



รายงานผลงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัย

ผลจากรังสีวินิจฉัยต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนนิวเคลียสและเซลล์ต้นกำเนิดชนิด CD34⁺
และ CD133⁺ ในอาสาสมัครสุขภาพดี

Effect of X-ray Diagnostic to Peripheral Blood Mononuclear Cells and
CD34⁺/CD133⁺ Stem Cells in Healthy Volunteers

โดย
อาจารย์ ดร.นัฐพงษ์ มุลคำ

สนับสนุนโดย
สถาบันวิจัย มหาวิทยาลัยรังสิต

2561



รายงานผลงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัย

ผลจากรังสีวินิจฉัยต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนนิวเคลียสและเซลล์ต้นกำเนิดชนิด $CD34^+$
และ $CD133^+$ ในอาสาสมัครสุขภาพดี

Effect of X-ray Diagnostic to Peripheral Blood Mononuclear Cells and
 $CD34^+/CD133^+$ Stem cells in Healthy Volunteers

โดย
อาจารย์ ดร.นัฐพงษ์ มุลคำ

สนับสนุนโดย
สถาบันวิจัย มหาวิทยาลัยรังสิต

2561

ชื่อเรื่อง: ผลจากรังสีวินิจฉัยต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนนิวเคลียสและเซลล์ต้นกำเนิดชนิด CD34+ และ CD133+ ในอาสาสมัครสุขภาพดี

ผู้วิจัย: อาจารย์ ดร.นัฐพงษ์ มูลคำ

สถาบัน: คณะรังสีเทคนิค มหาวิทยาลัยรังสิต

ปีที่พิมพ์: 2562

สถานที่พิมพ์: มหาวิทยาลัยรังสิต

แหล่งที่เก็บรายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์: มหาวิทยาลัยรังสิต

จำนวนหน้างานวิจัย: 48 หน้า

คำสำคัญ: การฉายรังสี, กระแสเลือด, รังสีวินิจฉัย, ซีดีสามสิบสี่, ซีดีหนึ่งสามสาม, เซลล์ต้นกำเนิด, เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนนิวเคลียส

ลิขสิทธิ์: มหาวิทยาลัยรังสิต

บทคัดย่อ

รังสีทางการแพทย์มีประโยชน์อย่างมากสำหรับการวินิจฉัยโรคทางการแพทย์ แต่รังสีอาจมีผลต่อสิ่งมีชีวิตรวมถึงผลต่อระดับเซลล์ในร่างกายมนุษย์ ในงานวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายที่จะศึกษาผลของรังสีวินิจฉัยโดยใช้ปริมาณรังสีอ้างอิงในการถ่ายภาพรังสีวินิจฉัย ซึ่งเป็นระดับที่ใช้ในการถ่ายภาพเอกซเรย์ทั่วไปต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยวและศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ที่เกิดขึ้นหลังจากการฉายรังสี

เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนนิวเคลียสถูกเก็บมาจากกระแสเลือดของอาสาสมัครสุขภาพดีและแยกด้วยกระบวนการปั่นเหวี่ยง จากนั้นนำไปฉายรังสีโดยวัดระดับปริมาณรังสีได้ 0.47-2.30 มิลลิเกรย์ โดยเป็นปริมาณรังสีที่ใช้ถ่ายปอด อุ้งเชิงกราน ช่องท้องและกระดูกสันหลังส่วนบั้นเอว โดยถือว่าส่วนของแกนกลางที่ประกอบด้วยอวัยวะที่สำคัญของร่างกายและเก็บผลการทดลอง ที่เวลา 1 ชั่วโมง, 1, 5, 10, 15, และ 20 วัน หลังจากการฉายรังสี

ผลการทดลองพบว่าลักษณะเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนนิวเคลียสที่แยกได้มีลักษณะกลมและประกอบด้วยเซลล์ 2 กลุ่มคือ ลิมโฟไซต์และโมโนไซต์ โดยลักษณะของเซลล์ในวันที่ 20 ในกลุ่มที่ฉายรังสีพบว่าการเปลี่ยนแปลงรูปร่างน้อยกว่ากลุ่มที่ไม่ฉายรังสี และการติด CD34⁺ และ CD133⁺ มีความแตกต่างกันกลุ่มเซลล์ที่ใช้ปริมาณรังสีด้วยเทคนิคการถ่ายภาพเอกซเรย์ทรวงอกซึ่งมีระดับปริมาณรังสีที่น้อยที่สุด ในขณะที่

กลุ่มไม่ฉายรังสีและการใช้ปริมาณรังสีด้วยเทคนิคอื่นไม่พบความแตกต่างของการติด CD34⁺ และ CD133⁺ ส่วนผลของสัดส่วนระหว่าง CD34⁺/CD133⁺ พบว่ากลุ่มฉายรังสีด้วยเทคนิค การถ่ายเอกซเรย์อุ้งเชิงกราน การถ่ายเอกซเรย์ช่องท้อง และการถ่ายเอกซเรย์กระดูกส่วนบั้นเอว มีความแตกต่างจากกลุ่มไม่ฉายรังสี

สรุปผลการทดลองพบว่ารังสีปริมาณต่ำที่สุดจากเทคนิคการถ่ายเอกซเรย์ปอดมีผลต่อการแสดงออกของเซลล์ต้นกำเนิดชนิด CD34⁺ และ CD133⁺ และพบว่าถ้าเมื่อใช้ปริมาณรังสีที่มากขึ้นตามเทคนิคการถ่ายเอกซเรย์อาจส่งผลต่อสัดส่วนของ CD34⁺ และ CD133⁺ และนอกจากนั้นเมื่อเลี้ยงเซลล์ไปจนถึงวันที่ 20 พบว่าปริมาณรังสีที่ใช้สำหรับการถ่ายเอกซเรย์ทั่วไปมีผลต่อคุณสมบัติการเปลี่ยนรูปร่างของเซลล์

ผลการศึกษาโดยรวมบ่งชี้ว่าเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยว อาจเป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพ และพบว่าผลของรังสีมีนัยสำคัญต่อสัณฐานวิทยาและความแตกต่างของเซลล์ ซึ่งทำให้เกิดความตระหนักในการใช้รังสีในทางการแพทย์รวมถึงความระมัดระวังเมื่อใช้รังสีวินิจฉัยทั้งในผู้ปฏิบัติงานและผู้ป่วย



Title: Effect of X-ray diagnostic to peripheral blood mononuclear cells and CD34 ⁺ /CD133 ⁺ stem cells in healthy donor
Researcher: Nutthapong Moonkum
Institution: Faculty of Radiologic Technology, Rangsit University
Year of Publication: 2020
Publisher: Rangsit University
Sources: Rangsit University
No. of pages: 48 pages
Keywords: Ionizing radiation, Peripheral blood, X-ray diagnostic, CD34 ⁺ , CD133 ⁺ , Stem cells, Peripheral blood mononuclear cells
Copyrights: Rangsit University

Abstract

Medical radiation is very useful for the diagnosis of diseases but the radiation can affect to living including the cells in the human body. The objective of this research to study the effects of diagnostic radiography using diagnostic reference levels (DRLs) in radiographic imaging, which is the level used in general x-ray to peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and study the changes of cells after irradiation.

The freshly PBMCs were collected from the bloodstream of healthy volunteers and were isolated by density gradient technique and were irradiated by x-ray and measuring the amount of radiation at 0.47-2.30 mGy, which is the amount of radiation used in chest x-ray, pelvis, abdomen and lumbar spine. It is considered the central organ of the body. And the experimental results were collected at 1 hour, 1, 5, 10, 15, and 20 days after the irradiation.

The results were found that the morphology of the peripheral blood mononuclear cells were round and consist of two populations as lymphocyte and monocyte. The characteristics of the cells on the day 20 in the irradiated group were showed that the cell differentiation less than the control group. And the staining of CD34⁺ and CD133⁺ were found different in the chest x-ray techniques, which have the least amount of radiation. While the control group and other dose in difference x-ray technique were no difference staining of CD34⁺ and CD133⁺. As for the proportion between staining the ratio of

CD34⁺/CD133⁺ was found that the irradiation group using pelvic, abdomen and lumber spine x-ray technique are differences from the control groups.

In conclusion, the results showed that the lowest radiation dose from chest x-ray technique could effect to stem cells expression of CD34⁺ and CD133⁺ and the higher radiation dose by x - ray technique, it may effect to the proportion of CD34⁺ and CD133⁺ and in addition, when culture cells up to the 20 day was found that the amount of radiation used for general x-ray imaging had an effect on the differentiation potency of cell.

The overall results indicated that the PBMCs might be considered as biomarkers were found to have a significant radiation effect on the morphology and differentiation of PMBCs and raises awareness on the use of radiation in medical including being careful when using diagnostic radiation both in workers and patients.



กิตติกรรมประกาศ

ทางคณะวิจัยขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ มานัส มงคลสุข ที่ปรึกษาเป็นอย่างสูง ที่ได้ให้คำแนะนำในการเริ่มต้นงานวิจัย ให้คำปรึกษา ข้อเสนอแนะ และให้ความรู้เกี่ยวกับงานวิจัย และ

ขอขอบพระคุณคณาจารย์และภาควิชารังสีเทคนิค มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ที่อำนวยความสะดวกทั้งสถานที่และอุปกรณ์ เครื่องมือ ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณคณาจารย์คณะรังสีเทคนิคทุกท่านที่ได้ให้คำแนะนำ ทิชม และให้กำลังใจตลอดระยะเวลาในการทำวิจัย

นัฐพงษ์ มูลคำ

หัวหน้าโครงการวิจัย



สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญ	ฉ
สารบัญตาราง	ช
สารบัญรูปภาพ	ซ
สารบัญแผนภูมิ	ญ
บทที่ 1 บทนำ	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
สมมุติฐานของการวิจัย	2
ขอบเขตของการวิจัย	2
นิยามศัพท์เฉพาะ	3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
บทที่ 2 เอกสารและผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
บทที่ 3 ระเบียบวิธีวิจัย	9
ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง	9
เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย	9
การเก็บรวบรวมข้อมูล	12
การวิเคราะห์ข้อมูล	13
บทที่ 4 ผลการทดลอง และอภิปรายผล	14
บทที่ 5 สรุป วิจัย และข้อเสนอแนะ	27
สรุป	27
วิจัย	28
ข้อเสนอแนะ	30
เอกสารอ้างอิง	31
ภาคผนวก	33
ประวัติผู้วิจัย	

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
	1. เทคนิคในการตั้งค่าเอกซเรย์และปริมาณรังสี	23
	2. เปอร์เซ็นต์ในการติด Anti-CD34 ⁺ -FITC และ Anti-CD133 ⁺ -PE	31



สารบัญรูป

ภาพที่	หน้า
1. กรอบแนวคิดในการวิจัย	14
2. รังสีก่อประจุ (ionizing radiation)	17
3. แหล่งของต้นกำเนิดสามารถแบ่งออกได้เป็น แหล่งกำเนิดจากธรรมชาติเช่น ธาตุกัมมันตรังสีจากพื้นดิน, รังสีคอสมิก (cosmic Ray) และจากการที่มนุษย์สร้างขึ้นเช่นธาตุกัมมันตรังสีที่ใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์	18
4. การพัฒนามะเร็งจากการกลายพันธุ์ที่เกิดจากรังสีก่อประจุ	18
5. กระบวนการแยก เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนนิวเคลียส (PBMCs) จากเลือดโดยเทคนิค Density gradient centrifugation technique โดยส่วนประกอบของเลือดหลังจากการปั่นเหวี่ยงจะประกอบด้วย (1) Plasma, (2) Lymphocytes, Monocytes, Platelets และ (3) Granulocytes, Erythrocytes. ส่วนประกอบของ Lymphocytes, Monocytes, platelet เป็นตัวแทนของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนนิวเคลียส (PBMCs)	19
6. ระเบียบวิธีวิจัยในการทดลอง	22
7. เทคนิคการฉายรังสี a.เลือดหลังจากการปั่นเหวี่ยง b.เมื่อเติม lymphoprep แล้วปั่นเหวี่ยง c.ตะกอนเซลล์ d.เลี้ยงเซลล์ใน 24 well plate e.ใช้ระยะจากหลอดเอกซเรย์ถึงตำแหน่งงานเพราะเลี้ยงเซลล์ที่ระยะ 100 เซนติเมตร	24
8. ลักษณะของ Peripheral blood mononuclear cells โดยใช้เครื่อง flow cytometer	26
9. ลักษณะของเซลล์หลังจากการแยกโดยเทคนิค density gradient centrifugation technique และส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ (inverted microscope) a.ที่กำลังขยาย 4x B.ที่กำลังขยาย 10x และ C. เมื่อขยายภาพจะเห็นเซลล์มีลักษณะกลม	27
10. ที่ 1 ชั่วโมง ลักษณะของเซลล์ระหว่างกลุ่ม control และกลุ่มฉายรังสีด้วยปริมาณต่างๆ	28
11. วันที่ 1 ลักษณะของเซลล์ระหว่างกลุ่ม control และกลุ่มฉายรังสีด้วยปริมาณต่างๆ	28
12. วันที่ 5 ลักษณะของเซลล์ระหว่างกลุ่ม control และกลุ่มฉายรังสีด้วยปริมาณต่างๆ	28
13 วันที่ 10 ลักษณะของเซลล์ระหว่างกลุ่ม control และกลุ่มฉายรังสีด้วยปริมาณต่างๆ	29
14. วันที่ 15 ลักษณะของเซลล์ระหว่างกลุ่ม control และกลุ่มฉายรังสีด้วยปริมาณต่างๆ	29
15. วันที่ 20 ลักษณะของเซลล์ระหว่างกลุ่ม control และกลุ่มฉายรังสีด้วยปริมาณต่างๆ	29
16. วันที่ 20 ลักษณะของเซลล์ระหว่างกลุ่ม control และกลุ่มฉายรังสีด้วยปริมาณต่างๆ โดยเอาอาหารเลี้ยงเซลล์ออก	30

ภาพที่	หน้า
17. เปรียบเทียบ Anti-CD34 ⁺ -FITC และ Anti-CD133 ⁺ -PE เมื่อแยกตามการให้ปริมาณรังสี ในช่วงเวลา 1 ชั่วโมง, 24 ชั่วโมง, 5 วัน, 10 วัน และ 15 วัน	36
18. ลักษณะของเซลล์ระหว่างกลุ่ม control และกลุ่มฉายรังสีด้วยปริมาณต่างๆ โดยเอาอาหารเลี้ยงเซลล์ออก ในวันที่ 20 หลังจากฉายรังสี	41



สารบัญแผนภูมิ

แผนภูมิที่	หน้า
1. เพอร์เซ็นต์การย้อมติด Anti-CD34 ⁺ -FITC และ Anti-CD133 ⁺ -PE ที่เวลา 1 ชั่วโมง หลังจากการฉายรังสี	32
2. เพอร์เซ็นต์การย้อมติด Anti-CD34 ⁺ -FITC และ Anti-CD133 ⁺ -PE ที่เวลา 24 ชั่วโมง หรือ 1 วันหลังจากการฉายรังสี	33
3. เพอร์เซ็นต์การย้อมติด Anti-CD34 ⁺ -FITC และ Anti-CD133 ⁺ -PE ที่เวลา 5 วันหลังจาก การฉายรังสี	33
4. เพอร์เซ็นต์การย้อมติด Anti-CD34 ⁺ -FITC และ Anti-CD133 ⁺ -PE ที่เวลา 10 วัน หลังจากการฉายรังสี day 10	34
5. เพอร์เซ็นต์การย้อมติด Anti-CD34 ⁺ -FITC และ Anti-CD133 ⁺ -PE ที่เวลา 15 วัน หลังจากการฉายรังสี	34
6. สัดส่วน Anti-CD34 ⁺ -FITC และ Anti-CD133 ⁺ -PE ที่ปริมาณรังสีต่างๆ	37
7. สัดส่วน Anti-CD34 ⁺ -FITC และ Anti-CD133 ⁺ -PE ที่ช่วงเวลา 1 ชั่วโมง, 24 ชั่วโมง, 5 วัน, 10 วัน และ 15 วัน	38



บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ในช่วงที่ผ่านมา มีหลักฐานในงานวิจัยที่พบว่า การใช้รังสีเพื่อวินิจฉัยทางการแพทย์ อาจมีผลต่อการทำงาน ในระดับเซลล์รวมถึงผลที่เกิดต่อสิ่งมีชีวิต ซึ่งโดยทั่วไปแล้วบุคคลอาจได้รับปริมาณรังสีเพื่อวัตถุประสงค์ทางการแพทย์ หรืออาจเกิดจากการสัมผัสกัมมันตรังสีที่ปนเปื้อนในธรรมชาติ รังสีแบบก่อประจุ (ionizing radiation) มีผลต่อโดยตรง ต่อเซลล์ในร่างกาย รวมถึงเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนนิวเคลียส (PBMCs), เซลล์ต้นกำเนิด (stem cells) และอาจเป็นสาเหตุของการเกิดมะเร็ง (carcinogen) ในมนุษย์ได้ ซึ่งผลจากการใช้รังสีสามารถก่อให้เกิดผลกระทบทางชีวภาพที่หลากหลายขึ้นอยู่กับลักษณะทางกายภาพระยะเวลาปริมาณและอัตราการรับรังสี และสิ่งที่สำคัญที่สุดของผลกระทบจากการได้รับรังสี คือ การสูญเสียความสามารถในการแบ่งตัวซึ่งเกิดขึ้นในระดับเซลล์ของร่างกาย อย่างไรก็ตาม ในงานวิจัยที่ศึกษาผลของรังสีวินิจฉัยทางการแพทย์ต่อสิ่งมีชีวิตและผลกระทบต่อระดับเซลล์ ซึ่งรวมถึงเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนนิวเคลียสและเซลล์ต้นกำเนิด ก่อยังมีข้อถกเถียงและยังมีการศึกษาวิจัยอย่างต่อเนื่องถึงผลกระทบที่เกิดจากการใช้รังสีระหว่างการตรวจทางการแพทย์

ในงานวิจัยนี้จึงมีจุดมุ่งหมายที่จะศึกษาผลของรังสีวินิจฉัยทางการแพทย์ต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนนิวเคลียสและเซลล์ต้นกำเนิดชนิด CD34⁺ และ CD133⁺ ที่เก็บมาจากกระแสเลือดของอาสาสมัครสุขภาพดี โดยศึกษาผลของรังสีที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนนิวเคลียส, เซลล์ต้นกำเนิดชนิด CD34⁺ และ CD133⁺ รวมถึงการเจริญเติบโตในระบบการเพาะเลี้ยงเซลล์ในห้องทดลอง โดยใช้ปริมาณรังสีอ้างอิงในการถ่ายภาพรังสีวินิจฉัย (diagnostic reference levels) ในค่าที่อยู่ระหว่าง 0.17-8.08 mGy (Compagnone, Pagan, & Bergamini, 2004; Edmonds, 2009) ซึ่งเป็นระดับที่ใช้ในการถ่ายภาพเอกซเรย์ทั่วไป (plan film) และในงานวิจัยนี้จะทำให้ทราบถึงผลของรังสีวินิจฉัยทางการแพทย์ที่มีต่อเซลล์ต้นกำเนิด รวมถึงบทบาทของเซลล์ต้นกำเนิดที่อยู่ในระบบเลือดในการตอบสนองต่อรังสี รวมถึงยังมีคำถามเกี่ยวกับการฉายรังสีเพื่อวินิจฉัยในทางการแพทย์จะมีผลต่อการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนนิวเคลียส และเซลล์ต้นกำเนิดชนิด CD34⁺ และ CD133⁺ ที่เก็บจากเลือดหรือไม่ และถ้ามีจะมีผลต่อการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์แบบไหน

งานวิจัยนี้จะทำให้ทราบถึงผลของรังสีวินิจฉัยทางการแพทย์ที่มีเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนนิวเคลียส และเซลล์ต้นกำเนิดจากอาสาสมัครสุขภาพดี และถูกนำมาเพาะเลี้ยงในระบบห้องทดลอง รวมถึงบทบาทเซลล์ต้นกำเนิดที่อยู่ในระบบเลือดในการตอบสนองต่อรังสีตลอดจนถึงได้เผยแพร่ในวารสารต่างประเทศ และความรู้

ในการวิจัยในครั้งนี้ สามารถนำไปต่อยอดในการศึกษาผลจากปริมาณรังสีที่เกิดจากอุปกรณ์ทางรังสีชนิดต่างๆ ที่จะมีผลต่อร่างกายในระดับเซลล์ต่อไป

วัตถุประสงค์การวิจัย

เพื่อศึกษาวิจัยผลของรังสีวินิจฉัยทางการแพทย์ต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนนิวเคลียสรวมถึงเซลล์ต้นกำเนิด ในแง่ของการเจริญเติบโตและความในการเจริญไปเป็นเซลล์ชนิดต่างๆ ในระบบการเพาะเลี้ยงเซลล์ในห้องทดลอง

สมมุติฐานของการวิจัย

การฉายรังสีเพื่อวินิจฉัยในทางการแพทย์จะมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนนิวเคลียสและเซลล์ต้นกำเนิดที่เก็บจากเลือดหรือไม่ และถ้ามีจะมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของเซลล์แบบไหน

ขอบเขตของการวิจัย

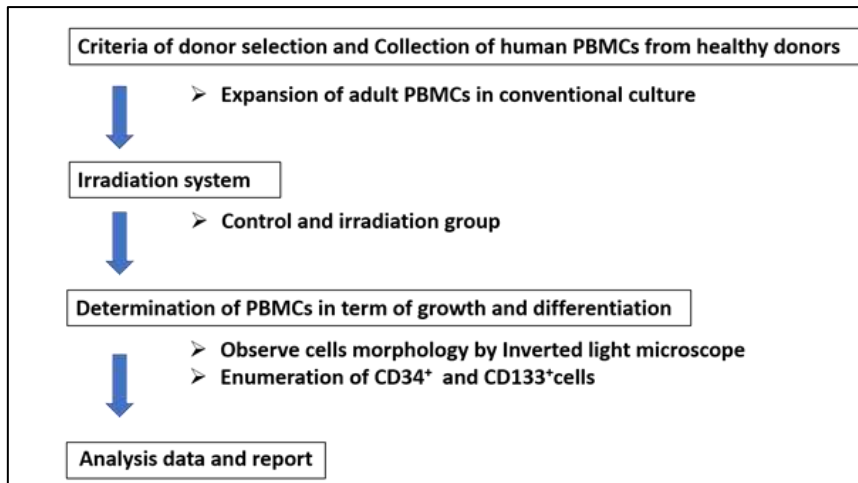
ด้านเนื้อหา: เนื้อหาวิจัยมีความเกี่ยวข้องกับรังสีชีววิทยาที่ดูผลระดับปริมาณรังสีอ้างอิงในการถ่ายภาพรังสีวินิจฉัย (diagnostic reference levels) ต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนนิวเคลียส (PBMCs) ว่าเปลี่ยนแปลงหรือแตกต่างจากกลุ่ม Control อย่างไร

ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง: เป็นผู้ใหญ่สุขภาพแข็งแรงอายุระหว่าง 20-30 ปี (Healthy adult donor) จ.เชียงใหม่ จำนวน 4 คน เพศชาย 2 คน และหญิง 2 คน

ระยะเวลาที่ดำเนินการวิจัย: 12 เดือน

กรอบแนวคิดในการวิจัย

การใช้รังสีเพื่อวินิจฉัยทางการแพทย์อาจมีผลต่อการทำงานในระดับเซลล์รวมถึงผลที่เกิดต่อสิ่งมีชีวิตในงานวิจัยนี้จึงมีจุดมุ่งหมายที่จะศึกษาผลของรังสีวินิจฉัยทางการแพทย์ต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนนิวเคลียสและเซลล์ต้นกำเนิดชนิด $CD34^+$ และ $CD133^+$ ที่เก็บมาจากเลือดของอาสาสมัครสุขภาพดี โดยศึกษาผลของรังสีที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนนิวเคลียส, เซลล์กำเนิดชนิด $CD34^+$ และ $CD133^+$ รวมถึงการเจริญเติบโตในระบบการเพาะเลี้ยงเซลล์ในห้องทดลอง โดยใช้ปริมาณรังสีอ้างอิงในการถ่ายภาพรังสีวินิจฉัย (diagnostic reference levels) ซึ่งเป็นระดับที่ใช้ในการถ่ายภาพเอกซเรย์ทั่วไป (plan film) ดังรูปที่ 1 ซึ่งในงานวิจัยนี้จะทำให้ทราบถึงผลของรังสีวินิจฉัยทางการแพทย์ที่มีต่อเซลล์ต้นกำเนิด รวมถึงบทบาทของเซลล์ต้นกำเนิดที่อยู่ในระบบเลือดในการตอบสนองต่อรังสี ตลอดจนถึงได้เผยแพร่ในวารสารต่างประเทศ และความรู้ในการวิจัยในครั้งนี้ สามารถนำไปต่อยอดในการศึกษาผลจากปริมาณรังสีที่เกิดจากอุปกรณ์ทางรังสีชนิดต่างๆ ที่จะมีผลต่อร่างกายในระดับเซลล์ต่อไป



รูปที่ 1 กรอบแนวคิดในการวิจัย

นิยามศัพท์เฉพาะ

เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนนิวเคลียส	เป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวที่มีนิวเคลียสเดี่ยว ไม่มีฮีโมโกลบิน สามารถเคลื่อนที่ได้อย่างอิสระ และไหลเวียนอยู่ในกระแสเลือด
เซลล์ต้นกำเนิดชนิด	เป็นเซลล์ไม่จำเพาะซึ่งสามารถเจริญ ไปเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่เฉพาะและสามารถแบ่งตัวเพื่อสร้างเซลล์ต้นกำเนิดเพิ่มได้
รังสีวินิจฉัย	สาขาหนึ่งที่ใหญ่จะเกี่ยวข้องกับการสร้างภาพในส่วนต่างๆ ของร่างกายเพื่อใช้ในการวินิจฉัยโรคโดยอาศัยเครื่องมือ พิเศษต่างๆในทางการแพทย์โดยเฉพาะการใช้ รังสีเอกซ์ (x-ray)
รังสีแบบก่อบรรจุ	เป็นคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าที่มีพลังงานสูงมากพอที่จะทำให้ อิเล็กตรอนวงนอกสุดของวงโคจรหลุดออกจากอะตอมหรือ โมเลกุล
รังสี	พลังงานที่แผ่มาจากแหล่งหนึ่งไปยังอีกแหล่งหนึ่งซึ่งอาจ สามารถทะลุผ่านวัตถุชนิดต่างๆได้

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

งานวิจัยนี้จะทำให้ทราบถึงผลของรังสีวินิจฉัยทางการแพทย์ที่มีเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนนิวเคลียส และเซลล์ต้นกำเนิดจากอสุไข่มดลูก และถูกนำมาเพาะเลี้ยงในระบบห้องทดลอง รวมถึงบทบาทเซลล์ต้นกำเนิดที่อยู่ในระบบเลือดในการตอบสนองต่อรังสีตลอดจนถึงได้เผยแพร่ในวารสารต่างประเทศ และความรู้ในการวิจัยในครั้งนี้ สามารถนำไปต่อยอดในการศึกษาผลจากปริมาณรังสีที่เกิดจากอุปกรณ์ทางรังสีชนิดต่างๆ ที่จะมีผลต่อร่างกายในระดับเซลล์ต่อไป

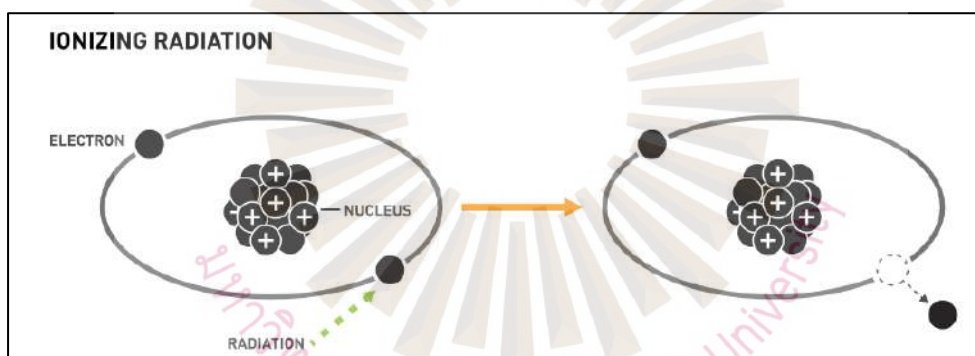


บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. แนวคิดและทฤษฎีที่เกี่ยวข้องกับรังสี

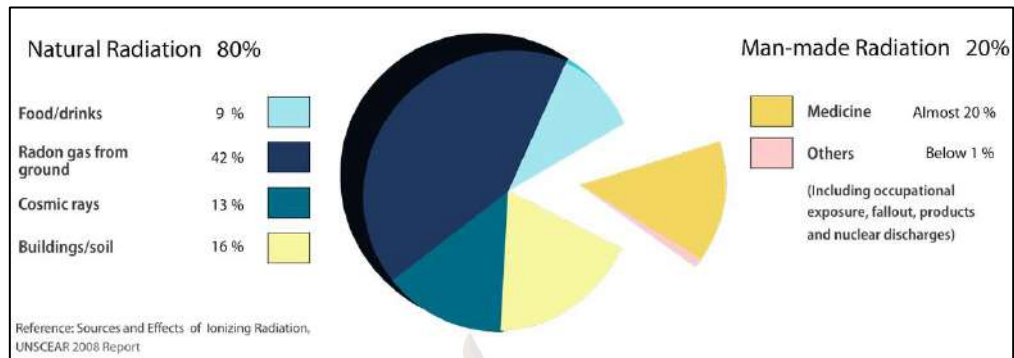
รังสี (radiation) คือ พลังงานที่แผ่มาจากแหล่งหนึ่งไปยังอีกแหล่งหนึ่งซึ่งอาจสามารถทะลุผ่านวัตถุชนิดต่างๆ ได้โดยเดินทางผ่านบรรยากาศ แบ่งได้เป็นสองประเภท คือ รังสีไม่ก่อประจุ (non-ionizing radiation) รังสีชนิดนี้เป็นรังสีที่มีพลังงานต่ำอยู่ในช่วงต่ำของแถบคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า (electromagnetic spectrum) เช่น แสงอาทิตย์ แสงอินฟราเรด คลื่นไมโครเวฟ และคลื่นวิทยุ เป็นต้น และรังสีก่อประจุ (ionizing radiation) หมายถึง เมื่อรังสีวิ่งผ่านอะตอมใด ทำให้อิเล็กตรอนตัวใดตัวหนึ่งที่โคจรอยู่ในวงโคจรรอบนิวเคลียส หลุดกระเด็นออกจากวงโคจร (รูปที่ 2) ซึ่งได้แก่ รังสีเอกซ์ รังสีแกมมา รังสีแอลฟา รังสีบีตา และรังสีนิวตรอนรังสีชนิดก่อไอออนนี้ เป็นรังสีที่สามารถก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต และทำให้เกิดอันตรายได้ ถ้าไม่รู้จักการป้องกันที่ถูกต้อง



รูปที่ 2. รังสีก่อประจุ (ionizing radiation)

มนุษย์และสิ่งมีชีวิตต่างได้รับรังสีได้อยู่ 2 ทาง คือธาตุกัมมันตรังสีที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติในดิน และหิน และได้รับรังสีคอสมิกจากอวกาศ ที่เข้ามายังบรรยากาศของโลก นอกจากนั้นเรายังได้รับรังสีเอกซเรย์ (X-ray) ทางการแพทย์ ซึ่งเกิดจากการสร้างขึ้นของมนุษย์ดังรูปที่ 3 (Seeram & Brennan, 2016) ในทางการแพทย์รังสีนั้นมีประโยชน์เป็นอย่างมากโดยเฉพาะรังสีเอกซ์ที่ถูกนำมาใช้ในการวินิจฉัยทางการแพทย์ เช่น การถ่ายภาพเอกซเรย์ปอดเพื่อตรวจหารอยโรคของมะเร็งปอด การถ่ายภาพเอกซเรย์กระดูก เพื่อตรวจการหลุดหรือการแตกหักของกระดูก การถ่ายภาพเอกซเรย์ร่างกายเพื่อตรวจหาตำแหน่งวัตถุหรือโลหะ เป็นต้นแต่โทษที่เกิดขึ้นจากรังสีนั้นก็มีมากและหลายระดับ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับปริมาณ ชนิดและระยะเวลาที่ได้รับรังสี เช่น ถ้าได้รับรังสีปริมาณ

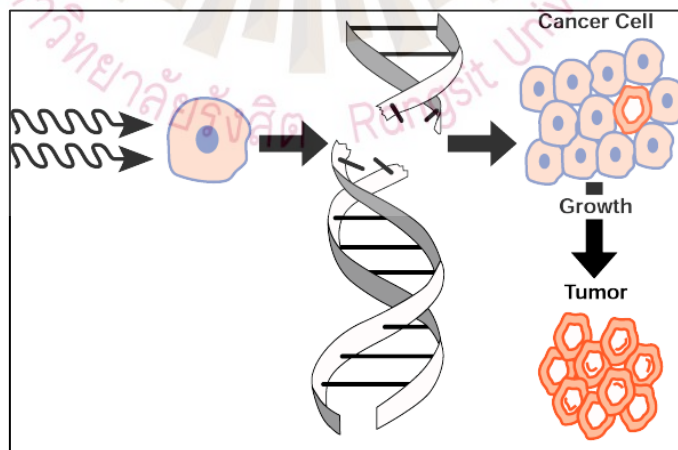
สูงแบบเฉียบพลันอาจเป็นอันตรายถึงแก่ชีวิตได้ การรับรังสีที่อวัยวะสืบพันธุ์ก็อาจทำให้เป็นหมัน เกิดการเปลี่ยนแปลงของสารชีวเคมีในสิ่งมีชีวิต รวมถึงอาจเป็นอันตรายต่อเซลล์ภายในร่างกาย หรือ เกิดการกลายพันธุ์ (mutation) ถ้าได้รับรังสีเป็นจำนวนมากและเป็นเวลานาน (Hall et al., 2017)



รูปที่ 3 แหล่งของต้นกำเนิดสามารถแบ่งออกได้เป็น แหล่งกำเนิดจากธรรมชาติเช่น ธาตุกัมมันตรังสีจากพื้นดิน, รังสีคอสมิก (cosmic Ray) และจากการที่มนุษย์สร้างขึ้นเช่นธาตุกัมมันตรังสีที่ใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์

2. แนวคิดและทฤษฎีที่เกี่ยวข้องกับผลของรังสีต่อสิ่งมีชีวิต

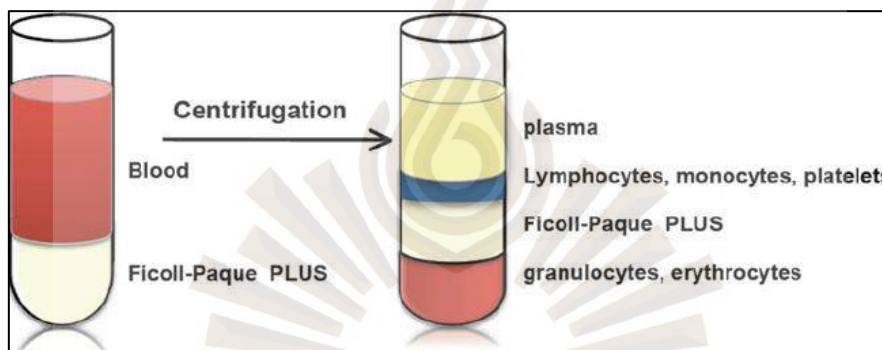
ในร่างกายมนุษย์นั้นมีการตอบสนองต่อรังสีที่หลากหลายซึ่งกำหนดโดยปัจจัยต่างๆ ที่ได้กล่าวมา และมนุษย์อาจได้รับรังสีจากเครื่องมือทางรังสีวินิจฉัยที่ใช้กันทั่วไปในทางการแพทย์ เช่น เครื่องถ่ายภาพเอกซเรย์ทั่วไป, เอกซเรย์คอมพิวเตอร์ (CT) หรือการใช้ปริมาณรังสีสูงๆ เช่น ในงานรังสีรักษา (El Naqa et al., 2017) และผลที่ร้ายแรงอาจจะส่งผลต่อระดับเซลล์หรือทำให้เกิดการกลายพันธุ์ของยีนซึ่งอาจจะพัฒนาให้เกิดโรค เช่น มะเร็งได้ รูปที่ 4 ซึ่งโดยทั่วไปในทางการแพทย์การใช้เอกซเรย์เพื่อวินิจฉัยรอยโรคในโรงพยาบาล โดยเครื่องเอกซเรย์ทั่วไปแล้วระดับปริมาณรังสีที่มนุษย์ได้รับจะต่ำกว่า 100 mGy (Moore, 2017)



รูปที่ 4 การพัฒนา มะเร็งจากการกลายพันธุ์ที่เกิดจากรังสีก่อประจุ

3. แนวคิดและทฤษฎีที่เกี่ยวข้องกับผลของรังสีต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนนิวเคลียส

ในงานวิจัยที่ผ่านมาได้มีการศึกษาค้นคว้าเกี่ยวกับผลของรังสีเอกซเรย์ในงานวินิจฉัยทางการแพทย์ต่อ เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนนิวเคลียส (PBMCs) ซึ่งเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนนิวเคลียส (PBMCs) เป็นเซลล์ ที่แยกได้จากเลือด ประกอบด้วยเซลล์ที่มีนิวเคลียสกลม เช่น Lymphocytes, Monocytes, Natural killer cells (NK cells) และ Dendritic cells (รูปที่ 5) และจะมีส่วนประกอบของเซลล์ต้นกำเนิดจากหลอดเลือดหรือ ที่เรียกกันว่า peripheral blood stem cells ซึ่งจะสามารถพบกลุ่มของ Hematopoietic stem cells และ Mesenchymal stem cells ซึ่งแสดง Antigen บน Membrane เป็น CD34+ และ CD133+ (Kleiveland, 2015) รวมถึงเม็ดเลือดขาวชนิดโมโนนิวเคลียส (PBMCs) ในมนุษย์นั้นจะพบสัดส่วนของ Lymphocyte ที่ 70-90%, Monocyte 10-20% ในขณะที่ Dendritic จะอยู่ที่ประมาณ 1-2% (Zhang & Huang, 2012)



รูปที่ 5 กระบวนการแยก เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนนิวเคลียส (PBMCs) จากเลือดโดยเทคนิค Density gradient centrifugation technique โดยส่วนประกอบของเลือดหลังจากการปั่นเหวี่ยงจะประกอบด้วย (1) Plasma, (2) Lymphocytes, Monocytes, Platelets และ (3) Granulocytes, Erythrocytes. ส่วนประกอบของ Lymphocytes, Monocytes, platelet เป็นตัวแทนของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนนิวเคลียส (PBMCs)

4. งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนนิวเคลียส (PBMCs) มีความสามารถที่จะเจริญไปเป็นเซลล์ต่างๆ (differentiation) เช่น Blood cells, Endothelial cells, Hepatocytes, Cardiomyogenic cells, Smooth muscle cells, Osteoblasts, Osteoclasts, Epithelial cells, Neural cells, Myofibroblasts แต่พฤติกรรมและความสามารถต่างๆ ของเซลล์ก็จะขึ้นกับสภาวะแวดล้อมและปัจจัยที่เป็นอยู่ในขณะนั้น รวมถึงการแสดงออกของเซลล์ต้นกำเนิดภายในร่างกาย ซึ่งสภาวะแวดล้อมต่างๆ รวมถึงปริมาณรังสีในธรรมชาติและรังสีที่ใช้ในทางการแพทย์ล้วนมีผลต่อวิวัฒนาการและระบบเซลล์ภายในร่างกาย ซึ่งรวมไปถึงรังสีเอกซ์ที่ใช้ในการวินิจฉัยทางการแพทย์ และมีการศึกษาพบว่ารังสีเอกซ์มีผลต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโน

นิวเคลียส (PBMCs) ทั้งทางตรงและทางอ้อม โดยพบว่ารังสีเอกซ์ปริมาณ 0.3-0.7 Gy ทำให้เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนนิวเคลียส (PBMCs) เกิดการตายแบบ Apoptosis ถึง 80% (KERN, 1999) และพบว่าเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนนิวเคลียส (PBMCs) ที่ได้จากอาสาสมัครสุขภาพดีแล้วนำมาฉายรังสีเอกซ์ปริมาณ 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2 และ 4 Gy พบว่า DNA มีการแตกหักโดยวัดตามช่วงเวลาต่างๆ หลังจากการฉายรังสีที่ 0, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง (Moreels, Baselet, Van Hoey, Vanhavere, & Baatout, 2020) ตลอดจนถึงพบว่า รังสีเอกซ์สามารถทำให้เกิดการแตกหักของ DNA อย่างรวดเร็วที่ 40 นาทีหลังจากฉายรังสีเอกซ์เมื่อทำงานการศึกษาในระดับห้องทดลอง (Azimi, Mozdarani, & Mahmoudzadeh, 2017) และในส่วนประกอบที่พบได้ในเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนนิวเคลียส (PBMCs) ที่แยกได้จากเลือดนอกจากจะประกอบด้วยเซลล์ที่มีนิวเคลียสกลมแล้วยังมีเซลล์ต้นกำเนิดที่พบได้ตลอดเลือดหรือน้ำเลือดชนิดที่เป็น CD34+ และ CD133+ ซึ่งมีความสามารถในการซ่อมสร้างภายในร่างกาย (Wang et al., 2019) ซึ่งแน่นอนว่าปริมาณรังสีย่อมส่งผลต่อ เซลล์ต้นกำเนิดด้วยเช่นกัน

ผลในการศึกษาต่างๆที่เกี่ยวกับการได้รับรังสีเอกซ์ในระดับปริมาณสูงอาจทำให้เกิดการทำลายเนื้อเยื่อรวมถึงดีเอ็นเอและโครโมโซม ดังนั้นการใช้รังสีจึงจำเป็นต้องให้เกิดประโยชน์สูงสุด และลดปริมาณรังสีที่ไม่จำเป็นให้กับผู้ป่วย จากข้อมูลระดับปริมาณรังสีอ้างอิงในการถ่ายภาพรังสีวินิจฉัย (diagnostic reference levels) ซึ่งเป็นหลักเกณฑ์อ้างอิงที่ใช้ในองค์การปรมาณูระหว่างประเทศ (international Atomic Energy Agency ;IAEA), สหภาพยุโรป (european Commission ;EC) และ National Radiological Protection Board (NRPB) เพื่อช่วยกำหนดและควบคุมปริมาณรังสีที่ใช้กับผู้ป่วยไม่ให้สูงเกินไป (Seidenbusch, Rösenberger, & Schneider, 2019) พบว่าระดับปริมาณรังสีอ้างอิงในการถ่ายเอกซเรย์ในท่าต่างๆ นั้น มีปริมาณรังสีที่แตกต่างกันไป พบว่าปริมาณรังสีในการถ่ายเอกซเรย์ส่วนต่างๆ เช่น Chest, Abdomen, Pelvis, Skull, Lumbar spine จะอยู่ที่ระหว่าง 0.17-8.08 mGy mGy (Compagnone et al., 2004; Edmonds, 2009) ซึ่งเป็นปริมาณรังสีที่ไม่สูงเกินไปสำหรับผู้ป่วย จุดประสงค์ในงานวิจัยในครั้งนี้จึงต้องการที่จะศึกษาผลของระดับปริมาณรังสีอ้างอิงในการถ่ายภาพรังสีวินิจฉัย (diagnostic reference levels) ในค่าที่อยู่ระหว่าง 0.17-8.08 mGy ซึ่งเป็นระดับที่ใช้ในการถ่ายเอกซเรย์ทั่วไป (plan film) และผลต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนนิวเคลียส (PBMCs) และเซลล์ต้นกำเนิดชนิด CD34⁺ และ CD133⁺ ที่เก็บจากอาสาสมัครสุขภาพดี โดยศึกษาการเปลี่ยนแปลงหลังจากเซลล์ได้รับรังสีรวมถึงการเจริญเติบโตในระดับห้องทดลอง

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย

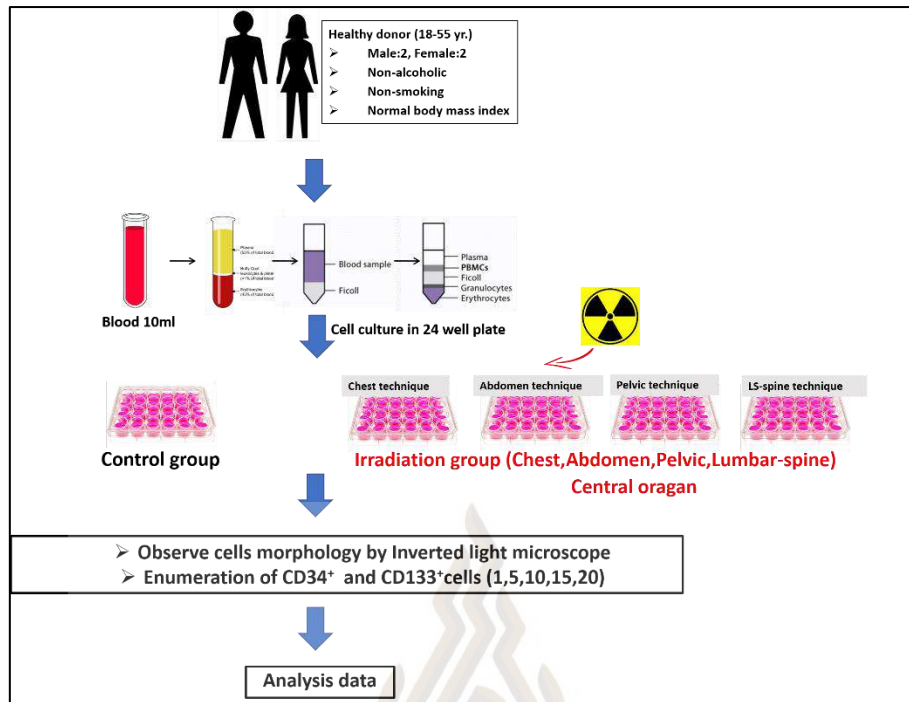
1. ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง

การคัดเลือกอาสาสมัคร โครงการวิจัยนี้ได้ผ่านการขอจริยธรรมในมนุษย์ มหาวิทยาลัยรังสิต รหัสโครงการวิจัย RSU-ERB2019/026.0702 โดยใช้อาสาสมัครซึ่งหลักเกณฑ์ในการคัดเลือกอาสาสมัครสุขภาพดี พิจารณาจากการคัดเลือกกลุ่มอาสาสมัครผู้ใหญ่ที่มีสุขภาพแข็งแรง (healthy donor) อายุ 20-30 ปี จำนวน 4 คน (เพศชาย 2 และหญิง 2 คน) ทำการเก็บเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนนิวเคลียสหรือส่วนของ buffy coat จากน้ำเลือด จำนวน 20 มิลลิลิตร (ml) ด้วยเทคนิคการปั่นเหวี่ยง (density gradient centrifugation technique)

2. เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

ระเบียบวิธีวิจัย

1. เป็นการวิจัยใน หลอดทดลอง (*in vitro*) และปฏิบัติตามจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ (ethic)
2. คัดเลือกกลุ่มอาสาสมัครผู้ใหญ่ที่มีสุขภาพแข็งแรง (healthy donor) อายุ 20-30 ปี จำนวน 4 คน (เพศชาย 2 และหญิง 2 คน) ทำการเก็บเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนนิวเคลียสหรือส่วนของ buffy coat จากหลอดเลือดดำ (peripheral blood mononuclear cells) (10ml) ด้วยเทคนิคการปั่นเหวี่ยง โดยวิธีการ Ficoll-Hypaque density gradient centrifugation ดังรูปที่ 6ดังต่อไปนี้



รูปที่ 6 ระเบียบวิธีวิจัยในการทดลอง

3. การสร้างเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

3.1. การแยกเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดียว

การแยกเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดียว (peripheral blood mononucleated cells) จากเลือดจำนวน 10 มิลลิลิตร โดยที่เป็นเลือดที่ได้ที่ได้มาจากการตรวจโรค โดยบรรจุใน lithium heparin tubes เพื่อป้องกันการแข็งตัวของเลือด จากนั้นนำเลือดไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที (rpm) เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นเก็บส่วนเฉพาะส่วนของ buffy coat และนำ buffy coat มาเจือจางในสารละลาย phosphate buffer saline (PBS) pH 7.4 แล้วค่อยๆเติมสารละลาย lymphoprep ในอัตราส่วน 1:1 แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4,000 rpm เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นดูดส่วนของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดียว ซึ่งจะมี ส่วนประกอบของเซลล์ต้นกำเนิด ชนิด CD34⁺ และ CD133⁺ นำมาล้างด้วย สารละลาย PBS pH 7.4 จากนั้นจึงเติมสารที่ทำให้เม็ดเลือดแดง (RBC lysing) เพื่อกำจัดเม็ดเลือดแดง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4000 รอบต่อนาที (rpm) เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นดูดส่วนตะกอนของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดียว แล้วนำไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ RPMI1640 ที่มีส่วนประกอบของ 10% Bovine serum และ 1% penicillin / streptomycin แล้วเก็บไว้ในตู้บ่มเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 °C, 5 % CO₂ และความชื้น (humidity) 95%

3.2. การเลี้ยงเซลล์ในระบบห้องทดลอง

เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยว จะถูกเลี้ยงที่ความเข้มข้น 10^6 cell/mL ในจานเลี้ยงเซลล์ชนิด 24-well plates with RPMI-1640 w/o L-glutamine and phenol red supplemented with 10 % human serum group O or fetal bovine serum and 1 % penicillin /streptomycin (BioMedia) at 37 °C in 5 % CO₂(g) atmosphere in a humidified incubator at 95% humidity. The cell morphology was examined under an inverted light microscope every 24 hours. The cells were counted using a flow cytometer.

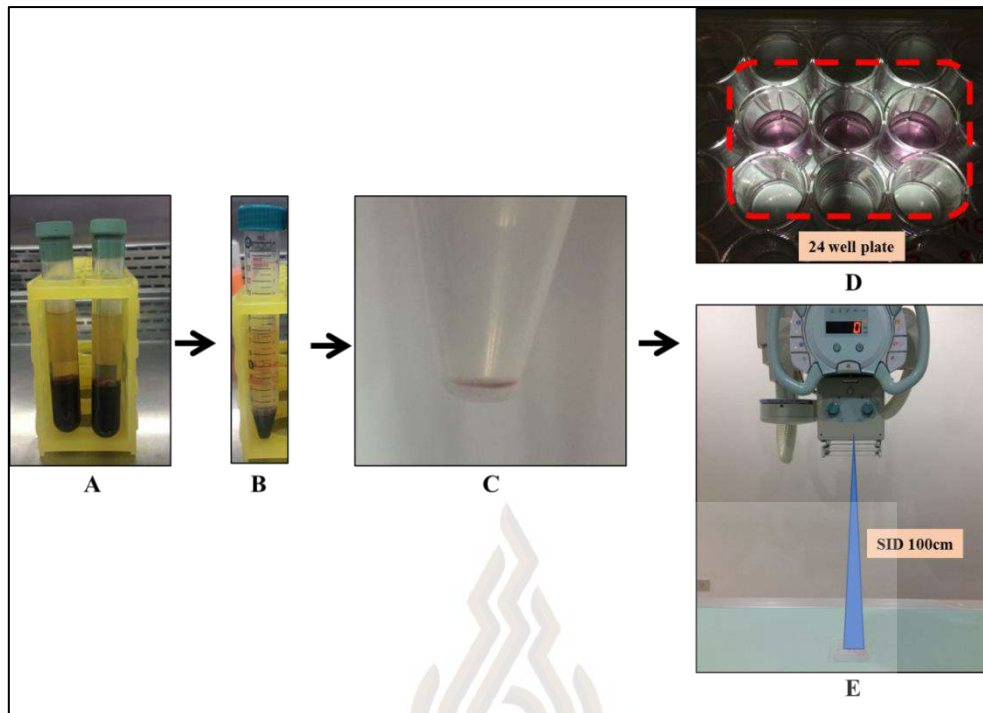
3.3. เทคนิคการฉายรังสี

เทคนิคการฉายรังสี (irradiation technique) โดยวิธีการทดลองจะแยกเซลล์ออกเป็น 2 กลุ่ม ดังตารางที่ 1 คือ
กลุ่มที่ 1 กลุ่มเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยว ชุดควบคุมไม่โดนฉายด้วยรังสีเอกซ์ และ
กลุ่มที่ 2 กลุ่มเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยว ที่ได้รับการฉายด้วยรังสีเอกซ์ปริมาณ 0.47-2.30 mGy

ตารางที่ 1 เทคนิคในการตั้งค่าเอกซเรย์และปริมาณรังสี

Organ	kV	mAs	mA	sec	mGy
Chest	110	5	100	0.05	0.47
Pelvis	70	20	200	0.1	0.71
Abdomen	90	20	200	0.1	1.16
Lumbar spine	90	40	200	0.2	2.30

โดยใช้ระยะระหว่างหลอดเอกซเรย์ถึงเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยวที่เลี้ยงอยู่ในจานเพาะเลี้ยงชนิด 24 well plate ที่ระยะ 100 เซนติเมตร ดังรูปที่ 7



รูปที่ 7 เทคนิคการฉายรังสี a.เลือดหลังจากการปั่นเหวี่ยง b.เมื่อเติม lymphoprep แล้วปั่นเหวี่ยง c.ตะกอนเซลล์ d.เลี้ยงเซลล์ใน 24 well plate e.ใช้ระยะจากหลอดเอกซเรย์ถึงตำแหน่งงานเพราะเลี้ยงเซลล์ที่ระยะ 100 เซนติเมตร

3.4. เทคนิคการย้อมเซลล์ antibodies CD34 CD133

ดูดเซลล์ที่อยู่ในจานเพาะเลี้ยงชนิด 24-well plate ที่ความเข้มข้น 10^6 cell/mL จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7000 รอบต่อนาที (rpm) เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นเก็บส่วนเฉพาะส่วนของตะกอนแล้วไปล้างด้วย PBS 1 รอบแล้วปั่นเหวี่ยงต่อที่ความเร็ว 7000 รอบต่อนาที (rpm) เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นเติม PBS 200 ul และ CD34 10ul , CD133 1ul และนำไปปั่นในที่มีด ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปวัดสัญญาณด้วย Flow cytometer

4. การเก็บรวบรวมข้อมูล

ศึกษาลักษณะ morphology ทั่วไปของเซลล์ เช่น cell membrane, nucleus โดยกล้อง Inverted light microscope และศึกษาการเปลี่ยนแปลงจำนวนและอัตราส่วน (ratio) ของเซลล์ต้นกำเนิดในหลอดเลือดระหว่างชนิด $CD34^+$ และ $CD133^+$ โดยใช้ Anti- $CD34^+$ -FITC และ Anti- $CD133^+$ -PE ที่ 1,5,10 และ 15 วัน โดยเครื่อง flow cytometer

การเก็บข้อมูล ศึกษาลักษณะรูปร่างเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนนิวเคลียสโดยกล้อง Inverted light microscope และศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ต้นกำเนิดในหลอดเลือดชนิด $CD34^+$ และ $CD133^+$ ที่ 1, 5,10 และ 15 วัน

5. การวิเคราะห์ข้อมูล

การวิเคราะห์ข้อมูลจะมีทั้งเชิงคุณภาพ โดยดูปัจจัยจากลักษณะของเซลล์ (morphology, cell membrane, nucleus) และเชิงปริมาณโดยศึกษาการเปลี่ยนแปลงจำนวนและอัตราส่วน (ratio) ของเซลล์ต้นกำเนิดหลังจากฉายรังสี โดยใช้ค่า mean, SD, หรือ ANOVA ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) วิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างกลุ่มควบคุมปกติ กับกลุ่มที่ได้รับการฉาย รังสีเอกซ์



บทที่ 4

ผลการทดลอง และอภิปรายผล

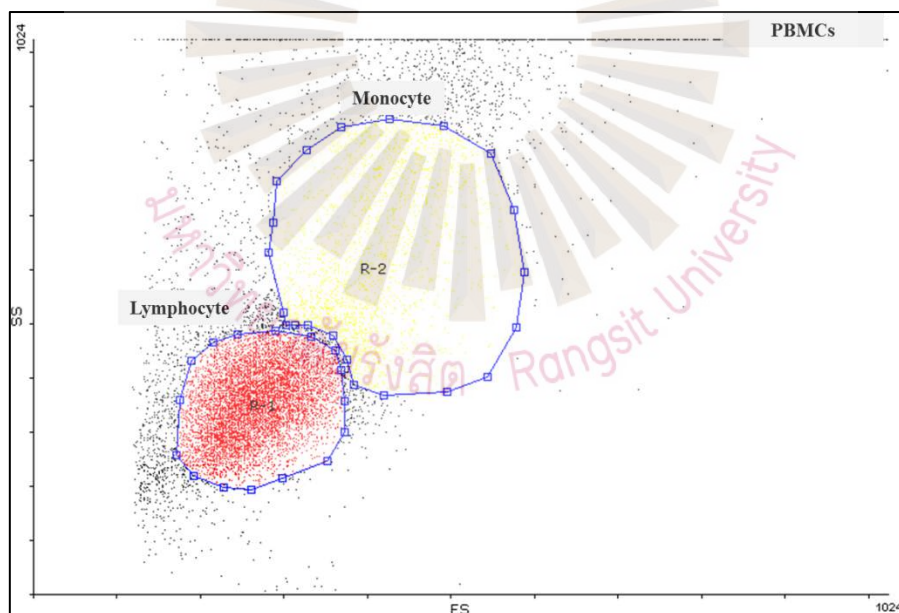
ผลการทดลอง

เทคนิคการแยก PBMCs และเทคนิคการฉายรังสี

จากเทคนิคการแยกเซลล์แบบด้วยเทคนิคการปั่นเหวี่ยง (density gradient centrifugation technique) จากเลือด 20 มิลลิลิตร พบว่าจะได้เซลล์ประมาณ 20×10^6 เซลล์ โดยทำการเลี้ยงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ 24 well plate และแบ่งกลุ่มสำหรับควบคุมและสำหรับฉายรังสีเอกซเรย์

ลักษณะของ PBMCs ที่เก็บจากเลือดของอาสาสมัครสุขภาพดี

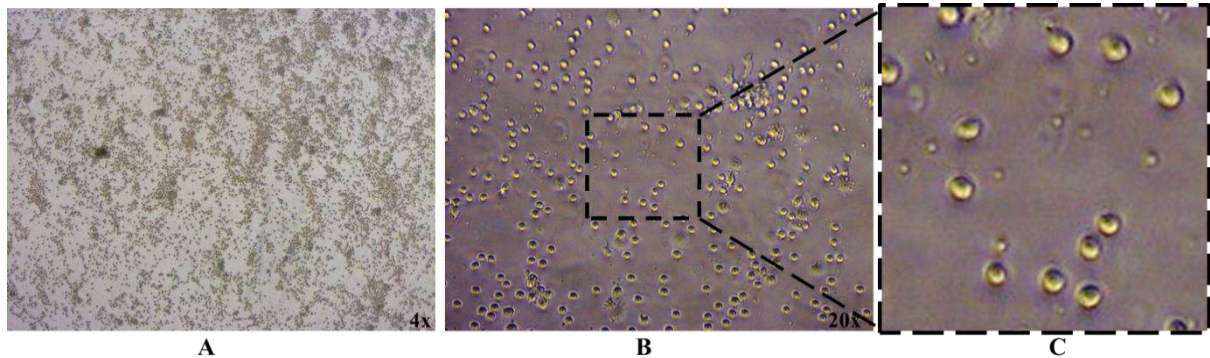
ลักษณะของ PBMCs เมื่อวัดโดยเครื่อง flow cytometer พบว่าสามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม คือ lymphocytes และ monocyte ดังรูปที่ 8 แสดงขนาดของ lymphocyte จะมีขนาดค่อนข้างเล็กกว่า monocyte



รูปที่ 8 ลักษณะของ Peripheral blood mononuclear cells โดยใช้เครื่อง flow cytometer

โดยที่ลักษณะของรูปร่างเซลล์ที่แยกโดยเทคนิค density gradient centrifugation technique เมื่อส่องจากกล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ (inverted microscope) จะพบว่าเซลล์มีลักษณะกลม (spherical shape) ดัง

รูปที่ 9 และที่ 1 ชั่วโมงยังคงพบว่าลักษณะเซลล์ยังมีลักษณะกลม ไม่มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างทั้งในกลุ่ม control และกลุ่มฉายรังสี ดังรูปที่ 10



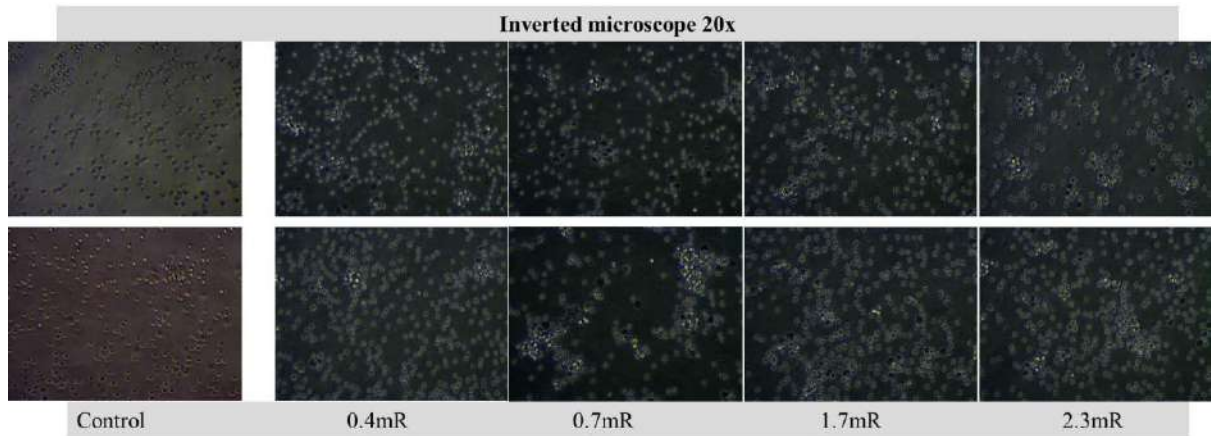
รูปที่ 9 ลักษณะของเซลล์หลังจากการแยกโดยเทคนิค density gradient centrifugation technique และส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ (inverted microscope) a.ที่กำลังขยาย 4x B.ที่กำลังขยาย 10x และ C. เมื่อขยายภาพจะเห็นเซลล์มีลักษณะกลม

ลักษณะของ PBMCs ที่เก็บจากเลือดของอาสาสมัครสุขภาพดี หลังจากฉายรังสี

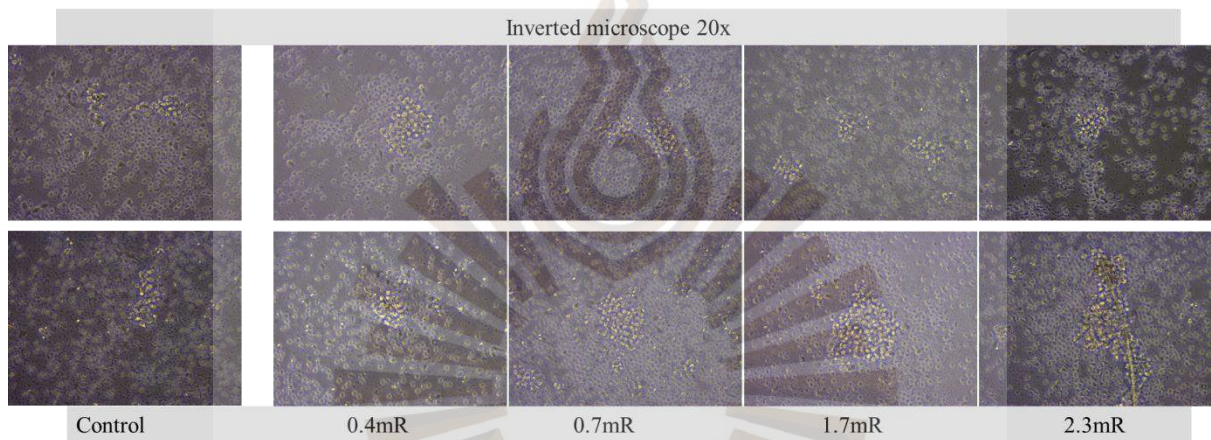
เมื่อทำการฉายรังสีเอกซเรย์ดังเทคนิคในตารางที่ 1 พบว่าในวันที่ 1 (24 ชั่วโมง) ลักษณะของเซลล์กลุ่มควบคุม และในกลุ่มที่ฉายรังสีเอกซเรย์ มีลักษณะที่คล้ายๆกัน และพบว่ามีกลุ่มเซลล์ที่เกิดการรวมตัวกันเป็นกลุ่มๆ ดังรูปที่ 11

และในวันที่ 5, 10, 15 และ 20 ดังรูปที่ 12-15 พบว่าเซลล์มีลักษณะการรวมตัวกันมากขึ้นซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของเซลล์ต้นกำเนิด (colony of stem cells) และเซลล์มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง (differentiation) ไปเป็นลักษณะเฉพาะ เช่น stromal cells, mesenchymal cells

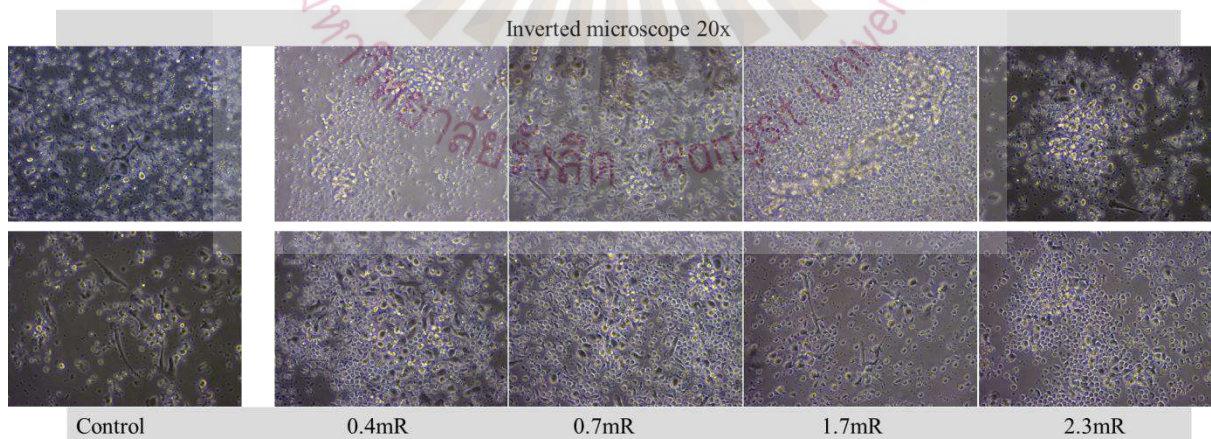
เมื่อทำการดูดส่วนของอาหารเลี้ยงเซลล์ออกในวันที่ 20 ดังรูปที่ 16 พบว่า จะมีเซลล์ส่วนที่ยังติดอยู่กับจานเพาะเลี้ยงเซลล์เรียกว่า เซลล์เกาะ (adherent cells) และเซลล์ลอย (suspension cells) คือส่วนที่ดูดทิ้งไป พบว่าทั้งในกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ฉายรังสีเอกซเรย์ปริมาณต่างๆ มีรูปร่างแบบการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง รวมถึงพบเซลล์เกาะขนาดใหญ่ในกลุ่มควบคุม ซึ่งปริมาณรังสีอาจจะมีผลต่อลักษณะการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์เกาะและเซลล์ลอย



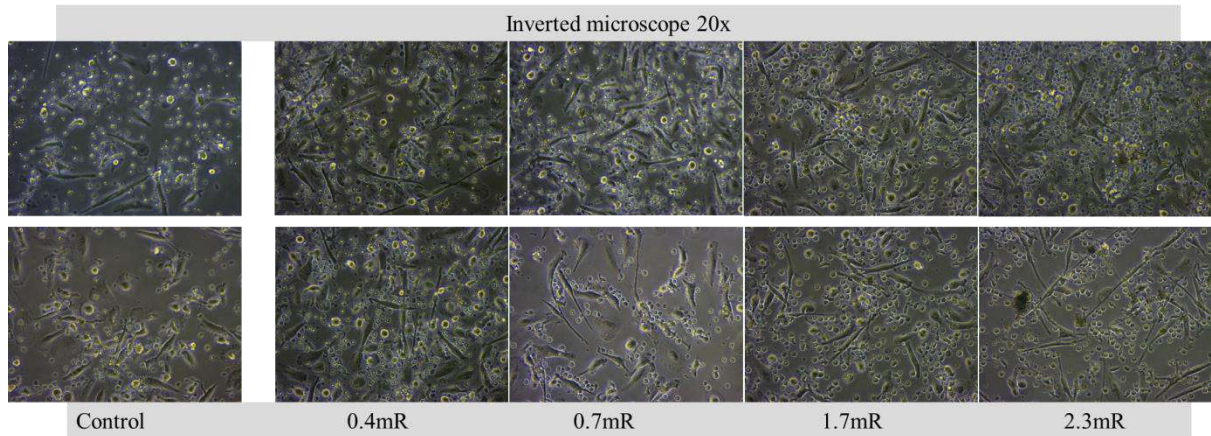
รูปที่ 10 ที่ 1 ชั่วโมง ลักษณะของเซลล์ระหว่างกลุ่ม control และกลุ่มฉายรังสีด้วยปริมาณต่างๆ



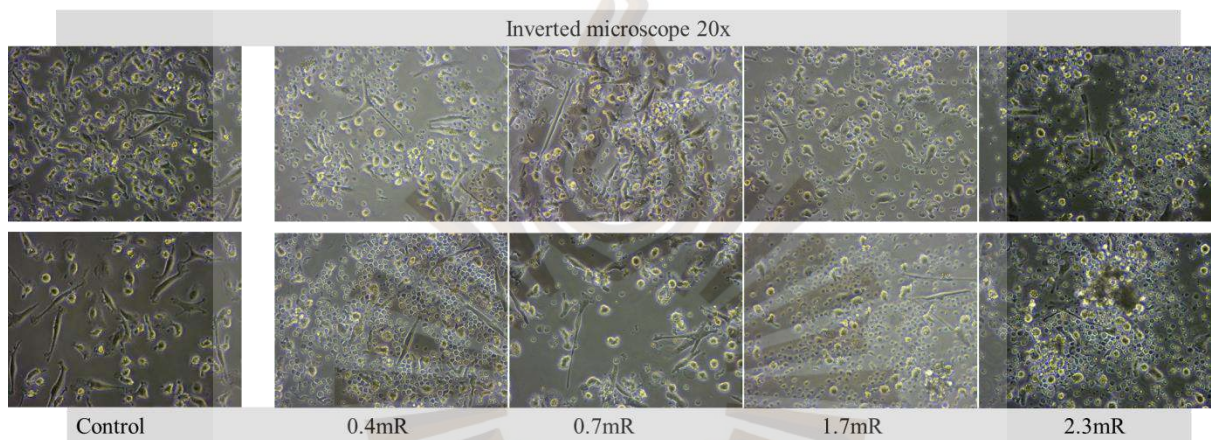
รูปที่ 11 วันที่ 1 ลักษณะของเซลล์ระหว่างกลุ่ม control และกลุ่มฉายรังสีด้วยปริมาณต่างๆ



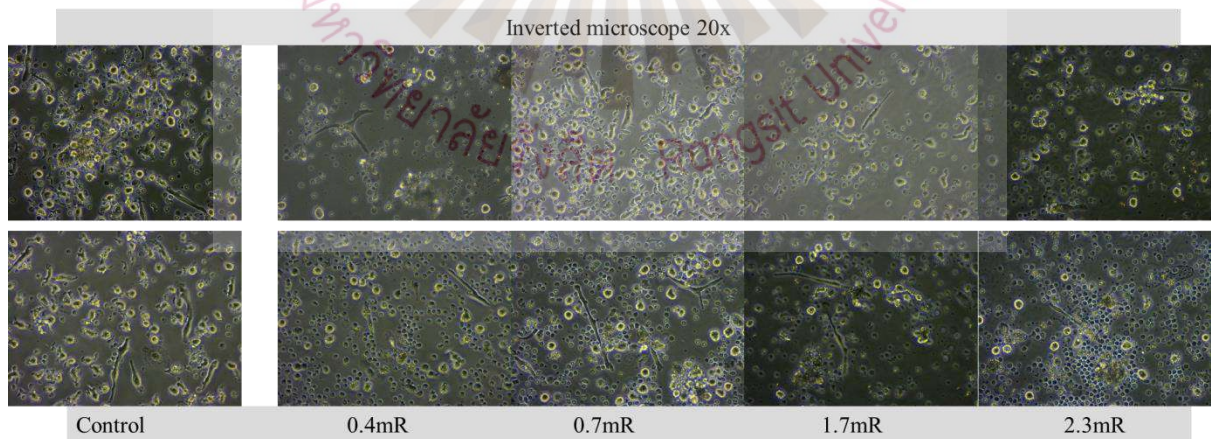
รูปที่ 12 วันที่ 5 ลักษณะของเซลล์ระหว่างกลุ่ม control และกลุ่มฉายรังสีด้วยปริมาณต่างๆ



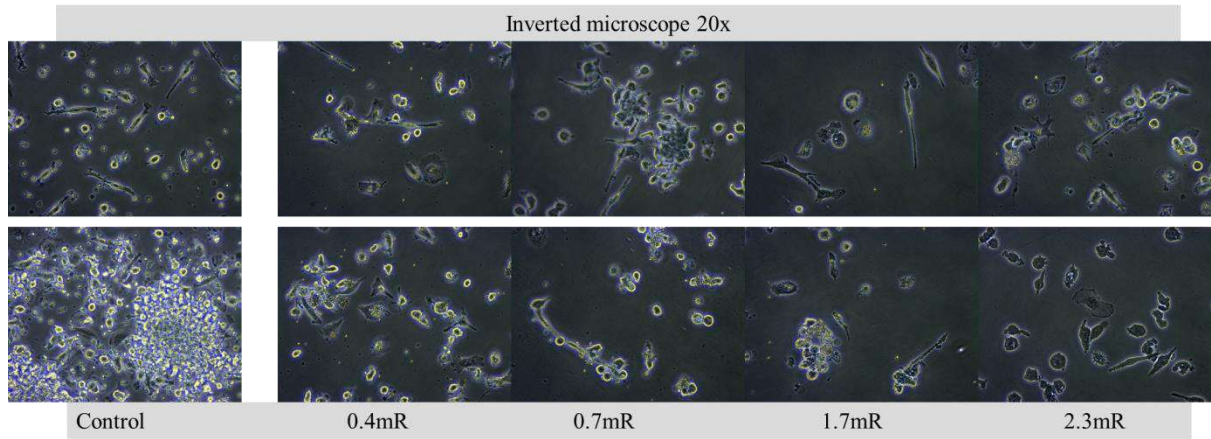
รูปที่ 13 วันที่ 10 ลักษณะของเซลล์ระหว่างกลุ่ม control และกลุ่มฉายรังสีด้วยปริมาณต่างๆ



รูปที่ 14 วันที่ 15 ลักษณะของเซลล์ระหว่างกลุ่ม control และกลุ่มฉายรังสีด้วยปริมาณต่างๆ



รูปที่ 15 วันที่ 20 ลักษณะของเซลล์ระหว่างกลุ่ม control และกลุ่มฉายรังสีด้วยปริมาณต่างๆ



รูปที่ 16 วันที่ 20 ลักษณะของเซลล์ระหว่างกลุ่ม control และกลุ่มฉายรังสีด้วยปริมาณต่างๆ โดยเอาอาหารเลี้ยงเซลล์ออก



การย้อม Anti-CD34⁺-FITC และ Anti-CD133⁺-PE กับ PBMCs

ทำการย้อมเซลล์จำนวน 10⁶ เซลล์กับ Anti-CD34⁺-FITC และ Anti-CD133⁺-PE เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มฉายรังสีที่เทคนิคต่างๆ โดยข้อมูลแสดงดังตารางที่ 2

ตาราง 2 เปอร์เซ็นต์ในการติด Anti-CD34⁺-FITC และ Anti-CD133⁺-PE

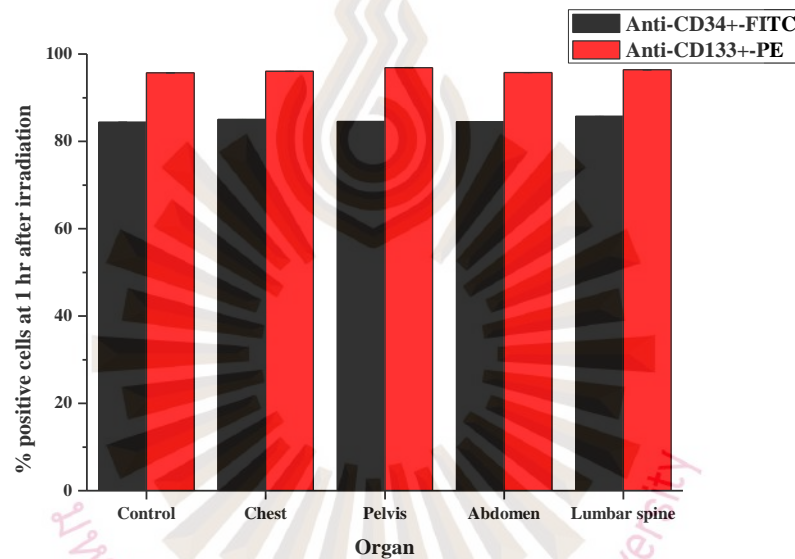
Time	Technique	% positive cells staining (CD34 ⁺)	% positive cells staining (CD133 ⁺)
1 ชั่วโมง	Control	84.35	95.67
	Chest (0.47 mGy)	84.99	96.04
	Pelvis (0.71 mGy)	84.52	96.89
	Abdomen (1.16 mGy)	84.49	95.75
	Lumbar spine (2.30 mGy)	85.71	96.39
24 ชั่วโมง	Control	85.63	78.35
	Chest (0.47 mGy)	91.11	97.37
	Pelvis (0.71 mGy)	85.75	95.45
	Abdomen (1.16 mGy)	91.35	97.38
	Lumbar spine (2.30 mGy)	91.37	97.37
Day 5	Control	99.62	95.47
	Chest (0.47 mGy)	89.76	96.64
	Pelvis (0.71 mGy)	89.86	96.42
	Abdomen (1.16 mGy)	88.73	97.16
	Lumbar spine (2.30 mGy)	91.88	97.73
Day 10	Control	95.65	96.20
	Chest (0.47 mGy)	92.94	96.94
	Pelvis (0.71 mGy)	91.51	96.03
	Abdomen (1.16 mGy)	93.14	96.79
	Lumbar spine (2.30 mGy)	92.29	95.44
Day 15	Control	93.85	72.31
	Chest (0.47 mGy)	96.77	96.27
	Pelvis (0.71 mGy)	97.90	84.54
	Abdomen (1.16 mGy)	75.39	64.60
	Lumbar spine (2.30 mGy)	96.37	90.43

และเมื่อทำการวิเคราะห์ผล เมื่อทำการย้อมเซลล์ที่ 1 ชั่วโมง จะพบว่าเปอร์เซ็นต์การย้อมเซลล์มีสัดส่วนการติด CD34 จะมีน้อยกว่า CD133 ทั้งในกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่โดนฉายรังสีด้วยเทคนิคต่างๆ โดยเปอร์เซ็นต์ของ CD34=84.35-85.71% และ CD133=95.75-96.89 ดังแผนภูมิที่ 1

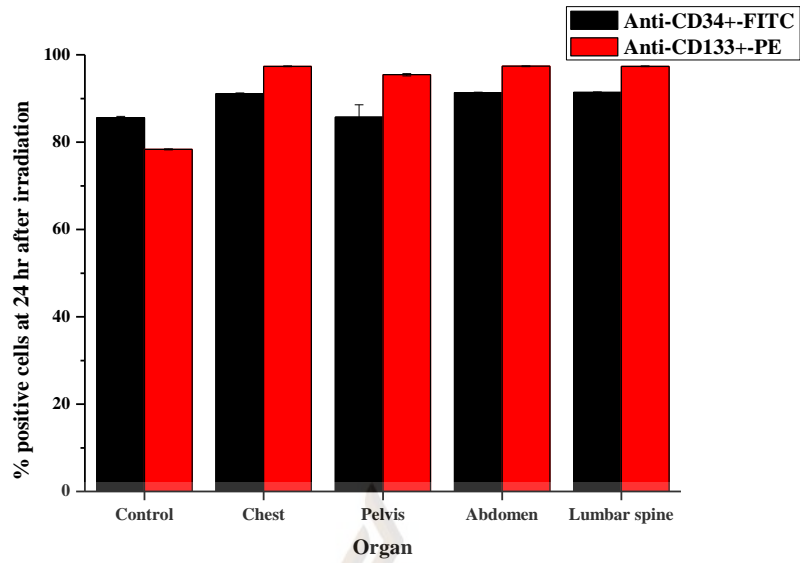
ที่ 24 ชั่วโมง และ 5 วัน พบว่าเปอร์เซ็นต์ของ Anti-CD34⁺-FITC มากกว่า Anti-CD133⁺-PE ในกลุ่มชุดควบคุม แต่ในกลุ่มที่ฉายรังสีด้วยเทคนิค chest, pelvis, abdomen, lumbar spine มีเปอร์เซ็นต์ Anti-CD133⁺-PE มากกว่า Anti-CD34⁺-FITC ดังแผนภูมิที่ 2 และ 3

วันที่ 10 พบว่ามีเปอร์เซ็นต์ของ Anti-CD34⁺-FITC (91.51-95.65%) น้อยกว่า Anti-CD133⁺-PE (95.44-96.94%) ซึ่งผลการทดลองจะคล้ายๆกับในช่วง 1 ชั่วโมงหลังจากการฉายรังสี ดังแผนภูมิที่ 4

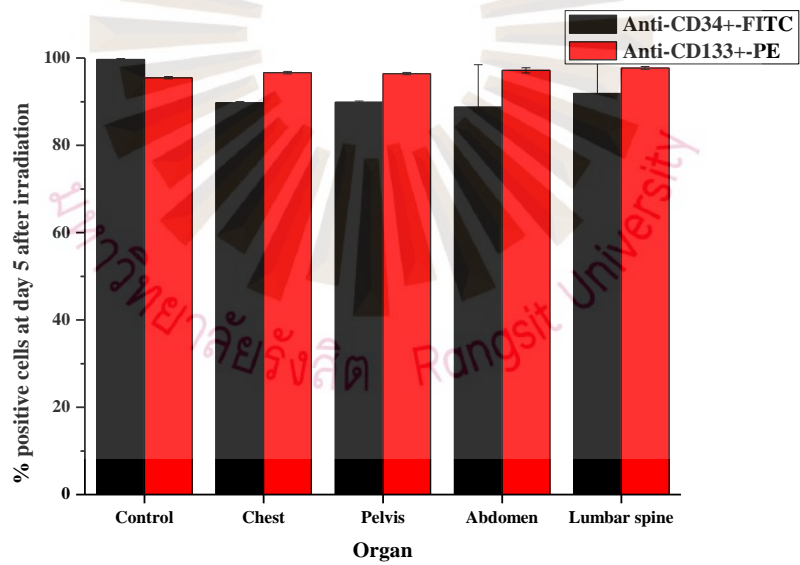
วันที่ 15 พบว่ามีเปอร์เซ็นต์ของ Anti-CD34⁺-FITC มากกว่า Anti-CD133⁺-PE ทั้งในกลุ่มชุดควบคุม และกลุ่มที่ฉายรังสี ดังแผนภูมิที่ 5



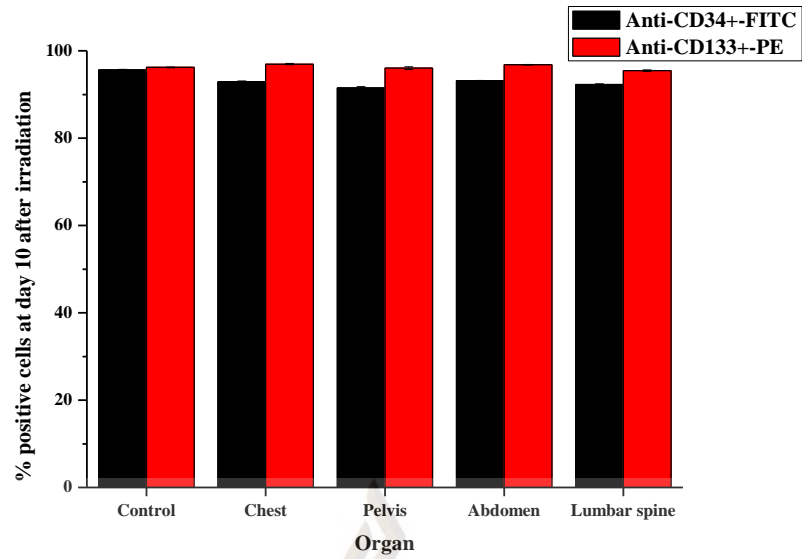
แผนภูมิที่ 1 เปอร์เซ็นต์การย้อมติด Anti-CD34⁺-FITC และ Anti-CD133⁺-PE ที่เวลา 1 ชั่วโมงหลังจากการฉายรังสี



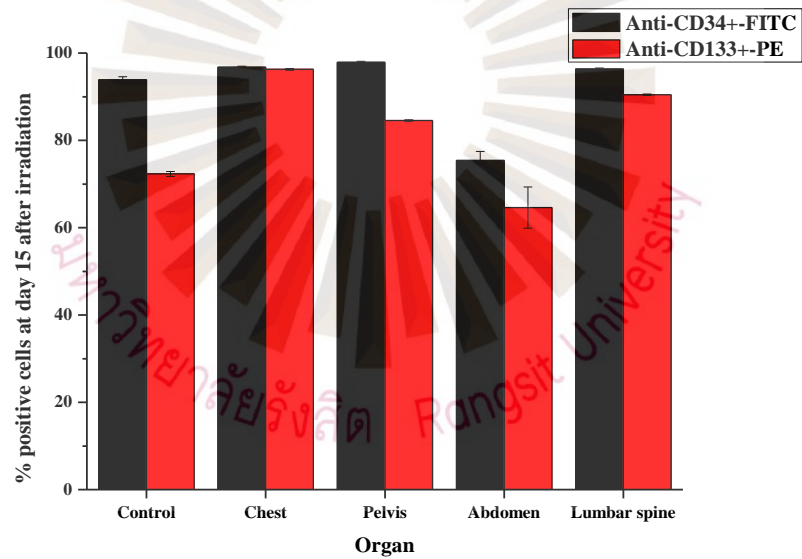
แผนภูมิที่ 2 เปรียบเทียบการย้อมติด Anti-CD34⁺-FITC และ Anti-CD133⁺-PE ที่เวลา 24 ชั่วโมง หรือ 1 วัน หลังจากการฉายรังสี



แผนภูมิที่ 3 เปรียบเทียบการย้อมติด Anti-CD34⁺-FITC และ Anti-CD133⁺-PE ที่เวลา 5 วันหลังจากการฉายรังสี



แผนภูมิที่ 4 เปรูเซ็นการย้อมติด Anti-CD34⁺-FITC และ Anti-CD133⁺-PE ที่เวลา 10 วันหลังจากการฉายรังสี day 10



แผนภูมิที่ 5 เปรูเซ็นการย้อมติด Anti-CD34⁺-FITC และ Anti-CD133⁺-PE ที่เวลา 15 วันหลังจากการฉายรังสี

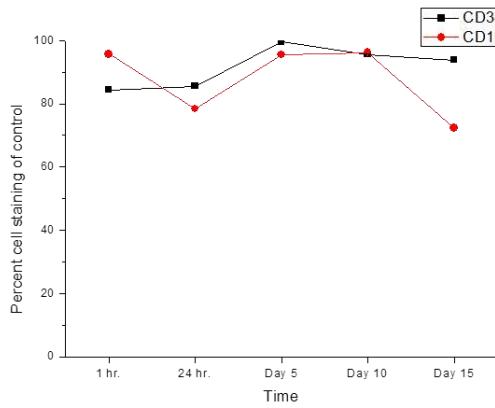
จะเห็นได้ว่าจากผลการทดลองตั้งแต่ที่ 1 ชั่วโมง จนถึงเวลา 15 วัน เซลล์ที่ย้อมติด Anti-CD34⁺-FITC มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในขณะที่ Anti-CD133⁺-PE ลดลงโดยเรียงจากกลุ่มควบคุมไปยังกลุ่มได้รับรังสี และยังพบว่าการให้ปริมาณรังสีโดยอ้างอิงจากระดับ diagnostic reference level โดยเรียงจากการให้ระดับปริมาณรังสีน้อยที่สุดไปมากที่สุด คือ การถ่ายเอกซเรย์ด้วยเทคนิคการถ่ายปอด (chest (0.47 mGy)), การถ่ายเอกซเรย์ด้วยเทคนิคการถ่ายอุ้งเชิงกราน (pelvis (0.71 mGy)), การถ่ายเอกซเรย์ด้วยเทคนิคการถ่ายช่องท้อง (abdomen (1.16 mGy)) และการถ่ายเอกซเรย์ด้วยเทคนิคการถ่ายกระดูกสันหลังส่วนบั้นเอว (lumbar spine (2.30 mGy)) มีแนวโน้มเปอร์เซ็นต์การย้อมติด Anti-CD34⁺-FITC เพิ่มขึ้น

ในผลการทดลองเพื่อดูการติด Anti-CD34⁺-FITC และ Anti-CD133⁺-PE พบว่าจากกราฟในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ฉายด้วยรังสีเทคนิคต่างๆมีการติด Anti-CD34⁺-FITC และ Anti-CD133⁺-PE อยู่ในช่วง 60 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป และสัดส่วนการติดจะใกล้เคียงกันทั้งสองกลุ่ม ในช่วงเวลา 1 ชั่วโมงถึง 15 วัน

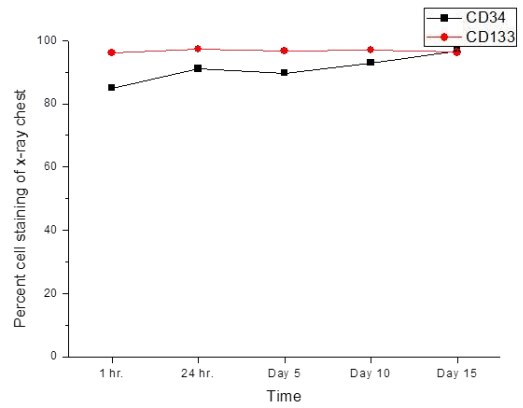
แต่ในกลุ่มที่ฉายรังสีด้วยเทคนิคการถ่ายเอกซเรย์ปอด (chest technique) พบว่าเปอร์เซ็นต์ในการติด Anti-CD34⁺-FITC และ Anti-CD133⁺-PE มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.04$) จากรูปที่

17

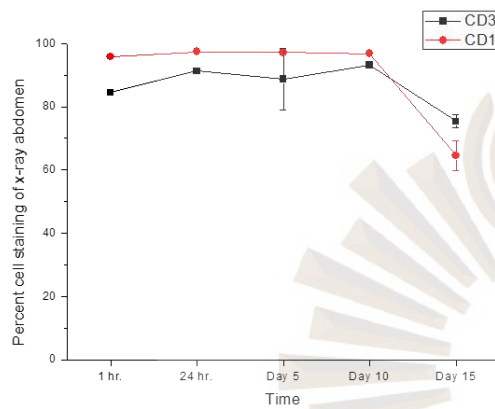




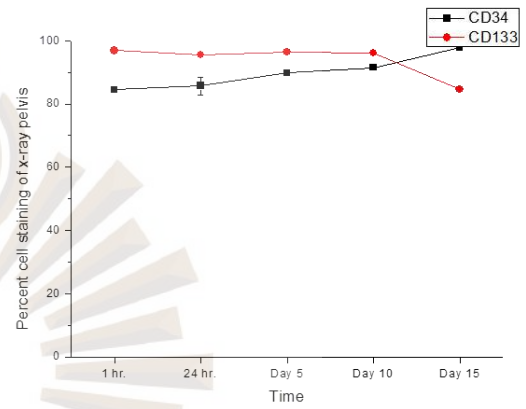
control



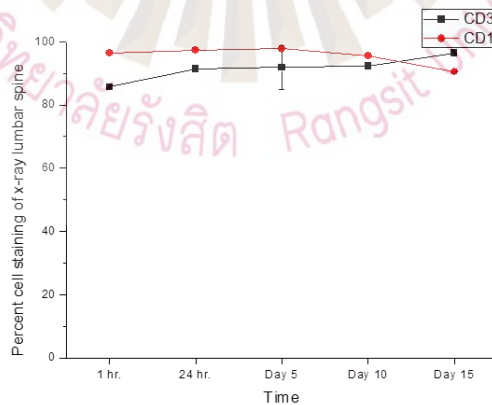
Chest x-ray 0.47 mGy



Abdomen x-ray 0.71 mGy



Pelvis x-ray 1.16 mGy

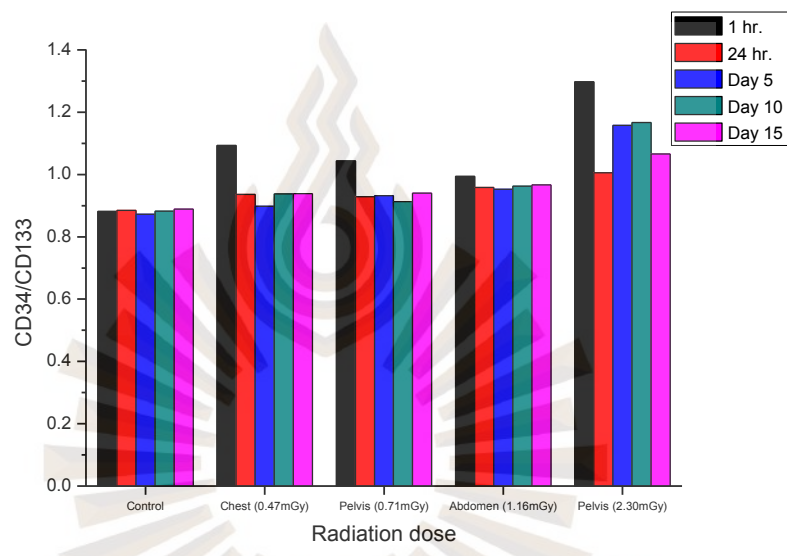


Lumbar spine x-ray 2.30 mGy

รูปที่ 17 เปรียบเทียบ Anti-CD34⁺-FITC และ Anti-CD133⁺-PE เมื่อแยกตามการให้ปริมาณรังสี ในช่วงเวลา 1 ชั่วโมง, 24 ชั่วโมง, 5 วัน, 10 วัน และ 15 วัน

สัดส่วนการติด Anti-CD34⁺-FITC และ Anti-CD133⁺-PE กับ PBMCs

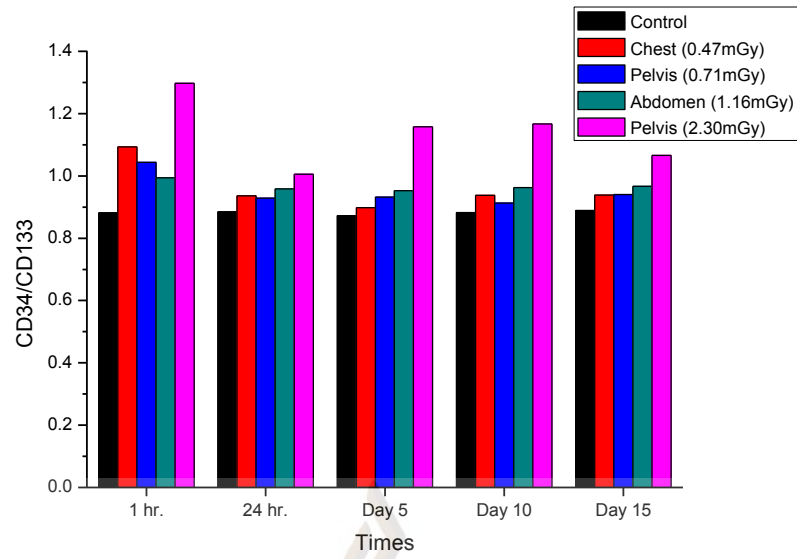
เทคนิคการฉายรังสีด้วยเทคนิคต่างๆ ซึ่งจะมีระดับปริมาณรังสีที่แตกต่างกัน มีผลต่อสัดส่วนการติด Anti-CD34⁺-FITC และ Anti-CD133⁺-PE ต่อ PBMCs ทั้งในกลุ่มควบคุมที่ไม่ฉายรังสีและกลุ่มที่ฉายรังสี โดยพบว่าสัดส่วน Anti-CD34⁺-FITC และ Anti-CD133⁺-PE ในกลุ่มควบคุมเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ฉายรังสี มีความแตกต่างกันในการถ่ายเอกซเรย์อุ้งเชิงกราน (pelvis x-ray) การถ่ายเอกซเรย์ช่องท้อง (abdomen x-ray) และการถ่ายเอกซเรย์กระดูกส่วนบนเอว (lumbar spine x-ray) โดยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.04, 0.0002$ และ 0.007) แต่ไม่พบความแตกต่างกันระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ฉายรังสีด้วยการเอกซเรย์ทรวงอก (chest x-ray) ซึ่งมีปริมาณรังสีน้อยที่สุด ดังแผนภูมิที่ 6



แผนภูมิที่ 6 สัดส่วน Anti-CD34⁺-FITC และ Anti-CD133⁺-PE ที่ปริมาณรังสีต่างๆ

ซึ่งผลการทดลองดังกล่าว แสดงให้เห็นว่าการถ่ายเอกซเรย์ด้วยเทคนิคต่างๆ จะมีปริมาณรังสีที่สูงขึ้น เรียงจากน้อยที่สุด คือการถ่ายเอกซเรย์ทรวงอก (chest x-ray) ส่วนการถ่ายเอกซเรย์อุ้งเชิงกราน (pelvis x-ray) การถ่ายเอกซเรย์ช่องท้อง (abdomen x-ray) และการถ่ายเอกซเรย์กระดูกส่วนบนเอว (lumbar spine x-ray) ปริมาณรังสีจะเพิ่มขึ้นตามลำดับที่ 0.47, 0.71, 1.16 และ 2.30 mGy ซึ่งปริมาณรังสีที่สูงขึ้นสัมพันธ์กับสัดส่วนการติด Anti-CD34⁺-FITC และ Anti-CD133⁺-PE โดยที่ปริมาณรังสีที่สูงขึ้น จะพบสัดส่วน Anti-CD34⁺-FITC และ Anti-CD133⁺-PE ที่ติดกับ PBMCs แตกต่างกับกลุ่มที่ไม่ได้รับการฉายรังสีที่ช่วงเวลา 1 ชั่วโมง ถึง 15 วัน

และสัดส่วนการติด Anti-CD34⁺-FITC และ Anti-CD133⁺-PE จะพบว่า การติด Anti-CD34⁺-FITC จะมีเปอร์เซ็นต์การติดน้อยกว่า Anti-CD133⁺-PE ในช่วงในช่วงเวลา 1 ชั่วโมง ถึง 10 วัน แต่ในวันที่ 15 จะพบเปอร์เซ็นต์การติด Anti-CD34⁺-FITC มากกว่า Anti-CD133⁺-PE โดยการเปลี่ยนแปลงในดังกล่าวจะเห็นได้อย่างชัดเจนในกลุ่มที่ได้รับการฉายรังสี ดังแผนภูมิที่ 7



แผนภูมิที่ 7 สัดส่วน Anti-CD34⁺-FITC และ Anti-CD133⁺-PE ที่ช่วงเวลา 1 ชั่วโมง, 24 ชั่วโมง, 5 วัน, 10 วัน และ 15 วัน



บทที่ 5

สรุป วิจัย และข้อเสนอแนะ

สรุป

จากผลการทดลองเพื่อดูระดับปริมาณรังสีที่ใช้ในทางการแพทย์โดยรังสีวินิจฉัย ซึ่งจัดว่าเป็นปริมาณรังสีในระดับปริมาณต่ำ และมีการใช้กันอย่างกว้างขวางในทางการแพทย์ เพื่อสร้างภาพทางการแพทย์เพื่อวินิจฉัยโรค แต่ผลสำหรับในระดับเซลล์ยังคงมีการศึกษากันอย่างต่อเนื่องในระดับห้องทดลอง (*in vitro*)

จากการศึกษานี้ทำให้ทราบว่า ผลของรังสีที่อ้างอิงจากระดับปริมาณรังสีอ้างอิงในการถ่ายภาพรังสีวินิจฉัย (diagnostic reference levels) ที่เป็นการใช้ถ่ายเอกซเรย์ในส่วนอวัยวะหลักของร่างกาย ซึ่งได้แก่ การถ่ายเอกซเรย์ทรวงอก, อุ้งเชิงกราน, ช่องท้อง และกระดูกสันหลังส่วนบั้นเอว ว่ามีผลต่อระดับเซลล์อย่างไร ในด้านลักษณะการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ (morphology) และการเปลี่ยนแปลงของระดับ CD34⁺ และ CD133⁺ ต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยว

พบว่าในด้านผลของรังสีที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ ปริมาณรังสีสำหรับการถ่ายเอกซเรย์ทรวงอก, อุ้งเชิงกราน, ช่องท้อง และกระดูกสันหลังส่วนบั้นเอว ที่ระดับ 0.47, 0.71, 1.16 และ 2.30 mGy มีต่อเซลล์ที่ระยะเวลา 20 วัน ล้วนส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์โดยเฉพาะในวันที่ 20 ที่มีการนำอาหารเลี้ยงเซลล์ออกแล้วสังเกตลักษณะเซลล์ จะพบ adherent cells หรือเซลล์เกาะในกลุ่มควบคุมที่ไม่ฉายรังสีมากกว่ากลุ่มฉายรังสี ดังรูปที่ 16

และเมื่อทำการศึกษาสัดส่วนการเปลี่ยนแปลงของ CD34⁺ และ CD133⁺ มี โดยพบว่าในช่วงเวลาที่เปลี่ยนแปลงไป CD34⁺ โดยจะพบในกลุ่มพวก hematopoietic stem cells มีเปอร์เซ็นต์ที่สูงขึ้น ส่วน CD133⁺ โดยจะพบในกลุ่มพวก mesenchymal stem cells มีเปอร์เซ็นต์ที่ลดลง เมื่อเก็บผลการทดลองตั้งแต่ 1 ชั่วโมงถึง 15 วันหลังจากฉายรังสี ซึ่งสอดคล้องกับ ลักษณะเซลล์ที่มีการเปลี่ยนแปลงไปเป็น adherent cell หรือ เซลล์เกาะเพิ่มมากขึ้น ทำให้การวัดโดย flow cytometer พบว่ามีจำนวนของกลุ่ม

จากการเปรียบเทียบข้อมูลทางสถิติ ในกลุ่มที่ฉายรังสีด้วยเทคนิคการถ่ายเอกซเรย์ปอด (chest technique) พบว่าเปอร์เซ็นต์ในการติด Anti-CD34⁺-FITC และ Anti-CD133⁺-PE มีความแตกต่างกันอย่างมี

นัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.04$) จากรูปที่ 17 ซึ่งเป็นระดับปริมาณรังสีที่น้อยที่สุดคือ 0.47 mGy

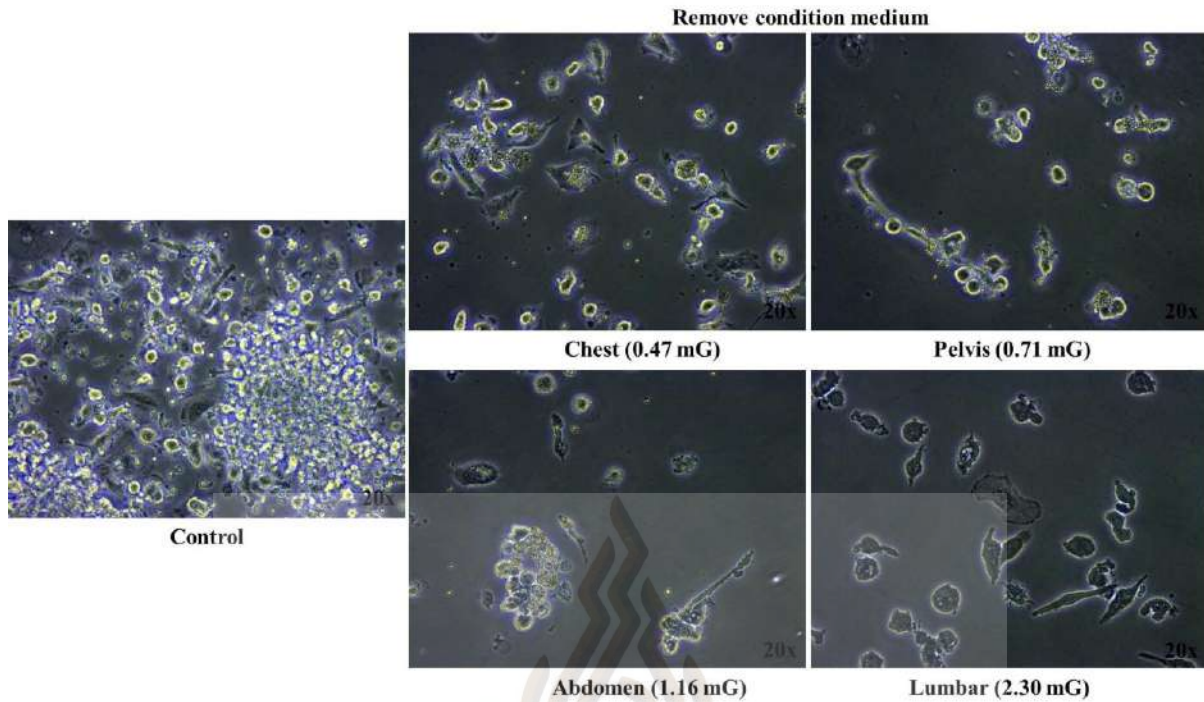
ส่วนในกลุ่มควบคุมเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ฉายรังสี มีความแตกต่างกันในการถ่ายเอกซเรย์อุ้งเชิงกราน (pelvis x-ray) การถ่ายเอกซเรย์ช่องท้อง (abdomen x-ray) และการถ่ายเอกซเรย์กระดูกส่วนบั้นเอว (lumbar spine x-ray) โดยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.04, 0.0002$ และ 0.007) แต่ไม่พบความแตกต่างกันระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ฉายรังสีด้วยการเอกซเรย์ทรวงอก (chest x-ray) ซึ่งมีปริมาณรังสีน้อยที่สุด ดังแผนภูมิที่ 8 จากผลการทดลองกล่าว จึงสรุปได้เกี่ยวกับปริมาณรังสีที่เพิ่มขึ้นอาจส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงต่อสัดส่วนของ CD34⁺ และ CD133⁺ โดยมีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุมหรือกลุ่มที่ไม่ได้รับการฉายรังสี

สรุปการทดลองในครั้งนี้จึงได้ข้อสรุปเกี่ยวกับผลของรังสีในทางวินิจัย อาจมีผลต่อระดับเซลล์ ซึ่งใช้เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยวเป็นตัวแทนของเซลล์ปกติ และพบว่า ระดับปริมาณรังสีระดับต่ำ ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์เมื่อศึกษาในระยะเวลา ช่วง 20 วันหลังจากฉายรังสี และผลต่อการเปลี่ยนแปลงสัดส่วน CD34⁺ และ CD133⁺ ซึ่งเป็นเซลล์ในกลุ่มจำพวกเซลล์ต้นกำเนิดชนิด hematopoietic stem cell ที่เป็นต้นกำเนิดของเซลล์เม็ดเลือด และ mesenchymal stem cells ที่เป็นต้นกำเนิดเซลล์กล้ามเนื้อและกระดูก ผลจากปริมาณรังสีดังกล่าว อาจจะมีการส่งผลกระทบต่อระดับเซลล์ต้นกำเนิด

วิจารณ์

ในการศึกษาทดลองครั้งนี้ไม่ได้ทำการฉายรังสีในสภาพที่เซลล์มีอาหารเลี้ยงเซลล์อยู่ในจานเพาะเลี้ยง ซึ่งในงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่ามีอาหารเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์แบบต่างๆ (condition medium) เช่น การใช้แยกเซลล์มาเลี้ยงใน PBS แล้วนำไปฉายรังสี หรือการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ได้อาหารจำพวกโปรตีน (free serum) (Marques et al., 2019) ในลักษณะการเลี้ยงเซลล์แบบต่างๆ อาจส่งต่อการทดลอง โดยพบว่าอาหารเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบไปด้วยโปรตีนแล้วนำไปกระตุ้นด้วยปัจจัยต่างๆ โปรตีนอาจมีส่วนช่วยในการยับยั้งสารอนุมูลอิสระ (free radical) ที่เกิดขึ้นในระบบ (Sovernigo et al., 2017)

ในงานวิจัยนี้พบว่าการเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบไปด้วย fetal bovine serum โปรตีนนี้อาจมีส่วนทำให้ลักษณะของรูปร่างเซลล์คล้ายๆกันในกลุ่มควบคุมและฉายรังสี โดยพบว่ามีลักษณะของ colony of stem cells รวมถึงการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ เนื่องด้วยโปรตีนที่อยู่ในระบบอาจส่งผลการกระตุ้นต่างๆ จากปัจจัยภายนอก (Guo et al., 2019) และการเปลี่ยนแปลงของรูปร่างเซลล์ในวันที่ 20 พบว่ามีลักษณะของเซลล์เกาะที่มีขนาดใหญ่ในกลุ่มควบคุม ซึ่งอาจจะบ่งบอกได้ว่า ปริมาณรังสีที่ระดับต่างๆ อาจจะมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเซลล์ไปเป็นแบบ adherent cells ดังรูปที่ 18



รูปที่ 18 ลักษณะของเซลล์ระหว่างกลุ่ม control และกลุ่มฉายรังสีด้วยปริมาณต่างๆ โดยเอาอาหารเลี้ยงเซลล์ออก ในวันที่ 20 หลังจากฉายรังสี

และรวมถึงผลจากการศึกษาเป็นการใช้รังสีในปริมาณต่ำทางรังสีวินิจฉัยต่อการแสดงออกของสัดส่วน $CD34^+$ ต่อ $CD133^+$ แตกต่างจากกลุ่มที่ไม่ได้รับรังสี เมื่อใช้ปริมาณรังสีจากเทคนิคการถ่ายเอกซเรย์ด้วยเทคนิคการถ่ายอุ้งเชิงกราน (pelvis (0.71 mG)), การถ่ายเอกซเรย์ด้วยเทคนิคการถ่ายช่องท้อง (abdomen (1.16 mG)) และ การถ่ายเอกซเรย์ด้วยเทคนิคการถ่ายกระดูกสันหลังส่วนบั้นเอว (lumbar spine (2.30 mG)) แต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงในการถ่ายเอกซเรย์ด้วยเทคนิคการถ่ายปอด (chest (0.47 mG)) และสามารถเห็นการเปลี่ยนแปลงลักษณะรูปร่างของเซลล์จากการตอบสนองต่อรังสีได้

ข้อเสนอแนะ

โดยการศึกษาในครั้งนี้เป็นการศึกษาในระดับห้องทดลอง (*in vitro*) โดยเฉพาะการเปลี่ยนแปลงระดับเซลล์ที่เกิดจากการใช้เอกซเรย์ซึ่งอาจจะเป็นตัวกระตุ้นให้เกิดโรคต่างๆตามมาได้ รวมถึงกระบวนการทดลองมีการศึกษาทั้งในลักษณะ morphology ของเซลล์ที่เปลี่ยนแปลง รวมถึงศึกษาเกี่ยวกับลักษณะทางกายภาพของเซลล์ โดย flow cytometer และ มีการศึกษาค้นคว้าอย่างแพร่หลาย โดยผู้วิจัยยังเลือกที่จะศึกษาในเม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยว (peripheral blood mononuclear cells) เพราะสามารถเป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพและเลือกใช้เฉพาะเซลล์ที่มาจากอาสาสมัครสุขภาพดี สามารถจัดเก็บได้ง่าย เพื่อจะได้เป็นข้อมูลที่เป็นประโยชน์สำหรับต่องานวิจัยสำหรับทำในกลุ่มผู้ป่วยโรคต่างๆทางการแพทย์ที่เข้ารับบริการทางรังสีวินิจฉัย

และเหตุผลที่ทำการศึกษาทดลองภายในระดับห้องทดลองแทนการใช้เซลล์จากผู้ป่วยที่ถูกเอกซเรย์จริงๆ เนื่องจากการใช้เซลล์จากอาสาสมัครหรือผู้ป่วยจริงอาจเกิดความยุ่งยาก และจะมีปัจจัยเกี่ยวสภาวะร่างกายของผู้ป่วยแต่ละคน ซึ่งอาจจะมีสภาวะรอยโรคชนิดต่างๆ แตกต่างกัน อาจส่งผลต่อเซลล์ที่เก็บมาจากตัวผู้ป่วยโดยตรง ซึ่งจะทำให้ผลการทดลองแปรปรวน รวมถึงอาจใช้เวลาในการศึกษาเป็นเวลานาน งานวิจัยนี้จึงต้องการศึกษาผลของรังสีที่มีต่อเซลล์ในระดับห้องทดลองก่อนในเบื้องต้น เพื่อให้เห็นแนวโน้มของผลจากการฉายเอกซเรย์ โดยงานวิจัยนี้จึงน่าจะเป็นประโยชน์สำหรับใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานหรือตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ (biomarker) ก่อนที่จะนำไปประยุกต์ ในระดับคลินิกต่อไปในอนาคต



เอกสารอ้างอิง

- Azimi, S., Mozdarani, H., & Mahmoudzadeh, A. (2017). Induction of DNA damage, apoptosis and micronuclei in peripheral blood lymphocytes following injection of contrast media in patients with abdominal CT scan. *International Journal of Radiation Research*, 15(2), 149-155.
- Compagnone, G., Pagan, L., & Bergamini, C. (2004). Local diagnostic reference levels in standard X-ray examinations. *Radiation Protection Dosimetry*, 113(1), 54-63.
- Edmonds, K. (2009). Diagnostic reference levels as a quality assurance tool. *Radiographer*, 56(3), 32-37.
- El Naqa, I., Kerns, S. L., Coates, J., Luo, Y., Speers, C., West, C. M., . . . Ten Haken, R. K. (2017). Radiogenomics and radiotherapy response modeling. *Physics in Medicine & Biology*, 62(16), R179.
- Guo, S., Liu, S., Bou, G., Guo, J., Jiang, L., Chai, Z., . . . Liu, Z. (2019). Fetal bovine serum promotes the development of in vitro porcine blastocysts by activating the Rho-associated kinase signalling pathway. *Reproduction, Fertility and Development*, 31(2), 366-376.
- Hall, J., Jeggo, P. A., West, C., Gomolka, M., Quintens, R., Badie, C., . . . Azimzadeh, O. (2017). Ionizing radiation biomarkers in epidemiological studies—an update. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 771, 59-84.
- KERN, L. K., C. FORSTER, M.-H. SEEGENSCHMIEDT, R. SAUER, M. HERRMANN, P. (1999). In vitro apoptosis in peripheral blood mononuclear cells induced by low-dose radiotherapy displays a discontinuous dose-dependence. *International journal of radiation biology*, 75(8), 995-1003.
- Marques, F. G., Poli, E., Rino, J., Pinto, M. T., Diegues, I., Pina, F., & Rosa Santos, S. C. (2019). Low Doses of Ionizing Radiation Enhance the Angiogenic Potential of Adipocyte Conditioned Medium. *Radiation research*, 192(5), 517-526.
- Moore, B. M. (2017). A review of the fundamental principles of radiation protection when applied to the patient in diagnostic radiology. *Radiation Protection*

Dosimetry, 175(1), 1-9.

Moreels, M., Baselet, B., Van Hoey, O., Vanhavere, F., & Baatout, S. (2020). Stress and radiation responsiveness *Stress Challenges and Immunity in Space* (pp. 373-404): Springer.

Seeram, E., & Brennan, P. C. (2016). *Radiation protection in diagnostic X-ray imaging*: Jones & Bartlett Publishers.

Seidenbusch, M., Rösenberger, V., & Schneider, K. (2019). Normalized Organ Doses in Tables *Imaging Practice and Radiation Protection in Pediatric Radiology* (pp. 901-903): Springer.

Sovernigo, T., Adona, P., Monzani, P., Guemra, S., Barros, F., Lopes, F., & Leal, C. (2017). Effects of supplementation of medium with different antioxidants during in vitro maturation of bovine oocytes on subsequent embryo production. *Reproduction in Domestic Animals*, 52(4), 561-569.

Wang, P., Zhang, H., Li, Z., Liu, X., Jin, Y., Lei, M., . . . Guo, W. (2019). Low-Dose Radiation Promotes the Proliferation and Migration of AGE-Treated Endothelial Progenitor Cells Derived from Bone Marrow via Activating SDF-1/CXCR4/ERK Signaling Pathway. *Radiation research*, 191(6), 518-526.

Zhang, M., & Huang, B. (2012). The multi-differentiation potential of peripheral blood mononuclear cells. *Stem cell research & therapy*, 3(6), 48.



ภาคผนวก
ประวัติผู้วิจัย



คำนำหน้า นาย นาง นางสาว

ตำแหน่งทางวิชาการ ศ. รศ. ผศ. อื่นๆ

ชื่อผู้วิจัย นัฐพงษ์

นามสกุลผู้วิจัย มุลคำ

ชื่อภาษาอังกฤษ NUTTHAPONG

นามสกุลภาษาอังกฤษ MOONKUM

วัน/เดือน/ปี เกิด

ที่อยู่(บ้าน) 149/26 หมู่ 5 ต.สุเทพ อ.เมือง จ.เชียงใหม่ 50200

จังหวัด(บ้าน) เชียงใหม่

รหัสไปรษณีย์(บ้าน) 50200

โทรศัพท์(บ้าน) -

แฟกซ์(บ้าน) -

ที่อยู่(ที่ทำงาน) คณะรังสีเทคนิค มหาวิทยาลัยรังสิต 52/347 พหลโยธิน 87 ถ.พหลโยธิน อ.เมือง

จังหวัด(ที่ทำงาน) ปทุมธานี

รหัสไปรษณีย์(ที่ทำงาน) 12000

โทรศัพท์(ที่ทำงาน) 02-791-6000 ต่อ 1723

แฟกซ์(ที่ทำงาน) 02-791-6000 ต่อ 1723

E-Mail Address: Nutthapong.m@rsu.ac.th

ปริญญาตรี

สาขา วิทยาศาสตร์บัณฑิต (รังสีเทคนิค)

ปีที่จบ 2550

สถาบัน คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ประเทศ ไทย

ปริญญาโท

สาขา วิทยาศาสตร์รังสีการแพทย์

ปีที่จบ 2557

สถาบัน คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
ประเทศไทย

ปริญญาเอก

สาขา วิทยาศาสตร์ชีวการแพทย์

ปีที่จบ 2561

สถาบัน คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
ประเทศไทย

ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์วารสารภายในประเทศ

-

ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์วารสารต่างประเทศ

Kantapan, J., Moonkum, N., Jaruchainiwat, S., Suttana, W., Sangthong, P., & Mankhetkorn, S. (2016). Characteristics of Peripheral Blood Stem Cells: 2D-Gel Electrophoresis and Kinetic Parameter of Exocytosis. *Current Biomarkers (Formerly: Recent Patents on Biomarkers)*, 6(2), 113-123.

Moonkum, N., Chaichana, A., Kantakhum, P., Malimart, C., Piyachon, C., Chananpanich, N., & Mankhetkorn, S. (2018). Siamois Polyphenols as Circulating Endogenous Stem Cell Regulators: Primordial Sources for Repair and Regeneration of Tissue in vivo. *The Open Biomarkers Journal*, 8(1).

ผลงานที่ได้นำเสนอในการประชุมวิชาการภายในประเทศ

-

ผลงานวิจัยที่นำเสนอในการประชุมวิชาการในต่างประเทศ

-

ผลงานวิจัยที่ได้รับรางวัล

-

บทความทางวิชาการที่ตีพิมพ์ในวารสาร

-

สาขาวิชาที่นักวิจัยเชี่ยวชาญ

- 1) Molecular imaging
- 2) Radiobiology
- 3) Radiation protection
- 4) Adult stem cells

