



อภิธานนาการ

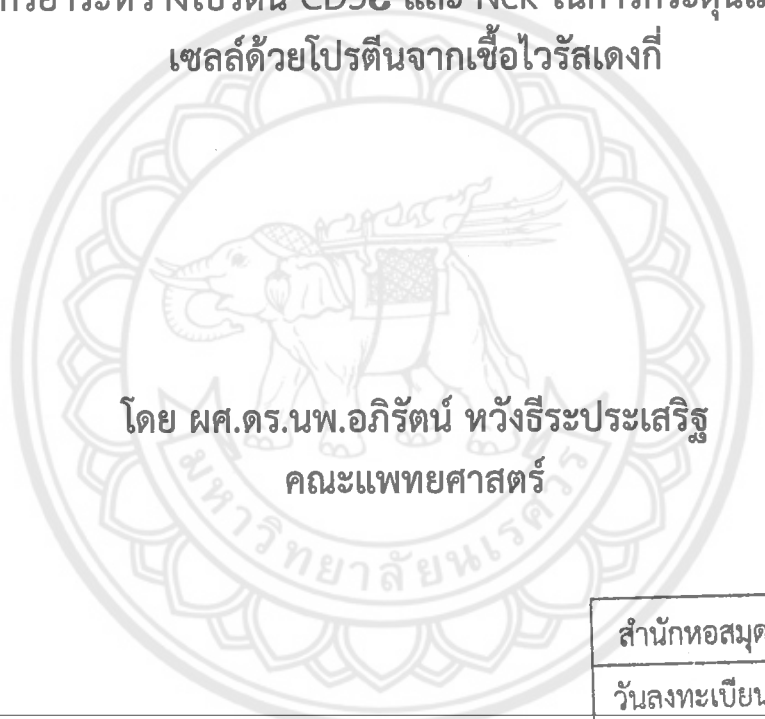
สัญญาเลขที่ R2560B043

สำนักหอสมุด

# รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง ปฏิบัติการระหว่างโปรตีน CD3E และ Nck ในการกระตุ้นเม็ดเลือดขาวที่  
เซลล์ด้วยโปรตีนจากเชื้อไวรัสแดงกี

โดย ผศ.ดร.นพ.อภิรัตน์ หวังธีระประเสริฐ  
คณะแพทยศาสตร์



สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยนเรศวร
วันลงทะเบียน..... 3 มี.ค. 2565
เลขทะเบียน..... 1049211
เลขเรียกหนังสือ..... ๙๙
ชั้น..... ๒๒๒

•D๙  
๐๒๖๒๕  
๒๕๖๐

สนับสนุนโดย  
งบประมาณรายได้มหาวิทยาลัยนเรศวร  
ปีงบประมาณ 2560

## กิตติกรรมประกาศ

โครงการนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยนเรศวร ประจำปี ๒๕๖๐ รหัสโครงการ R2560B043



## แบบฟอร์มบทย่อยมหาวิทยาลัยนเรศวร

### ส่วนที่ 1 รายละเอียดเกี่ยวกับโครงการวิจัย

ชื่อโครงการ ปฏิกริยาระหว่างโปรตีน CD3E และ Nck ในการกระตุ้นเม็ดเลือดขาวที่เซลล์ด้วยโปรตีนจากเชื้อไวรัสเดงกี (The CD3E-Nck interaction in T cell activation by dengue peptide variants.)

ชื่อผู้วิจัย ผศ.ดร.นพ.อภิรัตน์ หวังธีระประเสริฐ

หน่วยงานที่สังกัด คณะแพทยศาสตร์

หมายเลขโทรศัพท์ 0839599997

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยสาขา วิทยาศาสตร์สุขภาพ

งบประมาณแผ่นดิน หรืองบประมาณรายได้ ประจำปี 2560

จำนวนเงิน 341,000 บาท ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี

ตั้งแต่ 1 ตุลาคม 2559 ถึง 30 กันยายน 2560

### ส่วนที่ 2 บทคัดย่อ

ไข้เลือดออก หรือ dengue hemorrhagic fever (DHF) เป็นโรคติดเชื้อรุนแรงเกิดจากการติดเชื้อไวรัสเดงกีที่พบในประเทศเขตร้อนชื้นในหลายทวีป ซึ่งเด็กและผู้ใหญ่ที่เป็นโรคนี้อาจมีอันตรายถึงชีวิต การติดเชื้อซ้ำที่เรียกว่า secondary infection จากเชื้อไวรัสเดงกีต่างซีโรไทป์เป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้เกิดภาวะ DHF เชื่อว่าการตอบสนองของ T cell ในระหว่างการติดเชื้อมีบทบาทสำคัญต่อการดำเนินโรคในการติดเชื้อเฉียบพลัน แต่กลไกนี้ยังไม่เป็นที่เข้าใจทั้งหมด แม้จะทราบว่ามีปฏิกิริยา cross-reactive ของ memory T cells ซึ่งอาจจะหลั่งสารไปทำลายเซลล์ได้มากขึ้นขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง เช่น ลำดับการติดเชื้อไวรัสแต่ละซีโรไทป์ การตอบสนองของ T cell ต่อการติดเชื้อนั้น T cell จะใช้ T cell receptor (TCR) ในการจับกับตัวกระตุ้นคือ antigenic peptide ที่อยู่กับโมเลกุล major histocompatibility complex (pMHC) ที่ผิวเซลล์ของเซลล์ antigen presenting cells (APC) ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างโปรตีนของโมเลกุล CD3 ของ TCR/CD3 complex เกี่ยวข้องกับการเผยแพร่โปรตีนส่วนที่มี proline-rich sequence (PRS) ที่จับกับโปรตีนตัวปรับชนิดหนึ่งคือ non-catalytic region of tyrosine kinase หรือ Nck ปรากฏการณ์นี้มีความสำคัญต่อการกระตุ้น T cell อย่างไรก็ตาม กลไกที่กล่าวมานี้ไม่เป็นที่เข้าใจกันดีนัก ดังนั้นโครงการวิจัยนี้จึงศึกษาในส่วนการเกิดการกระตุ้นของ T cell ต่อการติดเชื้อไวรัสเดงกีเพื่อนำไปสู่ความเข้าใจพื้นฐานของการตอบสนองของ T cell ต่อการเกิดโรคไข้เลือดออกได้มากขึ้นต่อไป

### Abstract

Dengue hemorrhagic fever (DHF), a severe form of dengue infection, is a serious infectious disease in tropical and subtropical areas and can cause a life-threatening condition especially in infected children. The secondary infection from different serotype is a major risk for DHF. Many studies support the role of T cells during acute infection. However, it is not known how T cells dictate the severity of disease. Cross-reactive memory T cells perform less degranulation and more cytokine production depending on sequential dengue infection and its peptide variants may contribute to the severity of disease. T cell responses to invading pathogens using T cell receptor (TCR) as it recognizes antigenic peptide presented on major histocompatibility complex (pMHC) molecule expressed on antigen presenting cells (APC). Upon binding of the TCR to pMHC complex, the conformational change in CD3 allows a proline-rich sequence (PRS) to bind to Nck (non-catalytic region of tyrosine kinase), this interaction is crucial for T cell activation. However, this process may not be required for

functional T cell response to high avidity agonist peptide but may be essential for the response to weak or low-avidity ligand. Thus, it is of interest to study the early signaling involving the conformational change of the CD3 and the adapter protein Nck upon TCR engagement with dengue peptide variants.



## สารบัญ

กิตติกรรมประกาศ	2
บทคัดย่อ	3
Abstract	3
บทนำ	6
วัตถุประสงค์ของโครงการ	8
วิธีดำเนินการวิจัย	8
ผลการวิจัย	9
ข้อวิจารณ์และข้อเสนอแนะ	9
บรรณานุกรม	11
Output ที่ได้จากโครงการ	13
ภาคผนวก บทความที่ได้รับการเผยแพร่	



## บทนำ

### Dengue infection

This mosquito-borne infectious disease is caused by Dengue virus (DENV) which is a single stranded RNA from family Flaviviridae. This virus is divided into 4 serotypes, DENV1, DENV2, DENV3 and DENV4, according to the difference in amino acid sequence around 30% among them (Henchal and Putnak, 1990, Fu et al., 1992). However, the difference in sequence is enough to initiate the immunity to one serotype but cannot fully protect the host from the other serotypes. Dengue virus contains 3 structural proteins: C (core), M (membrane) and E (envelope), and 7 non-structural proteins: NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b, and NS5 (around 3390 amino acids) (Weaver and Vasilakis, 2009).

Dengue infected patients can be asymptomatic or develop a mild form of disease. Most patients are diagnosed as “undifferentiated fever” if they have only abrupt onset of fever. The clinical manifestation of Dengue fever (DF) includes high fever, severe headache, muscle and bone or joint pain. Most patients complain of nausea, vomiting and loss of appetite. A maculopapular rash may appear after fever subsides.

Dengue hemorrhagic fever (DHF) is defined by high grade fever, thrombocytopenia (platelet count less than 100,000/ml), hemorrhagic manifestation (bleeding per gum, GI bleeding, etc.) and plasma leakage which can be detected in patients who have hemoconcentration, pleural effusion or ascites. The most severe form of DHF is defined as Dengue shock syndrome (DSS) if DHF patients have narrow pulse pressure (<20 mmHg) and hypotension (WHO, 2012).

### T cell responses in dengue infection

T cells start its defense mechanism when their T cell receptors recognize dengue epitopes binding to MHC molecules. Most of dengue epitopes are reported from NS3 protein, although they are found in all dengue proteins (Vaughan et al., 2010). Previous study showed that the highest T cell responses were obtained from NS3 protein stimulation (Duangchinda et al., 2010). Many researchers have studied to explore the role of T-cells in pathogenesis of dengue infection especially in secondary infection. Many clinical studies showed evidence of T cell activation during the early phase of disease. For example, the detection of CD69 expression which is the activation marker of T cells, and other markers of CD8+ T cell activation, such as soluble CD8 and soluble interleukin-2 receptor (IL-2R) levels in DHF patients (Green et al., 1999, Kurane et al., 1991, Vaughn et al., 2000). The phenomenon termed ‘original antigenic sin’ in T-cell was recognized by Mongkolsapaya et al. as they found naïve T-cells are poorly prompted to attack the currently infecting DENV serotype and the response is instead dominated by cross-reactive T-cells induced during the primary infection (Mongkolsapaya et al., 2003). The subsequent study showed that these cross-reactive memory CD8+ T cells performed predominant cytokine production than cytotoxicity (Mongkolsapaya et al., 2006). Another study has shown that elevated TNF- $\alpha$  was found in sera from acute dengue infected patients and induced apoptosis of endothelial cells in vitro (Cardier et al., 2005). DHF patients had significantly higher level of TNF- $\alpha$  than that in DF patients (Vitarana et al., 1991). Both pieces of evidence of T cell activation and proinflammatory cytokine release may lead to vascular leakage in DHF.

### T cell activation

T cell activation initiates immediately after TCR engages the peptide-MHC complexes which causes an extracellular assembly of TCR and immunological synapse formation. The intracellular event is started by the phosphorylation of the ITAMs contained within the cytoplasmic domain of TCR subunits (Love and Hayes, 2010, Irving and Weiss, 1991). A Syk family tyrosine kinase named ZAP-70 is recruited to phosphorylated ITAMs (Chan et al., 1992). Lck and Fyn from Src family tyrosine kinase induce phosphorylation of tyrosine residues located in ITAMs of CD3 molecules (TCR subunits) (Samelson et al., 1990, June et al., 1990). The action from both Src kinase and ZAP-70 are sufficient to trigger downstream signaling and activate many transcription factors, such as nuclear factor of activated T-cell (NFAT), nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B). The difference in activation of each transcription factor has an effect on regulating the effector functions of T cells (Kannan et al., 2012).

### Nck and T cell signaling

Nck (non-catalytic region of tyrosine kinase) is an adapter protein which consists of one SH2 domain and three SH3 domains. Nck1 and Nck2 are found in humans and have roughly 30% amino acid different (Buday et al., 2002). Generally, the term Nck protein represents both Nck1 and Nck2 protein due to their overlapping functions in murine study (Bladt et al., 2003). However, a recent study in Jurkat T cells has illustrated that Nck1 have an impact on T cell activation more than Nck2 (Ngoenkam et al., 2014). Basically, Nck protein is known as a connection between the TCR and the intracellular signaling. Gil et al. illustrated that a conformational change in CD3 $\epsilon$  occurred after TCR ligation and revealed a proline-rich sequence (PRS) to which Nck binds in CD3 $\epsilon$  chain and this protein is crucial for the formation of immune synapse and T-cell activation (Gil et al., 2002). However, Taylor et al. demonstrated that this process was not required for functional T cell response to high-avidity agonist peptide but was essential for the response to weak or low-avidity ligand using murine CD8+ T-cells (Taylor et al., 2008).

## วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

To study the Nck-related early signaling events of CD8+ T cell activated by dengue-peptide variants

## วิธีการดำเนินการวิจัย

### 1. Culture human dengue-specific CD8+ T-cell lines

Dengue specific CD8+ T-cell lines were either generated from dengue infected patients in Naresuan University hospital or kindly provided from Dr. Juthathip Mongkolsapaya, Imperial College London, UK. T-cell lines were stimulated by irradiated autologous B-cell lines that were pulsed with dengue peptide and irradiated mixed peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). These T-cell lines were stimulated every 14 days to maintain in cell culture and to perform further experiments. HLA-A\*11 restricted peptide from dengue serotype 1, 2 and 3 were used in this study. These peptides were GTSGSPIVNR (DENV1), GTSGSPIVDR (DENV2) and GTSGSPIINR (DENV3), respectively.

### 2. Detecting T-cell activation and functions

Dengue specific CD8+ T-cell lines were stimulated with irradiated autologous B-cell lines (BCL) that were pulsed with dengue peptide variants, DENV1-3. Activated T-cells were then detected its activation and functions by measuring CD69+, IFN gamma secretion and CD107a expression using Flow cytometry.

### 3. Immunoprecipitation and Western blotting

Dengue specific CD8+ T-cells were stimulated with dengue-pulsed BCL at various concentrations of peptides. Activated T-cells were lysed using lysis buffer. Cell lysates were precipitated with G-Sepharose beads and antibody for the proteins of interest, such as CD3 $\epsilon$  and Nck, as previous describe by Ngoenkam et al. Cell lysates were separated using SDS-PAGE and detected proteins of interest using specific antibody and read out by chemiluninescence assay.)



## ผลการวิจัย

The present study was in collaboration with Dr Juththip Mongkolsappaya from Faculty of Medicine Siriraj Hospital Mahidol University, Bangkok, Thailand. There was a long delay in the process of transferring the cells used in this study and the process of signing documents in MOU between collaborators. The author then had received cell lines, namely the B cell lines and T cell clones specific for Dengue virus serotypes in November 2017. These cells have been in culturing process as also frozen for further use since February 2018. The problem also occurred with using irradiation facility due to technical problems, which had made another long delay on laboratory work on T cell clones.

Nevertheless, the author had collected commercially available dengue virus peptides and now the laboratory work is on going to optimize the conditions for constructing and culturing T cell clones specific for dengue virus serotypes. In addition, Dr Sutapit Pongcharoen also kindly provided reagents for preliminary study on T cells,  $\square \square \square$  T cells and thymocytes cultures and fortunately we have got some results for manuscript that has been accepted in Proceeding of 15<sup>th</sup> Mahasarakham University Research Conference. This would be useful for the author's continual study in T cells and T cell development in the aspect of dengue virus infection as there is a plan from the author about using some T cell sub-populations and antigen presenting cells to study further on dengue virus infection and biology of the T cell response.

## ข้อวิจารณ์และข้อเสนอแนะ

Dengue virus causes a mosquito-borne infectious disease in tropical areas of the world and also in Thailand. This virus causes dengue fever (DF), mild form, and dengue hemorrhagic fever (DHF) which can be life threatening. There is an increase in dengue infected patients every year. Half of the world population or estimated 3.6 billion people live in the endemic area in 2013 (Gubler, 2011, Wilder-Smith et al., 2012). The pathogenesis of DHF is complex and not clearly understood. Epidemiological studies have shown that the majority of DHF cases occur in patients infected by different serotype in secondary infection (Sangkawibha et al., 1984, Kouri et al., 1989). This implies that the immune response, especially that of the adaptive immune system, may involve in the severity of the disease.

Memory T cells show cross-reactivity but low affinity to recent dengue infection and has acknowledged this phenomenon as "original antigenic sin" (Mongkolsapaya et al., 2003). This study suggests that dengue-specific memory T cells induced during the primary response are cross-reactive and dominating encounter the dengue antigen better than naïve T cells induced by the currently infecting dengue virus serotype. Another study has demonstrated that HLA-A\*24 restricted memory T cell lines generated from dengue patients show cytotoxic function when stimulated with peptide from dengue serotype 1 (DENV1) and 2 (DENV2), but not dengue serotype 3 (DENV3) and 4 (DENV4). These peptide sequences are QYSDRRWCF, NYADRRWCF, KYTDRKWCF and SYKDREWCF, respectively. There are

a few different amino acids among these dengue peptide variants. That study suggests that cross-reactive T cells perform less degranulation and more cytokine production depending on sequential dengue infection and its peptide variants may contribute to the severity of disease (Mongkolsapaya et al., 2006).

T cell responses to invading pathogens using T cell receptor (TCR) to recognize antigenic peptide presented on major histocompatibility complex (MHC) molecule expressed on antigen presenting cells (APC). When T cells recognize foreign peptides, they differentiate, become activated, and perform their functions, such as producing cytokines and being cytotoxic (Choudhuri et al., 2005). One factor that is responsible for the difference in the magnitude of these functions is an antigenic peptide and its peptide variants which have at least one amino acid different (Kersh and Allen, 1996, Chen et al., 2005). This leads to the difference in TCR avidity which has been demonstrated to have a good correlation to the degree of T cell activation (Gascoigne et al., 2001).

There may be at least two pathways in T cell activation after TCR engagement. One pathway is tyrosine phosphorylation of the immune receptor-tyrosine based activation motifs (ITAMs) by Src family proteins. Another pathway is the conformational change in CD3 allowing a recruitment of an adapter protein Nck (non-catalytic region of tyrosine kinase). The early signaling events also induce other adapter proteins, such as ZAP-70 and SLP-76, including many transcription factors to initiate T cell functions (Davis, 2002). It has been shown that the adaptor protein Nck involves in early T cell triggering after TCR engagement with peptide-MHC complexes. Gil et al. illustrated that a conformational change in CD3 occurred after TCR ligation and revealed a proline-rich sequence (PRS) to which Nck binds in CD3 chain and this protein is crucial for the formation of immune synapse and T cell activation (Gil et al., 2002). However, Tailor et al. demonstrated that this process was not required for functional T cell response to high avidity agonist peptide but was essential for the response to weak or low-avidity ligand using murine CD8<sup>+</sup> T-cells (Tailor et al., 2008).

According to the previous data, the early signaling events involving the conformational change of CD3 and adapter protein Nck upon TCR engagement with dengue peptide variants may play a role in various outcomes of dengue-specific T cell responses regulated by the CD3-Nck interaction.

## บรรณานุกรม


- BLADT, F., AIPPERSBACH, E., GELKOP, S., STRASSER, G. A., NASH, P., TAFURI, A., GERTLER, F. B. & PAWSON, T. 2003. The murine Nck SH2/SH3 adaptors are important for the development of mesoderm-derived embryonic structures and for regulating the cellular actin network. *Mol Cell Biol*, 23, 4586-97.
- BUDAY, L., WUNDERLICH, L. & TAMAS, P. 2002. The Nck family of adapter proteins: regulators of actin cytoskeleton. *Cell Signal*, 14, 723-31.
- CARDIER, J. E., MARINO, E., ROMANO, E., TAYLOR, P., LIPRANDI, F., BOSCH, N. & ROTHMAN, A. L. 2005. Proinflammatory factors present in sera from patients with acute dengue infection induce activation and apoptosis of human microvascular endothelial cells: possible role of TNF-alpha in endothelial cell damage in dengue. *Cytokine*, 30, 359-65.
- CHAN, A. C., IWASHIMA, M., TURCK, C. W. & WEISS, A. 1992. ZAP-70: a 70 kd protein-tyrosine kinase that associates with the TCR zeta chain. *Cell*, 71, 649-62.
- CHEN, J. L., STEWART-JONES, G., BOSSI, G., LISSIN, N. M., WOOLDRIDGE, L., CHOI, E. M., HELD, G., DUNBAR, P. R., ESNOUF, R. M., SAMI, M., BOULTER, J. M., RIZKALLAH, P., RENNER, C., SEWELL, A., VAN DER MERWE, P. A., JAKOBSEN, B. K., GRIFFITHS, G., JONES, E. Y. & CERUNDOLO, V. 2005. Structural and kinetic basis for heightened immunogenicity of T cell vaccines. *J Exp Med*, 201, 1243-55.
- CHOUDHURI, K., KEARNEY, A., BAKKER, T. R. & VAN DER MERWE, P. A. 2005. Immunology: how do T cells recognize antigen? *Curr Biol*, 15, R382-5.
- DAVIS, M. M. 2002. A new trigger for T cells. *Cell*, 110, 285-7.
- DUANGCHINDA, T., DEJNIRATTISAI, W., VASANAWATHANA, S., LIMPITIKUL, W., TANGTHAWORNCHAIKUL, N., MALASIT, P., MONGKOLSAPAYA, J. & SCREATON, G. 2010. Immunodominant T-cell responses to dengue virus NS3 are associated with DHF. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 16922-7.
- FU, J., TAN, B. H., YAP, E. H., CHAN, Y. C. & TAN, Y. H. 1992. Full-length cDNA sequence of dengue type 1 virus (Singapore strain S275/90). *Virology*, 188, 953-8.
- GASCOIGNE, N. R., ZAL, T. & ALAM, S. M. 2001. T-cell receptor binding kinetics in T-cell development and activation. *Expert Rev Mol Med*, 2001, 1-17.
- GIL, D., SCHAMEL, W. W., MONTOYA, M., SANCHEZ-MADRID, F. & ALARCON, B. 2002. Recruitment of Nck by CD3 epsilon reveals a ligand-induced conformational change essential for T cell receptor signaling and synapse formation. *Cell*, 109, 901-12.
- GREEN, S., PICHYANGKUL, S., VAUGHN, D. W., KALAYANAROOJ, S., NIMMANNITYA, S., NISALAK, A., KURANE, I., ROTHMAN, A. L. & ENNIS, F. A. 1999. Early CD69 expression on peripheral blood lymphocytes from children with dengue hemorrhagic fever. *J Infect Dis*, 180, 1429-35.
- GUBLER, D. J. 2011. Dengue, Urbanization and Globalization: The Unholy Trinity of the 21(st) Century. *Trop Med Health*, 39, 3-11.
- HENCHAL, E. A. & PUTNAK, J. R. 1990. The dengue viruses. *Clin Microbiol Rev*, 3, 376-96.
- IRVING, B. A. & WEISS, A. 1991. The cytoplasmic domain of the T cell receptor zeta chain is sufficient to couple to receptor-associated signal transduction pathways. *Cell*, 64, 891-901.
- JUNE, C. H., FLETCHER, M. C., LEDBETTER, J. A., SCHIEVEN, G. L., SIEGEL, J. N., PHILLIPS, A. F. & SAMELSON, L. E. 1990. Inhibition of tyrosine phosphorylation prevents T-cell receptor-mediated signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87, 7722-6.

- KANNAN, A., HUANG, W., HUANG, F. & AUGUST, A. 2012. Signal transduction via the T cell antigen receptor in naive and effector/memory T cells. *Int J Biochem Cell Biol*, 44, 2129-34.
- KERSH, G. J. & ALLEN, P. M. 1996. Essential flexibility in the T-cell recognition of antigen. *Nature*, 380, 495-8.
- KOURI, G. P., GUZMAN, M. G., BRAVO, J. R. & TRIANA, C. 1989. Dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome: lessons from the Cuban epidemic, 1981. *Bull World Health Organ*, 67, 375-80.
- KURANE, I., INNIS, B. L., NIMMANNITYA, S., NISALAK, A., MEAGER, A., JANUS, J. & ENNIS, F. A. 1991. Activation of T lymphocytes in dengue virus infections. High levels of soluble interleukin 2 receptor, soluble CD4, soluble CD8, interleukin 2, and interferon-gamma in sera of children with dengue. *J Clin Invest*, 88, 1473-80.
- LOVE, P. E. & HAYES, S. M. 2010. ITAM-mediated signaling by the T-cell antigen receptor. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2, a002485.
- MONGKOLSAPAYA, J., DEJNIRATTISAI, W., XU, X. N., VASANAWATHANA, S., TANGTHAWORNCHAIKUL, N., CHAIRUNSRI, A., SAWASDIVORN, S., DUANGCHINDA, T., DONG, T., ROWLAND-JONES, S., YENCHITSOMANUS, P. T., MCMICHAEL, A., MALASIT, P. & SREATON, G. 2003. Original antigenic sin and apoptosis in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Nat Med*, 9, 921-7.
- MONGKOLSAPAYA, J., DUANGCHINDA, T., DEJNIRATTISAI, W., VASANAWATHANA, S., AVIRUTNAN, P., JAIRUNGSRI, A., KHEMNU, N., TANGTHAWORNCHAIKUL, N., CHOTIYARNWONG, P., SAE-JANG, K., KOCH, M., JONES, Y., MCMICHAEL, A., XU, X., MALASIT, P. & SREATON, G. 2006. T cell responses in dengue hemorrhagic fever: are cross-reactive T cells suboptimal? *J Immunol*, 176, 3821-9.
- NGOENKAM, J., PAENSUWAN, P., PREECHANUKUL, K., KHAMSRI, B., YIEMWATTANA, I., BECK-GARCIA, E., MINGUET, S., SCHAMEL, W. W. & PONGCHAROEN, S. 2014. Non-overlapping functions of Nck1 and Nck2 adaptor proteins in T cell activation. *Cell Commun Signal*, 12, 21.
- SAMELSON, L. E., PHILLIPS, A. F., LUONG, E. T. & KLAUSNER, R. D. 1990. Association of the fyn protein-tyrosine kinase with the T-cell antigen receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87, 4358-62.
- SANGKAWIBHA, N., ROJANASUPHOT, S., AHANDRIK, S., VIRIYAPONGSE, S., JATANASEN, S., SALITUL, V., PHANTHUMACHINDA, B. & HALSTEAD, S. B. 1984. Risk factors in dengue shock syndrome: a prospective epidemiologic study in Rayong, Thailand. I. The 1980 outbreak. *Am J Epidemiol*, 120, 653-69.
- TAILOR, P., TSAI, S., SHAMELI, A., SERRA, P., WANG, J., ROBBINS, S., NAGATA, M., SZYM CZAK-WORKMAN, A. L., VIGNALI, D. A. & SANTAMARIA, P. 2008. The proline-rich sequence of CD3epsilon as an amplifier of low-avidity TCR signaling. *J Immunol*, 181, 243-55.
- VAUGHAN, K., GREENBAUM, J., BLYTHE, M., PETERS, B. & SETTE, A. 2010. Meta-analysis of all immune epitope data in the Flavivirus genus: inventory of current immune epitope data status in the context of virus immunity and immunopathology. *Viral Immunol*, 23, 259-84.
- VAUGHN, D. W., GREEN, S., KALAYANAROOJ, S., INNIS, B. L., NIMMANNITYA, S., SUNTAYAKORN, S., ENDY, T. P., RAENGSAKULRACH, B., ROTHMAN, A. L., ENNIS, F. A. & NISALAK, A. 2000. Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity. *J Infect Dis*, 181, 2-9.
- VITARANA, T., DE SILVA, H., WITHANA, N. & GUNASEKERA, C. 1991. Elevated tumour necrosis factor in dengue fever and dengue haemorrhagic fever. *Ceylon Med J*, 36, 63-5.

WEAVER, S. C. & VASILAKIS, N. 2009. Molecular evolution of dengue viruses: contributions of phylogenetics to understanding the history and epidemiology of the preeminent arboviral disease. *Infect Genet Evol*, 9, 523-40.

WHO 2012. Dengue and severe dengue. Fact sheets, 117.

WILDER-SMITH, A., RENHORN, K. E., TISSERA, H., ABU BAKAR, S., ALPHEY, L., KITTAYAPONG, P., LINDSAY, S., LOGAN, J., HATZ, C., REITER, P., ROCKLOV, J., BYASS, P., LOUIS, V. R., TOZAN, Y., MASSAD, E., TENORIO, A., LAGNEAU, C., L'AMBERT, G., BROOKS, D., WEGERDT, J. & GUBLER, D. 2012. DengueTools: innovative tools and strategies for the surveillance and control of dengue. *Glob Health Action*, 5.



Output ที่ได้จากโครงการ  
ปรับตัวชีวิตเพื่อการประเมินผลสำเร็จของโครงการ  
นำเสนอในการประชุมวิชาการระดับชาติ ที่มีการตีพิมพ์บน Proceedings 1 เรื่อง

ภาคผนวก

บทความสำหรับการเผยแพร่



1049011



สำนักหอสมุด

# การเปรียบเทียบการสร้าง $\gamma\delta$ T cells จาก PBMC โดยใช้ Concanavalin A และ Zoledronic Acid เป็นตัวกระตุ้น

## Generation of $\gamma\delta$ T cells from PBMC using Concanavalin A compare with Zoledronic acid

- 3 มี.ค. 2565

มนัสวี คนหลัก<sup>1</sup> อภิรัตน์ หวังธีระประเสริฐ,<sup>2</sup> วูล์ฟกัง ซาเมล,<sup>3</sup> สุชาติพย์ พงษ์เจริญ,<sup>2</sup> ดลฤดี สงวนเสริมศรี<sup>4</sup>  
Manutsavee Khonlak<sup>1</sup> Apirath Wangteeraprasert,<sup>2</sup> Wolfgang Schamel,<sup>3</sup> Sutatip Pongcharoen,<sup>2</sup> Donruedee Sanguansemsr<sup>4</sup>

### บทคัดย่อ

T cells เป็นเซลล์ที่มีความสำคัญเป็นอย่างมากในระบบภูมิคุ้มกันโดยจะทำหน้าที่กำจัดสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกาย ซึ่ง  $\gamma\delta$  T cells ซึ่งจัดเป็น T cells ชนิดหนึ่งที่มีเพียง 5-10 % ของ T Lymphocytes ที่มีความสำคัญเป็นอย่างมากต่อการต่อต้านการติดเชื้อและการทำลายเซลล์มะเร็ง ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษาวิธีการเพิ่มจำนวนของ  $\gamma\delta$  T cells โดยใช้ Concanavalin A (Con A) เปรียบเทียบกับการใช้ Zoledronic Acid พบว่า Zoledronic Acid และ Con A และเมื่อนำเซลล์ที่เพิ่มขึ้นหลังจากการกระตุ้น มาทำการวิเคราะห์หาจำนวน  $\gamma\delta$  T cells โดยใช้เทคนิค Flow cytometry พบว่าเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วยสาร Zoledronic Acid สามารถสร้าง  $\gamma\delta$  T cell ได้ 92.74% ซึ่งมากกว่าการกระตุ้นด้วย Con A ที่สามารถสร้าง  $\gamma\delta$  T cell ได้ที่ 34.51% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )

**คำสำคัญ:** แกมมาเดลตาทีเซลล์, คอนคานาวัลินเอ, กรดโซลิโดรอนิก

### Abstract

T cells are one of the most important cells in the immune system, which eliminate pathogen invading our body. The study found that  $\gamma\delta$  T cells, which are 5-10 % of total T Lymphocytes, are very important for fighting against infection and cancer cells. The objective of this study is to compare the method of increasing the number of  $\gamma\delta$  T cells using Concanavalin A (Con A) to that using Zoledronic Acid. The results showed that Zoledronic acid and Con A can increase the number of  $\gamma\delta$  T cells after stimulation. The number of  $\gamma\delta$  T cells generating from Zoledronic acid (93.43%) is higher than Con A (19.53%) ( $p < 0.05$ ) therefore Zoledronic acid should be an preparation method for generating  $\gamma\delta$  T cells for further study

**Keywords:**  $\gamma\delta$  T cell, Concanavalin A, Zoledronic acid

<sup>1</sup> นิสิตปริญญาโท, สาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร <sup>2,4</sup> อาจารย์, มหาวิทยาลัยนเรศวร อำเภอเมืองพิษณุโลก จังหวัดพิษณุโลก 65000 <sup>3</sup> อาจารย์, มหาวิทยาลัยไฟรบวร์ก ประเทศเยอรมัน

<sup>1</sup> Master's student, Microbiology, Faculty of Medical Science, Mueang Phitsanulok District, Phitsanulok 65000, Thailand.

<sup>2</sup> Lecturer, Faculty of medicine, Naresuan University, Mueang Phitsanulok District, Phitsanulok 65000, Thailand

<sup>3</sup> Lecturer, Department of immunology, Faculty of Biology, University of Freiburg, Freiburg, Germany

<sup>4</sup> Lecturer, Microbiology, Faculty of Medical Science, Mueang Phitsanulok District, Phitsanulok 65000, Thailand.

\* Corresponding author: Apirath Wongteeraprasert, [apirathw@yahoo.com](mailto:apirathw@yahoo.com), Faculty of Medical, Naresuan University, Mueang

## บทนำ

T cells เป็นเซลล์ที่มีความสำคัญเป็นอย่างมากในระบบภูมิคุ้มกันแบบ adaptive immunity ในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกาย โดยแบ่งเป็น 2 ประเภทใหญ่ๆ คือ CD4+ T cells ที่เรียกว่า T-helper cell และ CD8+ T cells หรือที่เรียกว่า Cytotoxic T cells โดย CD4+ T cells จะหลั่งสารที่ออกฤทธิ์กระตุ้นการทำงานของเซลล์อื่นให้ทำหน้าที่ได้ดียิ่งขึ้น เช่น กระตุ้นการทำงานของ B cells ให้หลั่ง antibody เพื่อไม่ให้เชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคได้ หรือช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการจับกินของ macrophages ให้จับกินและทำลายจุลินทรีย์แปลกปลอมภายในเซลล์ได้มีประสิทธิภาพเพิ่มมากขึ้น ในขณะที่ CD8+ T cells จะทำหน้าที่หลั่งสารไปฆ่าเซลล์ที่ติดเชื้อโดยตรง การทำงานของ T cell เหล่านี้จะทำงานเมื่อนำเสนอส่วนประกอบของจุลินทรีย์หรือสารแปลกปลอม เซลล์ที่ทำหน้าที่นำเสนอแอนติเจนนี้จะถูกเรียกว่า antigen-presenting cell (APC) โดย antigen ที่ถูกนำเสนอจะมีลักษณะเป็น peptide สายสั้นๆ อยู่ร่วมกับโมเลกุลของ major histocompatibility complex (MHC) ซึ่งเป็นโมเลกุลที่อยู่บนผิวเซลล์ในกลุ่มเซลล์ antigen-presenting cell (APC) โดย APC เหล่านี้จะจับกินจุลินทรีย์แล้วย่อยเป็น peptide สายสั้นๆ ก่อนจะนำเสนอ peptide ผ่านทาง MHC class I หรือ class II ให้กับ T cell และเกิดการตอบสนองต่อ antigen ดังกล่าว (Wu et al., 2000) โดย 80 % ของ T cells ที่พบในระบบไหลเวียนเลือด (blood circulation) และเนื้อเยื่อน้ำเหลือง (lymphoid tissues) จะมีลักษณะ T cell receptor (TCR) ชนิด  $\alpha\beta$  T cell ซึ่งแบ่งตามคุณลักษณะของตัวรับที่บริเวณผิวเซลล์ (T cell receptor) ซึ่งจะประกอบด้วยสาย  $\alpha$  chain และ  $\beta$  chain นอกจากนี้แต่ยังมี T cells อีกชนิดหนึ่งที่มีเพียงร้อยละ 10 ซึ่งมีลักษณะ T cell receptors เป็น Gamma-Delta T cells Receptor ( $\gamma\delta$  T cells receptor) ที่ประกอบด้วยสายของ  $\gamma$  chain และ  $\delta$

chain และถึงแม้ว่า  $\gamma\delta$  T cells จะเป็น T cell ที่พบได้น้อยกว่า  $\alpha\beta$  T cell แต่  $\gamma\delta$  T cells สามารถจับได้กับแอนติเจนหลายชนิดทั้งที่เป็น protein และ non-protein เช่น heat shock proteins, phospholipids โดยไม่ต้องอาศัยการนำเสนอด้วยโมเลกุล MHC ของ APCs (Rust et al., 1990; Wu et al., 2014) ดังนั้นเมื่อมีการติดเชื้อ  $\gamma\delta$  T cell จะสามารถตอบสนองต่อแอนติเจนของได้อย่างรวดเร็ว โดยใช้  $\gamma\delta$  TCR จับได้กับโมเลกุลของแอนติเจนได้หลากหลายไม่จำกัดว่าต้องเป็นโมเลกุลของสายโปรตีนเท่านั้น ดังนั้นจึงสามารถตอบสนองต่อแอนติเจนได้โดยตรง ส่งผลให้  $\gamma\delta$  T cell สามารถตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมได้อย่างรวดเร็ว ในขณะที่เซลล์  $\alpha\beta$  T cell ต้องใช้เวลา 5 ถึง 7 วันเพื่อตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมดังกล่าว (Wang & Welte 2013) นอกจากนี้  $\gamma\delta$  TCR แล้ว  $\gamma\delta$  T cell ยังมีโมเลกุลตัวรับที่ผิวเซลล์ที่สำคัญ คือ natural killer (NK) cell receptor ชนิด NKG2D ซึ่งอยู่ในกลุ่ม C-type lectin-like receptor อีกด้วย ซึ่งมีคุณสมบัติคล้าย natural killer (NK) cell ซึ่งจะมีผลในการต่อต้านมะเร็ง (Kakimi et al., 2014) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาผลของ  $\gamma\delta$  T cell ที่เกี่ยวข้องกับเซลล์ติดเชื้อพบว่าเมื่อเกิดการติดเชื้อ  $\gamma\delta$  T cell จะผลิต cytokines เช่น IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  และ IL-17 ฯลฯ ออกมาเพื่อตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอม (Hirsh & Junger, 2008; O'Brien, Roark & Born, 2009; Wang & Welte, 2013) เช่น V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells ซึ่งเป็น  $\gamma\delta$  T cell ที่สามารถพบได้เฉพาะในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมจะยับยั้งและจัดการเซลล์ติดเชื้อไวรัส ไข้หวัดใหญ่ตามฤดูกาล (H1N1) ไข้หวัดนก (H5N1) และไข้หวัดที่เกิดจากไวรัส H9N2 (Zheng, Liu, Lau & Tu, 2012) และยังมีผลต่อเซลล์ติดเชื้อไวรัสชนิดอื่น ๆ เช่นเซลล์ที่มีการติดเชื้อไวรัส West Nile (Wang & Welte, 2013) ไวรัสเดงกี (Tsai et al., 2015) โดย V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells จะหลั่ง cytotoxic เช่น IFN- $\gamma$ ,



TNF- $\alpha$  และ IL-17 ออกมาเพื่อยับยั้งและจัดการเซลล์ติดเชื้อไวรัส (Palmer et al., 2005) และจากการศึกษาดังกล่าวจะเห็นได้ว่า  $\gamma\delta$  T cell มีความสำคัญเป็นอย่างมากต่อการต่อต้านการติดเชื้อและการต่อต้านและทำลายเซลล์มะเร็งทั้งในห้องทดลองและในทางคลินิก (Deniger et al., 2014; Kabelitz et al., 2015; Silva-Santos et al., 2015) ทางผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษาวิธีการเพิ่มจำนวนของ  $\gamma\delta$  T cell ที่พบได้น้อยในร่างกายซึ่งอาจนำไปสู่การรักษาโรคที่เกิดจากการติดเชื้อ และโรคมะเร็งโดยใช้การกระตุ้นการเพื่อเพิ่มจำนวนของ  $\gamma\delta$  T cell ของตัวผู้ป่วยเองเพื่อลดผลข้างเคียงอันเกิดจากยารักษาโรคได้

### วิธีการดำเนินงานวิจัย

1. การแยกเม็ดเลือดขาวชนิดโมโนนิวเคลียร์ (Peripheral blood mononuclear cells; PBMC) จากตัวอย่างเลือด (buffy coat) ที่นำมาใช้ในการวิจัยได้รับความอนุเคราะห์จากธนาคารเลือดมหาวิทยาลัยนเรศวร ซึ่งทางผู้วิจัยได้รับอนุญาตการใช้เลือดเพื่อการวิจัยจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยนเรศวรแล้ว โดยนำตัวอย่างเลือดจำนวน 50 มิลลิลิตร ผสม Phosphate buffer saline (PBS) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เพื่อเจือจางความเข้มข้น จากนั้นนำตัวอย่างเลือดที่เจือจางแล้ว 30 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองที่ใส่สาร Ficoll Hypaque PLUS ที่ปริมาตร 15 มิลลิลิตร เพื่อแยกเม็ดเลือดขาว (Peripheral blood mononuclear cells; PBMC) ด้วยวิธี density gradient centrifugation เพื่อแยกขนาดเซลล์และน้ำหนักเซลล์ที่ต่างกัน โดยทำการปั่นเหวี่ยงที่ 2000 rpm เป็นเวลา 20 นาที 25 องศาเซลเซียส เมื่อครบเวลาปล่อยให้หยุดเองโดยไม่มีใช้ระบบเบรกช่วยหยุด จากนั้นเก็บ PBMC ที่อยู่บริเวณด้านบนของ Ficoll Hypaque PLUS ใส่ในหลอดทดลองที่มี PBS เพื่อนำไปปั่นล้าง โดยใช้ความเร็วที่ 1500 rpm 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที 2 รอบทิ้งสารละลายส่วนใส และเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ตูบปั่นกระจายเซลล์ให้เป็น

เซลล์เดี่ยวก่อนนำไปนับจำนวนเซลล์โดยใช้ hemacytometer ดังสมการ

$$\text{จำนวนเซลล์ทั้งหมด} = \frac{\text{จำนวนเซลล์ทั้งหมดที่ได้จากตาราง 4 ช่อง} \times \text{Dilution factor} \times 10^4}{4}$$

หลังจากนั้นนำ PBMC ที่ได้มาตรวจสอบเพื่อหาจำนวน  $\gamma\delta$  T cell เริ่มต้นโดยใช้วิธีการย้อมด้วยสี immunofluorescence (anti-  $\gamma\delta$  TCR conjugate with FITC และ anti-CD3 conjugate with PerCP) ก่อนนำมาวิเคราะห์ผลด้วยวิธี Flow Cytometry

2. การเพาะเลี้ยงเซลล์แถมมาเดลตาจาก PBMC ( $\gamma\delta$  T cell culture)

2.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์แถมมาเดลตาจาก PBMC โดยใช้ Concanavalin A (Con A) เป็นตัวกระตุ้น

โดยนำ PBMC จำนวน  $10 \times 10^6$  มาเพาะเลี้ยงใน RPMI-10 (RPMI1640, 10% Fetal Bovine Serum (FCS), 100 U/ml penicillin streptomycin 2 mM L-glutamine และมีความเข้มข้น 100  $\mu\text{g}/\text{mm}$  HEPES) ปริมาตร 10 ml ที่มีความเข้มข้นของ Interleukin-2 (IL-2), Interleukin-4 (IL-4) 100 U/ml และ Concanavalin A (Con A) 5 mg/ml ก่อนนำมาเลี้ยงในตู้ปลอดเชื้อที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 5% คาร์บอนไดออกไซด์ เพื่อเพิ่มจำนวน  $\gamma\delta$  T cell เป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ โดยทุก ๆ 3 วันจะเติม Interleukin-2 (IL-2), Interleukin-4 (IL-4) เพื่อกระตุ้นการเพิ่มจำนวนเซลล์ หลังจากนั้นนำ  $\gamma\delta$  T cell ที่ได้มาตรวจสอบโดยใช้วิธีการย้อมด้วยสี-immunofluorescence (anti-  $\gamma\delta$  TCR conjugate with FITC และ anti-CD3 conjugate with PerCP) ก่อนนำมาวิเคราะห์ผลด้วยวิธี Flow Cytometry

2.2 การเพาะเลี้ยงเซลล์แถมมาเดลตาจาก PBMC โดยใช้ Zoledronic Acid เป็นตัวกระตุ้น

โดยนำ PBMC จำนวน  $10 \times 10^6$  มาเพาะเลี้ยงใน RPMI-10 (RPMI1640, 10% Fetal Bovine Serum (FCS), 100 U/ml penicillin streptomycin 2 mM L-glutamine และมีความเข้มข้น 100  $\mu\text{g}/\text{mm}$  HEPES)

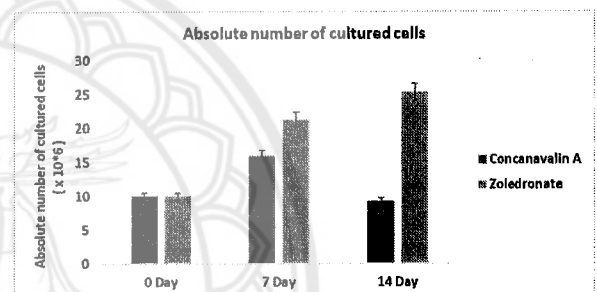
ปริมาณ 10 ml ที่มีความเข้มข้นของ Interleukin-2 (IL-2) 100 U/ml และ Zoledronic Acid 5  $\mu$ M/ml ก่อนนำมาเลี้ยงในตู้ปลอดเชื้อที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 5 % คาร์บอนไดออกไซด์ เพื่อเพิ่มจำนวน  $\gamma\delta$  T cell เป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ โดยจะเติม Interleukin-2 (IL-2) ทุก ๆ 2 วันเพื่อกระตุ้นการเพิ่มจำนวนเซลล์ หลังจากนั้นนำ  $\gamma\delta$  T cell ที่ได้มาตรวจสอบ โดย ใช้วิธีการย้อมด้วยสี immunofluorescence (anti-  $\gamma\delta$  TCR conjugate with FITC และ anti-CD3 conjugate with PerCP) ก่อนนำมาวิเคราะห์ผลด้วยวิธี Flow Cytometry

### ผลการทดลอง

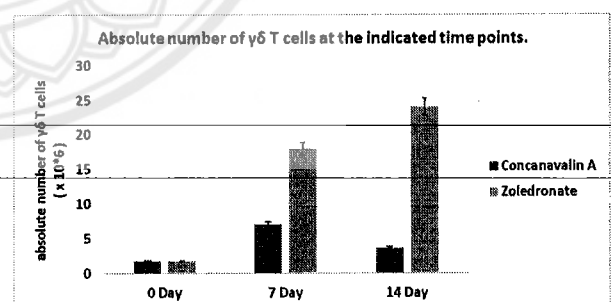
การศึกษานี้เป็นการเปรียบเทียบการเพิ่มจำนวน  $\gamma\delta$  T cells ที่ได้จากการกระตุ้น PBMC ด้วย Con A ความเข้มข้น 5 mg/ml ร่วมกับ IL-2, IL-4 ความเข้มข้นเท่ากันที่ 100 U/ml และ Zoledronic Acid ที่ความเข้มข้น 5  $\mu$ M/ml ร่วมกับ IL-2 ที่ความเข้มข้น 100 U/ml เป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ พบว่าหลังการกระตุ้น PBMC ด้วย Con A สามารถกระตุ้นเซลล์และเพิ่มจำนวนเซลล์จาก  $10 \times 10^6$  เซลล์เป็น  $16 \times 10^6$  เซลล์ได้ในวันที่ 7 ของการกระตุ้น แต่ในวันที่ 14 ของการกระตุ้นเซลล์เริ่มลดลงเหลือเพียง  $9.32 \times 10^6$  เซลล์ ในขณะที่เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย Zoledronic Acid สามารถเพิ่มจำนวนจาก  $10 \times 10^6$  เซลล์เป็น  $21.3 \times 10^6$  เซลล์ และ  $25.31 \times 10^6$  เซลล์ในวันที่ 7 และวันที่ 14 ตามลำดับ (ดังรูปที่ 1) และเมื่อนำผลการเพิ่มขึ้นของจำนวนเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย Zoledronic Acid และ Con A มาเปรียบเทียบกัน พบว่า Zoledronic Acid สามารถเพิ่มจำนวนเซลล์ได้มากกว่าการกระตุ้นด้วย Con A ที่ระยะเวลา 2 สัปดาห์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (\*  $p < 0.05$ )

การวิเคราะห์หาจำนวน  $\gamma\delta$  T cells โดยใช้เทคนิค Flow cytometry พบว่าจำนวน  $\gamma\delta$  T cell ที่เพิ่มขึ้นโดยการกระตุ้นด้วย Con A เมื่อเวลาผ่านไป 7 วันได้เท่ากับ  $7.05 \times 10^6$  เซลล์ (46.53%) และลดลงเหลือเพียง  $3.66 \times 10^6$  เซลล์ (34.51%) ในวันที่ 14 ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการลดลงของจำนวนเซลล์ในวันที่ 14

ในขณะที่เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วยสาร Zoledronic Acid สามารถเพิ่มจำนวน  $\gamma\delta$  T cells จาก  $1.75 \times 10^6$  เซลล์ (17.5%) เป็น  $17.4 \times 10^6$  เซลล์ (80.26%) หลังจากการกระตุ้นเป็นเวลา 7 วัน และเพิ่มเป็น  $23.9 \times 10^6$  เซลล์ (92.74%) หลังจากการกระตุ้นเป็นเวลา 14 วัน ซึ่งจำนวน  $\gamma\delta$  T cells ที่เพิ่มขึ้นจากวันที่ 0 ถึงวันที่ 14 แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (\*  $p < 0.05$ ) และเมื่อนำจำนวน  $\gamma\delta$  T cells ของการเพาะเลี้ยงทั้ง 2 วิธีมาเปรียบเทียบกันพบว่าจำนวน  $\gamma\delta$  T cells ที่เพิ่มขึ้นของ Zoledronic Acid ในวันที่ 14 แตกต่างจากจำนวน  $\gamma\delta$  T cells ที่ถูกกระตุ้นด้วย Con A อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (\*  $p < 0.05$ ) ดังรูปที่ 2.



รูปที่ 1. แสดงจำนวนเซลล์เมื่อถูกกระตุ้นด้วย Zoledronic Acid และ Con A ในวันที่ 0, 7 และ 14 วันตามลำดับ (\*  $p < 0.05$ ) (ทำการทดลอง 3 ครั้ง)



รูปที่ 2 แสดงจำนวน  $\gamma\delta$  T cells ที่ถูกกระตุ้นด้วย Zoledronic Acid และ Con A เมื่อวิเคราะห์ด้วย Flow cytometry ในวันที่ 0, 7 และ 14 วันตามลำดับ (\*  $p < 0.05$ ) (ทำการทดลอง 3 ครั้ง)

### สรุปผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการศึกษาการเพาะเลี้ยง  $\gamma\delta$  T cell จาก PBMC โดยใช้ Zoledronic Acid ที่ความเข้มข้น 5  $\mu\text{M}/\text{ml}$  และ 100 U/ml ของ IL-2 เพื่อเพิ่มจำนวน  $\gamma\delta$  T cell นั้นมีประสิทธิภาพดีกว่าการเพาะเลี้ยง  $\gamma\delta$  T cell จาก PBMC โดยใช้ Con A ที่ความเข้มข้น 5 mg/ml และ 100 U/ml ของ IL-2 และ IL-4 เนื่องจากสาร Zoledronic Acid เป็นสารที่จัดอยู่ในกลุ่ม Aminobisphosphonates จะไปยับยั้งการทำงานของ Farnesyl pyrophosphate synthase (FPPS) ในเซลล์ปกติ ส่งผลให้ FPPS ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ควบคุมสมบัติในการยับยั้งการสร้าง Isopentenyl pyrophosphate (IPP) ในยูคาริโอตไม่สามารถทำงานได้ ส่งผลให้เซลล์ที่อยู่ในภาวะปกติเซลล์สร้าง IPP ผ่านทาง Mevalonate pathway เพิ่มขึ้น IPP ที่เกิดขึ้นจะไปกระตุ้นการทำงานของ  $\gamma\delta$  T cell ผ่านทาง  $\gamma\delta$  TCR ได้อย่างรวดเร็วทำให้มีการเพิ่มจำนวน  $\gamma\delta$  T cells เพิ่มมากขึ้น (Kondo, M. et al., 2011 and Nussbaumer, O. et al., 2013) อีกทั้งเมื่อใช้ Zoledronic Acid กระตุ้นการ PBMC เพื่อสร้าง  $\gamma\delta$  T cells Zoledronic Acid กระตุ้นให้ Monocyte สร้างและนำเสนอ IPP เพื่อกระตุ้นการสร้าง  $\gamma\delta$  T cells เพิ่มขึ้นอีกด้วย (Roelofs, A. J. et al., 2009; Kondo, M. et al., 2011) และใช้ IL-2 ที่มีคุณสมบัติในการกระตุ้น T cell ให้เกิดการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนจึงทำให้มีปริมาณ  $\gamma\delta$  T cell เพิ่มขึ้นเป็นจำนวนมากซึ่งสอดคล้องกับงานของ Kondo, M และคณะ (2011). ที่มีการศึกษาการแสดงออกของ  $\gamma\delta$  T cells ในเลือดมนุษย์ โดยเก็บตัวอย่างเลือดเพื่อแยก PBMC และกระตุ้นด้วย Zoledronic Acid ที่ความเข้มข้น 5  $\mu\text{M}/\text{ml}$  และ 100 U/ml ของ IL-2 โดยสามารถเพิ่มปริมาณ  $\gamma\delta$  T cell ได้เป็นจำนวนมากและมีความบริสุทธิ์ถึง 93.8% ต่างจากการกระตุ้นเซลล์เพื่อเพิ่มจำนวน  $\gamma\delta$  T cells โดยใช้ Con A ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม Mitogen ที่มีคุณสมบัติในการกระตุ้นและเพิ่มจำนวนเซลล์ T cell Lymphocyte ผ่านทางไกลโคโปรตีนที่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ (Wands J. R., Podolsky D. K., & Isselbacher K. J., 1976; Siegers G.M. et al., 2013) และกระตุ้นให้ T cells ซึ่งจัดเป็นเซลล์ที่มีมากกว่า 70% ใน PBMC เพิ่มจำนวน  $\gamma\delta$  T cells ร่วมกับ IL-2 และ IL-4 ดังนั้น

ผลของ Con A จึงให้ผลน้อยกว่าการกระตุ้นด้วย Zoledronic Acid ดังนั้นการใช้ Zoledronic Acid ในการกระตุ้น PBMC เพื่อเพิ่มจำนวน  $\gamma\delta$  T cells เพื่อนำไปใช้ในการศึกษาทดลองและรักษาโรคจึงมีความเหมาะสมเนื่องจากสามารถเพิ่มจำนวน  $\gamma\delta$  T cells ได้เป็นจำนวนมาก และ  $\gamma\delta$  T cells มีความบริสุทธิ์สูงไม่จำเป็นต้องผ่านกระบวนการคัดแยกให้บริสุทธิ์ซึ่งอาจเกิดการปนเปื้อนในขั้นตอนดังกล่าวได้

## กิตติกรรมประกาศ

ในงานวิจัยฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้อย่างสมบูรณ์ด้วยความกรุณาอย่างยิ่งจาก อาจารย์อภิรัตน์ หวังธีระประเสริฐ อาจารย์สุชาติพิทย์ พงษ์เจริญ อาจารย์ดลฤดี สงวนเสริมศรี ที่ได้สละเวลาอันมีค่าแก่ผู้วิจัย เพื่อให้คำปรึกษาและคำแนะนำตลอดจนตรวจทานแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ด้วยความเอาใจใส่เป็นอย่างยิ่ง งานวิจัยฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ ลุล่วงได้ด้วยดี ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบคุณพี่นักวิทยาศาสตร์หน่วยวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์พื้นฐาน คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ผู้สนับสนุนการทำวิจัยในทุกด้าน และสุดท้ายนี้ขอขอบคุณ กำลังใจจากพี่ๆ ที่คอยสนับสนุน

## เอกสารอ้างอิง

- Deniger D, Moyes JS, Cooper L J N. (2014). Clinical applications of gamma delta T cells with multivalent immunity. *Frontiers in Immunology*; 5:636.
- Hirsh, M. I., & Junger, W. G. (2008). Roles of heat shock proteins and  $\gamma\delta$  T Cells in inflammation. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 39( 5) , 509- 513. doi: 10.1165/rcmb.2008-0090TR
- Kabelitz D, Dechanet-Merville J. (2015). Editorial: "Recent advances in gamma/ delta T cell biology: new ligands, new functions, and new

- translational perspectives". *Frontiers in Immunology*; 6:371.
- Kakimi K, Matsushita H, Murakawa T, Nakajima J. (2014). Gamma delta T cell therapy for the treatment of non- small cell lung cancer. *Translational Lung Cancer Research*; 3:23-33.
- Kondo, M., Izumi, T., Fujieda, N., Kondo, A., Morishita, T., Matsushita, H., & Kakimi, K. (2011). Expansion of human peripheral blood  $\gamma\delta$  T cells using zoledronate. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (55), 3182. doi:10.3791/3182
- Nussbaumer O., Gruenbacher G., Gander H., Komuczki J., Rahm A., Thurnher M. (2013). Essential requirements of zoledronate-induced cytokine and  $\gamma\delta$  T cell proliferative responses. *J. Immunol.*; 191: 1346– 1355. doi: 10.4049/jimmunol.1300603.
- O'Brien, R. L., Roark, C. L., & Born, W. K. (2009). IL-17-producing  $\gamma\delta$  T cells. *European Journal of Immunology*, 39( 3) , 662- 666. doi: 10.1002/eji.200839120
- Palmer, D. R., Sun, P., Celluzzi, C., Bisbing, J., Pang, S., Sun, W., . . . Burgess, T. (2005). Differential effects of dengue virus on infected and bystander dendritic cells. *Journal of Virology*, 79( 4) , 2432- 2439. doi: 10.1128/JVI.79.4.2432-2439.2005
- Roelofs, A. J., Jauhainen, M., Mönkkönen, H., Rogers, M. J., Mönkkönen, J., & Thompson, K. (2009). Peripheral blood monocytes are responsible for gammadelta T cell activation induced by zoledronic acid through accumulation of IPP/DMAPP. *British journal of haematology*, 144( 2) , 245– 250. doi:10.1111/j.1365-2141.2008.07435.x
- Rust CJ, Verreck F, Vietor H, Koning F. (1990). Specific recognition of staphylococcal enterotoxin A by human T cells bearing receptors with the V gamma 9 region. *Nature*; 346:572-574
- Siegers GM, Ribot EJ, Keating A, Foster PJ. (2013). Extensive expansion of primary human gamma delta T cells generates cytotoxic effector memory cells that can be labeled with Feraheme for cellular MRI. *Cancer Immunol Immunother* 62: 571–83. 10.1007/s00262-012-1353-y
- Silva-Santos B, Serre K, Norell H. (2015). Gamma-delta T cells in cancer. *Nature Reviews in Immunology*; 15:683-691.
- Tsai, C.-Y., Liang, K. H., Gunalan, M. G., Li, N., Lim, D. S. L., Fisher, D. A., . . . Wong, S. B. J. (2015). Type I IFNs and IL-18 regulate the antiviral response of primary human  $\gamma\delta$  T Cells against dendritic cells infected with dengue virus. *The Journal of Immunology*, 194( 8) , 3890-3900. doi: 10.4049/jimmunol.1303343
- Wands, J. R., Podolsky, D. K., & Isselbacher, K. J. (1976). Mechanism of human lymphocyte stimulation by concanavalin A: role of valence and surface binding sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 73( 6) , 2118–2122. doi:10.1073/pnas.73.6.2118
- Wang, T., & Welte, T. (2013). Role of natural killer and gamma delta T cells in west nile virus infection. *Viruses*, 5(9), 2298-2310. doi: 10.3390/v5092298
- Wu YL, Ding YP, Tanaka Y, Shen LW, Wei CH, Minato N, Zhang W. (2014). Gamma delta T cells and their potential for immunotherapy. *International Journal of Biological Sciences*; 10:119-135.
- Wu, S.-J. L., Grouard-Vogel, G., Sun, W., Mascola, J. R., Brachtel, E., Putvatana, R., . . . Frankel, S. S. (2000). Human skin langerhans cells are

targets of dengue virus infection. *Nature Medicine*, 6, 816. doi: 10.1038/77553

Zheng, J., Liu, Y., Lau, Y.-L., & Tu, W. (2012).  $\gamma\delta$ -T cells: an unpolished sword in human anti-infection immunity. *Cellular And Molecular Immunology*, 10, 50. doi: 10.1038/cmi.2012.43

