์วิทยทรัพยากร

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต


สาขาวิชาอายุรศาสตร์ ภาควิชาอายุรศาสตร์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2552

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

THE ASSOCIATION OF PRE-TRANSPLANT MIXED LYMPHOCYTE REACTION (MLR) BY  
CARBOXY-FLUORESCHEIN DIACETATE SUCCINIMIDYL ESTER (CFSE) ASSAY  
AND RENAL ALLOGRAFT OUTCOMES



Missis Onchuma Sooklim

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

Department of Medicine

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic Year 2009

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

ความสัมพันธ์ระหว่างปฏิกิริยาเคมีไฟฟ้าก่อนการปลูกถ่ายไต  
กับผลลัพธ์ที่ได้หลังการปลูกถ่ายไต

โดย

นางสาว อรชума สุขลิ้ม


สาขาวิชา

อายุรศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

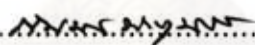
รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ เกื้อเกียรติ ประดิษฐ์พรศิลป์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง  
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

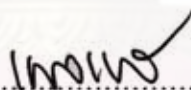
  
.....  
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ อติศร ภัทราดุลย์)

คณบดีคณะแพทยศาสตร์

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

  
.....  
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ กัมมันต์ พันธุมจินดา)

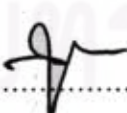
ประธานกรรมการ

  
.....  
(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ เกื้อเกียรติ ประดิษฐ์พรศิลป์)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

  
.....  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ วิโรจน์ ศรีอุฬารพงศ์)

กรรมการ

  
.....  
(อาจารย์ นายแพทย์ สุรสิทธิ์ พร้อมมูล)

กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

ศูนย์วิทยาศาสตร์สุขภาพ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อรชุนา สุขลิ้ม : ความสัมพันธ์ระหว่างปฏิกิริยาลิมโฟไซต์ก่อนการปลูกถ่ายไตกับผลลัพธ์ที่ได้หลังการปลูกถ่ายไต ( THE ASSOCIATION OF PRE-TRANSPLANT MIXED LYMPHOCYTE REACTION (MLR) BY CARBOXY-FLUORESCHEIN DIACETATE SUCCINIMIDYL ESTER (CFSE) ASSAY AND RENAL ALLOGRAFT OUTCOMES ) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : รศ. นพ. เกื้อเกียรติ ประดิษฐ์พรศิลป์., 69 หน้า

ที่มา การประเมินความเสี่ยงด้านภูมิคุ้มกันก่อนการปลูกถ่ายอวัยวะมีผลต่อการทำงานของไต การตรวจหาแอนติบอดีที่จำเพาะต่อผู้บริจาคถือเป็นการประเมินขั้นพื้นฐานก่อนการปลูกถ่ายไต โดยการตรวจพบแอนติบอดีที่จำเพาะต่อผู้บริจาคก่อนการปลูกถ่ายอวัยวะจะมีผลต่อการทำงานของไตที่ลดลงและเกิดการปฏิเสธไตมากขึ้น แต่การประเมินในด้านการตอบสนองของเซลล์ก่อนการปลูกถ่ายไตต่อการทำงานของไตนั้นไม่ได้ทำการศึกษากันทั่วไป การตรวจปฏิกิริยาลิมโฟไซต์ระหว่างเซลล์ของผู้บริจาคและผู้รับไตนั้นจัดเป็นการประเมินด้านการตอบสนองของเซลล์ชนิดหนึ่ง จึงเป็นที่มาของการ ศึกษานี้ที่ต้องการหาความสัมพันธ์ระหว่างปฏิกิริยาลิมโฟไซต์ก่อนการปลูกถ่ายไตกับผลลัพธ์ที่ได้หลังการปลูกถ่ายไต

วิธีการศึกษา ผู้ป่วยทุกรายจะได้รับการตรวจปฏิกิริยาลิมโฟไซต์โดยใช้วิธี CFSE เป็นตัวตรวจวัดการแบ่งตัวของลิมโฟไซต์ก่อนการปลูกถ่ายไต ซึ่งแสดงผลเป็นค่าดัชนีการกระตุ้น และหลังจากติดตามผู้ป่วยเป็นระยะเวลา 3 เดือน ทำการเก็บข้อมูลด้านการทำงานของไต เช่น ครีเอตินินเพื่อนำมาคำนวณค่าการกรองของไต และการเกิดการปฏิเสธไต จากนั้นนำค่าดัชนีการกระตุ้นที่ได้มาหาความสัมพันธ์กับการทำงานของไตและการปฏิเสธไตที่ 3 เดือน

ผลการศึกษา ผู้ป่วย 11 รายที่เข้าร่วมการศึกษา เกิดการปฏิเสธไตทั้งสิ้น 2 ราย พบว่าผู้ป่วยที่มีอายุน้อยกว่า 40 ปีมีค่าดัชนีการกระตุ้นจากปฏิกิริยาลิมโฟไซต์สูงกว่าผู้ป่วยที่มีอายุมีมากกว่า 40 ปี ( $7.89 \pm 6.87 / 3.32 \pm 5.14$ ,  $p = 0.04$ ) ผู้ป่วยที่เกิดการปฏิเสธไตมีค่าดัชนีการกระตุ้นสูงกว่าผู้ป่วยที่ไม่เกิดการปฏิเสธไต ( $9.99 \pm 8.23 / 3.36 \pm 4.81$ ,  $p = 0.05$ ) ผู้ป่วยที่มี PRA มากกว่า 25 เปอร์เซ็นต์, HLA mismatch มากกว่า 3 และไตไม่ทำงานทันทีหลังผ่าตัดมีแนวโน้มของค่าดัชนีการกระตุ้นสูงกว่าแต่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติและการศึกษานี้ไม่พบความสัมพันธ์ของค่าดัชนีการกระตุ้นกับค่าการกรองของไตที่ 3 เดือนหลังปลูกถ่ายไต

สรุปผลการศึกษา ผู้ป่วยที่มีอายุน้อยและเกิดการปฏิเสธไตมีค่าดัชนีการกระตุ้นจากปฏิกิริยาลิมโฟไซต์สูงกว่าผู้ป่วยที่มีอายุมากและไม่เกิดการปฏิเสธไต ปฏิกิริยาลิมโฟไซต์ก่อนการปลูกถ่ายไตน่าจะมีประโยชน์ในการประเมินความเสี่ยงต่อการปฏิเสธไตได้

ภาควิชา อายุรศาสตร์  
สาขาวิชา อายุรศาสตร์  
ปีการศึกษา 2552

ลายมือชื่อนิสิต ..... อ.อรชุนา สุขลิ้ม  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก..... เกื้อเกียรติ



# # 5174849230 : MAJOR MEDICINE

KEYWORDS: MIXED LYMPHOCYTE REACTION / RENAL TRANSPLANTATION / CFSE

ONCHUMA SOOKLIM : THE ASSOCIATION OF PRE-TRANSPLANT MIXED LYMPHOCYTE REACTION (MLR) BY CARBOXY-FLUORESCHEIN DIACETATE SUCCINIMIDYL ESTER (CFSE) ASSAY AND RENAL ALLOGRAFT OUTCOMES. THESIS ADVISOR: ASSOC. PROF. KEARKIAT PRADITPORNILPA, M.D. 69 pp.

**Background:** Pre-transplant immunologic risk assessments determine renal allograft outcomes. Pre-transplant humoral immunologic risk evaluations include panel reactive antibody (PRA) and crossmatching which are standard protocols. The pre-transplant cellular immunologic risk evaluation has not been routinely assessed. This study was aimed to evaluate role of pre-transplant cellular immunologic risk assessment by the MLR and renal allograft outcomes.

**Method:** The MLR by CFSE assay were performed prior to kidney transplantation. CFSE-labeling was used as the lymphocyte proliferate marker. The renal allograft outcomes, creatinine, estimated glomerular filtration rate (eGFR), and acute rejection at 3 months were evaluated. The eGFR was calculated by abbreviated MDRD formula. The MLR was expressed as stimulation index (SI).

**Results:** There were 11 patients participating in this study. Eight and three underwent living-related and cadaveric kidney transplantation, respectively. Biopsy proven acute rejection was diagnosed in two recipients. The younger recipients (< 40 yr) had significantly higher SI when compared with the older recipients ( $\geq 40$  yr) ( $7.89 \pm 6.87$  vs  $3.32 \pm 5.14$ ,  $p=0.04$ ). The SI by MLR was higher in rejected patients than non-rejected recipients ( $9.99 \pm 8.23$  vs  $3.36 \pm 4.81$ ,  $p=0.05$ ). The cadaveric renal transplant recipients had slightly higher SI when compared with the living-related renal transplant recipients. There were tendencies to have higher SI in recipients who had higher PRA ( $\geq 25\%$ ) ( $6.31 \pm 6.35$  vs  $3.5 \pm 5.54$ ), higher HLA mismatch ( $\geq 3$ ) ( $5.97 \pm 6.83$  vs  $2.10 \pm 1.50$ ), and delayed graft function (DGF) ( $6.82 \pm 7.97$  vs  $3.71 \pm 5.01$ ) but not statistically significant. There was no correlation between SI by MLR and the eGFR.

**Conclusion:** The younger recipients and the recipients who had acute rejection had higher pre-transplant SI by MLR-CFSE assay than the older and non-rejected recipients. The SI by MLR-CFSE assay may be beneficial to evaluate the cellular immunologic risk of acute rejection.

Department : Medicine

Student's Signature

Field of Study : Medicine

Advisor's Signature

Academic Year : 2009

*Onchuma Sooklim*  
*Kearkiat Praditpornilpa*

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้เนื่องจากการได้รับความช่วยเหลืออย่างดียิ่งจากหลายบุคคล ได้แก่ รองศาสตราจารย์นายแพทย์เกื้อเกียรติ ประดิษฐ์พรศิลป์ ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษา อาจารย์ นายแพทย์ณัฐวุฒิ ไตวนาชัยและอาจารย์หน่วยโรคไต โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ทุกท่านที่เป็นผู้ให้ คำแนะนำเกี่ยวกับงานวิจัย รวมทั้งให้ความช่วยเหลือทุกด้านมาโดยตลอดจนกระทั่งวิทยานิพนธ์นี้ เสร็จสมบูรณ์

เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ HLA สภาอากาศไทยและห้องปฏิบัติการระบบภูมิคุ้มกัน โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ที่ให้ความเอื้อเฟื้อด้านห้องปฏิบัติการ เครื่องมือและแนะนำการใช้ อุปกรณ์จนเสร็จสิ้นวิทยานิพนธ์

เพื่อนแพทย์ประจำบ้านต่อยอดโรคไตและพยาบาลหน่วยโรคไตโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ทุกคนที่ให้ความช่วยเหลือตลอดช่วงเวลาดำเนินงานวิจัย

ท้ายสุดขอขอบคุณผู้ป่วยที่เข้าร่วมการวิจัยทุกท่านที่ให้ความร่วมมือเป็นอย่างดีจน ส่งผลให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฌ
สารบัญรูป.....	ญ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ความสำคัญและที่มาของการวิจัย.....	1
คำถามของการวิจัย.....	3
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	3
กรอบแนวความคิดในการวิจัย.....	4
วิธีดำเนินการวิจัยโดยย่อ.....	4
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	5
ปัญหาทางจริยธรรม.....	5
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง.....	6
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	34

ประชากรและตัวอย่าง.....	34
การคำนวณขนาดตัวอย่าง.....	34
การสังเกตและการวัด.....	35
การรวบรวมข้อมูล.....	40
การวิเคราะห์ข้อมูล.....	40
บทที่ 4 ผลการวิจัย.....	41
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ.....	52
รายการอ้างอิง.....	55
ภาคผนวก.....	62
ภาคผนวก ก หนังสือยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัย.....	63
ภาคผนวก ข แบบฟอร์มการเก็บข้อมูล.....	67
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	69

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



## สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 แสดงความแตกต่างของ Innate Immunity และ Adaptive Immunity.....	6
ตารางที่ 2 แสดง Potential Immunological Monitoring Assay in Transplantation.....	12
ตารางที่ 3 แสดงการเปรียบเทียบ T Cell Assays for Immunologic Monitoring.....	28
ตารางที่ 4 แสดงการรวบรวมการศึกษา Mixed Lymphocyte Reaction.....	32
ตารางที่ 5 แสดงข้อมูลพื้นฐานผู้ป่วยปลูกถ่ายไตที่เข้าร่วมการศึกษา.....	41
ตารางที่ 6 แสดงผลลัพธ์หลังการปลูกถ่ายไต.....	43
ตารางที่ 7 แสดงค่า Proliferation (%) โดยแบ่งตามการฉายแสง, จำนวน Donor Cell และจำนวนวันที่บ่มเพาะ.....	44
ตารางที่ 8 แสดงค่า stimulation index โดยแบ่งตามการฉายแสง, จำนวน donor cell และจำนวนวันที่บ่มเพาะ.....	45

## สารบัญรูป

	หน้า
รูปที่ 1 แสดง humoral immunity และ cellular immunity.....	8
รูปที่ 2 แสดง direct allorecognition และ indirect allorecognition.....	11
รูปที่ 3 แสดง renal graft survival ตาม panel reactive antibody (PRA).....	13
รูปที่ 4 แสดง cummulative proportion surviving ของไตตามการตรวจพบ donor specific antibody (DSA) ก่อนการปลูกถ่ายไต.....	14
รูปที่ 5 แสดง One-way MLR และ Two-way MLR.....	15
รูปที่ 6 แสดงผลเสียของ $^3\text{H}$ -thymidine ต่อเซลล์ที่มีการแบ่งตัว.....	16
รูปที่ 7 แสดงกลไกการย้อมติดสารเรืองแสงของ carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester.....	17
รูปที่ 8 แสดง fluorescence intensity ของเซลล์ที่ย้อม CFSE.....	18
รูปที่ 9 แสดง cellular fluorescence histogram.....	19
รูปที่ 10 แสดงจำนวน cell proliferation โดย CFSE assay.....	19
รูปที่ 11 แสดง kinetic analysis ของ T cell division.....	20
รูปที่ 12 แสดง flow cytometry analysis of cell division.....	21
รูปที่ 13 แสดง kinetics of MLR โดย CFSE และ $^3\text{H}$ -thymidine ในหนู.....	21
รูปที่ 14 แสดง stimulation index โดย CFSE และ $^3\text{H}$ -thymidine ในหนู.....	22

รูปที่ 15	แสดง proliferation of subset ของ T cell.....	23
รูปที่ 16	แสดง limiting dilution assay.....	23
รูปที่ 17	แสดงการใช้ MHC tetramer ในการตรวจหา specific T cells ด้วย flow cytometry.....	25
รูปที่ 18	แสดงวิธีการ ELISpot และการแปลผล.....	26
รูปที่ 19	แสดง cumulative graft survival ที่ 1 ปีและ 5 ปี แยกตามกลุ่ม hypo-responder และ กลุ่ม hyper-responder.....	29
รูปที่ 20	แสดงการเพิ่มขึ้นของ donor-specific alloreactive precursor frequencies และ alloreactivity indices ในลิงหลังการปลูกถ่ายหัวใจ.....	31
รูปที่ 21	แสดงการเพิ่มขึ้นของ donor-specific alloreactive precursor frequencies และ alloreactivity indices ในลิงหลังฉีด donor stem cell เข้าต่อมไทมัส.....	31
รูปที่ 22	แสดงตำแหน่งของชั้นของการแยก PBMC.....	36
รูปที่ 23	แสดงตำแหน่งการนับเซลล์ในช่องของ red blood cell บน hemocytometer.....	37
รูปที่ 24	แสดงค่า proliferation (%) โดยแบ่งตามการฉายแสง, จำนวน donor cell และ จำนวนวันที่ปัมเพาะ.....	45
รูปที่ 25	แสดงค่า stimulation index โดยแบ่งตามการฉายแสง, จำนวน donor cell และ จำนวนวันที่ปัมเพาะ.....	46
รูปที่ 26	แสดงค่า stimulation index แยกตามชนิดของการปลูกถ่ายไต.....	47

รูปที่ 27	แสดงค่า stimulation index แยกตามค่า panel reactive antibody.....	48
รูปที่ 28	แสดงค่า stimulation index แยกตามค่า HLA mismatch.....	49
รูปที่ 29	แสดงค่า stimulation index แยกตาม recipient age.....	49
รูปที่ 30	แสดงค่า stimulation index แยกตามการเกิด delayed graft function (DGF).....	50
รูปที่ 31	แสดงค่า stimulation index แยกตามการเกิด acute rejection.....	51
รูปที่ 32	แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง stimulation index และ estimated glomerular filtration.....	51



# บทที่ 1

## บทนำ

### ความสำคัญและที่มาของการวิจัย

การผ่าตัดปลูกถ่ายไตถือเป็นวิธีการรักษาที่ดีที่สุดในปัจจุบันของผู้ป่วยไตวายระยะสุดท้ายทั้งในแง่อายุขัยและคุณภาพชีวิต มีผู้ป่วยไตวายเรื้อรังจำนวนมากที่ต้องรอการปลูกถ่ายไตเป็นระยะเวลาอันยาวนานทั้งนี้เป็นเพราะไตบริจาคมีอยู่จำกัด ดังนั้นการจัดสรรไต (organ allocation) ที่เหมาะสมร่วมกับการเลือกยากดภูมิคุ้มกันที่มีประสิทธิภาพจะทำให้ได้ผลลัพธ์ของการปลูกถ่ายไตที่คุ้มค่าที่สุด ในปัจจุบันการจัดสรรไตบริจาคอาศัยวิธีการตรวจหลายวิธีขึ้นเพื่อต้องการประเมินความเข้ากันของไตบริจาคกับภูมิคุ้มกันผู้รับและความเสี่ยงต่อการเกิดภาวะปฏิเสธไต

Immunologic risk assessment เป็นหนึ่งในการประเมินความเสี่ยงก่อนการปลูกถ่ายไตต่อการเกิด renal allograft rejection และ graft loss ปัจจุบันอาศัยการตรวจ human leukocyte antigen (HLA) matching ระหว่างผู้บริจาคกับผู้รับไตและ panel reactive antibody (PRA) เป็นการประเมินหลัก โดยมีข้อมูลเป็นที่ยอมรับว่า HLA mismatch มีผลต่อการทำงานของ renal allograft อย่างมีนัยสำคัญ<sup>(1,2)</sup> เช่นเดียวกับ PRA ที่สามารถทำนาย renal outcome ได้ เช่น PRA ที่สูงมีความสัมพันธ์กับการทำงานของไตที่ไม่ดี เป็นที่ทราบกันโดยทั่วไปว่า PRA เป็นการประเมินในส่วน humoral immunity เท่านั้นส่วนการประเมิน cellular mediated immunity นั้นไม่ได้กระทำกันเป็นประจำ ปัจจุบันมีการศึกษา cellular mediated immunity กันมากขึ้นทั้งในแง่ cellular mediated rejection และ tolerance พบว่า T cell เป็นศูนย์กลางของการเกิดการปฏิเสธไตทั้ง direct effect ของ T cell ที่ก่อความเสียหายต่อไตโดยตรงและ indirect effect ที่มีส่วนช่วย B cell ในการสร้าง humoral immune response (antibody) ต่อไต ดังนั้นการประเมิน cellular mediated immunity ก่อนการผ่าตัดจึงมีประโยชน์ต่อการตัดสินใจทั้งในแง่การจัดสรรไตและการเลือกยากดภูมิคุ้มกัน โดยมีแนวโน้มเลือก potent immunosuppressive drug ในรายที่เป็นกลุ่ม high immunologic risk เพื่อป้องกันการเกิดการปฏิเสธไตและปรับลดยากดภูมิคุ้มกันในรายที่เป็น low immunologic risk<sup>(3,4)</sup> เพื่อลดผลข้างเคียง เช่น การติดเชื้อ การเกิดมะเร็งและการเสื่อมของไต (calcineurin induce nephropathy หรือ interstitial fibrosis and tubular atrophy (IF/TA))

ถึงแม้จะมีผลการปลูกถ่ายไตในระยะสั้น (short-term outcome) ที่ดีขึ้นแต่พบว่ายังมี renal allograft loss ประมาณร้อยละ 3-5 ต่อปี ส่วนใหญ่มีสาเหตุจาก long-term allograft

nephropathy และ death with functioning allograft<sup>(5)</sup> ภายหลังจากผ่าตัดปลูกถ่ายไต หากได้ยากดภูมิคุ้มกันที่ไม่เพียงพอจะก่อให้เกิดการปฏิเสธไต แต่ถ้าหากได้ยากดภูมิคุ้มกันที่แรงเกินไปผู้ป่วยก็จะมีความเสี่ยงต่อ infection, malignancy และ interstitial fibrosis/tubular atrophy (IF/TA) ทั้งๆที่มีการเฝ้าติดตามระดับยาอย่างใกล้ชิดแต่ยากที่จะคาดการณ์ biological effects ของยากดภูมิคุ้มกัน T cell ถือว่ามีบทบาทสำคัญของระบบภูมิคุ้มกันในการเกิดการปฏิเสธไต ยากดภูมิคุ้มกันหลายตัวมีผลที่ T cell ดังนั้นหากสามารถหาวิธีประเมิน T cell reactivity (cellular immunity) ได้ก็จะมีข้อมูลเกี่ยวกับ immunosuppressive status ว่า under- หรือ over-immunosuppression อันนำไปสู่การวางแผนการรักษา

ปัจจุบัน mixed lymphocyte reaction (MLR) และ cell mediated lympholysis (CML) ถือเป็นวิธีการที่ใช้กันแพร่หลายในการศึกษา T-cell mediated immunity<sup>(6)</sup> โดย MLR เป็นการประเมิน proliferative response ของ T cell ซึ่งส่วนใหญ่เป็น CD4 positive T cell ส่วน CML นั้นเป็นการประเมิน cytotoxic T cell ซึ่งส่วนใหญ่เป็น CD8 positive T cell ในอดีตมีหลายการศึกษาที่พยายามทดสอบว่า mixed lymphocyte reaction (MLR) ว่ามีความสัมพันธ์กับ renal allograft rejection หรือ graft survival<sup>(7,8)</sup> โดยอาศัยการเพาะเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาวระหว่าง donor กับ recipient แล้วประเมินผลเป็นค่า stimulation index และ relative response โดยตั้งสมมุติฐานไว้ว่าปฏิกิริยาที่เกิดมากน่าจะมีความสัมพันธ์ poor renal allograft outcome แต่ผลที่ได้มีทั้งที่พบและไม่พบความสัมพันธ์ ซึ่งมีการอธิบายว่าอาจเป็นผลจากวิธีการทดลองและขั้นตอนที่ยุ่งยาก โดยอดีตจะใช้การ uptake <sup>3</sup>H-Thymidine ในการประเมินการแบ่งตัวของเซลล์เม็ดเลือดขาว พบว่า MLR ที่บอกถึง high T cell proliferation (hyperimmune response) มีความสัมพันธ์กับ poor renal outcome<sup>(9)</sup> แต่การใช้ <sup>3</sup>H-Thymidine ซึ่งเป็นสารรังสี (radioisotope) นั้นมีข้อจำกัดทั้งในแง่การสัมผัสสารรังสีและยับยั้ง DNA synthesis

ต่อมาจึงมีการศึกษานำ carboxy-fluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) ซึ่งเป็น fluorescence dye เข้ามาแทนที่เพื่อแก้ไขข้อจำกัดดังกล่าว CFSE เป็นสารที่สามารถแพร่ผ่านเข้าเซลล์ได้อย่างอิสระโดยเข้าไปจับกับ cytoplasmic protein แล้วถูก esterase enzyme ตัด carboxyl group ออกไปก่อให้เกิดสาร fluorescence ติดภายในเซลล์โดยที่ไม่สามารถแพร่ออกไปนอกเซลล์ได้ และพบว่าทุกรอบของการแบ่งเซลล์ที่เพิ่มขึ้น fluorescence intensity จะลดลงครึ่งหนึ่ง ด้วยคุณสมบัตินี้เองเมื่อนำมาใช้ร่วมกับ flow cytometry ทำให้สามารถทราบจำนวนและรอบของการแบ่งเซลล์ได้ นอกจากข้อมูล in vitro study แล้ว Song และคณะ<sup>(10)</sup> ได้ศึกษาข้อมูล in vivo ของ mixed lymphocyte reaction โดยใช้ CFSE พบว่าสามารถติดตาม lymphocyte

proliferation และให้รูปแบบการลดลงของ CFSE intensity เหมือน in vitro ปัจจุบันมีการศึกษาสัมพันธ์ของ MLR ด้วย CFSE assay กับ allograft outcome โดยศึกษาใน liver transplantatio<sup>(11)</sup> พบว่ามีความสัมพันธ์กันโดยเฉพาะในรายที่เกิด rejection ซึ่งการศึกษานี้ทำในผู้ป่วยที่ได้รับการผ่าตัดปลูกถ่ายตับเรียบร้อยแล้ว

จากข้อมูลข้างต้นแสดงให้เห็นถึงความสำคัญของการประเมิน cellular immunity ต่อผลของ renal allograft outcomes และยังไม่มีข้อมูลของ pre-transplant MLR by CFSE assay. ในผู้ป่วยที่ได้รับการปลูกถ่ายไต จึงเป็นที่มาของการศึกษานี้เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่าง pre-transplant MLR by CFSE assay กับ renal allograft outcomes ซึ่งจะมีประโยชน์ต่อการดูแลผู้ปลูกถ่ายไตต่อไป

#### คำถามของการวิจัย

1. Pre-transplant mixed lymphocyte reaction มีความสัมพันธ์กับการทำงานของไตที่ 3 เดือนหลังการปลูกถ่ายไตหรือไม่
2. Pre-transplant mixed lymphocyte reaction มีความสัมพันธ์กับการเกิดการปฏิเสธไตแบบเฉียบพลัน (acute rejection) ภายหลังจากการปลูกถ่ายไตหรือไม่

#### วัตถุประสงค์ของการวิจัย

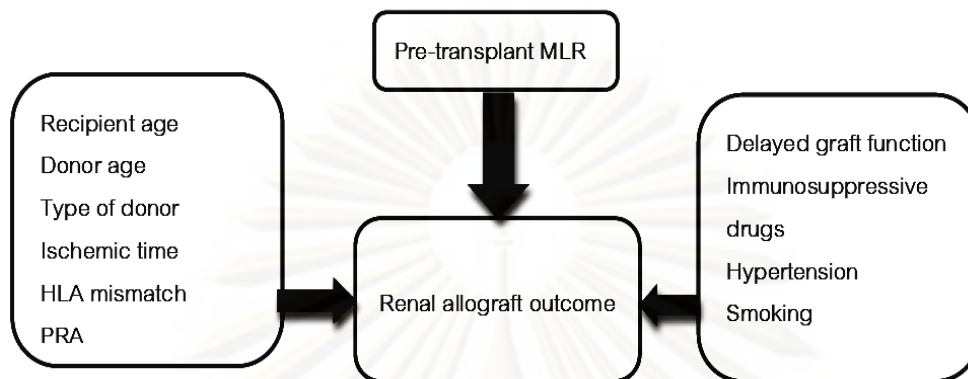
##### วัตถุประสงค์หลัก (primary objective)

เพื่อศึกษาหาความสัมพันธ์ระหว่าง pre-transplant mixed lymphocyte reaction กับการทำงานของไต (estimated glomerular filtration rate) ที่ 3 เดือนหลังการปลูกถ่ายไต

##### วัตถุประสงค์รอง (secondary objective)

เพื่อศึกษาหาความสัมพันธ์ระหว่าง pre-transplant mixed lymphocyte reaction กับเกิดการปฏิเสธไตแบบเฉียบพลัน (acute rejection) ภายใน 3 เดือนหลังการปลูกถ่ายไต

### กรอบแนวความคิดในการวิจัย



### วิธีดำเนินการวิจัยโดยย่อ

- รูปแบบการวิจัย : Prospective analytic study (Pilot study)
- ประชากรเป้าหมาย : ผู้ป่วยไตวายเรื้อรังระยะสุดท้ายที่จะได้รับการผ่าตัดปลูกถ่ายไต
- ประชากรตัวอย่าง : ผู้ป่วยเรื้อรังระยะสุดท้ายที่ได้รับการปลูกถ่ายไตและมาตรวจติดตามการรักษาที่คลินิกผู้ป่วยหลังการปลูกถ่ายไต
- จำนวนประชากรตัวอย่าง 12 ราย
- ข้อตกลงเบื้องต้น : เลือดของผู้รับการปลูกถ่ายไต (recipient) ที่นำมาศึกษาจะต้องเก็บก่อนได้รับยากดภูมิคุ้มกันหรือสเตียรอยด์
- คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย

ปฏิกิริยาลิมโฟไซต์ (mixed lymphocyte reaction) คือ การประเมิน antidonor alloreactivity ของลิมโฟไซต์ของ recipient ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ร่วมกันระหว่าง peripheral blood mononuclear cell (PBMC) ของ recipient และ donor โดยใช้ CFSE เป็นสารเรืองแสงที่ใช้ประเมินการแบ่งตัว (proliferation) ของ T lymphocyte ของ recipient และวัดผลเป็นเปอร์เซ็นต์ cell proliferation โดยอาศัย flow cytometry



หน้าที่การทำงานของไต (renal allograft function) คือ estimated glomerular filtration rate (eGFR) ที่ได้จากการคำนวณ เนื่องจากการตรวจ creatinine ในปัจจุบันมี 2 วิธี คือ Jaffe และ Enzymatic assay จึงอาศัยสูตรคำนวณต่างกัันดังนี้  
 วิธี abbreviated MDRD equation<sup>(12)</sup> (สำหรับค่า creatinine จากวิธี Jaffe assay)

$$\text{abbMDRD} = 186 \times (\text{S.Cr})^{-1.154} \times \text{age}^{-0.203} \times 0.742 \text{ (for woman)}$$

วิธี re-express MDRD equation<sup>(13)</sup> (สำหรับค่า creatinine จากวิธี Enzymatic assay)

$$\text{MDRD} = 175 \times (0.95 \times \text{S.Cr})^{-1.154} \times \text{age}^{-0.203} \times 0.742 \text{ (for woman)}$$

การปฏิเสธไตแบบเฉียบพลัน (acute allograft rejection) คือ ปฏิกิริยาปฏิเสธการปลูกถ่ายไตซึ่งทำให้หน้าที่การทำงานของไตเสื่อมลงแบบเฉียบพลัน โดยอาศัยการวินิจฉัยจากพยาธิสภาพที่ได้จากการทำ renal allograft biopsy เท่านั้น

### ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ในอนาคตหากผลการศึกษพบว่า MLR ก่อนการปลูกถ่ายไตมีผลต่อ renal allograft outcome จริง สามารถนำข้อมูลที่ได้จากการศึกษามาช่วยในการพิจารณาปรับการรักษา เช่น เลือกลดยาคดภูมิคุ้มกันที่แรงขึ้นในรายที่มี T-cell alloreactivity สูงเพื่อป้องกันการเกิด acute rejection และวางแผนการปรับลดยาคดภูมิคุ้มกันในรายที่มี T-cell alloreactivity ต่ำซึ่งน่าจะมีโอกาสเกิด acute rejection ต่ำด้วยเพื่อลดผลข้างเคียงจากยาคดภูมิคุ้มกัน

### ปัญหาทางจริยธรรม

เนื่องจากการวิจัยนี้ต้องเจาะเลือดของผู้เข้าร่วมการวิจัย 50 มิลลิลิตร ท่านอาจมีความเสี่ยงที่ได้จากการเจาะเลือด เช่น อาจเกิดอาการเจ็บ เลือดออก ช้ำจากการเจาะเลือด อาการบวมบริเวณที่เจาะเลือด หรือหน้ามืด และโอกาสที่จะเกิดการติดเชื้อบริเวณที่เจาะเลือดซึ่งพบได้น้อยมาก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เนื่องจากการศึกษานี้ต้องการประเมิน mixed lymphocyte reaction by CFSE assay ก่อนการปลูกถ่ายไตว่ามีความสัมพันธ์กับ renal allograft outcomes หรือไม่ ซึ่งเป็นการประเมินด้าน cellular immunity โดยความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับระบบภูมิคุ้มกันและการติดตามประเมินผลได้รวบรวมไว้ดังนี้

#### ระบบภูมิคุ้มกัน (Immune system)<sup>(14,15)</sup>

คือ การพัฒนาของ molecules และเซลล์เพื่อทำหน้าที่พิเศษในการต่อต้านเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอม ระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายแบ่งเป็น 2 ระบบใหญ่ๆ คือ ภูมิคุ้มกันโดยกำเนิด (innate immunity) และภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะที่เกิดตามหลังการได้รับสิ่งแปลกปลอม (adaptive หรือ acquired immunity) ตารางที่ 1

#### ตารางที่ 1 แสดงความแตกต่างของ Innate Immunity และ Adaptive Immunity

Characteristic	Innate immunity	Adaptive immunity
เวลาในการตอบสนอง	นาทีหรือชั่วโมง	4-7 วัน ใน primary response
ความจำเพาะ (specificity)	จำเพาะกับ pathogen associated molecular pattern (PAMPs)	มีความจำเพาะสูงมากต่อ epitope ของ antigen
ความจำ (memory)	ไม่มี	มีความจำและตอบสนองได้รุนแรงและรวดเร็ว
ความหลากหลาย (diversity)	มีจำกัดเพราะมี receptor ไม่มาก	มีความหลากหลายมาก
Self/non-self discrimination	แยกได้เนื่องจากจำเพาะกับเชื้อโรคเท่านั้น	เนื่องจาก receptor สร้างมาแบบ random บางครั้งทำให้มี autoimmunity ได้
ชนิดของเซลล์	Macrophage, monocyte, neutrophil, NK cell, dendritic cell	T cells และ B cells

1. **Innate immunity** เป็นภูมิคุ้มกันด่านแรกในการต่อสู้และป้องกันสิ่งแปลกปลอมที่เข้ามาในร่างกายซึ่งมีอยู่แล้วตั้งแต่กำเนิด สามารถกำจัดเชื้อโรคได้ทันทีและไม่มีการตอบสนองต่อต้านเซลล์ของตัวเอง ประกอบด้วย macrophage, monocyte, NK cell และ dendritic cell
2. **Adaptive immunity** เป็นภูมิคุ้มกันเกิดหลังจากการที่ innate immunity รับรู้ว่ามีสิ่งแปลกปลอมเข้ามาในร่างกายแล้วกระตุ้นและควบคุมให้ adaptive immunity เกิดการตอบสนองที่จำเพาะต่อสิ่งแปลกปลอมนั้น ประกอบด้วย T cell และ B cell ที่มี receptor มากมายถูกสร้างมาให้สามารถรับรู้ antigens ทุกชนิดไม่ว่าจะเป็นเชื้อโรค สิ่งแปลกปลอมและแม้กระทั่งเนื้อเยื่อของตนเอง

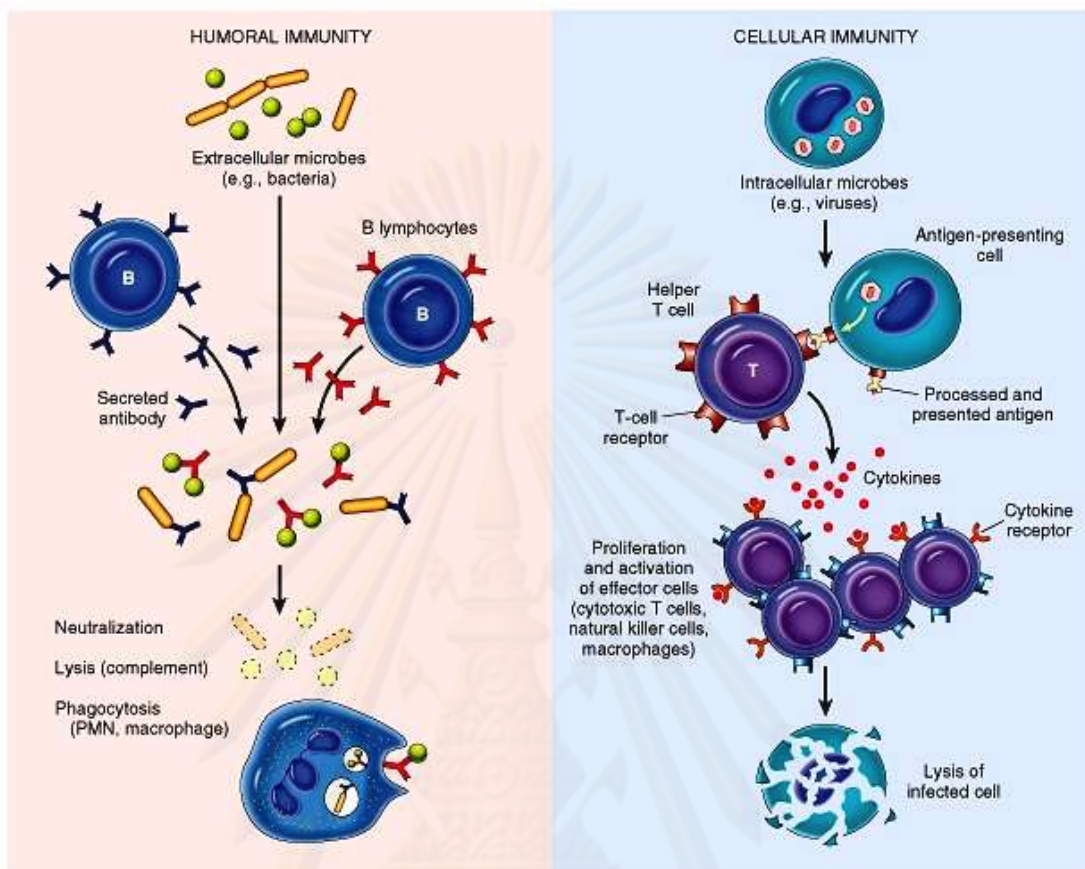
### ชนิดของการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน (Type of immune response)

แบ่งตามเซลล์ที่รับผิดชอบในการก่อให้เกิดการตอบสนองได้เป็น 2 แบบ (รูปที่ 1) คือ

1. **Humoral immune responses** คือ การสร้าง antibody เพื่อกำจัดสิ่งแปลกปลอม โดย antigen เป็นตัวเลือกจับกับ B lymphocyte ที่มี receptor ที่จำเพาะกับมันก่อให้เกิดการกระตุ้น B lymphocyte ให้มีการแบ่งตัวและเปลี่ยนแปลงเป็น plasma cell ซึ่งสร้างและหลั่ง antibody ที่จำเพาะกับ antigen นั้น
2. **Cell-mediated immune response** คือ การเกิดภูมิคุ้มกันขึ้นผ่านเซลล์ โดย antigen เข้ามากระตุ้น T lymphocyte ด้วยการนำเสนอของ antigen presenting cell (APC) ให้กลายเป็น activated T lymphocyte ซึ่ง antigen จะกระตุ้นทั้ง CD4 ( $T_H$ ) และ CD8 T lymphocyte ( $T_C$ ) โดย activated  $T_H$  จะทำหน้าที่หลั่ง cytokine ไปกระตุ้น macrophage ให้จับกินเชื้อโรคและกระตุ้น B cell ให้เปลี่ยนแปลงไปเป็น plasma cell ส่วน activated  $T_C$  จะกลายเป็น cytotoxic T lymphocyte (CTL) ซึ่งทำหน้าที่สำคัญในการกำจัดสิ่งแปลกปลอม

### ขั้นตอนในการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน (Phase of immune response)

การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันเริ่มต้นจากสิ่งแปลกปลอม (foreign antigen) เข้ามาในร่างกาย ร่างกายเกิดการรับรู้และตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมนั้น ขบวนการเหล่านี้แบ่งได้เป็น 3 ขั้นตอน คือ recognition, activation, และ effector phase



รูปที่ 1 แสดง humoral immunity และ cellular immunity

1. Recognition phase ขั้นตอนการรับรู้แอนติเจนประกอบด้วยการจับกันระหว่างแอนติเจนและ receptor ที่อยู่บนผิว lymphocyte โดยการนำเสนอ antigen presenting cell T cells จะใช้ T cell receptor (TCR) ในการ recognize antigen ที่อยู่ภายใน antigen binding groove ของ major histocompatibility (MHC) molecules ซึ่งอยู่บนผิวเม็ดเลือดขาวและ professional antigen presenting cell (APC) ในมนุษย์ MHC molecules มี 2 ชนิด คือ MHC class I และ MHC class II ขึ้นอยู่กับความแตกต่างของรูปร่างและหน้าที่

- MHC class I จะทำหน้าที่ present endogenous antigen ซึ่งได้แก่ HLA-A, -B, -C ซึ่งอยู่บนผิวเซลล์ทั่วไป
- MHC class II จะทำหน้าที่ present exogenous antigen ซึ่งได้แก่ HLA-DR, -DP และ DQ



Mature T cell แบ่งตามลักษณะ CD4 และ CD8 glycoprotein ที่อยู่บนผิว T cell ในการเกิด antigen recognition นั้น CD4 T cell มีปฏิกิริยาต่อ MHC class II ส่วน CD8 T cell มีปฏิกิริยากับ MHC class I โดยทั่วไป HLA class II molecules มีความสำคัญในการเริ่มการเกิด immune response ต่อ foreign protein และ HLA class I molecules จะ present endogenous cytosolic antigen มีความสำคัญต่อการกำจัด virus infected cells หรือ malignant transformation cell ซึ่งความสามารถของ T cell ในการรับรู้ foreign HLA molecules เหล่านี้เป็นจุดเริ่มต้นของขบวนการปฏิเสธการปลูกถ่ายอวัยวะ

2. **Activation phase** เป็นระยะที่มีขบวนการต่างๆเกิดขึ้นภายในเซลล์ลิมโฟไซต์หลังจากการรับรู้แอนติเจน ขบวนการเหล่านี้ได้แก่

2.1. Proliferation (การเพิ่มจำนวน) ลิมโฟไซต์ที่รับรู้แอนติเจนจะแบ่งตัวเพิ่มจำนวนจาก clone ที่จำเพาะกับแอนติเจนนั้น

2.2. Differentiation (การแปรรูป) ลิมโฟไซต์ที่เพิ่มจำนวนจะเปลี่ยนแปลงไปเป็น effector cell หรือ memory cell เช่น ถ้าเป็น CD4 T lymphocyte จะแปรรูปเป็น activated T<sub>H</sub> lymphocyte ทำหน้าที่หลั่ง cytokine ช่วยการตอบสนองของทางภูมิคุ้มกัน ส่วน CD8 T lymphocyte จะแปรรูปเป็น cytotoxic หรือ cytolytic T lymphocyte (CTL) ทำหน้าที่ทำลายเซลล์ที่มีแอนติเจนแปลกปลอม

3. **Effector phase** เป็นระยะที่ลิมโฟไซต์ที่ถูกกระตุ้นออกฤทธิ์กำจัดแอนติเจนโดย lysis cell

### Immune response to renal allograft

เมื่อมีการปลูกถ่ายอวัยวะจากบุคคลหนึ่งไปยังอีกบุคคลหนึ่งที่ไม่ใช่คู่แฝด (identical twin) จะเกิดปฏิกิริยาการปฏิเสธ (rejection process) เกิดขึ้นซึ่งเกิดจากการที่มีปฏิกิริยากับ non self antigen จาก allograft เนื่องจากระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายมีการแยก self และ non self antigen อย่างชัดเจน โดยสิ่งแปลกปลอม (foreign antigen or non self antigen) ที่สำคัญที่สุดของการปลูกถ่ายอวัยวะ คือ human leukocyte antigens (HLA) ที่อยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 6 ของ major histocompatibility (MHC) ขบวนการ rejection เริ่มจากการมี antigen presentation และ allorecognition โดยกลไกการเกิด allorecognition มี 2 ประเภท (รูปที่ 2) คือ

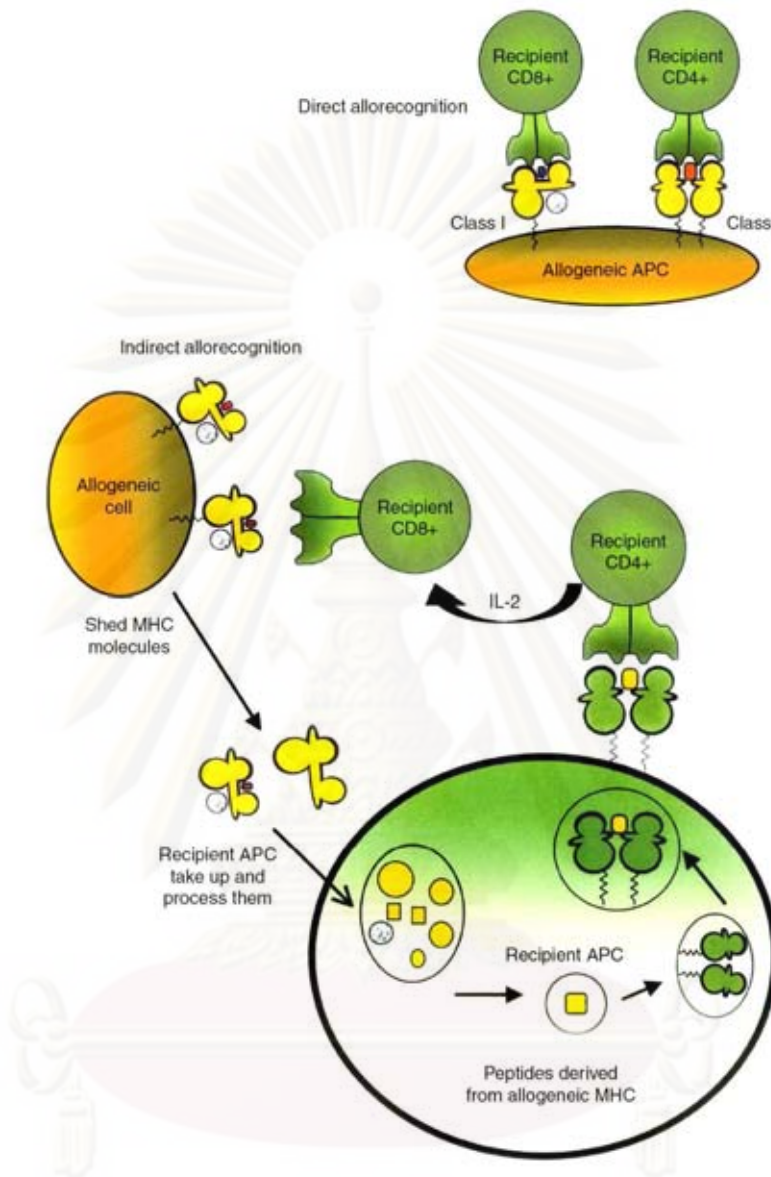
1. Direct allorecognition เกิดโดย donor T cell lymphocyte จะนำเสนอ foreign HLA molecules โดยตรงโดยไม่มีผ่านการผ่าน recipient antigen presenting cell (APC) โดย direct allorecognition มีความสัมพันธ์อย่างยิ่งกับการเกิด mixed lymphocyte reaction (MLR) และก่อให้เกิด early acute transplant rejection
2. Indirect allorecognition เกิดจาก foreign HLA molecules ถูก recognize และนำเสนอ โดย recipient antigen presenting cell โดยพบว่า indirect allorecognition มีความสัมพันธ์กับการเกิด rejection<sup>(16,17)</sup> และการ induce ให้เกิด tolerance ผ่าน indirect allorecognition มีผลต่อ long term graft survival<sup>(18)</sup>

โดยหลังมี allorecognition เกิดขึ้นแล้ว CD4 T helper cell จะหลั่ง cytokines ซึ่งสามารถ กระตุ้นการแบ่งตัวและการพัฒนาตัวของ B cell (humoral immunity) ให้เปลี่ยนเป็น plasma cell, plasma cell จะสร้าง antibodies และ proinflammatory cytokine ส่งผลให้มีการกระตุ้น macrophage และ CD8 cytotoxic T cell จัดการกับ alloantigen ก่อให้เกิดการปฏิเสธไตตามมา

#### Immunologic monitoring<sup>(19,20)</sup>

การพัฒนาเครื่องมือ (assays) ในการติดตามภูมิคุ้มกัน (immunologic monitoring) ที่เกิดขึ้นมีประโยชน์ต่อการประเมิน immunologic risk ว่ารายใดเสี่ยงต่อการเกิด rejection หากลด หรือหยุด immunosuppressive agents ซึ่งพบว่าเครื่องมือแต่ละอย่างมีทั้งข้อดีและข้อเสียที่ ต่างกัน ไม่สามารถอาศัยเครื่องมือเพียงชนิดเดียวในการให้ข้อมูลทั้งหมด ดังนั้นอาจต้องใช้หลายๆ เครื่องมือช่วยในการติดตามภูมิคุ้มกันเพื่อให้ได้ข้อมูลมากที่สุด

Immunologic monitoring assays ที่ใช้ในปัจจุบันสามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ antigen-specific assays และ non-antigen-specific assays โดย antigen-specific assays เป็นการตรวจวัดการตอบสนองของ B และ T cell ต่อ specific donor antigen ในขณะที่ non-antigen-specific assays เป็นการ determine phenotype ของ surface marker หรือ functional state ดังตารางที่ 2



รูปที่ 2 แสดง direct allorecognition และ indirect allorecognition<sup>(19)</sup> โดย direct pathway นั้น allogenic antigen presenting cell ( donor APC) จะเป็นตัว present MHC class I และ MHC class II ต่อ recipient CD8+ T cell และ CD4+ T cell ตามลำดับ สำหรับ indirect pathway นั้น allogeneic MHC molecules จะถูกขับออกจาก allograft ถูก recipient APC จับกินแล้ว present ต่อ recipient CD4+ T cell.

## ตารางที่ 2 แสดง Potential Immunological Monitoring Assay in Transplantation<sup>(20)</sup>

### Antigen-specific assays for immune monitoring

1. Cell proliferation assays
  - 1.1. Mixed lymphocyte reaction (MLR)
  - 1.2. Limiting dilution assays (LDA)
  - 1.3. Cell-mediated lymphotoxicity
  - 1.4. Tetramer technology
  - 1.5. Measurement of cell division by CFSE labeling
2. Enzyme-linked immunosorbent spots (ELISPOT)
3. Delayed-type hypersensitivity (Trans-vivo DTH assay)
4. Detection of donor-specific-antibodies
5. Detection of hematopoietic chimerism

### Non-antigen-specific assays for immune monitoring

1. Pre and post-transplant measurement of soluble immune mediators
  - 1.1. Circulating cytokines levels
  - 1.2. Soluble CD30 level measurement
1. Regulatory T cells
2. Non-antigen-specific stimulation (Immuknow measurement)
3. Analyses of T cell receptor repertoire
4. Proteomic biomarker
5. Detection of tolerogenic dendritic cells
6. Gene analyses
  - 6.1. Gene polymorphisms
  - 6.2. Quantification of mRNA precursors
  - 6.3. Microarray analysis of gene expression

สำหรับการประเมิน immunologic riskassessment ก่อนการปลูกถ่ายไตในปัจจุบันแบ่งตามเซลล์ที่ตอบสนองออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ ได้แก่ humoral immunologic risk assessment และ cellular immunologic risk assessment

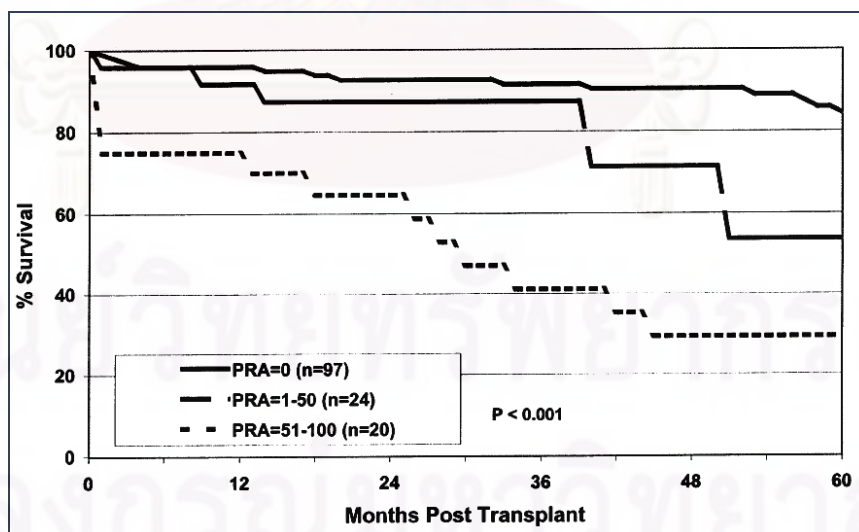


### Humoral immunologic risk assesment

เป็นการประเมินที่ทำก่อนการปลูกถ่ายไตเป็นประจำและถือเป็นการประเมินขั้นพื้นฐานที่ต้องทำ ได้แก่ crossmatch โดยวิธี complement dependent cytotoxic assay, panel reactive antibody (PRA) และ donor specific anti-HLA antibody (DSA) ซึ่งเป็นการตรวจหา anti-HLA antibody ทั้งที่จำเพาะต่อ donor HLA antigen (crossmatch และ DSA) และต่อ HLA antigen ของประชากรทั่วไป (PRA) โดยมีการศึกษามากมายที่พบว่า การตรวจพบ humoral risk ก่อนการปลูกถ่ายไตมีผลต่อ renal allograft outcomes

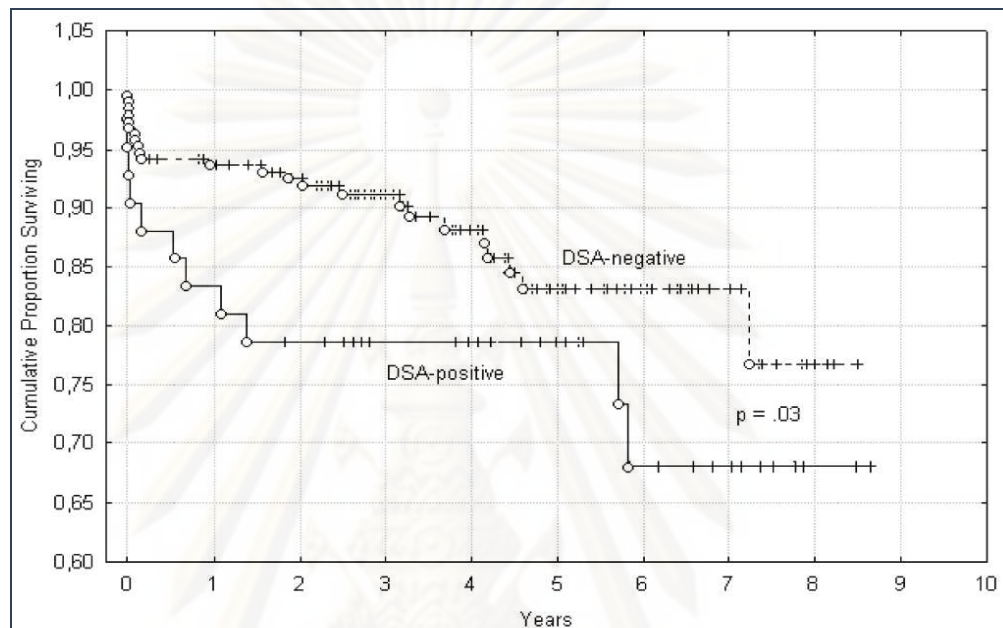
Complement dependent cytotoxicity assays (CDC) Patel และ Terasaki<sup>(21)</sup> ได้สังเกตพบว่าการปลูกถ่ายไตในกรณีที่เกิด crossmatch ด้วยวิธี complement dependent cytotoxicity assay (CDC) เป็นบวกรวมหมายถึงผู้ป่วยมี preformed DSA จะเกิดการปฏิเสธไตภายใน 48 ชั่วโมงได้ถึงร้อยละ 80 ในทางตรงกันข้ามจะพบการปฏิเสธไตได้เพียงร้อยละ 4 ถ้าผล crossmatch เป็นลบ จึงเป็นที่ถือปฏิบัติมาในปัจจุบันว่าการ crossmatch ด้วยวิธี CDC เป็นบวกรถือเป็นการห้ามของการปลูกถ่ายไต

Panel reactive antibody (PRA) มีหลายการศึกษาแสดงให้เห็นว่า PRA ที่ตรวจพบก่อนการปลูกถ่ายไตมีผล renal allograft survival และการตรวจพบมี PRA มากจะส่งผลให้ renal allograft survival ต่ำกว่าการตรวจพบ PRA น้อยหรือไม่พบ PRA เลย<sup>(22)</sup> รูปที่ 3



รูปที่ 3 แสดง renal graft survival ตาม panel reactive antibody (PRA)

Donor specific anti-HLA antibody (DSA) แม้ว่า crossmatch จะให้ผลลบแต่มีหลาย การศึกษาพบว่ากลุ่มที่ DSA เป็นบวกก่อนการปลูกถ่ายไตมี renal allograft survival ต่ำกว่า กลุ่มที่ DSA เป็นลบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 4)(23)



**รูปที่ 4** แสดง cumulative proportion surviving ของไตตามการตรวจพบ donor specific antibody (DSA) ก่อนการปลูกถ่ายไต

จะเห็นได้ว่า humoral immunologic risk assessment นั้นมีการศึกษาถึงบทบาทของการ ประเมินต่อ renal allograft outcome ที่ค่อนข้างชัดเจนแต่สำหรับ cellular immunologic risk assessment นั้นมีการศึกษาน้อย โดยการประเมินส่วนมากจะเป็นการประเมินด้านการแบ่งตัวของเซลล์หรือวัด cytokines ที่หลัง

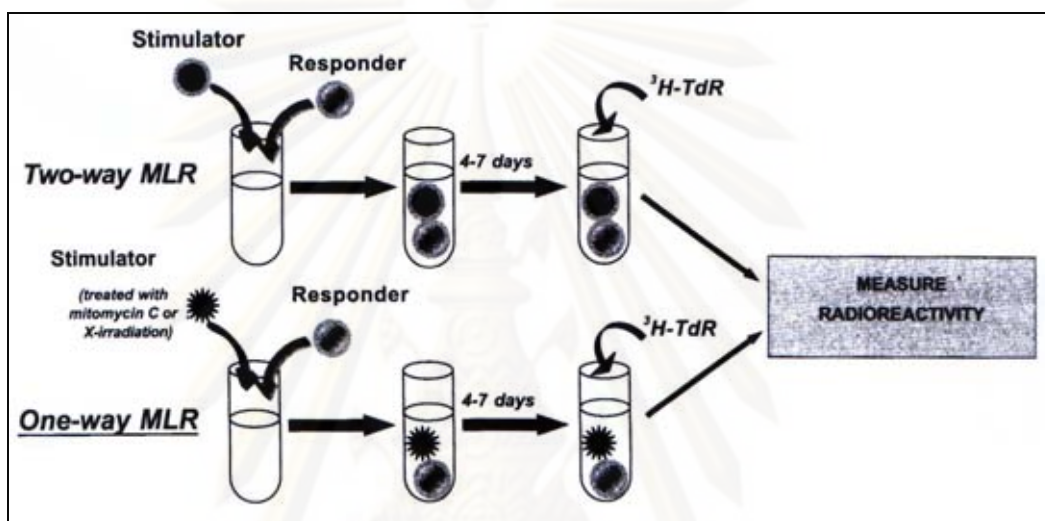
## Cellular immunologic risk assessment

### 1. Cell proliferation assays

เป็นการประเมินการตอบสนองด้านการแบ่งตัวของลิมโฟไซต์ต่อตัวกระตุ้น ซึ่งส่วนใหญ่ อาศัยการนับจำนวนเซลล์ที่แบ่งตัวใหม่หลังจาก culture ระหว่างลิมโฟไซต์กับตัวกระตุ้น โดย ตัวกระตุ้นที่ใช้ในแง่ของการปลูกถ่ายไต คือ donor alloantigen ส่วนมากได้มาจาก donor lymphocyte สามารถแบ่ง cell proliferation assays ได้ดังต่อไปนี้

### 1.1. Mixed lymphocyte reaction (MLR)

เป็นการศึกษาในหลอดทดลองแรกๆที่ศึกษาการตอบสนองของ T lymphocyte ต่อ histocompatibility antigen หรือ MHC molecule ที่ต่างจากตัวมัน โดยนำเอาลิมโฟไซต์ของ recipient (responder) และ donor (stimulator) มาเพาะเลี้ยงรวมกัน เวลานั้นประมาณ 3-7 วัน แบ่งเป็น One-way MLR และ Two-way MLR (รูปที่ 5)



รูปที่ 5 แสดง One-way MLR และ Two-way MLR

One-way MLR มีขั้นตอนเริ่มจากการนำ peripheral blood mononuclear cell (PBMC) ของ recipient มาเพาะเลี้ยง (incubate) ร่วมกับ donor cells ที่ผ่านการฉายแสงหรือใส่ mitomycin-C เพื่อให้ donor cells หยุดการสร้าง DNA แต่ยังไม่ตาย ซึ่ง donor lymphocyte (stimulator) จะแสดง alloantigen ที่ต่างจาก recipient lymphocyte (responder) จึงกระตุ้นให้ responder cell เกิดการแบ่งตัว

Two-way MLR ขั้นตอนเหมือนกันกับ one-way MLR แต่จะไม่มี การฉายแสง donor lymphocyte ก่อให้เกิดการกระตุ้นซึ่งกันและกัน ทำให้ทั้ง donor และ recipient lymphocyte แบ่งตัวไปพร้อมๆกัน

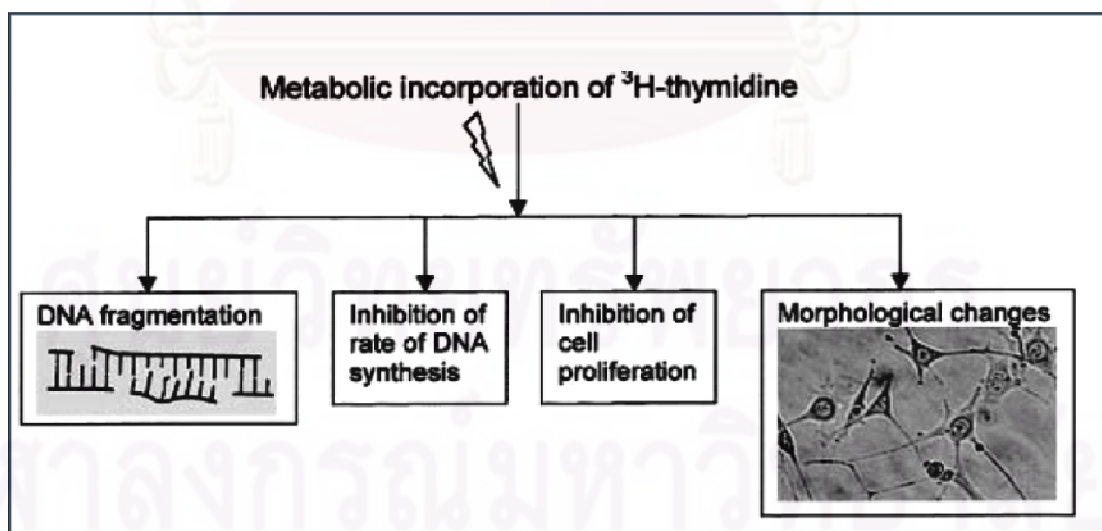
จนกระทั่งใน 18 ชั่วโมงสุดท้ายของการเพาะเลี้ยงจะมีการเติม tritiated thymidine ( $^3\text{H-Thymidine}$ ) หลังจากนั้นนำลิมโฟไซต์มา lysed แล้วนับ DNA โดยนับเป็น mean count per minute (cpm) แสดงข้อมูลที่แสดงถึง cellular proliferation เป็น

$$\begin{aligned}\Delta \text{ cpm} &= \text{experimental cpm} - \text{background cpm} \\ &= \text{donor cpm} - \text{recipient (autologous) cpm}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Stimulation index} &= \text{experimental cpm} / \text{background cpm} \\ &= \text{donor cpm} / \text{recipient (autologous) cpm}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Relative response} &= \frac{\text{donor cpm} - \text{recipient (autologous) cpm}}{\text{Third party cpm} - \text{recipient (autologous) cpm}}\end{aligned}$$

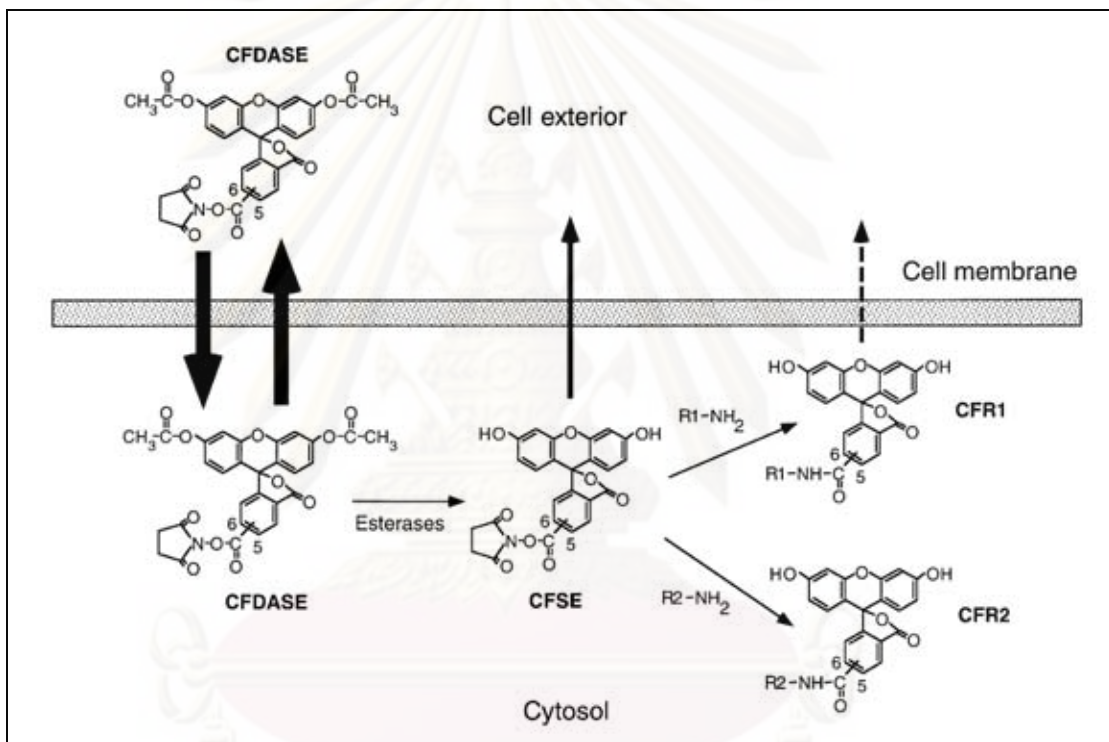
ในอดีต MLR โดย tritiated thymidine ( $^3\text{H}$ -thymidine)<sup>(24,25)</sup> เป็นการดูการสังเคราะห์ DNA โดยนำลิ้มโฟไซต์ที่ถูกกระตุ้นมาเติม nucleoside ที่จำเป็นในการสร้าง DNA ลงไป นั่นคือ thymidine ที่ถูกติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสี ( $^3\text{H}$ -thymidine) เซลล์จะ incorporate  $^3\text{H}$ -thymidine เข้าไปใน DNA ระหว่างที่มีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนลิ้มโฟไซต์ มีการเปลี่ยนจาก soluble nucleoside เป็น insoluble DNA polymers หลังจากนั้นนำมาตกตะกอน DNA ด้วย trichloroacetic acid แล้วกรองบน glass fiber filter ที่งไว้ให้แห้งแล้วใส่ scintillation fluid แล้ววัดรังสี  $\beta$  ของ  $^3\text{H}$ -thymidine ที่ถูก incorporate เข้าไปด้วยเครื่อง beta scintillation counter มีหน่วยเป็น count per min (cpm) ค่า cpm ที่ได้แสดงถึงการแบ่งตัวของลิ้มโฟไซต์ ถ้ามีแบ่งตัวมาก สร้าง DNA มากค่า cpm ก็จะสูงมากตามไปด้วย



รูปที่ 6 แสดงผลเสียของ  $^3\text{H}$ -thymidine ต่อเซลล์ที่มีการแบ่งตัว



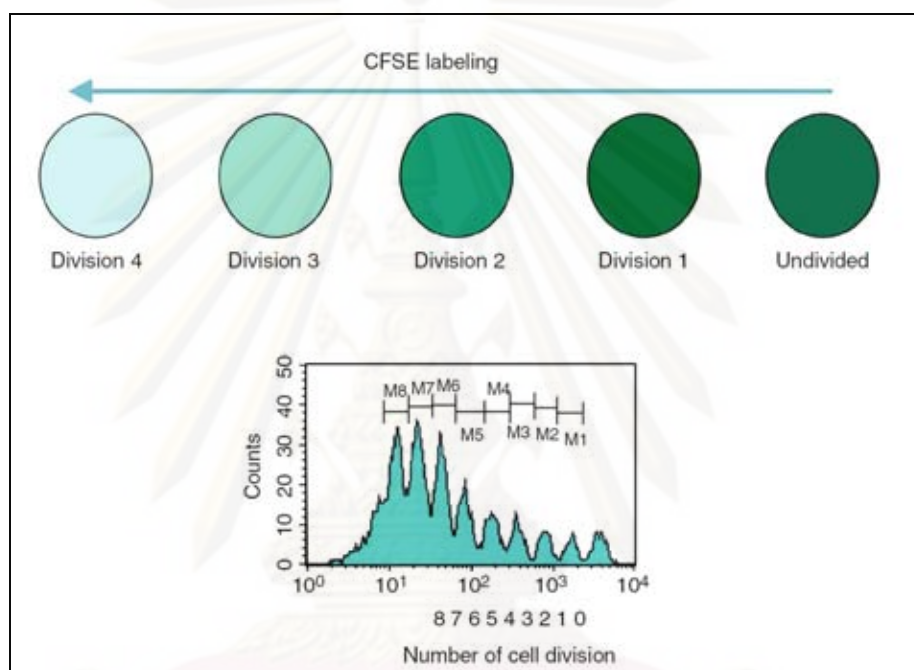
เนื่องจาก MLR โดย tritiated thymidine มีข้อด้อยหลายอย่าง ได้แก่ วิธีการทำยุ่งยากและต้องสัมผัสสารกัมมันตรังสี ทำลายดีเอ็นเอ ยับยั้งการแบ่งเซลล์ (รูปที่ 6) ไม่สามารถระบุขอบของการแบ่งตัวและชนิดของเซลล์ (phenotype of cell) การแปลผลก็มีปัญหา เช่น กรณี low level of  $^3\text{H}$ -thymidine uptake อาจเป็นจากเซลล์ที่แบ่งตัวมีปริมาณน้อยจริง หรือ มีปัญหาในขั้นตอนการเติม  $^3\text{H}$ -Thymidine (poor batch of  $^3\text{H}$ -thymidine) ต่อมาจึงมีการพัฒนาวิธีการย้อมภายในเซลล์โดยใช้ fluorescein dye เพื่อแก้ปัญหาที่เกิดขึ้น



**รูปที่ 7** แสดงกลไกการย้อมติดสารเรืองแสงของ carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester <sup>(26)</sup> โดยเริ่มจาก 5-(and-6)-carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester (CFDASE) ซึ่งเป็น non-fluorescent และ highly membrane permeant แพร่เข้าเซลล์ได้อย่างอิสระด้วยคุณสมบัติ high lipophilicity ถูก esterases ภายในเซลล์ตัด acetate groups ออก 2 ตำแหน่งได้เป็น carboxy fluorescein succinimidyl ester (CFSE) ทำให้แพร่ออกจากเซลล์ได้ช้า หลังจากนั้นจะทำปฏิกิริยากับ amino group ถ้าจับกับ R1-NH<sub>2</sub> จะได้เป็น CFR1 ซึ่งยังสามารถแพร่ออกนอกเซลล์หรือสลายตัวเร็วได้ แต่ถ้าจับกับ R2-NH<sub>2</sub> ได้เป็น CFR2 ซึ่งไม่สามารถแพร่ออกจากเซลล์ได้ทำให้ fluorescent ติดค้างภายในเซลล์

หมายเหตุ ขนาดลูกศรแทนความสามารถในการแพร่ผ่านผนังเซลล์

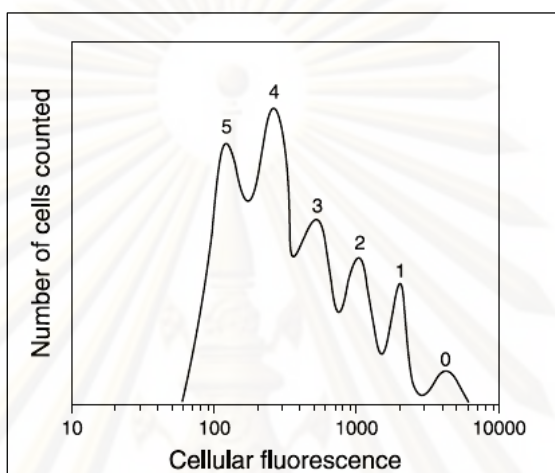
Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) จัดเป็นหนึ่งใน membrane-permanent fluorescein-based dyes โดยในปี พ.ศ. 2533 Weston SA และคณะ<sup>(27)</sup> ได้นำมาใช้ศึกษา lymphocyte migration เป็นครั้งแรก ต่อมาในปี พ.ศ. 2537 Lyons และคณะ<sup>(28)</sup> ได้นำ flow cytometry มาใช้ร่วมกับ CFSE ในการย้อมลิมโฟไซต์เพื่อศึกษาการแบ่งเซลล์เป็นครั้งแรกจนเป็นที่แพร่หลายในห้องปฏิบัติการมาจนถึงปัจจุบัน



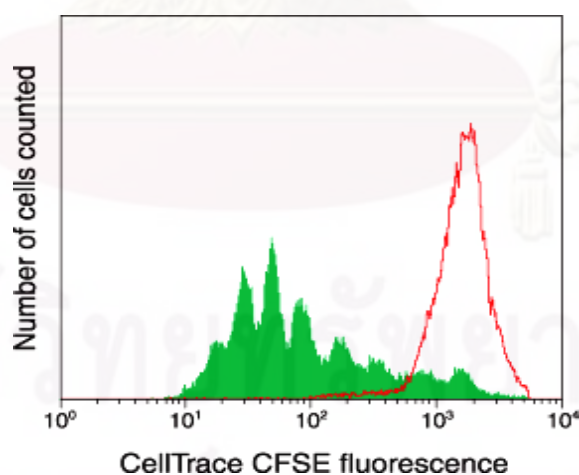
**รูปที่ 8** แสดง fluorescence intensity ของเซลล์ที่ย้อม CFSE โดยจะลดลงครึ่งหนึ่งทุกรอบของการแบ่งตัว สำหรับ T lymphocyte สามารถแสดงการแบ่งเซลล์ได้มากถึง 8 รอบ

CFSE fluorescence dye ที่ใช้ย้อมดูการแบ่งตัวของ T cell lymphocyte นั้นจะอยู่ในรูป carboxy-fluorescein diacetatesuccinimidyl ester (CFDASE) ซึ่งเป็น diacetate form ของ CFSE จะเป็นรูปแบบที่ไม่เป็นพิษ (nontoxic) และไม่เรืองแสง (nonfluorescent molecule) มีความสามารถในการแพร่ผ่านผนังเซลล์ได้อย่างอิสระ (passively diffuse) หลังจากผ่านผนังเซลล์ที่มีชีวิต (live cell) แล้ว CFDASE จะถูก esterase enzyme ตัด acetyl group ออกไปได้เป็น CFSE (deacetylated form of CFDASE) ดังรูปที่ 7 ซึ่งเป็นสารเรืองแสง (active fluorophore) ที่มีความยาวคลื่น 488 นาโนเมตร และติดเซลล์แบบ homogeneous และ very bright โดยมีระยะเวลาความคงตัวของสารเรืองแสงได้ประมาณหนึ่งอาทิตย์<sup>(29)</sup> CFSE จะกระจายตัวทั่วทั้งเซลล์เท่าๆกัน เมื่อเกิดการแบ่งตัวจากเซลล์ต้นกำเนิดหนึ่งเซลล์ได้เซลล์ลูกสองเซลล์ ความเข้มของการ

เรียงแสงในเซลล์จะถูกจะลดลงครึ่งหนึ่งและจะลดลงแบบนี้ทุกๆรอบของการแบ่งเซลล์<sup>(28)</sup> ดังรูปที่ 8 ซึ่งการลดลงแบบครึ่งๆนี้จะสังเกตได้จากการค่อยลดลงของ peak ของ histogram แต่ละ peak ที่ได้จาก flow cytometry ดังรูปที่ 9 โดยสำหรับ T lymphocyte นั้นสามารถติดตามการแบ่งเซลล์ได้ประมาณ 8-10 รอบตามความเข้มของ CFSE ที่ลดลง

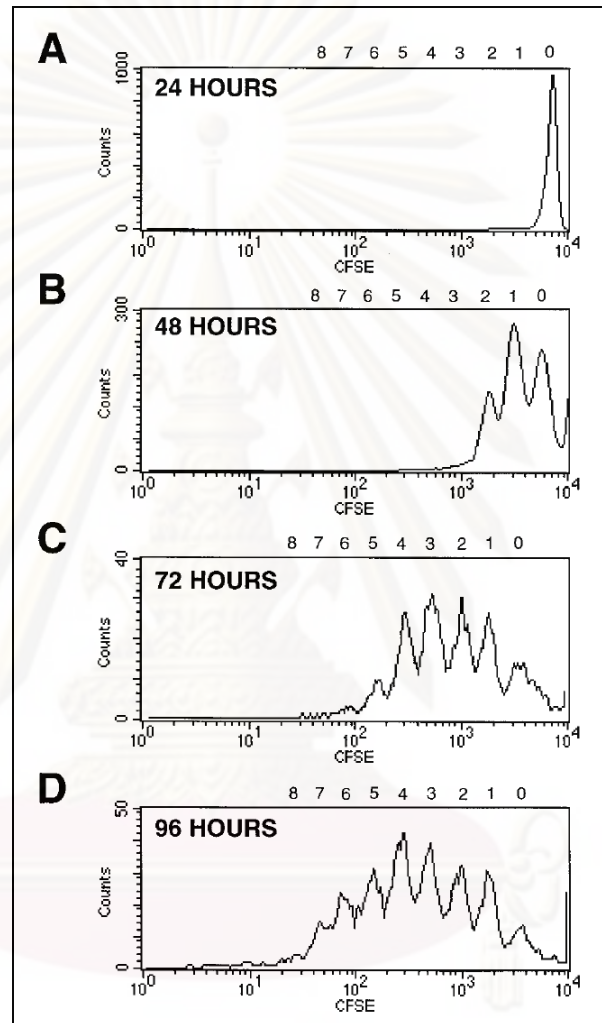


รูปที่ 9 แสดง cellular fluorescence histogram ที่แสดงให้เห็นการลดลงครึ่งหนึ่งของ fluorescence ในทุกรอบของการแบ่งตัว โดยที่ peak 0, 1, 2, 3, 4 และ 5 เป็นตัวบอกจำนวนรอบของการแบ่งตัว



รูปที่ 10 แสดงจำนวน cell proliferation โดย CFSE assay peak ไปรุ่งแรกทางขวามือแสดงจำนวนเซลล์ต้นกำเนิดที่ Day 0 ซึ่งมีความเข้มของ สารเรืองแสง มากที่สุด และ peaks ที่บีบอัดมาทางซ้ายมือแสดงจำนวนเซลล์และจำนวนรอบของการแบ่งตัว

วิธีนี้สามารถตรวจพบการแบ่งเซลล์ตั้งแต่ 24-48 ชั่วโมงแรก ดังรูปที่ 10 และค่อยๆ แบ่งเพิ่มตามระยะเวลาที่เพาะเลี้ยง พบว่าความเข้ม CFSE fluorescien ที่ติดเซลล์ที่ค่าสูงสุดในวันแรก (day 0) หลังจากที่มีการแบ่งเซลล์ ความเข้มก็จะลดลงเป็น log ทุกๆรอบ ดังรูปที่ 11

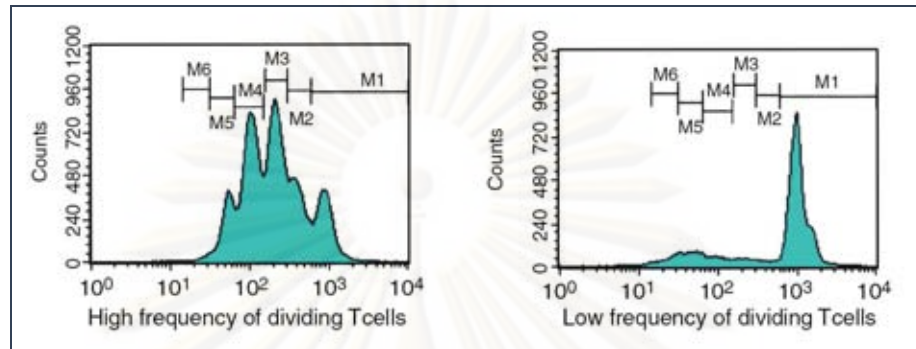


รูปที่ 11 แสดง kinetic analysis ของ T cell division ของ CFSE labeled splenocytes ณ ช่วงระยะเวลาต่างๆ (A) 24 ชั่วโมง (B) 48 ชั่วโมง (C) 72 ชั่วโมง (D) 96 ชั่วโมง โดยหมายเลข 0-8 แสดงจำนวนรอบของการแบ่งตัว และ peak ขวาสุดเป็น T cell ที่ไม่ได้แบ่งตัว ส่วน peak ซ้ายสุดเป็นการแบ่งตัวรอบสุดท้าย<sup>(30)</sup>

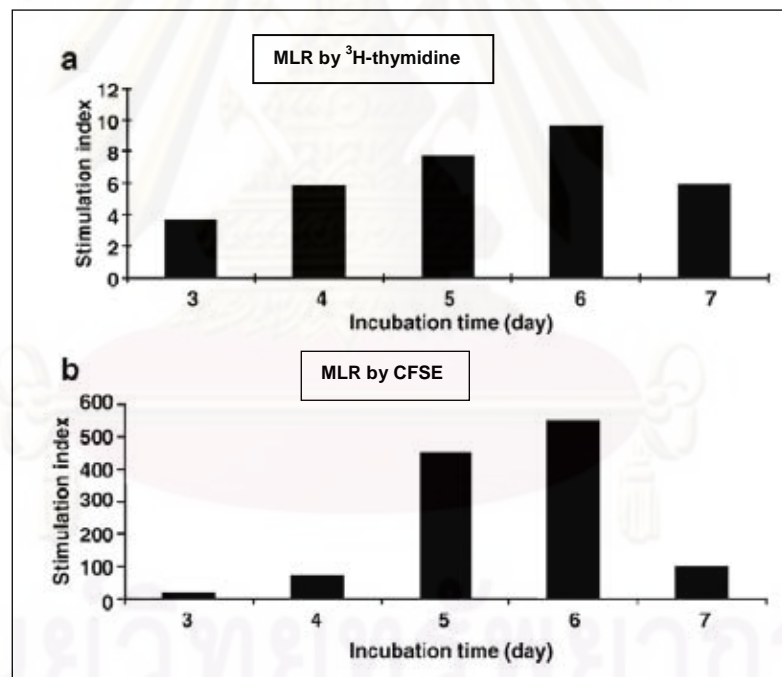
MLR by CFSE assay เป็นการประเมิน T cell response ต่อ alloantigen (donor cell) ที่แตกต่างกัน ดังนั้นจึงต้องอาศัยปริมาณการแบ่งตัวของ T cell (T cell proliferation) เป็นตัววัด จากรูปที่ 12 พบว่าถ้ามีการตอบสนองมากจะมีการแบ่งเซลล์มากจะเห็น histogram มีหลายยอด



(peak) มีความสูงมากและขยับมาทางซ้ายมือ ต่างจากกรณีที่มีการตอบสนองน้อยจะพบว่า histogram ค่อนข้างเตี้ยและไม่เห็นยอดการแบ่งตัว



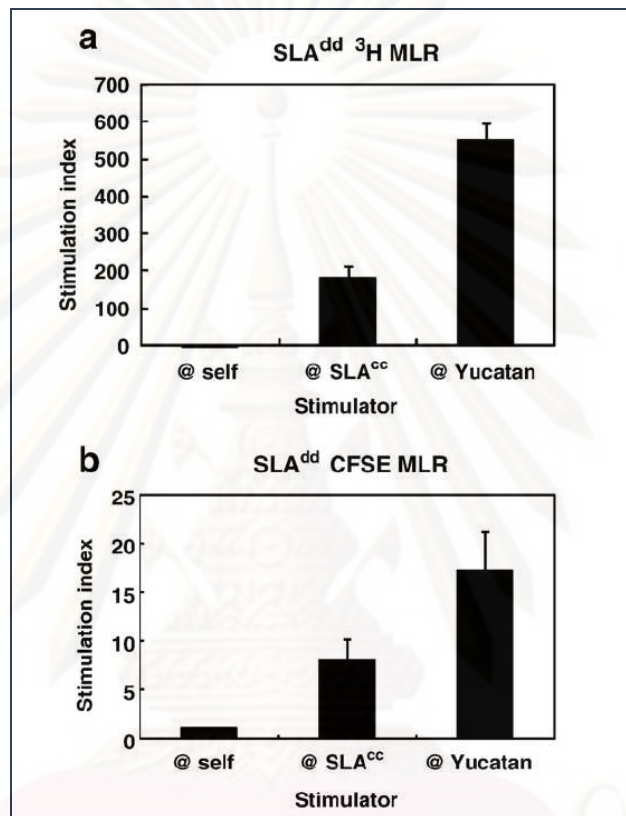
รูปที่ 12 แสดง flow cytometry analysis of cell division โดยซ้ายมือแสดงถึงเซลล์มีการแบ่งตัวมาก และขวามือแสดงถึงเซลล์มีการแบ่งตัวน้อย



รูปที่ 13 แสดง kinetics of MLR by CFSE (a) and MLR by <sup>3</sup>H-thymidine (b) พบว่า stimulation index ของทั้งสองวิธีมีค่าสูงขึ้นตั้งแต่วันที่ 3 และสูงสุดในวันที่ 6 เช่นเดียวกัน

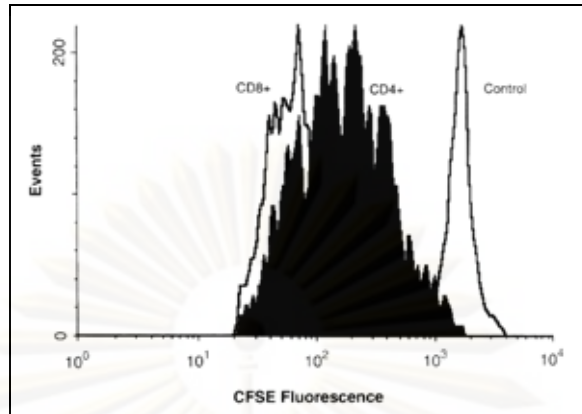
ได้มีการศึกษา T cell function โดย CFSE เทียบกับ <sup>3</sup>H-Thymidine ซึ่งเป็นที่ใช้กันมาก่อน พบว่าให้ผลไปในทิศทางเดียวกัน Manei Oku และคณะ<sup>(31)</sup> ได้ศึกษาเปรียบเทียบ <sup>3</sup>H-Thymidine MLR assay กับ CFSE MLR assay ในหนู พบว่าให้ผลไปในทางเดียวกัน ทั้งในเรื่องการ

เปลี่ยนแปลงทาง kinetic ดังรูปที่ 13 และผลดัชนีการกระตุ้น (stimulation index) ดังรูปที่ 14 แต่พบว่าค่า stimulation index ที่ได้จากวิธี CFSE MLR assay มีค่าต่ำกว่าวิธี  $^3\text{H}$ -Thymidine MLR assay



รูปที่ 14 แสดง Stimulation index โดย both traditional MLR (a) and CFSE MLR assays (b)

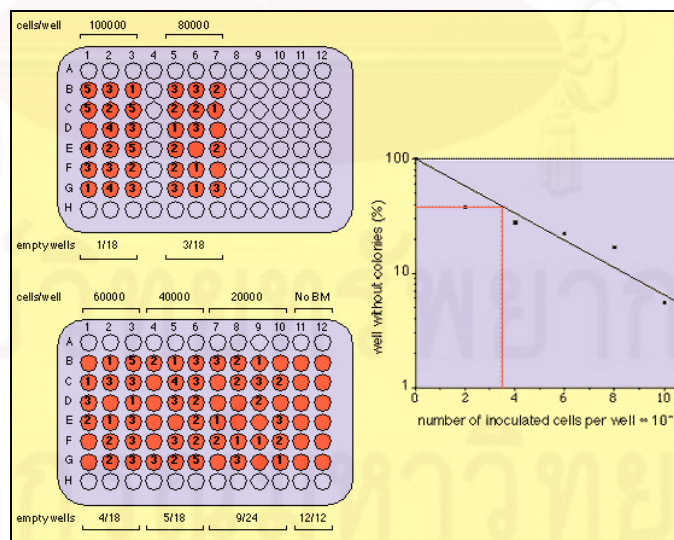
ข้อดีอีกอย่างของ MLR by CFSE assay คือ การสามารถบอก phenotype ของเซลล์ที่ต้องการตรวจการแบ่งตัวได้โดยอาศัยการย้อมด้วย antibody ที่จำเพาะต่อเซลล์ที่ต้องการวัด เช่น phycoerythrin (PE) conjugate anti-CD4 หรือ PE conjugate anti-CD8 ดังรูปที่ 15 Onoe และคณะ<sup>(32)</sup> ได้ทำการศึกษาในหนูโดยใช้ multiparameter flow cytometric MLR by CFSE โดยใช้ anti-CD4, anti-CD8, anti-CD44 และ anti-45RA พบว่าสามารถระบุ phenotype ของ T cell ที่แบ่งตัวตอบสนองต่อ alloantigen ได้



รูปที่ 15 แสดง proliferation of subset ของ T cell โดยภายหลังการย้อมด้วย PE conjugate anti-CD4 และ PE conjugate anti-CD8 ทำให้แยก CD4 T cell (shaded histogram) และ CD8 T cell (open histogram)

1.2. Limiting dilution assays (LDA)<sup>(19,20)</sup>

Lefkovits ได้กล่าวไว้ครั้งแรกตั้งแต่ พ.ศ.2515<sup>(33)</sup> วิธีการนี้เป็นวิธีแรกๆที่ใช้ตรวจการตอบสนองของภูมิคุ้มกันต่อ antigen specific ในเชิงปริมาณ โดยขั้นตอนเริ่มจากการ dilute responder cell (recipient PBMC) ด้วยอัตราส่วนที่แตกต่างแล้วเติมลงไปในภาชนะที่มี non-limiting stimulus (donor stimulator cell) การแปลผลต้องเปรียบเทียบกับหลุม negative control



รูปที่ 16 แสดง limiting dilution assay และกราฟระหว่างจำนวนหลุมที่ให้ผลลบกับจำนวนเซลล์ในหลุมนั้น

(หลุมที่ไม่มี responder cell) โดยที่จะแปลผลว่า positive เมื่อการตอบสนองมีค่าสูงกว่า negative control ประมาณ 3 เท่าขึ้นไป โดยจำนวนหลุม negative ในแต่ละความเข้มข้นของ responder cell จะถูกระบุซึ่งจำนวนของหลุมที่แปลผล negative จะแตกต่างกันไปขึ้นกับ dilution ของ responder cell คือ เมื่อความเข้มข้นของ responder cell มากจำนวนหลุมที่ negative จะน้อยลง หลังจากนั้นจะมีการวาดกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนหลุมที่ให้ผล negative กับค่าเฉลี่ยของจำนวน precursor cell ดังรูปที่ 16

### 1.3. Cell-mediated lymphotoxicity (CML)<sup>(20,34)</sup>

เป็นการทดสอบความสามารถของ cytotoxic T lymphocyte (CTL) ในการทำลายเซลล์เป้าหมายที่ติดฉลากด้วย chromium-51 (<sup>51</sup>Cr) โดยนำมิมโฟไซต์ของผู้รับ (recipient) มาเลี้ยงร่วมกับ <sup>51</sup>Cr-donor target cell ใน microtiter plate เมื่อครบเวลานำไปปั่นแยกเอาน้ำส่วนบนซึ่งมี <sup>51</sup>Cr release ออกมาจาก donor cell ที่ถูกทำลายโดย cytotoxic T cell เอาน้ำส่วนบนที่ได้ไปวัดสารกัมมันตรังสีด้วยเครื่อง gamma counter หน่วยเป็น count per minute (cpm) แสดงผลด้วยค่า % specific lysis ถ้าค่า % specific lysis สูงแสดงถึง CTL ของผู้รับมีความสามารถในการทำลาย donor cell สูง

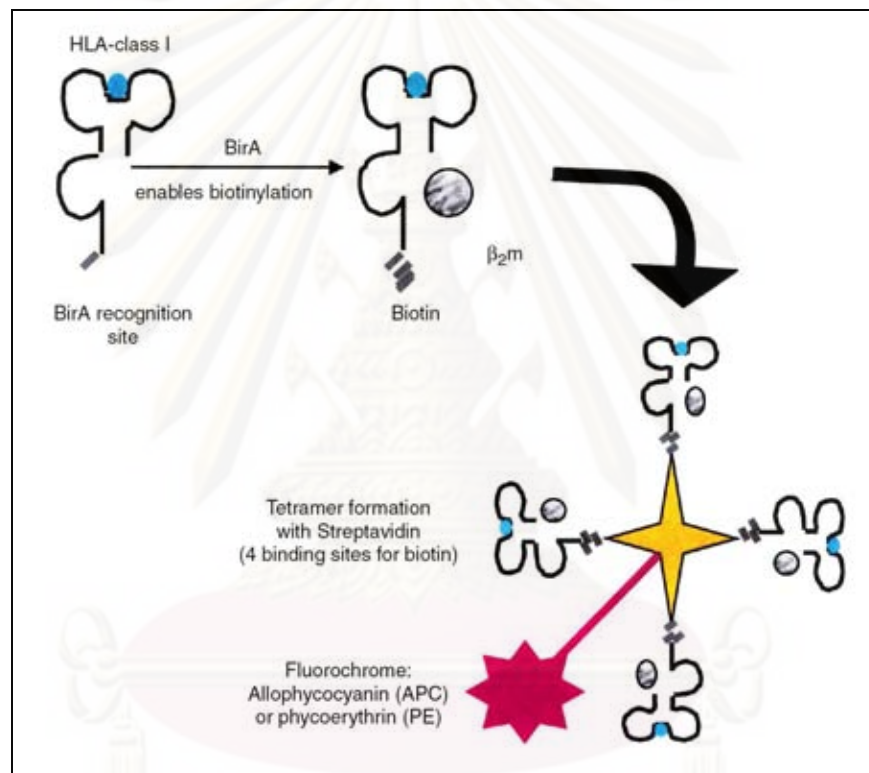
Weimer และคณะ<sup>(35)</sup> ศึกษาบทบาทของ CTL assay ต่อการลดยากดภูมิคุ้มกันในผู้ป่วยที่ได้รับการผ่าตัดปลูกถ่ายไตมาเป็นระยะเวลา 2 ปีจำนวน 81 ราย พบว่ามีผู้ป่วยทั้งสิ้น 50 รายที่ตรวจไม่พบ donor specific CTL (hyporesponsive) และหลังจาก inform consent ได้มีการลดขนาดยากดภูมิคุ้มกันลงครึ่งหนึ่งและติดตามต่อ 12 เดือน พบว่ามีเพียง 1 รายที่เกิดการปฏิเสธไต มีข้อเสนอแนะว่า hyporesponsive ใน CTL assay หลังปลูกถ่ายไตสามารถช่วยประกอบการตัดสินใจในการปรับลดยากดภูมิคุ้มกัน อย่างไรก็ตาม CTL assay เป็นการตรวจการทำงานของ CD8 T cell เท่านั้นไม่สามารถเข้าใจบทบาทของ alloreactivity ได้

### 1.4. Tetramer technology<sup>(19,20,34)</sup>

เป็นการศึกษา T lymphocyte ที่จำเพาะต่อ antigen โดยการย้อมเซลล์ด้วย MHC tetramer ซึ่งประกอบด้วย MHC class I-peptide complex 4 โมเลกุลที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสงแล้วนำไปนับจำนวนด้วยเครื่อง flow cytometry ดังรูปที่ 17 โดยสังเคราะห์ peptide ใส่ลงบนร่องของ MHC class I molecule แล้วนำมา conjugate กับ biotin ได้เป็น biotinylated MHC class I-peptide complexes นำมาเชื่อมต่อกัน 4 โมเลกุลโดยผสมกับ streptavidin แล้วติดฉลากกับสารเรืองแสง phycoerythrin (PE) นำ MHC tetramer ไปย้อมเซลล์ เติมน้ำ anti-CD8 ลงไปแล้วนับ



ด้วยเครื่อง flow cytometer ทำให้ทราบจำนวนของ cytotoxic T lymphocyte ที่มี T cell receptor จำเพาะกับ peptide บน MHC tetramer ปกติการจับกันระหว่าง MHC-peptide กับ T cell receptor ค่อนข้างอ่อนจึงต้องใช้วิธีการเพิ่ม avidity โดยการให้ MHC-peptide ถึง 4 โมเลกุล เป็นวิธีที่มีความไวค่อนข้างสูงในการตรวจหา CD8 T cell และนิยมสร้าง MHC class I มากกว่า MHC class II เนื่องจากสามารถสร้าง recombinant protein ได้ง่ายกว่าเพราะมี polypeptide chain ซึ่งเป็น polymorphic เพียงหนึ่งสายและสั้นกว่า

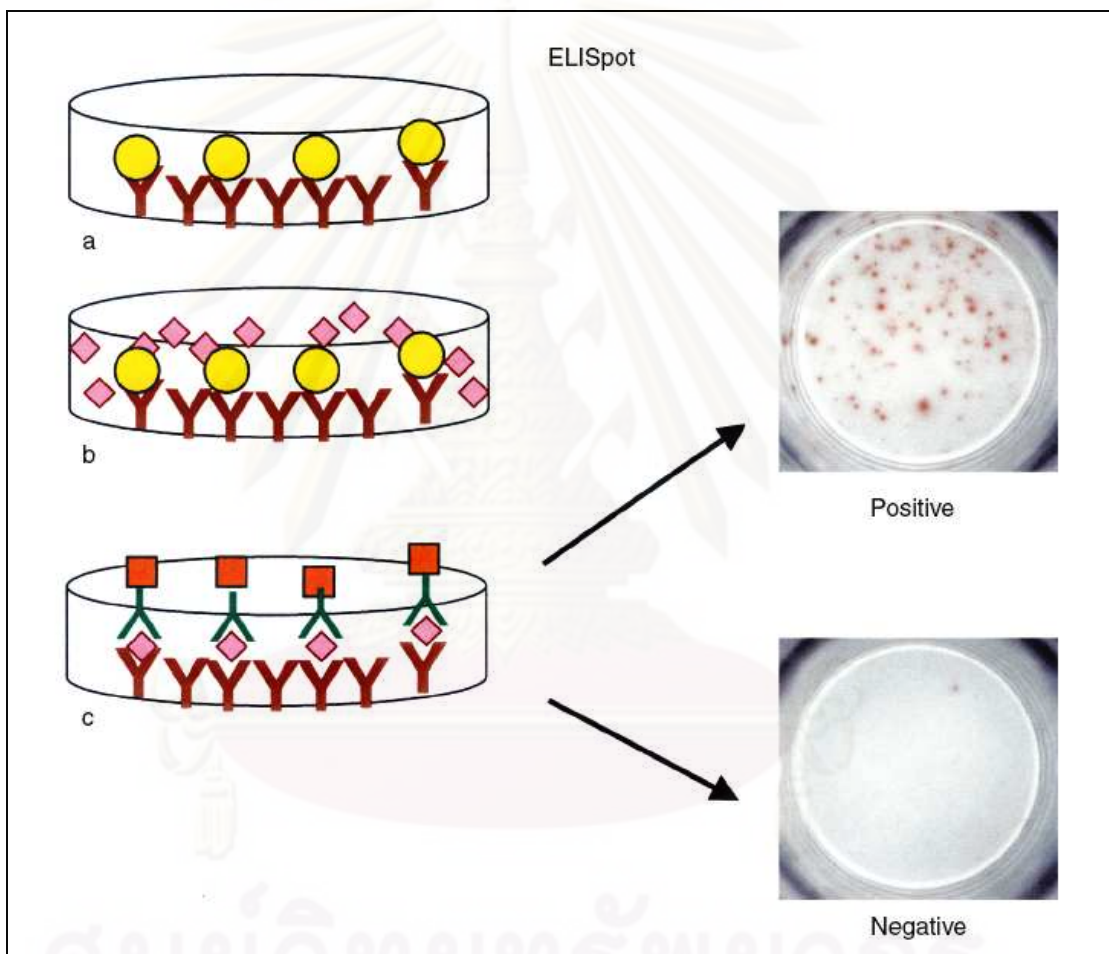


รูปที่ 17 แสดงการใช้ MHC tetramer ในการตรวจหา specific T cells ด้วย flow cytometry

## 2. Enzyme-linked immunosorbent spots (ELISPOT)

ELISPOT assay จัดเป็นวิธีที่ผสมระหว่าง MLR และ ELISA เป็นการศึกษาคือการตอบสนองของ T cell (previous activate or memory T cell ) ต่อ donor antigen โดยอาศัยการหลั่ง cytokine จาก single cell<sup>(36,37)</sup> ELISPOT assay สามารถตรวจ immune response ได้ทั้ง direct และ indirect pathway โดยมีขั้นตอน (รูปที่ 18) เริ่มจากการเพาะเลี้ยงเซลล์ responder (recipient T cell) ร่วมกับ inactivated stimulator (donor cell) ใน plate ที่มีการเคลือบ

antibody ต่อ cytokine ที่สนใจศึกษา เช่น IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-5, และ IL-10 เมื่อ recipient T cell ถูกกระตุ้นก็จะหลั่ง cytokine ออกมา โดย cytokine จะถูกจับไว้ด้วย antibody ที่จำเพาะต่อ cytokine นั้น หลังจากล้างเซลล์ออกไปเติมแอนติบอดีตัวที่สอง (secondary anti-cytokine antibody) ที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์แล้วตามด้วย substrate เมื่อทำปฏิกิริยากันจะเกิดเป็นจุด (spots) ให้เห็นตามเซลล์ที่หลั่ง cytokines นั้น



**รูปที่ 18** แสดงวิธีการ ELISpot และการแปลผล (a) เคลือบ culture well ไว้ด้วย antibodies ต่อ cytokines แล้วใส่เซลล์ลงไป culture (b) culture 24-48 ชั่วโมง cytokines ถูกหลั่งโดยเซลล์ ล้างเซลล์ออกเหลือเพียง cytokines ที่จับ antibodies (c) เติม biotinylated antibodies ซึ่งเป็นแอนติบอดีตัวที่สองซึ่ง มี streptavidin enzyme อยู่ ตามด้วย substrate เมื่อทำปฏิกิริยากันเกิดเป็นจุด (spots) ให้เห็นตามเซลล์ที่หลั่ง cytokines นั้น

Nickel และคณะ<sup>(38)</sup> ได้ศึกษา IFN- $\gamma$  ELISPOT ก่อนการปลูกถ่ายไตในผู้ป่วย 42 ราย พบว่ารายที่เกิดการปฏิเสธไตมี IFN- $\gamma$  ELISPOT ก่อนการปลูกถ่ายไตสูงกว่ารายที่ไม่เกิดการปฏิเสธไตอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

Augustine และคณะ<sup>(39)</sup> ศึกษา IFN- $\gamma$  ELISPOT ก่อนการปลูกถ่ายไตในผู้ป่วย African American 37 ราย พบว่า กลุ่มที่ ELISPOT เป็นบวกมีอุบัติการณ์การ biopsy-proven acute rejection สูงกว่ากลุ่มที่ ELISPOT เป็นลบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (50% vs 17%,  $p=0.036$ ). และที่ 12 เดือนหลังผ่าตัดกลุ่มที่ ELISPOT เป็นบวกมีค่า calculated glomerular filtration rate (MDRD) ต่ำกว่าที่กลุ่มที่ ELISPOT เป็นลบ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $37\pm 16$  mL/min vs  $55\pm 20$  mL/min,  $p=0.01$ )

การประเมิน cellular immunologic risk assessment ประกอบด้วยหลายวิธีดังได้รวบรวมข้อมูล โดยสรุปข้อดีข้อเสียไว้ดังตารางที่ 3 และเนื่องด้วยการตรวจ mixed lymphocyte reaction สามารถประเมินได้ตั้งแต่ขั้นตอน recognition จนกระทั่ง T cell proliferation ทำให้สามารถประเมิน cellular risk assessment ได้ดี

ในอดีตมีการศึกษาบทบาทของ mixed lymphocyte reaction ทั้งก่อนและหลังการปลูกถ่ายไตต่อ renal allograft outcome ซึ่งผลที่ได้มีทั้งที่พบความสัมพันธ์และไม่พบทั้งนี้มีการตั้งข้อสังเกตไว้ว่าอาจเป็นเพราะในอดีตใช้  $^3\text{H}$ -thymidine เป็นตัวประเมินการแบ่งเซลล์ซึ่งมีข้อมูลภายหลังทราบว่าตัว  $^3\text{H}$ -thymidine เองก็มีผลต่อการสร้างดีเอ็นเอส่งผลให้การแบ่งเซลล์ลดลง ดังนั้นจึงรวบรวมการศึกษา mixed lymphocyte reaction โดย  $^3\text{H}$ -thymidine ไว้ ส่วนการศึกษาของ mixed lymphocyte reaction โดย CFSE นั้นปัจจุบันมีเฉพาะใน liver transplantation และทำหลังจากที่ปลูกถ่ายไตแล้ว

#### **การศึกษา mixed lymphocyte culture and mixed lymphocyte reaction โดย $^3\text{H}$ -thymidine**

Santiago-Delpin และคณะ<sup>(40)</sup> ได้ทำการศึกษาแบบ prospective study ในผู้ป่วย 35 ราย ที่ได้ทำการปลูกถ่ายไต พบว่า pretransplant mixed lymphocyte culture reactivity มีผลต่อการเกิด rejection แต่ไม่สามารถนำมาใช้แยกความแตกต่างระหว่างรายที่มี rejection มากออกจากรายที่มี rejection น้อย แต่พบว่ารายที่มี stimulation index  $> 3$  มี morbidity และ mortality สูงกว่ารายที่มี stimulation index  $< 3$



ตารางที่ 3 แสดงการเปรียบเทียบ T Cell Assays for Immunologic Monitoring<sup>a(34)</sup>

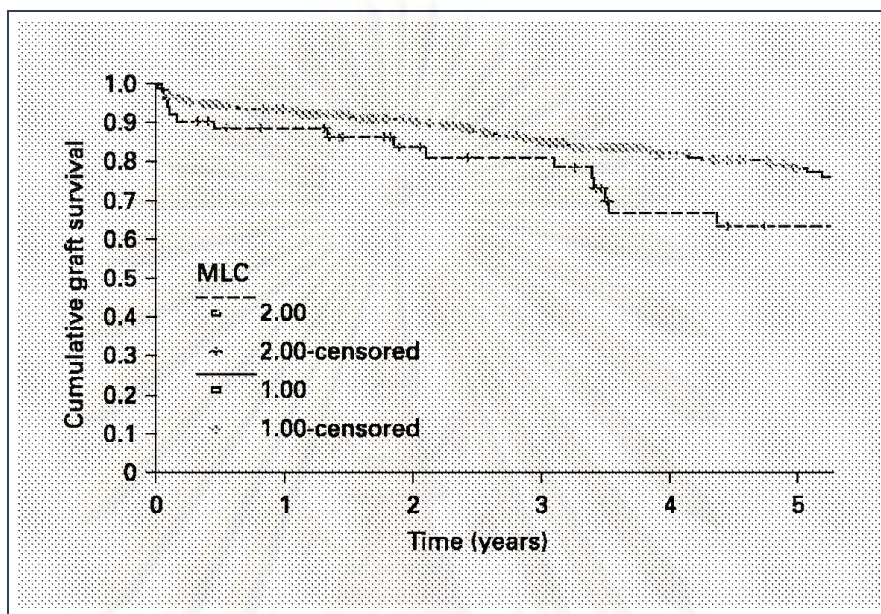
Assay	Technique	Advantages	Disadvantages
ELISPOT	Frequency of effector/memory T cells measured by detection of cytokine production using two high-affinity antibodies against the cytokine	High sensitivity Measures both frequency and phenotype of cells Short <i>in vitro</i> culture Direct and indirect alloreactivity measured Uncover regulation Use of frozen cells possible Relatively easy to perform	Frequency measured on the basis of the cytokine production of cells Snapshot of events Counting of cells/spots somewhat subjective Not yet used to study tolerant patients
Transvivo DTH	Index of reactivity of T cells to antigens measured by quantification of resultant swelling in mouse footpad	Direct and indirect alloreactivity Uncover regulation Only assay used to study tolerant patients	Requires mice Cumbersome Larger number of cells required Measurement of swelling subjective
Tetramers	Frequency of T cells measured by their binding to specific peptide-MHC complexes using flow cytometry	Direct visualization of T cells regardless of their function No activation or expansion needed Easy to perform Requirement for cell numbers low Could be combined with other flow cytometric assays to evaluate cytokines/functional status of cells	Need for large numbers of MHC/peptide tetramers to study multiple antigens Not well established for class II Not yet studied in clinical transplantation
CFSE	Measurement of proliferation by dilution of the dye in dividing cells using flow cytometry	Ability to distinguish dividing/nondividing cells Proliferation of cells followed over time Characterization of the phenotype/activation/death of the dividing cells using multicolor flow cytometric techniques	Requires optimization for human cells Lack of sensitivity Toxicity of the dye Studied only in a single clinical liver transplantation trial
Intracellular staining	Frequency of cytokine-producing T cells by flow cytometry	Measures frequency and phenotype of cells Easy to perform Requires very few cells Multiparametric staining possible	Requires specific activation procedures/inhibitors of intracellular transport Toxic to cells Limited sensitivity Not yet studied in clinical transplantation

<sup>a</sup>CFSE, carboxy-fluorescein diacetate succinimidyl ester; DTH, delayed-type hypersensitivity; ELISPOT, enzyme-linked immunosorbent spot.

El Agroudy AE และคณะ<sup>(9)</sup> ได้ศึกษาหาความสัมพันธ์ระหว่าง mixed lymphocyte culture (MLC) ก่อนการปลูกถ่ายไต กับ transplant outcomes (graft function และ survival) ในผู้ป่วย living donor renal transplant จำนวน 477 ราย โดยแบ่งผู้ป่วยเป็น 2 กลุ่มตาม relative response (RR) คือ กลุ่ม hypo-responder มีค่า relative response < 4 จำนวน 406 ราย และกลุ่ม hyper-responder มีค่า relative response > 4 จำนวน 71 ราย พบว่าในกลุ่ม hyper-responder มีอุบัติการณ์ acute rejection 46.5% เทียบกับ 44.8% ในกลุ่ม hypo-responder และเกิด chronic allograft nephropathy สูงกว่ากลุ่ม hypo-responder อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (27.3% vs 14.5%, p = 0.01) นอกจากนี้พบว่ากลุ่ม hyper-responder มี 1 yr และ 5 yr



graft survival ต่ำกว่ากลุ่ม hypo-responder อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (89% และ 66% vs 94% และ 79%,  $p = 0.03$ ) (รูปที่ 19)



รูปที่ 19 แสดง cumulative graft survival ที่ 1 ปีและ 5 ปี แยกตามกลุ่ม hypo-responder (กราฟเส้นบน) กลุ่ม hyper-responder (กราฟประเส้นล่าง)

Nakagawa และคณะ<sup>(41)</sup> ศึกษาผู้ป่วย living related kidney transplantation จำนวน 13 รายที่มีการทำงานของไตดีภายหลังการปลูกถ่ายไต (long term well functioning allograft) โดยมีระยะเวลาหลังปลูกถ่ายไตเฉลี่ยประมาณ 8 ปี พบว่าทั้ง stimulation index (against donor cell) และ stimulation index (against third party cell) หลังปลูกถ่ายไตมีค่าสูงกว่าก่อนปลูกถ่ายไต แต่เมื่อเปรียบเทียบเฉพาะหลังปลูกถ่ายไตพบว่า stimulation index (against donor cell) หลังปลูกถ่ายไตมีค่าต่ำกว่า stimulation index (against third party cell)

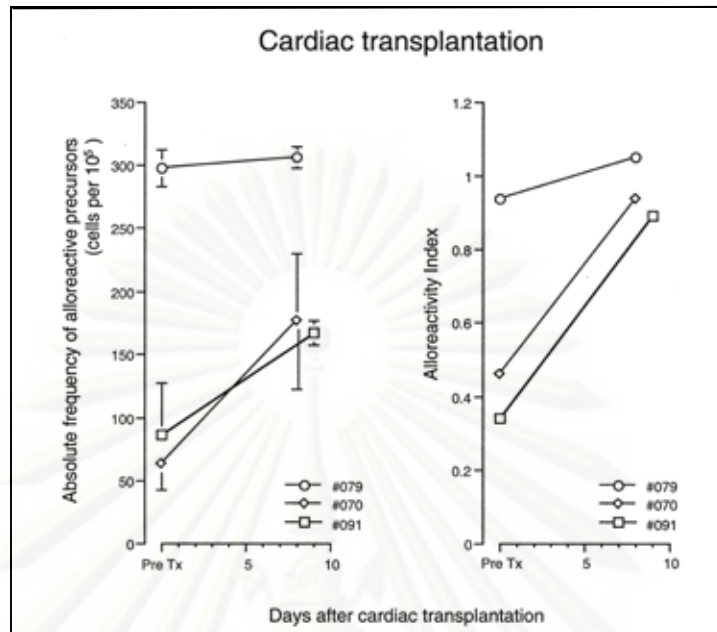
Holman และคณะ<sup>(42)</sup> ศึกษาว่า pre-transplant mixed lymphocyte culture ในยุคที่มี cyclosporine เป็นยากดภูมิคุ้มกันหลักสามารถทำนาย renal allograft outcomes ได้หรือไม่ จากการศึกษาผู้ป่วยทั้งสิ้น 102 รายติดตามนาน 24 เดือน โดยรายที่ผล inhibition rate (IR) > 70 % จัดเป็นกลุ่มที่ sensitive และรายที่ผล Inhibition rate (IR) < 70 % จัดเป็นกลุ่มที่ resistant พบว่ารายที่ผล inhibition rate (IR) < 70 % (resistant) จะมี one year graft survival ที่มากกว่า (100% vs 83%,  $p = 0.01$ ) และเกิด acute rejection น้อยกว่า (25% vs 44%,  $p = 0.08$ )

Kerman และคณะ<sup>(43)</sup>ศึกษา pre-transplant และ post-transplant MLR ในผู้ป่วยปลูกถ่ายไต 115 ราย โดยแบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ hypo-responder (stimulation index <10) และ hyper-responder (stimulation index >10) พบว่าผู้ป่วยทั้งหมดมีผล MLR ก่อนการผ่าตัดเป็น hyper-responder โดยภายหลังการผ่าตัดปลูกถ่ายไตและได้ยากดภูมิคุ้มกันเป็น cyclosporine และ prednisolone พบว่ามีผู้ป่วยร้อยละ 45 ที่ผล MLR กลับมาเป็น hypo-responder และยังพบว่ากลุ่มนี้มี acute rejection ต่ำและ renal allograft survival สูงกว่ากลุ่มที่ยังคงมีผล MLR เป็น hyper-responder เหมือนก่อนการผ่าตัด

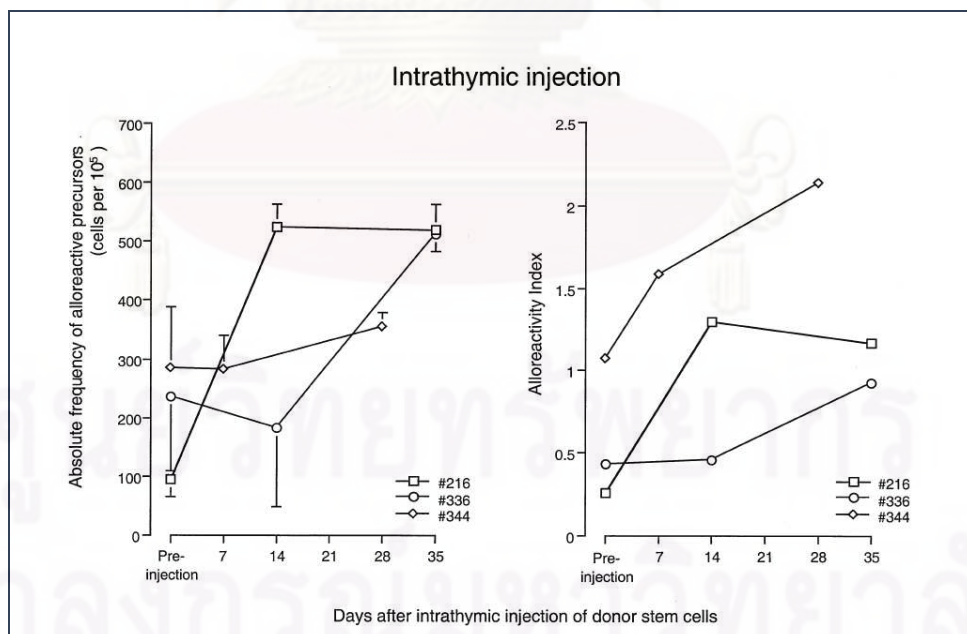
ต่อมา Kerman และคณะ<sup>(44)</sup>ได้ติดตามผู้ป่วย 95 ราย (HLA identical 20 ราย, HLA haploidentical 75 รายเป็นเวลา 10 ปี พบว่าในกลุ่ม HLA identical มีผลทั้ง pre-transplant และ post-transplant MLR เป็น hypo-responder (stimulation index <10) โดยพบว่าเกิด acute rejection 2 ครั้งก่อนหยุด prednisolone และเกิด acute rejection 5 ครั้งหลังหยุด prednisolone มี renal allograft survival คิดเป็นร้อยละ 90 เมื่อติดตามไป 10 ปี สำหรับกลุ่ม haploidentical พบว่าผล pre-transplant MLR เป็น hyper-responder (stimulation index >10) ทั้งหมดและเมื่อติดตามไปพบว่า 35 รายกลับมีผล post-transplant MLR เป็น hypo-responder โดยในกลุ่ม hypo-responder เกิด acute rejection ต่ำกว่ากลุ่ม hyper-responder (32% vs 65%,  $p < 0.05$ ) และกลุ่ม hypo-responder มี renal allograft survival ที่ 10 ปีสูงกว่ากลุ่ม hyper-responder (85% vs 60%,  $p = 0.01$ )

### การศึกษา mixed lymphocyte reaction โดย CFSE assay

ในช่วงแรกมีการศึกษาในลิง Nitta Y และคณะ<sup>(45)</sup>ได้ศึกษา donor specific alloreactive โดยวิธี mixed lymphocyte reaction by CFSE assay ใน nonhuman primates เป็นลิง bamboo (*Papio cynocephalus anubis*) เพศเมียที่ได้ผ่าตัด cardiac transplantation จำนวน 3 ตัว หรือ intrathymic stem cell implantation จำนวน 3 ตัว โดยไม่ได้ยากดภูมิคุ้มกัน การจับคู่ donor และ recipient ต้องไม่มีการตรวจพบ preformed anti-donor specific IgM or IgG antibodies พบว่า ทั้งหมดเกิด rejection และมีการเพิ่มขึ้นของ donor reactive precursor frequencies และ alloreactivity indices ใน cardiac transplantation (รูปที่ 20) เช่นเดียวกับ ภายหลัง intrathymic injection of MHC class II mismatch donor CD3<sup>+</sup> cell (รูปที่ 21) ทางคณะผู้วิจัยจึงเสนอแนะว่า CFSE dye dilution MLR น่าจะสามารถนำมาใช้ monitor cardiac rejection แทน cardiac biopsy ซึ่งเป็น invasive procedure



รูปที่ 20 แสดงการเพิ่มขึ้นของ donor-specific alloreactive precursor frequencies (ซ้าย) alloreactivity indices (ขวา) ในลิง baboons 3 ตัว (#070, #079, #091) ภายหลัง cardiac transplantation โดยไม่ได้ยากดภูมิคุ้มกัน.



รูปที่ 21 แสดงการเพิ่มขึ้นของ donor-specific alloreactive precursor frequencies (ซ้าย) alloreactivity indices (ขวา) หลังฉีด donor stem cell เข้าต่อมไทมัส ในลิง baboons 3 ตัว (#216, #336, #344) ภายหลัง cardiac transplantation โดยไม่ได้ยากดภูมิคุ้มกัน

สำหรับการศึกษา mixed lymphocyte reaction (MLR) โดย CFSE assay. ในมนุษย์นั้นมีการศึกษาเฉพาะในกรณีของการปลูกถ่ายตับและทำภายหลังจากการผ่าตัดไปแล้ว ซึ่ง Tanaka Y และคณะ<sup>(11)</sup> ศึกษาผู้ป่วย 29 รายที่ได้รับการผ่าตัดปลูกถ่ายตับ พบว่ามีผู้ป่วย 12 รายมีการทำงานของตับแย่งลงมากภายใน 6 เดือนหลังผ่าตัดและทั้งหมดได้รับการทำ liver biopsy และ MLR โดย CFSE assay ผลทางพยาธิวิทยารายงานว่าเกิด acute rejection 8 ราย แต่กลับพบว่าผล stimulation index ของ CD8 T cell ที่ได้จาก MLR โดย CFSE assay สูงเพียง 4 ราย ซึ่งภายหลังได้มีการตรวจเพิ่มเติมอย่างละเอียดก็พบว่า ผู้ป่วย 8 ราย ที่วินิจฉัยว่าเกิดการปฏิเสธตับจากผลทางพยาธิวิทยานั้นมีการปฏิเสธตับจริงเพียง 4 รายที่เหลือเกิดจากสาเหตุอื่น เช่น ตับอักเสบจากยา เป็นต้น จึงสรุปได้ว่า MLR โดย CFSE assay สามารถใช้ติดตามการเกิดการปฏิเสธตับได้

โดยสรุป การศึกษาถึงบทบาทของ mixed lymphocyte reaction ต่อ renal allograft outcomes ในอดีตนั้นได้ผลแตกต่างกัน บางการศึกษาพบว่า MLR ที่สูงส่งผลต่อการเกิดการปฏิเสธไตและทำให้การทำงานของไตที่แย่งลงแต่บางการศึกษาก็ไม่พบความสัมพันธ์นี้ (ตารางที่ 4) ทั้งนี้อาจเป็นเพราะวิธีการศึกษา MLR โดย <sup>3</sup>H-thymidine มีผลต่อการแบ่งเซลล์ จนกระทั่งมีการตรวจ MLR โดย CFSE assay ทำให้ผลมีความแม่นยำขึ้นแต่ยังขาดข้อมูลในผู้ป่วยปลูกถ่ายไต จึงเป็นที่มาของการศึกษาในครั้งนี้

#### ตารางที่ 4 แสดงการรวบรวมการศึกษา Mixed Lymphocyte Reaction

Study author	Year	Time	Type of transplantation	Measurement	Outcomes	Signification
Cerilli	1978 <sup>(46)</sup> , 1980 <sup>(47)</sup>	pre	living	SI (cut point 5)	acute rejection	yes
Ringden	1976 <sup>(48)</sup>	pre/ post	living	SI	graft survival	no
Butt	1979 <sup>(49)</sup>	pre	cadaver	SI	acute rejection	yes
Cochrum	1973 <sup>(50)</sup> , 1974 <sup>(51)</sup>	pre	living and cadaver	SI	graft survival	yes
Jone	1976 <sup>(52)</sup>	pre	cadaver	SI, RR	graft survival	no
Cullen	1977 <sup>(8)</sup>	pre	cadaver	SI, RR	acute rejection, graft survival	no



ตารางที่ 4 (ต่อ) แสดงการรวบรวมการศึกษา Mixed Lymphocyte Reaction

Study author	Year	Time	Type of transplantation	Measurement	Outcomes	Signification
Walker	1978 <sup>(53)</sup>	pre	living cadaver	SI, RR, cpm SI, RR, cpm	graft survival graft survival	yes no
Festenstein	1976 <sup>(54)</sup>	pre	cadaver	RR	graft survival	yes
Sachs	1977 <sup>(55)</sup>	pre	cadaver	RR	graft survival	no
El-Agroudy	2004 <sup>(9)</sup>	pre	living	RR	acute rejection graft survival	yes
Agrawal	1998 <sup>(56)</sup>	pre	living	SI	acute rejection graft survival	Yes no
Holman	1999 <sup>(57)</sup>	pre	living and cadaver	IR	acute rejection	yes
Kerman	1997 <sup>(44)</sup>	pre/ post	living	SI (cutpoint 10)	acute rejection graft survival	yes

## บทที่ 3

### วิธีดำเนินการวิจัย

#### 3.1 ประชากร

##### 3.1.1 ประชากรเป้าหมาย

ผู้ป่วยไตวายเรื้อรังระยะสุดท้ายที่ได้รับการปลูกถ่ายไต

##### 3.1.2 ประชากรตัวอย่าง

ผู้ป่วยเรื้อรังระยะสุดท้ายที่ได้รับการปลูกถ่ายไตและมาตรวจติดตามการรักษาที่คลินิกผู้ป่วยหลังการปลูกถ่ายไต

##### 3.1.3 กฎเกณฑ์ในการคัดเลือกเข้ามาศึกษา (inclusion criteria)

- ผู้ป่วยไตวายเรื้อรังที่มีอายุมากกว่า 15 ปี
- ผู้ป่วยกำลังจะได้ผ่าตัดปลูกถ่ายไตภายใน 2 สัปดาห์
- ผู้ป่วยมีเม็ดเลือดขาวมากกว่า  $5,000 \text{ cell/mm}^3$
- ผู้ป่วยที่ยินยอมให้ความร่วมมือในการศึกษา

##### 3.1.4 กฎเกณฑ์ในการตัดออกจากการศึกษา (exclusion criteria)

- ผู้ป่วยที่กำลังได้รับยากดภูมิคุ้มกัน หรือ สเตียรอยด์
- ผล crossmatch เป็นบวก
- ผู้ป่วยที่ไม่สามารถติดตามการรักษาได้

##### 3.1.5 การคำนวณขนาดตัวอย่าง (sample size determination)

การคำนวณขนาดตัวอย่างสำหรับการหาค่าความสัมพันธ์ค่าเดียว (A single correlation)

ได้จากสูตร

$$n = (Z_{\alpha} + Z_{\beta})^2 + 3Z_{F(p)}$$

$Z_F$  = ค่าสถิติ Fisher's Z Transformation (ค่าได้จากตาราง)

$$Z_F = \frac{1}{2} \log_e \frac{1+r}{1-r}$$

$$2 \quad 1-r$$

โดยกำหนดให้  $\alpha$ , %5 = อำนาจการทดสอบเท่ากับ %90 และค่าความสัมพันธ์เท่ากับ 0.8

$$Z_{\alpha} = \text{ค่า } Z \text{ ที่ระดับ } \alpha = 1.645 = (0.05) \text{ (ค่าได้จากตาราง)}$$

$$Z_{\beta} = \text{ค่า } Z \text{ ที่ระดับ } \beta = 1.282 = (0.10) \text{ (ค่าได้จากตาราง)}$$

$$Z_{F(p1)} = \text{ค่า Fisher's Z Transformation ของค่า } r = 0.8$$

$$Z_{F(0.8)} = 1.098$$

$$n = (1.645 + 1.282)^2 + 3(1.098)$$

$$= 8.567 + 3.294$$

$$= 11.861$$

ดังนั้นต้องใช้จำนวนตัวอย่างเท่ากับ 12 คน

### 3.2 การสังเกตและการวัด

#### 3.2.1 ข้อมูลพื้นฐานของผู้ป่วย

ได้แก่ เพศ อายุ สาเหตุของโรคไตวายเรื้อรัง, ชนิดของการปลูกถ่ายไต, ระยะเวลาที่ไตที่ได้รับการปลูกถ่ายขาดเลือด (ischemic time), ชนิดของ immunosuppressive drugs ที่ผู้ป่วยได้รับ หลังจากการปลูกถ่ายไต, จำนวน HLA mismatch, ค่าเปอร์เซ็นต์ panel reactive antibody (%PRA) และการสูบบุหรี่

#### 3.2.2 ข้อมูลที่ศึกษา

ได้แก่ T cell proliferation ที่ได้จาก MLR by CFSE assay โดยอาศัย flow cytometry ก่อนการปลูกถ่ายไต, ค่า serum creatinine ที่ 3 เดือนเพื่อใช้ในการคำนวณ estimate glomerular filtration rate (eGFR), การเกิด delay graft dysfunction (DGF), และการเกิด acute biopsy proven allograft rejection ที่ 3 หลังการปลูกถ่ายไต

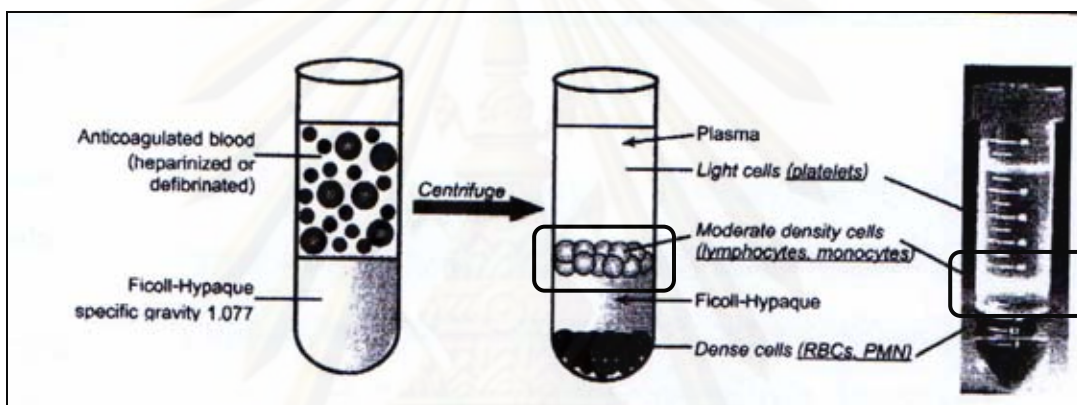
#### 3.2.3 เครื่องมือที่ใช้ในการวัด

**ขั้นตอนการแยกเซลล์ peripheral blood mononuclear cell (PBMC)**

จากเลือดผู้ป่วยและผู้บริจาคไตเพื่อนำมาทดสอบ MLR by CFSE assay

1. ปั่นเลือดผู้ป่วยและผู้บริจาคจากเลือดตั้งต้น 60 ml (ACD blood) ด้วยความเร็ว 2,000 rpm นาน 10 นาที brake 5 นาทีที่อุณหภูมิ 22 °C

2. ดูดชั้น buffy coat มาเจือจางด้วย RPMI 1640 (RPMI 1640+Antibiotics+HEPES 5 ml) ให้ได้อัตราส่วน buffy coat ต่อ RPMI 1640 ประมาณ 1:2 ถึง 1:3 จนได้ปริมาตรรวม 40 ml
3. นำ buffy coat ที่เจือจางด้วย RPMI 1640 แล้วมา overlay บน isoprep 3 ml ที่เทใส่หลอด ปริมาตร 15 ml ไว้แล้วโดยเติมให้ได้ปริมาตรรวมเท่ากับ 13 ml (เติมชั้น buffy coat ที่เจือจาง 10 ml) จากนั้นนำไปปั่น 2,000 rpm นาน 20 นาที brake 0 ที่อุณหภูมิ 22 °C
4. เมื่อครบเวลาแล้วจะได้ชั้นของ PBMC ที่มีลักษณะสีขาวขุ่นซึ่งลอยอยู่บนชั้นของ Isoprep (ดังรูปที่ 22)



รูปที่ 22 แสดงตำแหน่งของชั้นของการแยก PBMC

5. จากนั้นดูดชั้นของ PBMC ที่แยกได้ใส่ลงในหลอดปริมาตร 15 ml แล้ว dilute ด้วย RPMI 1640 ให้ได้ปริมาตรรวมเท่ากับ 13 ml นำไปปั่น 1,200 rpm นาน 10 นาที brake 5 ที่อุณหภูมิ 22°C
6. เมื่อครบเวลาแล้วจะได้ PBMC เกาะติดที่ก้นหลอด ให้เททิ้งส่วนของ supernatant ไปแล้วเติม 10% RPMI 1640 (Antibiotics+HEPES 5mL+FBS 10mL) 10 ml แล้วนับเซลล์ทั้งหมด
7. นำเซลล์ของผู้บริจาคที่ได้ไปฉายแสงที่ความยาวคลื่น 2,500 Gy และ 3,500 Gy  
หมายเหตุ ส่วนเซลล์ของผู้ป่วยไม่ต้องนำไปฉายแสง

### วิธีการเตรียม CFSE dye

(Cell Proliferation using Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester)

Molecular Probe Vybrant CFDA Se cell tracer kit (#V-12883)

1. นำ CFSE stock 10 nM มาทำให้เจือจางโดยใช้ DMSO 90  $\mu$ l จะได้ความเข้มข้นที่ 20,000x
2. จากนั้นแบ่งเก็บไว้สำหรับการย้อมเซลล์ (working concentration) หลอดละ 5  $\mu$ l



3. เก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ  $-20^{\circ}\text{C}$  เก็บได้นาน 6 เดือน

#### วิธีการเตรียม PHA/Ionomycin

เตรียม PHA/I ปริมาณ 3mL ใน 10%RPMI1640

- PHA 15  $\mu\text{l}$
- Ionomycin 120  $\mu\text{l}$
- 10%RPMI1640 3ml

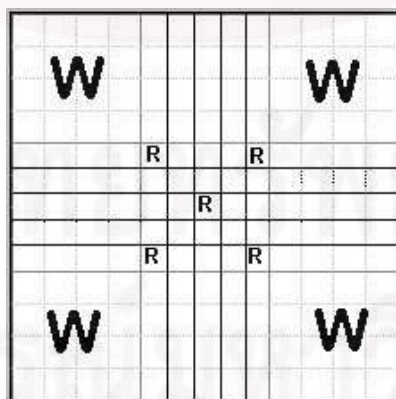
#### ขั้นตอนการย้อมเซลล์ด้วย CFSE และขั้นตอนการทำ mixed lymphocyte culture

1. นำ PBMC ของผู้ป่วยและผู้บริจาค (แยกตามการฉายแสง 2500 cGy และ 3500 cGy) ที่เตรียมไว้ไปปั่นตกด้วยความเร็ว 2,000 rpm, brake 9 นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ  $4^{\circ}\text{C}$
2. เมื่อครบเวลาเท supernatant ทิ้งแล้วเติม 10%RPMI1640 (Antibiotics+HEPES 5 ml+FBS 10 ml) ปริมาตร 2 ml แล้วนับเซลล์ทั้งหมดใน 4 ช่องของ WBC (ดังรูปที่ 23)

วิธีการนับเซลล์ใช้สี trypanblue 190  $\mu\text{l}$  ผสมกับเซลล์ 10  $\mu\text{l}$

สูตรคำนวณเซลล์

$$\text{จำนวนเซลล์ทั้งหมด} = \frac{\text{เซลล์ที่นับได้} \times \text{dilution factor}(20) \times 10^4}{\text{จำนวนช่องที่นับเซลล์}(4)}$$



รูปที่ 23 แสดงตำแหน่งการนับเซลล์ในช่องของ red blood cell บน hemocytometer

3. แบ่งเซลล์ของผู้บริจาคเก็บรอไว้ที่ตู้ incubator อุณหภูมิ 37 °C ที่มี 5%CO<sub>2</sub> จำนวน 2x10<sup>6</sup> เซลล์ใน 10%RPMI 1640 เพื่อนำมาทำปฏิกิริยากับเซลล์ของผู้ป่วยที่ถูกย้อมด้วยสี CFSE
4. นำเซลล์ที่เหลือปั่นตกที่ความเร็ว 1500 rpm เป็นเวลา 10 นาที อุณหภูมิ 4 °C
5. ทิ้ง supernatant จากทำให้เซลล์กระจายออกพร้อมทั้งเติม PBS 5 ml
6. นำเซลล์ไปปั่นล้างที่ความเร็ว 1500 rpm เป็นเวลา 10 นาที อุณหภูมิ 4 °C
7. ทิ้ง supernatant จากทำให้เซลล์กระจายออกพร้อมทั้งเติม PBS ในอัตราส่วน 1:5 ของปริมาณเซลล์ที่เหลือทั้งหมด
8. นำเซลล์ที่ละลายด้วย PBS 1 ml มาย้อมด้วยสี CFSE โดยใช้สี CFSE 10 µl (เซลล์ของผู้ป่วยจะถูกย้อม 3 หลอดและเซลล์ของผู้บริจาคที่ถูกฉายแสงในแต่ละความยาวคลื่นมีเพียงอย่างละ 1 หลอด)
9. นำไป vortex เป็นเวลา 5 นาที เมื่อครบเวลาหยุดปฏิกิริยาด้วย FCS 200 µl
10. นำไปปั่นที่ความเร็ว 3600 rpm เป็นเวลา 5 นาที อุณหภูมิ 4 °C
11. ทิ้ง supernatant จากทำให้เซลล์กระจายออกพร้อมทั้งเติม PBS 1 ml
12. นำไปปั่นล้างที่ความเร็ว 3600 rpm เป็นเวลา 5 นาที อุณหภูมิ 4 °C
13. ทิ้ง supernatant จากทำให้เซลล์กระจายออกพร้อมทั้งเติม 10% RPMI 1640 1 ml
14. นับเซลล์ทั้งหมดหลังจากการย้อม CFSE ใน 4 ช่องของ WBC (ดังรูป 1.3) จากนั้นคำนวณเซลล์ทั้งหมดที่นับได้
15. เซลล์ของผู้ป่วยต้องการ 6x10<sup>6</sup> เซลล์ และเซลล์ของผู้บริจาคที่ถูกฉายแสงในแต่ละความยาวคลื่นต้องการ 2x10<sup>6</sup> เซลล์ ใน 10%RPMI 1640 ปริมาณ 6 ml และ 2 ml ตามลำดับ
16. จากนั้นนำเซลล์ที่เตรียมได้มาลงใน 96 well plate จำนวน 2 plate โดยที่ plate 1 เป็นเซลล์สำหรับ control ของผู้ป่วยและผู้บริจาคทั้งที่ไม่ได้เติมสารกระตุ้น ( PHA/I 100 uL) และที่เติมสารกระตุ้น ส่วน plate ที่ 2 เป็นเซลล์ที่นำมาทำปฏิกิริยา MLR โดยจะใช้เซลล์ของผู้ป่วย 10<sup>5</sup> เซลล์ร่วมกับเซลล์ของผู้บริจาคที่ถูกฉายแสงในแต่ละความยาวคลื่น 10<sup>4</sup> เซลล์และ 10<sup>5</sup> เซลล์เซลล์ตามลำดับ โดยจะถูกเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3, 4 และ 5 วัน ตามลำดับในตู้ incubator ที่อุณหภูมิ 37 °C และมี 5%CO<sub>2</sub>

#### ขั้นตอนการเก็บเซลล์ที่ทำปฏิกิริยา MLR

1. เซลล์ที่เป็นตัว control เก็บโดยใส่หลอดขนาด 2 ml ส่วนเซลล์ที่ทำปฏิกิริยา MLR เก็บโดยใส่ลงใน plate ที่มีลักษณะเป็น V shape

2. นำเซลล์ที่เป็นตัว control และเซลล์ที่ทำปฏิกิริยา MLR ไปปั่นที่ความเร็ว 3600 rpm เป็นเวลา 5 นาที อุณหภูมิ 4 °C และปั่นที่ความเร็ว 2000 rpm เป็นเวลา 5 นาที อุณหภูมิ 4 °C
3. จากนั้นทิ้ง supernatant แล้วเติม PFA 100 µl รววัดด้วยเครื่อง flow cytometry สำหรับเซลล์ที่เป็น control ส่วนเซลล์ที่ทำปฏิกิริยา MLR นำไปย้อม CD4 และ CD8 ปริมาณ 25 (CD4/APC 20 µl, CD8/PERCP 60 µl + PBS 420 µl) นำไป incubate ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที อุณหภูมิ 4 °C
4. เมื่อครบเวลาเติม FACS 150 µl ปั่นที่ความเร็ว 2000 rpm เป็นเวลา 5 นาที อุณหภูมิ 4 °C จากนั้นเติม PFA 100 µl แล้วเปลี่ยนไปใส่หลอดขนาด 2 ml รววัดด้วยเครื่อง Flow cytometry โดยจะแสดงผลเป็น % lymphocyte proliferation และจะนำไปคำนวณค่า stimulation index (SI)

### 3.2.4 การคำนวณ

- Stimulation index (SI) เป็นการคำนวณโดยนำค่า % lymphocyte proliferation ของ recipient lymphocyte ที่กระตุ้นด้วย donor lymphocyte ที่ผ่านการฉายแสงแล้วหารด้วย % lymphocyte proliferation ของ recipient lymphocyte ที่ไม่ได้ใส่ donor lymphocyte ไปกระตุ้น

$$SI = \frac{\% \text{ proliferation of recipient response to donor cell}}{\% \text{ proliferation of unstimulated recipient cell}}$$

- Estimated glomerular filtration rate (eGFR) หน่วย mL/min/1.73 m<sup>2</sup>  
วิธี abbreviated MDRD equation<sup>(12)</sup> (สำหรับค่า creatinine จากวิธี Jaffe assay)

$$= 186 \times (S.Cr)^{-1.154} \times \text{age}^{-0.203} \times 0.742 \text{ (for woman)} \times 1.212 \text{ (if black)}$$

- วิธี re-express MDRD equation<sup>(13)</sup> (สำหรับค่า creatinine จากวิธี Enzymatic assay)

$$= 175 \times (0.95 \times S.Cr)^{-1.154} \times \text{age}^{-0.203} \times 0.742 \text{ (for woman)} \times 1.212 \text{ (if black)}$$

### 3.3 การเก็บรวบรวมข้อมูล

ผู้ทำการวิจัยเป็นผู้เก็บรวบรวมข้อมูล บันทึกข้อมูล และตรวจสอบความสมบูรณ์ของข้อมูล เพื่อให้ได้ครบถ้วนตามจำนวนที่ต้องการและนำมาวิเคราะห์ข้อมูลต่อไป

### 3.4 การวิเคราะห์ข้อมูล

ทดสอบความแตกต่างของ MLR by CFSE assay ของผู้ป่วยโดยแบ่งผู้ป่วยเป็นกลุ่มอาศัยตัวแปรดังนี้

- อายุ
- ชนิดของการทำ transplantation (cadaveric donor or living related donor)
- จำนวน mismatch
- ค่า PRA (Panel Reactive Antibody)
- การสูบบุหรี่
- ค่า serum creatinine ที่ 3 เดือนหลังการปลูกถ่ายไต
- estimate glomerular filtration rate จาก abbreviated MDRD equation

ใช้ SPSS version 13 ในการวิเคราะห์ข้อมูล โดยใช้ Non-parametric test (two-independent-sample test) ในข้อมูลที่เป็น continuous data และใช้ Spearman's Rho ทดสอบความสัมพันธ์ของตัวแปรต่างๆ



## บทที่ 4

### ผลการวิจัย

#### 4.1 ข้อมูลพื้นฐาน

มีผู้ป่วยที่ได้รับการปลูกถ่ายไตเข้าร่วมการศึกษาทั้งหมด 11 ราย เป็นผู้ป่วยเพศชาย 8 ราย เพศหญิง 3 ราย มีอายุระหว่าง 21 ปี ถึง 61 ปี อายุเฉลี่ย (mean  $\pm$  SD)  $48.7 \pm 14.3$  ปี แบ่งเป็นผู้ป่วย living related transplantation จำนวน 8 ราย ผู้ป่วย cadaveric transplantation จำนวน 3 ราย ผู้บริจาคไตมีอายุระหว่าง 22 ปี ถึง 61 ปี อายุเฉลี่ย (mean  $\pm$  SD)  $40.9 \pm 12.8$  ปี มีระยะเวลาขาดเลือด (ischemic time) ใน living related transplantation เฉลี่ย (mean  $\pm$  SD)  $52.5 \pm 20.1$  นาที และระยะเวลาขาดเลือดใน cadaveric transplantation เฉลี่ย (mean  $\pm$  SD)  $1,142.3 \pm 246.5$  นาที โดยมี HLA mismatch ตั้งแต่ 0 ถึง 4 เฉลี่ย (mean  $\pm$  SD)  $2.4 \pm 1.2$  มีค่า panel reactive antibodies (PRA) ตั้งแต่ 0 ถึง 98 เฉลี่ย (mean  $\pm$  SD)  $33.4 \pm 41.4$  % มีผู้ป่วย 3 รายที่สูบบุหรี่ สำหรับสาเหตุของ ESRD และยากดภูมิคุ้มกันที่ผู้ป่วยได้รับได้แสดงไว้ในตารางที่ 5

#### ตารางที่ 5 แสดงข้อมูลพื้นฐานผู้ป่วยปลูกถ่ายไตที่เข้าร่วมการศึกษา

Characteristics	Values
N	11
Sex	
• Male (n)	8
• Female (n)	3
Age (yr)	
• Donor (mean $\pm$ SD)	$40.9 \pm 12.8$
• Recipient (mean $\pm$ SD)	$48.7 \pm 14.3$
Type of renal transplantation	
• Cadaveric (n)	3
• Living (n)	8

ตารางที่ 5 (ต่อ) แสดงข้อมูลพื้นฐานผู้ป่วยปลูกถ่ายไตที่เข้าร่วมการศึกษา

Characteristics	Values
Ischemic time (min)	
• Cadaveric (mean±SD)	1,142.3 ± 246.5
• Living (mean±SD)	52.5 ± 20.1
HLA mismatch (n)	
• 0	1
• 1	2
• 2	1
• 3	6
• 4	1
HLA mismatch (mean ± SD)	2.3 ± 1.2
Cause of ESRD <sup>1</sup> (n)	
• Presumed chronic glomerulonephritis	4
• Diabetic nephropathy	2
• ADPKD <sup>2</sup>	1
• First renal allograft failure	1
• Unknown	3
Smoking (n)	3
Immunosuppressive regimen (N)	
• Neoral, azathioprine, prednisolone	3
• Rapamune, neoral, prednisolone	1
• Tacrolimus, cellcept, prednisolone	3
• Tacrolimus, myfortic, prednisolone	4
PRA <sup>3</sup> (%) (mean ± SD)	33.4 ± 41.4

1. ESRD หมายถึง end stage renal disease

2. ADPKD หมายถึง autosomal dominant polycystic kidney disease

3. PRA หมายถึงค่า Panel Reaction Activity (%)

## 4.2 ผลลัพธ์ของการปลูกถ่ายไต

ผลลัพธ์ของการปลูกถ่ายไตแสดงไว้ดังตารางที่ 6 จากจำนวนผู้ผ่าตัดปลูกถ่ายไตที่เข้าร่วมการศึกษา 11 ราย เกิด delayed graft function จำเป็นต้อง hemodialysis ภายใน 7 วันหลังผ่าตัดทั้งสิ้น 3 ราย โดยในจำนวนนี้มีผู้ป่วย 2 รายเกิด acute rejection พบว่า 1 ใน 2 รายที่เกิด acute rejection จำเป็นต้องทำ allograft nephrectomy และผลทางพยาธิวิทยาให้การวินิจฉัยว่าเป็น acute humoral mediated rejection ทั้งสองราย

เนื่องจากมีผู้ป่วย 1 รายที่ต้อง nephrectomy ทำให้เหลือผู้ป่วยเพียง 10 รายที่สามารถติดตามครบ 3 เดือน โดยพบว่าค่า creatinine เฉลี่ย (mean  $\pm$  SD)  $1.3 \pm 0.4$  mg% และค่า estimated glomerular filtration rate (mean  $\pm$  SD)  $55.3 \pm 16.1$  mm/min

### ตารางที่ 6 แสดงผลลัพธ์หลังการปลูกถ่ายไต

Renal allograft outcomes	Value
Estimate glomerular filtration rate (ml/min/1.73 m <sup>2</sup> ) (mean $\pm$ SD)	55.3 $\pm$ 16.1
Creatinine (mg%) (mean $\pm$ SD)	1.3 $\pm$ 0.4
Biopsy proven acute rejection (n)	2
Delayed graft function (n)	3

## 4.3 ผล proliferation of T lymphocyte of mixed lymphocyte reaction by CFSE assay

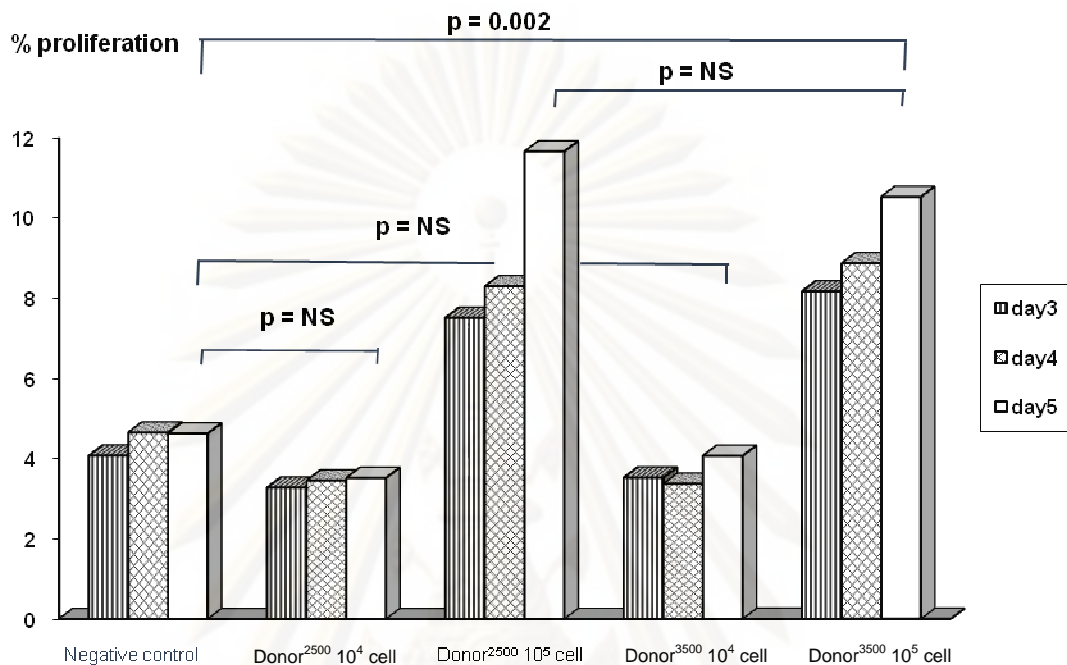
ข้อมูล proliferation (%) ได้จากผู้ป่วยทั้ง 11 ราย พบว่าในกลุ่ม negative control ซึ่งประกอบด้วยเซลล์ของ recipient เพียงอย่างเดียว ( $10^5$  cell) โดยไม่มีตัวกระตุ้นหลังจาก incubation นาน 3,4 และ 5 วันตามกำหนดและกลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วย donor cell ที่ถูกฉายแสง 2500 cGy และ 3500 cGy นอกจากนี้ยังแบ่งตามปริมาณของ donor cell ที่ใช้กระตุ้นได้อีก 2 กลุ่มย่อย คือ donor cell  $10^4$  และ  $10^5$  cell โดยแสดงผล % proliferation ไว้ดังตารางที่ 7

ตารางที่ 7 แสดงค่า proliferation (%) โดยแบ่งตามการฉายแสง, จำนวน donor cell และจำนวนวันที่บ่มเพาะ

Group	Mean proliferation (%)	SD
Negative control day 3 (recipient)	4.08	2.37
Negative control day 4 (recipient)	4.66	3.47
Negative control day 5 (recipient)	4.63	3.73
Recipient+donor <sup>2500</sup> 10 <sup>4</sup> cell day 3	3.28	2.36
Recipient+donor <sup>2500</sup> 10 <sup>4</sup> cell day 4	3.45	2.01
Recipient+donor <sup>2500</sup> 10 <sup>4</sup> cell day 5	3.52	3.44
Recipient+donor <sup>2500</sup> 10 <sup>5</sup> cell day 3	4.08	5.98
Recipient+donor <sup>2500</sup> 10 <sup>5</sup> cell day 4	8.30	3.76
Recipient+donor <sup>2500</sup> 10 <sup>5</sup> cell day 5	11.67	9.41
Recipient+donor <sup>3500</sup> 10 <sup>4</sup> cell day 3	3.53	2.21
Recipient+donor <sup>3500</sup> 10 <sup>4</sup> cell day 4	3.37	2.03
Recipient+donor <sup>3500</sup> 10 <sup>4</sup> cell day 5	4.07	4.89
Recipient+donor <sup>3500</sup> 10 <sup>5</sup> cell day 3	8.18	6.57
Recipient+donor <sup>3500</sup> 10 <sup>5</sup> cell day 4	8.84	4.75
Recipient+donor <sup>3500</sup> 10 <sup>5</sup> cell day 5	10.54	9.01

จากผลการศึกษาที่ได้พบว่าระยะเวลาที่ culture มีผลต่อปริมาณการแบ่งเซลล์โดยวันที่ 5 เป็นวันที่มีการแบ่งตัวมากที่สุด นอกจากนี้ปริมาณ donor cell ที่ใช้ก็มีผลต่อการกระตุ้นการแบ่งตัวของ recipient lymphocyte โดย donor cell 10<sup>5</sup> cell จะกระตุ้นให้เกิดการแบ่งเซลล์มากกว่า negative control อย่างมีนัยสำคัญ (p=0.02) แต่หากใช้ donor cell 10<sup>4</sup> cell พบว่าการแบ่งเซลล์ไม่แตกต่างจาก negative control ส่วนการฉายแสง donor ด้วย 2500 cGy และ 3500 cGy นั้น ไม่พบความแตกต่างของการกระตุ้นการแบ่งเซลล์ ดังรูปที่ 24





รูปที่ 24 แสดงค่า proliferation (%) โดยแบ่งตามการฉายแสง, จำนวน donor cell และจำนวนวันที่บ่มเพาะ

#### 4.4 ผล stimulation index (SI) of mixed lymphocyte reaction by CFSE assay

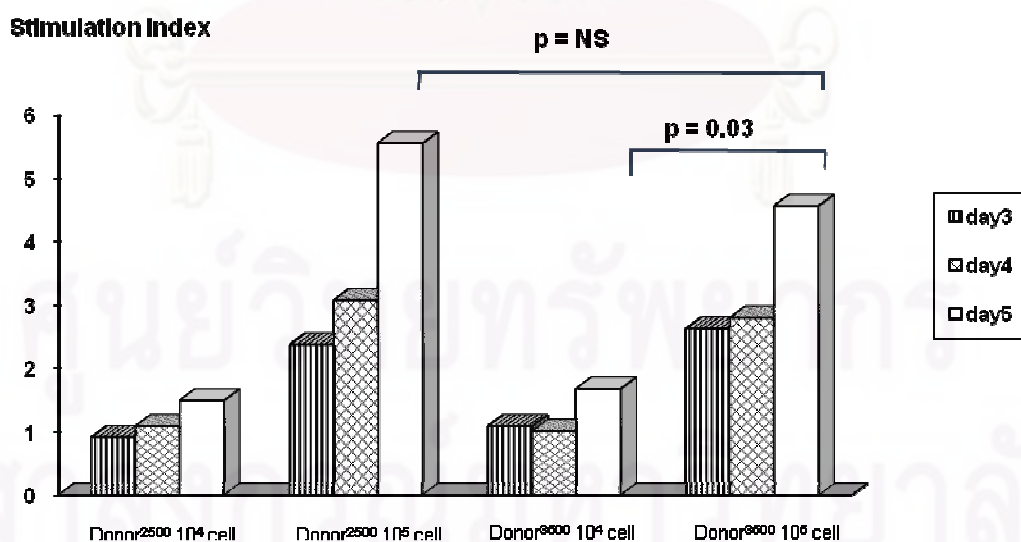
ค่า stimulation index ที่ได้จากกลุ่มต่างๆ โดยแบ่งตามการฉายแสง, จำนวน donor cell และจำนวนวันที่บ่มเพาะ แสดงไว้ดังตารางที่ 8 พบว่าค่า stimulation index ของวันที่ 5 มีค่าสูงสุด

ตารางที่ 8 แสดงค่า stimulation index โดยแบ่งตามการฉายแสง, จำนวน donor cell และจำนวนวันที่บ่มเพาะ

Group	Stimulation index	SD
Recipient+donor <sup>2500</sup> 10 <sup>4</sup> cell day 3	0.92	0.46
Recipient+donor <sup>2500</sup> 10 <sup>4</sup> cell day 4	1.09	0.89
Recipient+donor <sup>2500</sup> 10 <sup>4</sup> cell day 5	1.49	1.63

ตารางที่ 8 (ต่อ) แสดงค่า stimulation index โดยแบ่งตามการฉายแสง, จำนวน donor cell และจำนวนวันที่บ่มเพาะ

Group	Stimulation index	SD
Recipient+donor <sup>2500</sup> 10 <sup>5</sup> cell day 3	2.38	1.80
Recipient+donor <sup>2500</sup> 10 <sup>5</sup> cell day 4	3.08	2.59
Recipient+donor <sup>2500</sup> 10 <sup>5</sup> cell day 5	5.56	6.48
Recipient+donor <sup>3500</sup> 10 <sup>4</sup> cell day 3	1.09	0.67
Recipient+donor <sup>3500</sup> 10 <sup>4</sup> cell day 4	1.01	0.81
Recipient+donor <sup>3500</sup> 10 <sup>4</sup> cell day 5	1.68	2.27
Recipient+donor <sup>3500</sup> 10 <sup>5</sup> cell day 3	2.63	2.39
Recipient+donor <sup>3500</sup> 10 <sup>5</sup> cell day 4	2.80	2.03
Recipient+donor <sup>3500</sup> 10 <sup>5</sup> cell day 5	4.56	5.70



รูปที่ 25 แสดงค่า stimulation index โดยแบ่งตามการฉายแสง, จำนวน donor cell และจำนวนวันที่บ่มเพาะ

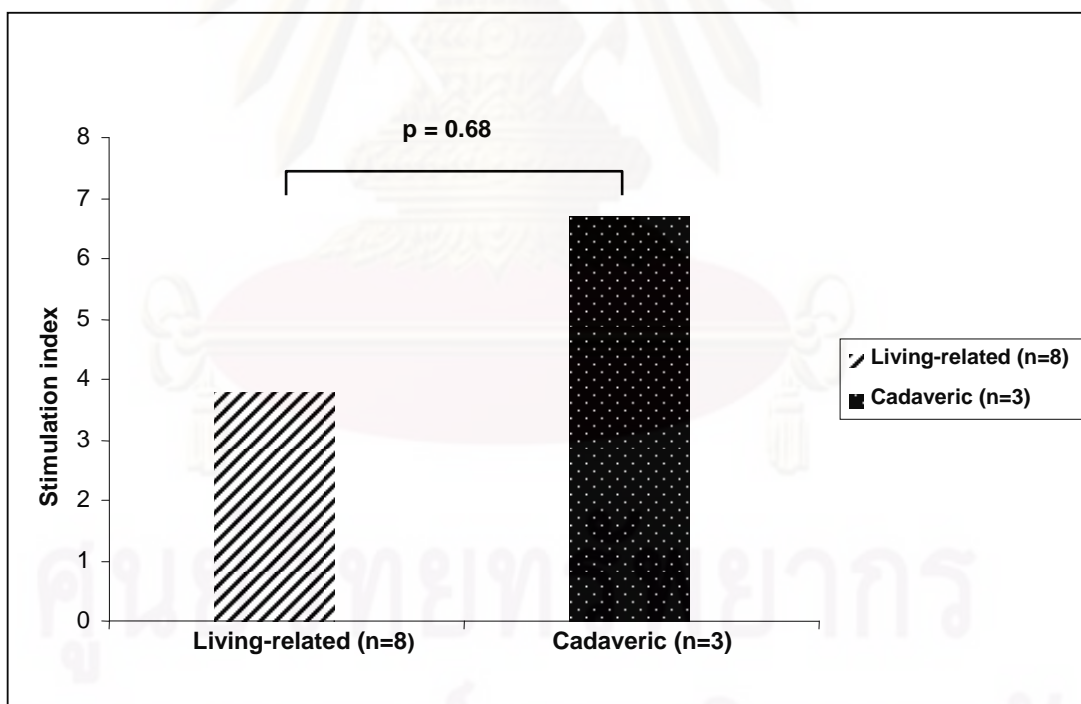
โดยที่ไม่มีมีความแตกต่างระหว่างปริมาณการฉายแสงแต่การใช้ donor  $10^5$  cell มีค่า stimulation index สูงกว่าการใช้ donor  $10^4$  cell อย่างมีนัยสำคัญ ( $p = 0.03$ ) (รูปที่ 25)

ดังนั้นการศึกษานี้จึงอาศัยข้อมูลของการบ่มเพาะที่ 5 วัน โดยใช้ donor  $10^5$  cell และถูกฉายแสง 3500 Gy มาทำการวิเคราะห์ผล

#### 4.5 ผลการเปรียบเทียบระหว่างค่า stimulation index กับตัวแปรต่างๆ

##### 4.5.1 เปรียบเทียบระหว่างค่า stimulation index (SI) กับชนิดของการปลูกถ่ายไต

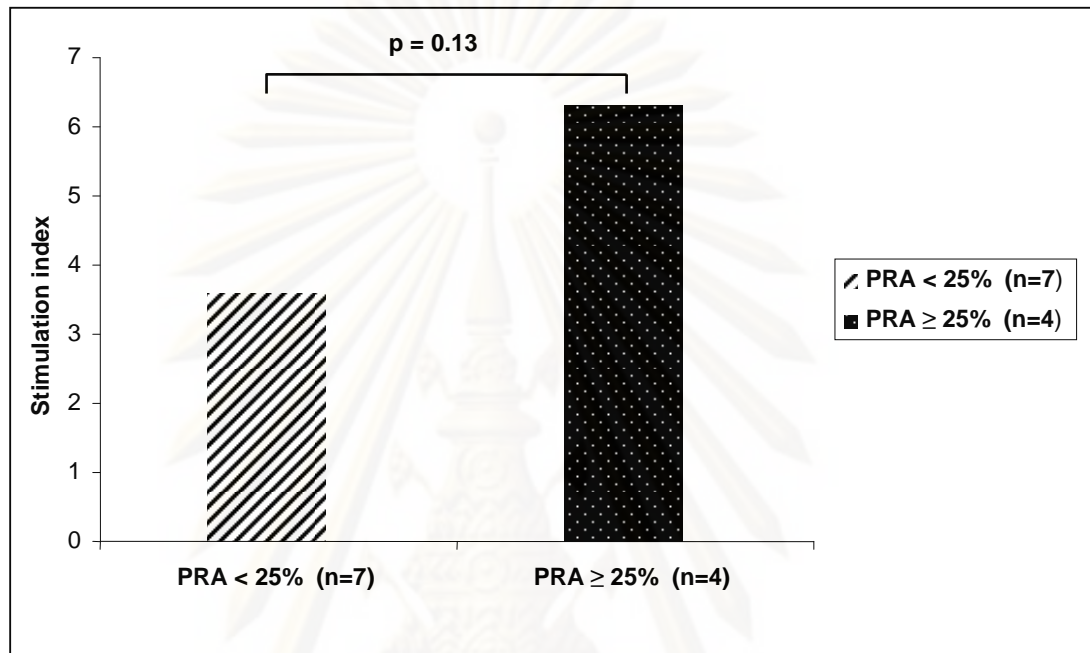
พบว่าผู้ป่วยที่ได้รับการผ่าตัดปลูกถ่ายไตจากผู้บริจาคสมองตาย (cadaveric renal transplantation) ( $n=3$ ) มีแนวโน้มของค่า SI สูงกว่าผู้ป่วยที่ได้รับการผ่าตัดปลูกถ่ายไตจากผู้บริจาคมีชีวิต (living-related renal transplantation) ( $n=8$ ) แต่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $6.69 \pm 8.05$  vs  $3.77 \pm 5.02$ ,  $p = 0.68$ ) (รูปที่ 26)



รูปที่ 26 แสดงค่า stimulation index แยกตามชนิดของการปลูกถ่ายไต

##### 4.5.2 เปรียบเทียบระหว่างค่า stimulation index (SI) กับ panel reactive antibody (PRA)

พบว่าผู้ป่วยที่ได้รับการผ่าตัดปลูกถ่ายไตที่มีค่า PRA  $\geq 25\%$  (n=4) มีแนวโน้มของค่า SI สูงกว่าผู้ป่วยที่มีค่า PRA  $< 25\%$  (n=7) แต่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $6.31 \pm 6.35$  vs  $3.57 \pm 5.54$ ,  $p = 0.13$ ) (รูปที่ 27)



รูปที่ 27 แสดงค่า stimulation index แยกตามค่า panel reactive antibody (PRA)

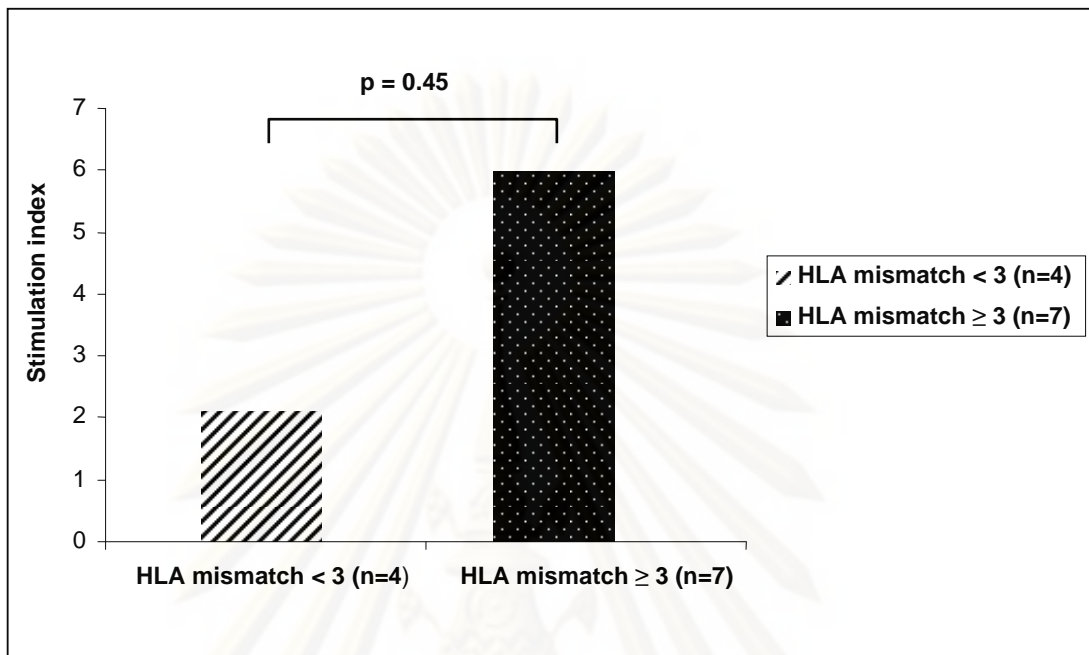
#### 4.5.3 เปรียบเทียบระหว่างค่า stimulation index (SI) กับ HLA mismatch

พบว่าผู้ป่วยที่ได้รับการผ่าตัดปลูกถ่ายไตที่มีค่า HLA mismatch  $\geq 3$  (n=7) มีแนวโน้มของค่า SI สูงกว่าผู้ป่วยที่มีค่า HLA mismatch  $< 3$  (n=4) แต่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $5.97 \pm 6.83$  vs  $2.10 \pm 1.50$ ,  $p = 0.45$ ) (รูปที่ 28)

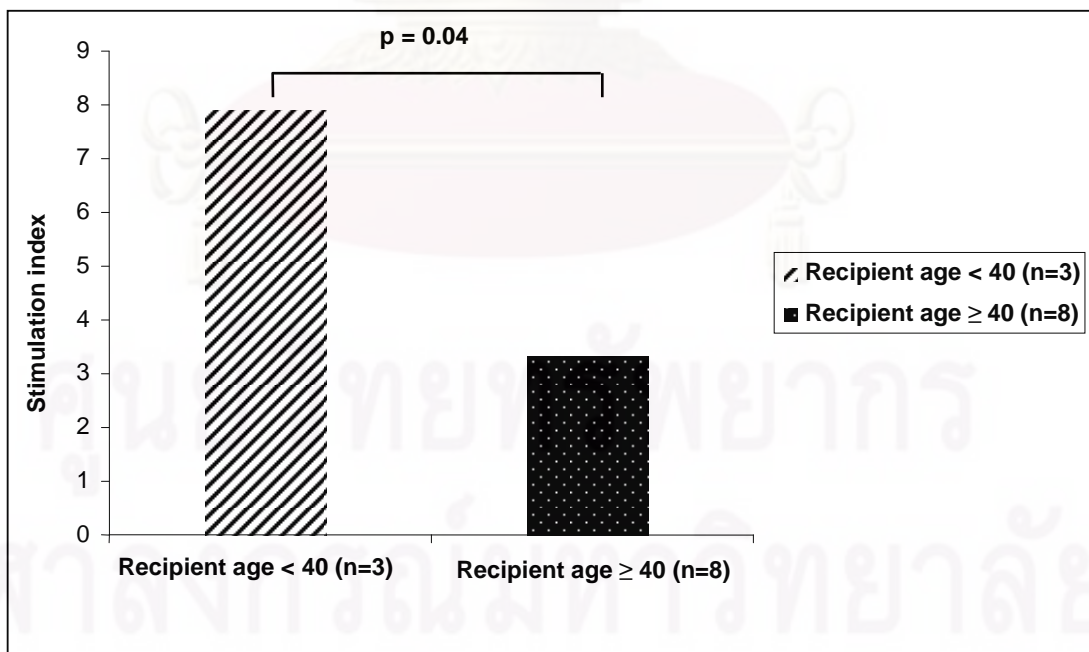
#### 4.5.4 เปรียบเทียบระหว่างค่า stimulation index (SI) กับ recipient age

พบว่าผู้ป่วยที่ได้รับการผ่าตัดปลูกถ่ายไตที่มีอายุ  $< 40$  ปี (n=3) มีแนวโน้มของค่า SI สูงกว่าผู้ป่วยที่มีอายุ  $\geq 40$  ปี (n=8) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $7.89 \pm 6.87$  vs  $3.32 \pm 5.14$ ,  $p = 0.04$ ) (รูปที่ 29)





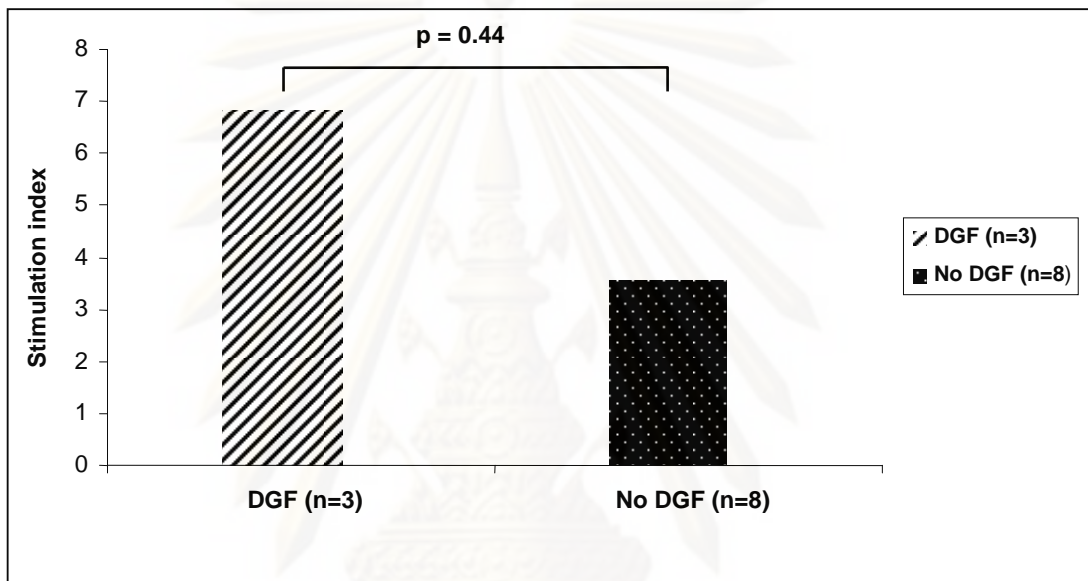
รูปที่ 28 แสดงค่า stimulation index แยกตามค่า HLA mismatch



รูปที่ 29 แสดงค่า stimulation index แยกตาม recipient age

#### 4.5.5 เปรียบเทียบระหว่างค่า stimulation index (SI) กับ delayed graft function (DGF)

พบว่าผู้ป่วยที่เกิด delayed graft function หลังการผ่าตัดปลูกถ่ายไต (n=3) มีแนวโน้มของค่า SI สูงกว่าผู้ป่วยที่ไม่เกิด delayed graft function (n=8) แต่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $6.82 \pm 7.97$  vs  $3.71 \pm 5.01$ ,  $p = 0.44$ ) (รูปที่ 30)



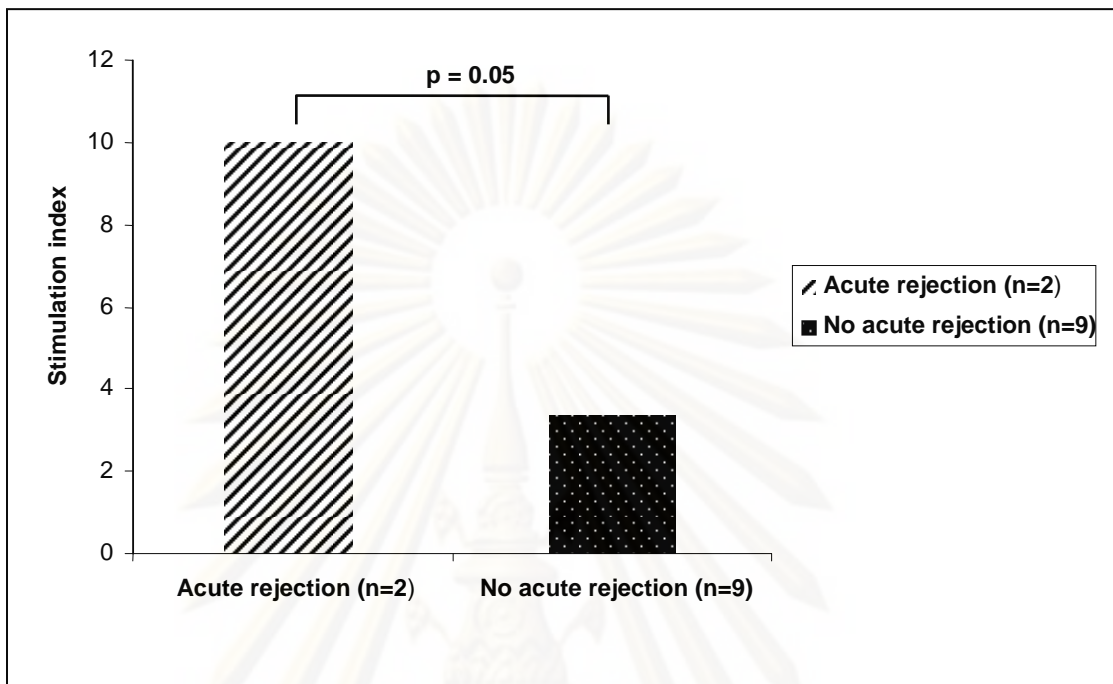
รูปที่ 30 แสดงค่า stimulation index แยกตามการเกิด delayed graft function (DGF)

#### 4.5.6 เปรียบเทียบระหว่างค่า stimulation index (SI) กับ acute rejection

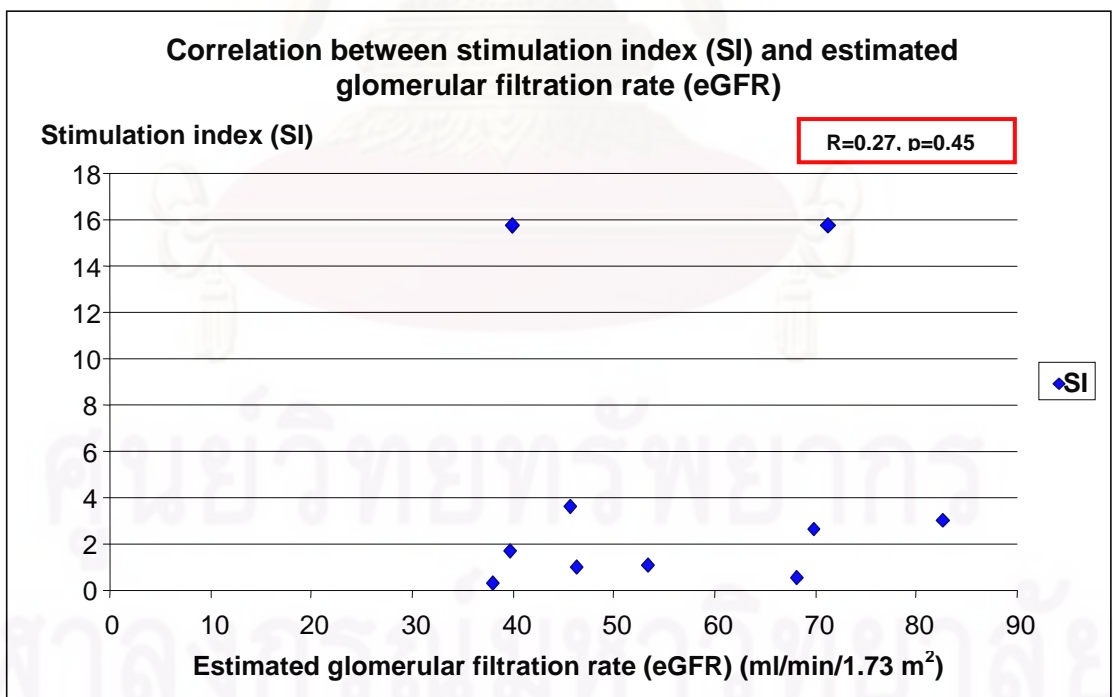
พบว่าผู้ป่วยที่เกิด acute rejection (n=2) มีค่า SI สูงกว่าผู้ป่วยที่ไม่เกิด acute rejection (n=9) ( $9.99 \pm 8.23$  vs  $3.36 \pm 4.8$ ,  $p = 0.05$ ) (รูปที่ 31)

#### 4.6 ความสัมพันธ์ระหว่าง stimulation index (SI) และ estimated glomerular filtration rate (eGFR)

เนื่องจากมีผู้ป่วย 1 รายที่เกิด acute rejection แล้วต้องผ่าตัดไตออก (renal allograft nephrectomy) ทำให้มีข้อมูล eGFR ที่ 3 เดือนเพียง 10 ราย และจากการหาค่าสัมพันธ์ระหว่าง SI และ eGFR โดย Spearman's correlation พบว่าไม่สามารถหาความสัมพันธ์ระหว่าง SI และ eGFR ( $r = 0.27$ ,  $p = 0.45$ ) (รูปที่ 32)



รูปที่ 31 แสดงค่า stimulation index แยกตามการเกิด acute rejection



รูปที่ 32 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง stimulation index และ estimated glomerular filtration rate

## บทที่ 5

### สรุปผลการวิจัย อภิปรายผลและข้อเสนอแนะ

#### สรุปผลการวิจัย

1. ผู้ป่วยที่ได้รับการปลูกถ่ายไตที่มีอายุน้อยกว่า 40 ปีจะมีค่า stimulation index ที่ได้จาก pre-transplant mixed lymphocyte reaction โดย CFSE assay สูงกว่าผู้ป่วยที่มีอายุมากกว่า 40 ปี อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p = 0.04$ )
2. ผู้ป่วยที่ได้รับการปลูกถ่ายไตที่เกิดการปฏิเสธไตแบบเฉียบพลันมีแนวโน้มจะมีค่า stimulation index ที่ได้จาก pre-transplant mixed lymphocyte reaction โดย CFSE assay สูงกว่าผู้ป่วยที่ไม่เกิดการปฏิเสธไตแบบเฉียบพลัน ( $p = 0.05$ )
3. การศึกษานี้ยังไม่สามารถระบุความสัมพันธ์ระหว่าง stimulation index ที่ได้จาก pre-transplant mixed lymphocyte reaction โดย CFSE assay กับ estimated glomerular filtration rate ที่ 3 เดือน

#### อภิปรายผลการวิจัย

เนื่องจากการศึกษานี้เป็น pilot study ขบวนการทำ mixed lymphocyte reaction โดย CFSE assay เพื่อประเมินการแบ่งตัวของ T lymphocyte ให้ผลสอดคล้องกับการศึกษา<sup>(30;31)</sup> ก่อนหน้านี้ที่พบว่าการแบ่งตัวจะเริ่มตั้งแต่ 24-48 ชั่วโมงแรกและจะพบการแบ่งตัวมากที่สุดประมาณวันที่ 5-6 ของการบ่มเพาะหลังจากนั้นการแบ่งตัวจะค่อยๆลดลง ในส่วนของปริมาณรังสีที่ฉาย donor cell พบว่าทั้ง 2500 cGy และ 3500 cGy ให้ผลให้ไม่แตกต่างกัน ด้านสัดส่วนของ donor cell ต่อ recipient cell (responder) พบว่ามีความสำคัญต่อการแบ่งตัวของ recipient โดยสัดส่วนสัดส่วนของ donor cell ต่อ recipient cell (responder) เท่ากับ 1:1 จะเกิดการกระตุ้นให้ recipient cell มีการแบ่งตัวสูงกว่ากลุ่มควบคุม (unstimulate recipient cell) และสูงกว่าสัดส่วนสัดส่วนของ donor cell ต่อ recipient cell (responder) เท่ากับ 1:10 ซึ่งใกล้เคียงกับการศึกษาของ Tanaka<sup>(11)</sup> ที่ใช้ปริมาณรังสี 3000 cGy ฉายแสง donor cell เพื่อให้หยุดการแบ่งตัวและใช้สัดส่วน donor cell ต่อ recipient cell (responder) เท่ากับ 1:1



การศึกษานี้พบว่าผู้ป่วยที่มีอายุน้อยกว่า 40 ปีมีค่า stimulation index สูงกว่าผู้ป่วยที่มีอายุมากกว่า 40 ปี ซึ่งอายุเป็นปัจจัยหนึ่งที่สามารถทำนายได้ว่าการตอบสนองของภูมิคุ้มกันต่อสิ่งแปลกปลอมโดยอายุน้อยจะมีการตอบสนองของภูมิคุ้มกันที่สูงกว่า

การศึกษานี้พบว่าค่า stimulation index ของผู้ป่วยที่เกิดการปฏิเสธไตมีค่าสูงกว่าผู้ป่วยที่ไม่เกิดการปฏิเสธไต ( $p = 0.05$ ) ซึ่งถือว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เนื่องจากการศึกษานี้เกิดปฏิเสธไตเพียง 2 รายคิดเป็นร้อยละ 18 จึงอาจทำให้ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ หากมีจำนวนผู้ป่วยที่ศึกษามากขึ้นและมีจำนวนผู้ป่วยที่เกิดการปฏิเสธไตเพิ่มขึ้นก็อาจจะแสดงให้เห็นความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติได้ และจากข้อมูลนี้ทำได้อีกข้อมูลว่า pre-transplant MLR โดย CFSE assay มีความสัมพันธ์กับการเกิดการปฏิเสธไต ซึ่งให้ผลของความสัมพันธ์เหมือนกับ post-transplant MLR โดย CFSE assay ที่ทำการศึกษาในผู้ป่วยปลูกถ่ายตับ<sup>(11)</sup>

นอกจากนี้ยังพบว่าค่า stimulation index ในผู้ป่วยที่มี PRA  $\geq 25\%$ , HLA mismatch  $\geq 3$  และเกิด delayed graft function มีแนวโน้มสูงกว่าผู้ป่วยที่มี PRA  $< 25\%$ , HLA mismatch  $< 3$  และไม่เกิด delayed graft function แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทั้งนี้อาจต้องอาศัยการศึกษาที่มีผู้ป่วยจำนวนมากกว่านี้

สุดท้ายการศึกษานี้พบว่าค่า stimulation index ที่ได้จาก pre-transplant MLR โดย CFSE assay ไม่มีความสัมพันธ์กับค่า estimated glomerular filtration rate ที่ 3 เดือนเมื่อนำมาหาค่า correlation (Spearman' s Rho) นั้นเป็นเพราะว่าปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของไตมีมากมายที่ไม่สามารถควบคุมได้ เช่น ชนิดของการปลูกถ่ายไต ชนิดและระดับของยากดภูมิคุ้มกัน อายุของผู้บริจาค การติดเชื้อทางเดินปัสสาวะ ซึ่งหากมีการศึกษาต่อและมีจำนวนตัวอย่างมากพอที่จะวิเคราะห์ข้อมูลแบบ multivariate analysis เพื่อควบคุมแต่ละปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของไต อาจทำให้เห็นความสัมพันธ์ระหว่าง stimulation index กับค่า estimated glomerular filtration rate ได้

### ข้อเสนอแนะ

1. เนื่องจากการศึกษาวิจัยในครั้งนี้มีจำนวนตัวอย่างน้อยจึงอาจทำให้ไม่เห็นความแตกต่างของค่า stimulation index ที่ได้จาก pre-transplant mixed lymphocyte reaction โดย CFSE assay ในกลุ่มตัวแปรต่างๆที่นำมาเปรียบเทียบ ดังนั้นหากมีการเก็บตัวอย่างเพิ่มขึ้นอาจจะทำให้เห็นความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติได้

2. การนำ pre-transplant mixed lymphocyte reaction โดย CFSE assay มาใช้ร่วมกับการประเมินความเสี่ยงด้านภูมิคุ้มกันเดิมที่ทำกันอยู่ เช่น crossmatchng, PRA และ DSA เพื่อเป็นการเติมเต็มให้การประเมินความเสี่ยงด้านภูมิคุ้มกันก่อนการปลูกถ่ายไตสมบูรณ์มากขึ้น อันจะนำไปสู่การเกิดการปฏิเสธไตที่ลดลงและอายุขัยของไตที่ยาวนานขึ้น
3. ทางคณะผู้วิจัยวางแผนที่จะศึกษา mixed lymphocyte reaction โดย CFSE assay ในผู้ป่วยที่ได้รับการผ่าตัดปลูกถ่ายไตแล้ว เพื่อศึกษาหาความสัมพันธ์ของ post-transplant mixed lymphocyte reaction โดย CFSE assay กับการทำงานของไต ณ ขณะนั้นอันจะนำไปสู่การวางแผนปรับยากดภูมิคุ้มกันต่อไป



ศูนย์วิทยุทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## รายการอ้างอิง

- (1) Takemoto SK, Terasaki PI, Gjertson DW, Cecka JM. Twelve years' experience with national sharing of HLA-matched cadaveric kidneys for transplantation. **N Engl J Med** 2000; 343(15):1078-84.
- (2) Terasaki PI. The HLA-matching effect in different cohorts of kidney transplant recipients. **Clin Transpl** 2000;497-514.
- (3) Kawai T, Cosimi AB, Spitzer TR, Tolloff-Rubin N, Suthanthiran M, Saidman SL et al. HLA-mismatched renal transplantation without maintenance immunosuppression. **N Engl J Med** 2008; 358(4):353-61.
- (4) van der Mast BJ, van Besouw NM, de Kuiper P, Vaessen LM, Gregoor PJ, IJzermans JN et al. Pretransplant donor-specific helper T cell reactivity as a tool for tailoring the individual need for immunosuppression. **Transplantation** 2001; 72(5):873-80.
- (5) Pascual M, Theruvath T, Kawai T, Tolloff-Rubin N, Cosimi AB. Strategies to improve long-term outcomes after renal transplantation. **N Engl J Med** 2002; 346(8):580-90.
- (6) Iacomini J, Sayegh MH. Measuring T cell alloreactivity to predict kidney transplant outcomes: are we there yet? **J Am Soc Nephrol** 2006; 17(2):328-30.
- (7) Bach JF, Debray-Sachs M, Crosnier J, Kreis H, Dormont J. Correlation between mixed lymphocyte culture performed before renal transplantation and kidney function. **Clin Exp Immunol** 1970; 6(6):821-7.
- (8) Cullen PR, Lester S, Rouch J, Morris PJ. Mixed lymphocyte reaction and graft survival in forty cadaveric renal transplants. **Clin Exp Immunol** 1977; 28(2):218-22.
- (9) El Agroudy AE, Ismail AM, El Chenawy FA, Shehab El-Din AB, Ghoneim MA. Pretransplant mixed lymphocyte culture still has an impact on graft survival. **Am J Nephrol** 2004; 24(3):296-300.

- (10) Song HK, Noorchashm H, Lieu YK, Rostami S, Greeley SA, Barker CF et al. In vivo MLR: a novel method for the study of alloimmune responses. **Transplant Proc** 1999; 31(1-2):834-5.
- (11) Tanaka Y, Ohdan H, Onoe T, Mitsuta H, Tashiro H, Itamoto T et al. Low incidence of acute rejection after living-donor liver transplantation: immunologic analyses by mixed lymphocyte reaction using a carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester labeling technique. **Transplantation** 2005; 79(9):1262-7.
- (12) Levey AS, Bosch JP, Lewis JB, Greene T, Rogers N, Roth D. A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation. Modification of Diet in Renal Disease Study Group. **Ann Intern Med** 1999; 130(6):461-70.
- (13) Levey AS, Coresh J, Greene T, Marsh J, Stevens LA, Kusek JW et al. Expressing the Modification of Diet in Renal Disease Study equation for estimating glomerular filtration rate with standardized serum creatinine values. **Clin Chem** 2007; 53(4):766-72.
- (14) Delves PJ, Roitt IM. The immune system. Second of two parts. **N Engl J Med** 2000; 343(2):108-17.
- (15) Delves PJ, Roitt IM. The immune system. First of two parts. **N Engl J Med** 2000; 343(1):37-49.
- (16) Baker RJ, Hernandez-Fuentes MP, Brookes PA, Chaudhry AN, Cook HT, Lechler RI. Loss of direct and maintenance of indirect alloresponses in renal allograft recipients: implications for the pathogenesis of chronic allograft nephropathy. **J Immunol** 2001; 167(12):7199-206.
- (17) Vella JP, Spadafora-Ferreira M, Murphy B, Alexander SI, Harmon W, Carpenter CB et al. Indirect allorecognition of major histocompatibility complex allopeptides in human renal transplant recipients with chronic graft dysfunction. **Transplantation** 1997; 64(6):795-800.



- (18) Azuma H, Chandraker A, Nadeau K, Hancock WW, Carpenter CB, Tilney NL et al. Blockade of T-cell costimulation prevents development of experimental chronic renal allograft rejection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93(22):12439-44.
- (19) Hernandez-Fuentes MP, Warrens AN, Lechler RI. Immunologic monitoring. *Immunol Rev* 2003; 196:247-64.
- (20) Truong DQ, Bourdeaux C, Wieers G, Saussoy P, Latinne D, Reding R. The immunological monitoring of kidney and liver transplants in adult and pediatric recipients. *Transpl Immunol* 2009; 22(1-2):18-27.
- (21) Patel R, Terasaki PI. Significance of the positive crossmatch test in kidney transplantation. *N Engl J Med* 1969; 280(14):735-9.
- (22) Barama A, Oza U, Panek R, Belitsky P, MacDonald AS, Lawen J et al. Effect of recipient sensitization (peak PRA) on graft outcome in haploidentical living related kidney transplants. *Clin Transplant* 2000; 14(3):212-7.
- (23) Lefaucheur C, Suberbielle-Boissel C, Hill GS, Nochy D, Andrade J, Antoine C et al. Clinical relevance of preformed HLA donor-specific antibodies in kidney transplantation. *Am J Transplant* 2008; 8(2):324-31.
- (24) Bloom BR, Gaffney J, Jimenez L. Dissociation of MIF production and cell proliferation. *J Immunol* 1972; 109(6):1395-8.
- (25) Cheers C, Sprent J. Proliferation of activated thymocytes in mixed lymphocyte reactions. *Adv Exp Med Biol* 1973; 29(0):149-56.
- (26) Parish CR. Fluorescent dyes for lymphocyte migration and proliferation studies. *Immunol Cell Biol* 1999; 77(6):499-508.
- (27) Weston SA, Parish CR. New fluorescent dyes for lymphocyte migration studies. Analysis by flow cytometry and fluorescence microscopy. *J Immunol Methods* 1990; 133(1):87-97.
- (28) Lyons AB, Parish CR. Determination of lymphocyte division by flow cytometry. *J Immunol Methods* 1994; 171(1):131-7.

- (29) Weston SA, Parish CR. New fluorescent dyes for lymphocyte migration studies. Analysis by flow cytometry and fluorescence microscopy. **J Immunol Methods** 1990; 133(1):87-97.
- (30) Wells AD, Gudmundsdottir H, Turka LA. Following the fate of individual T cells throughout activation and clonal expansion. Signals from T cell receptor and CD28 differentially regulate the induction and duration of a proliferative response. **J Clin Invest** 1997; 100(12):3173-83.
- (31) Oku M, Okumi M, Sahara H, Hirakata A, Onoe T, Griesemer AD et al. Porcine CFSE mixed lymphocyte reaction and PKH-26 cell-mediated lympholysis assays. **Transpl Immunol** 2008; 20(1-2):78-82.
- (32) Onoe T, Ohdan H, Ochi M, Tanaka Y, Tokita D, Hara H et al. Multiparameter flow cytometric mixed lymphocyte reaction assay using fluorescent cytoplasmic dye for assessing phenotypic property of T cells responding to allogeneic stimulation. **Transplant Proc** 2003; 35(1):557-8.
- (33) Lefkovits I. Induction of antibody-forming cell clones in microcultures. **Eur J Immunol** 1972; 2(4):360-6.
- (34) Najafian N, Albin MJ, Newell KA. How can we measure immunologic tolerance in humans? **J Am Soc Nephrol** 2006; 17(10):2652-63.
- (35) Weimar W, Rischen-Vos J, de Kuiper P, Gregoor PJ, IJzermans JN, van Besouw NM et al. Tapering immunosuppression in recipients of living donor kidney transplants. **Nephrol Dial Transplant** 2004; 19 Suppl 4:iv61-iv63.
- (36) Miyahira Y, Murata K, Rodriguez D, Rodriguez JR, Esteban M, Rodrigues MM et al. Quantification of antigen specific CD8+ T cells using an ELISPOT assay. **J Immunol Methods** 1995; 181(1):45-54.
- (37) Taguchi T, McGhee JR, Coffman RL, Beagley KW, Eldridge JH, Takatsu K et al. Detection of individual mouse splenic T cells producing IFN-gamma and IL-5 using the enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay. **J Immunol Methods** 1990; 128(1):65-73.

- (38) Nickel P, Presber F, Bold G, Biti D, Schonemann C, Tullius SG et al. Enzyme-linked immunosorbent spot assay for donor-reactive interferon-gamma-producing cells identifies T-cell presensitization and correlates with graft function at 6 and 12 months in renal-transplant recipients. **Transplantation** 2004; 78(11):1640-6.
- (39) Augustine JJ, Siu DS, Clemente MJ, Schulak JA, Heeger PS, Hricik DE. Pre-transplant IFN-gamma ELISPOTs are associated with post-transplant renal function in African American renal transplant recipients. **Am J Transplant** 2005; 5(8):1971-5.
- (40) Santiago-Delpin EA, Nettleship E, Ruiz ML. Pretransplant predictors in renal transplantation. **Am J Surg** 1983; 146(5):586-8.
- (41) Nakagawa K, Matsuno T, Iwagaki H, Fujiwara T, Tanaka N. Analysis of the immune status in the recipients with long-term well-functioning kidneys allografts. **Acta Med Okayama** 2001; 55(1):31-9.
- (42) Holman DM, Dunn TB, Ward M, Raofi V, Jovanovic B, Kumins NH et al. Pretransplant MLC in the presence of cyclosporine may predict renal allograft survival. **Transplant Proc** 1999; 31(1-2):746-7.
- (43) Kerman RH, Susskind B, Katz SM, Van Buren CT, Kahan BD. Postrenal transplant MLR hypo-responders have fewer rejections and better graft survival than MLR hyper-responders. **Transplant Proc** 1997; 29(1-2):1410-1.
- (44) Kerman RH, Katz SM, Schoenberg L, Baraket O, Van Buren CT, Kahan BD. Ten-year follow-up of mixed lymphocyte reaction-hypo-responsive living related cyclosporine monotherapy-treated renal allograft recipients. **Transplant Proc** 1997; 29(1-2):198-9.
- (45) Nitta Y, Nelson K, Andrews RG, Thomas R, Gaur LK, Allen MD. CFSE dye dilution mixed lymphocyte reactions quantify donor-specific alloreactive precursors in non-human primate cardiac graft rejection. **Transplant Proc** 2001; 33(1-2):326-9.
- (46) Cerilli J, Newhouse YG, Williams MA. The correlation of tissue typing, mixed lymphocyte culture, and related donor renal allograft survival. **Transplant Proc** 1978; 10(4):953-4.

- (47) Cerilli J, Newhouse YG, Fesperman DP, Brasile L. The significance of mixed lymphocyte culture in related renal transplantation. **Surgery** 1980; 88(5):631-5.
- (48) Ringden O, Moller E, Lundgren G, Groth CG. Role of MLC compatibility in intrafamilial kidney transplantation. **Transplantation** 1976; 22(1):9-17.
- (49) Butt KM, Glass NR, Parsa I, Rao TK, Adamsons RJ, Kountz SL. Rapid mixed lymphocyte culture (MLC)--an aid for selection of recipients of cadaveric renal allografts. **Transplant Proc** 1979; 11(1):763-6.
- (50) Cochrum KC, Perkins HA, Payne RO, Kountz SL, Belzer FO. The correlation of MLC with graft survival. **Transplant Proc** 1973; 5(1):391-6.
- (51) Cochrum KC, Salvatierra O, Belzer FO. Correlation between MLC stimulation and graft survival in living related and cadaver transplants. **Ann Surg** 1974; 180(4):617-22.
- (52) Jones AR, Bewick M, Vaughan RW, Batchelor JR. Transformation of lymphocytes from patients awaiting cadaver renal transplants. **Lancet** 1976; 2(7985):529-31.
- (53) Walker J, Opelz G, Terasaki PI. Correlation of MLC response with graft survival in cadaver and related donor kidney transplants. **Transplant Proc** 1978; 10(4):949-51.
- (54) Festenstein H, Sachs JA, Pegrum GD, Moorhead JF, Paris AM. Influence of HLA matching and blood-transfusion on outcome of 502 London Transplant Group renal-graft recipients. **Lancet** 1976; 1(7952):157-61.
- (55) Sachs JA, Festenstein H, Tuffnell VA, Paris AM. Collaborative scheme for tissue typing and matching in renal transplantation. IX. Effect of HLA-A, -B, and -D locus matching, pretransplant transfusion, and other factors on 612 cadaver renal grafts. **Transplant Proc** 1977; 9(1):483-6.
- (56) Agrawal S, Singh AK, Sharma RK, Gupta A, Kumar A, Kapoor R et al. In vitro pretransplant mixed lymphocyte culture response and acute rejection episodes. **Transplant Proc** 1998; 30(7):2974.

- (57) Holman DM, Dunn TB, Ward M, Raofi V, Jovanovic B, Kumins NH et al. Pretransplant MLC in the presence of cyclosporine may predict renal allograft survival. **Transplant Proc** 1999; 31(1-2):746-7.



ศูนย์วิทยุทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย





ภาคผนวก (Appendix)

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ภาคผนวก ก (Appendix A)

### เอกสารข้อมูลคำอธิบายสำหรับผู้เข้าร่วมโครงการวิจัย

ท่านได้รับเชิญเข้าร่วมการวิจัยเรื่องความสัมพันธ์ระหว่างปฏิกิริยาภูมิโพลีไซต์ก่อนการปลูกถ่ายไตกับผลลัพธ์ที่ได้หลังการปลูกถ่ายไต (The Association of Pre-transplant Mixed Lymphocyte Reaction (MLR) by Carboxy-fluorescein Diacetate Succinimidyl Ester (CFSE) Assay and Renal Allograft Outcomes) เนื่องจากท่านเป็นผู้บริจาคไตให้กับผู้ที่กำลัง จะได้รับการเปลี่ยนไตรายใหม่ซึ่งสามารถศึกษาหาความสัมพันธ์ดังกล่าวข้างต้นได้ โดยก่อนที่ท่านจะตัดสินใจเข้าร่วมในการวิจัยดังกล่าวขอเรียนให้ ท่านทราบว่า

**แพทย์ผู้ทำการวิจัย**      **แพทย์หญิงอรชума สุขลัม**  
**อาจารย์ที่ปรึกษา**      **ผู้ช่วยศาสตราจารย์นายแพทย์เกื้อเกียรติ ประดิษฐ์พรศิลป์**  
 สาขาวิชาโรคไต ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

#### วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาหาความสัมพันธ์ระหว่างปฏิกิริยาภูมิโพลีไซต์ก่อนการปลูกถ่ายไตกับผลลัพธ์ที่ได้หลังการปลูกถ่ายไตที่ 3 เดือนหลังการปลูกถ่ายไต

#### วิธีการที่เกี่ยวข้องกับการวิจัย

ก่อนการเข้าร่วมโครงการวิจัยแพทย์จะอธิบายถึงผลดีและผลเสียของการเข้าร่วมโครงการวิจัย โดยผู้ที่เข้าร่วมการวิจัย(ผู้บริจาคไต)จะต้องเจาะเลือดก่อนการปลูกถ่ายไต 50 มิลลิลิตร (10 ซีซี) ซึ่งไม่น่าจะเกิดผลข้างเคียงจากการเสียเลือดปริมาณนี้ โดยจะนำเลือดที่ได้ก่อนการปลูกถ่ายไตนี้เข้าสู่ขบวนการตรวจปฏิกิริยาภูมิโพลีไซต์ต่อไป ซึ่งจะเป็นการเจาะเลือดเพียง ครั้งเดียวก่อนการปลูกถ่ายไต

#### ความรับผิดชอบของผู้เข้าร่วมโครงการวิจัย

เพื่อให้งานวิจัยนี้ประสบความสำเร็จ จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องได้รับความร่วมมือจากท่านโดยผู้เข้าร่วมโครงการวิจัยจะต้องมาตรวจเลือดก่อนการบริจาคไตตามเวลาที่กำหนดไว้

### ความเสี่ยงที่อาจได้รับ

ท่านอาจมีความเสี่ยงที่ได้จากการเจาะเลือด โดยอาจจะเกิดอาการเจ็บ เลือดออก ช้ำจากการเจาะเลือด อาการบวมบริเวณที่เจาะเลือด หรือหน้ามืด และโอกาสที่จะเกิดการติดเชื้อบริเวณที่เจาะเลือดซึ่งพบได้น้อยมาก

### ประโยชน์ที่ท่านจะได้รับจากการเข้าร่วมการวิจัย

ท่านอาจไม่ได้รับไม่ได้รับประโยชน์โดยตรงจากการศึกษาแต่อาจจะมีประโยชน์สำหรับผู้รับการปลูกถ่ายไต โดยถ้าผลการศึกษาศึกษาสามารถสรุปผลความสัมพันธ์ได้ ก็จะส่งผลให้การติดตามการรักษาที่มีประสิทธิภาพมากขึ้น แต่หากไม่สามารถสรุปผลความสัมพันธ์ได้ผลการวิจัยนี้ก็ยังคงจะเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาความรู้ทางการแพทย์ต่อไป

### คำชี้แจงเกี่ยวกับสิทธิของท่าน

เนื่องจากการตรวจปฏิกิริยาภูมิแพ้ไตนี้เป็นงานวิจัยของหน่วยโรคไต ภาควิชาอายุรศาสตร์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ดังนั้นท่านจะไม่เสียค่าใช้จ่ายในส่วนของการตรวจแต่อย่างใด

การเข้าร่วมวิจัยนี้เป็นไปด้วยความสมัครใจ ท่านมีสิทธิปฏิเสธการเข้าร่วมวิจัยได้ตลอดเวลา โดยยังมีสิทธิที่จะได้รับการดูแลจากแพทย์ได้ตามปกติ

ข้อมูลที่ท่านนำไปสู่การเปิดเผยตัวของท่านจะได้รับการปกปิดและจะไม่เปิดเผยแก่สาธารณชน ในกรณีที่ผลการวิจัยได้รับการตีพิมพ์ชื่อและที่อยู่ของท่านจะต้องได้รับการปกปิดอยู่เสมอโดยจะใช้เฉพาะรหัสประจำโครงการวิจัยของท่าน

ขอขอบคุณในการร่วมมือของท่านมา ณ ที่นี้

### หากท่านมีข้อสงสัยใดๆ สามารถติดต่อสอบถามได้ที่

พญ. อรชума สุขลิม เบอร์โทร 02-2564251 ต่อ 202 ในเวลาราชการ หรือ 089-7345881 นอกเวลาราชการ

หากท่านไม่ได้รับการปฏิบัติตามที่ปรากฏในเอกสารข้อมูลคำอธิบายสำหรับผู้เข้าร่วมในการวิจัย ท่านสามารถร้องเรียนได้ที่ คณะกรรมการจริยธรรมการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ตึกอำนวยการชั้น 3 โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ถนนพระราม 4 ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330 โทร 0-2256-4455 ต่อ 14, 15 ในเวลาราชการ

### หนังสือแสดงความยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัย (ผู้รับไต)

โครงการวิจัยเรื่องความสัมพันธ์ระหว่างปฏิกิริยาลิมโฟไซต์ก่อนการปลูกถ่ายไตกับผลลัพธ์ที่ได้หลังการปลูกถ่ายไต (The Association of Pre-transplant Mixed Lymphocyte Reaction (MLR) by Carboxy-fluorescein Diacetate Succinimidyl Ester (CFSE) Assay and Renal Allograft Outcomes)

ข้าพเจ้านาย/นาง/นางสาว.....ได้อ่านรายละเอียดจากเอกสารข้อมูลสำหรับผู้เข้าร่วมโครงการวิจัยที่แนบมาข้าพเจ้ายินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัยโดยสมัครใจและข้าพเจ้าได้รับสำเนาใบแสดงความยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัยที่ข้าพเจ้าได้ลงนามและวันที่ไว้พร้อมด้วยเอกสารข้อมูลสำหรับผู้เข้าร่วมวิจัย

ข้าพเจ้าได้รับการอธิบายจากผู้วิจัยถึงวัตถุประสงค์ของการวิจัยระยะเวลาของการทำวิจัยวิธีการวิจัยรวมถึงประโยชน์ที่จะเกิดขึ้นจากการวิจัยโดยผู้วิจัยได้ตอบคำถามต่างๆด้วยความเต็มใจไม่ปิดบังซ่อนเร้นจนข้าพเจ้าพอใจข้าพเจ้ามีสิทธิที่จะบอกเลิกเข้าร่วมในโครงการวิจัยเมื่อใดก็ได้โดยไม่จำเป็นต้องแจ้งเหตุผลและการบอกเลิกการเข้าร่วมวิจัยนี้จะไม่ส่งผลต่อการรักษาโรคหรือสิทธิอื่นๆที่ข้าพเจ้าจะพึงได้รับต่อไป

ข้าพเจ้าได้ตระหนักว่าข้อมูลในการวิจัยรวมถึงข้อมูลทางการแพทย์ที่ไม่มีการเปิดเผยชื่อจะผ่านกระบวนการต่างๆเช่นการเก็บข้อมูลการบันทึกข้อมูลในคอมพิวเตอร์การตรวจสอบการวิเคราะห์และการรายงานเพื่อวัตถุประสงค์ทางวิทยาศาสตร์รวมทั้งข้อมูลทางการแพทย์ในอนาคตหรือการวิจัยเท่านั้น

ข้าพเจ้ายินดีลงนามในใบยินยอมนี้เพื่อเข้าร่วมการวิจัยด้วยความเต็มใจ

วันที่...../...../.....

ลงชื่อ.....(ผู้ยินยอมรับไต)

(.....)

.....(แพทย์ผู้ทำการวิจัย)

(.....)

.....(พยาน)

(.....)

### หนังสือแสดงความยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัย (ผู้บริจาคไต)

โครงการวิจัยเรื่องความสัมพันธ์ระหว่างปฏิกิริยาภูมิแพ้ไตก่อนการปลูกถ่ายไตกับผลลัพธ์ที่ได้หลังการปลูกถ่ายไต (The Association of Pre-transplant Mixed Lymphocyte Reaction (MLR) by Carboxy-fluorescein Diacetate Succinimidyl Ester (CFSE) Assay and Renal Allograft Outcomes)

ข้าพเจ้านาย/นาง/นางสาว.....ได้อ่านรายละเอียดจากเอกสารข้อมูลสำหรับผู้เข้าร่วมโครงการวิจัยที่แนบมา ข้าพเจ้ายินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัยโดยสมัครใจและข้าพเจ้าได้รับสำเนาใบแสดงความยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัยที่ข้าพเจ้าได้ลงนามและวันที่ไว้พร้อมด้วยเอกสารข้อมูลสำหรับผู้เข้าร่วมวิจัย

ข้าพเจ้าได้รับการอธิบายจากผู้วิจัยถึงวัตถุประสงค์ของการวิจัย ระยะเวลาของการทำวิจัย วิธีการวิจัย รวมถึงประโยชน์ที่จะเกิดขึ้นจากการวิจัย โดยผู้วิจัยได้ตอบคำถามต่างๆด้วยความเต็มใจไม่ปิดบังซ่อนเร้นจนข้าพเจ้าพอใจ ข้าพเจ้ามีสิทธิที่จะบอกเลิกเข้าร่วมในโครงการวิจัยเมื่อใดก็ได้โดยไม่ต้องแจ้งเหตุผลและการบอกเลิกการเข้าร่วมวิจัยนี้จะไม่ส่งผลต่อการรักษาโรคหรือสิทธิอื่นๆที่ข้าพเจ้าจะพึงได้รับต่อไป

ข้าพเจ้าได้ตระหนักว่าข้อมูลในการวิจัยรวมถึงข้อมูลทางการแพทย์ที่ไม่มีการเปิดเผยชื่อจะผ่านกระบวนการต่างๆ เช่น การเก็บข้อมูล การบันทึกข้อมูลในคอมพิวเตอร์ การตรวจสอบ การวิเคราะห์และการรายงานเพื่อวัตถุประสงค์ทางวิทยาศาสตร์ รวมทั้งข้อมูลทางการแพทย์ในอนาคตหรือการวิจัยเท่านั้น

ข้าพเจ้ายินดีลงนามในใบยินยอมนี้เพื่อเข้าร่วมการวิจัยด้วยความเต็มใจ

วันที่...../...../.....

ลงชื่อ.....(ผู้ยินยอมบริจาคไต)

(.....)

.....(แพทย์ผู้ทำการวิจัย)

(.....)

.....(พยาน)

(.....)



## ภาคผนวก ข (Appendix B)

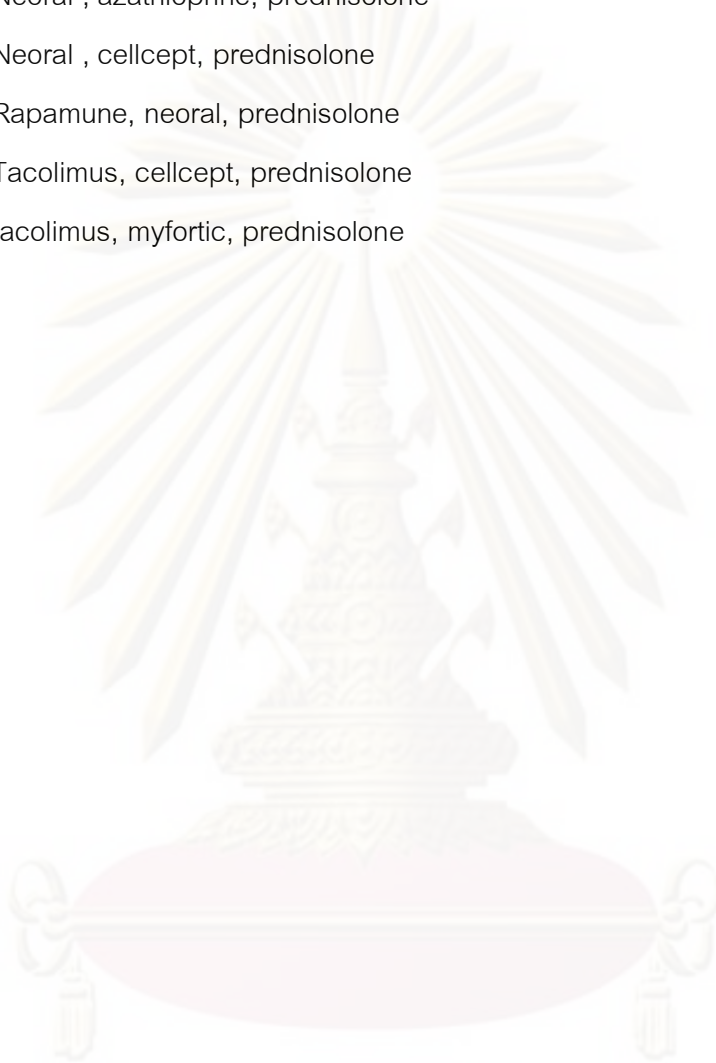
## แบบฟอร์มการเก็บข้อมูล

เลขที่ .....

ความสัมพันธ์ระหว่างปฏิกิริยาภูมิแพ้ไตก่อนการปลูกถ่ายไตกับผลลัพธ์ที่ได้หลังการปลูกถ่ายไต

1. อายุ .....ปี
2. เพศ .....1. ชาย .....2. หญิง
3. ชนิดของไตที่ได้รับการปลูกถ่าย  
.....1. Living .....2. Deceased
4. อายุของผู้ที่บริจาคไตให้ .....ปี
5. วันที่ที่ได้รับการเปลี่ยนไต วันที่.....เดือน.....ปีพ.ศ. ....
6. วันที่ได้รับการเจาะเลือดเพื่อเก็บตัวอย่าง วันที่.....เดือน.....ปีพ.ศ. ....
7. ระยะเวลาที่ไตขาดเลือด.....ชั่วโมง.....นาที
8. HLA mismatch ..... ตำแหน่ง (.....A.....B.....DR)
9. Panel-reactive antibody ..... %
10. สาเหตุของไตวายเรื้อรัง  
..... 1. Glomerulonephritis  
..... 2. Diabetes mellitus  
..... 3. Polycystic kidney disease  
..... 4. Obstructive uropathy  
..... 5. Renal artery stenosis  
..... 6. First renal allograft failure  
..... 7 Other
11. การสูบบุหรี่ .....1. สูบ ..... 2. ไม่สูบ
12. Delay graft function .....1. yes ..... 2. no
13. Serum creatinine ..... mg/dl ที่ 3 เดือน
14. GFR คำนวณโดย Abbreviate MDRD ..... ml/min
15. GFR คำนวณโดย re-expressMDRD equation ..... ml/min
16. ประวัติการปฏิเสธไต ..... ครั้ง

17. เปอ์เซินต์ cell proliferation ..... %
18. ยากดภูมิคุ้มกันที่ใช้
- ..... 1. Neoral , azathioprine, prednisolone
- ..... 2. Neoral , cellcept, prednisolone
- ..... 3. Rapamune, neoral, prednisolone
- ..... 4. Tacolimus, cellcept, prednisolone
- ..... 5. Tacolimus, myfortic, prednisolone



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ พญ. อรชฎมา สุขลี้ม

วันเดือนปีเกิด 19 ธันวาคม พ.ศ. 2521 จังหวัดนครศรีธรรมราช

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

นักศึกษาคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ 2539-2545

แพทย์ใช้ทุนอายุรศาสตร์โรงพยาบาลสงขลานครินทร์ 2545-2549

ปริญญาและประกาศนียบัตร

แพทยศาสตรบัณฑิต (เกียรตินิยมอันดับ 1) 2545

วุฒิปัตแพทย์ผู้เชี่ยวชาญสาขาอายุรศาสตร์ 2549

สมาชิกสมาคมวิชาชีพ

สมาชิกราชวิทยาลัยอายุรแพทย์แห่งประเทศไทย

สมาชิกสมาคมโรคไตแห่งประเทศไทย

ศูนย์วิทยุทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย