Thesis Title Determination of Interleukin 2 levels and number of Interleukin 2-producing cells from human T lymphocyte subpopulations.

Author Miss Jureerat Radomkij

M.S. Microbiology

Examining member

Associate Professor Dr.Sanit Makonkawkeyoon Chairman

Assistant Professor Dr.Niwat Maneekarn Member

Assistant Professor Dr.Vicharn Vithayasai Member

ABSTRACT

Interleukin 2 (IL2) is one of the most important lymphokine synthesized and secreted by antigen-or mitogen-stimulated T lymphocytes. IL2 plays a role in the proliferation and maturation of T cells and other cell types and represents an important element in a cascade of lymphokines released during an immune response. The precise and accurate determination of IL2 levels and numbers of IL2-producing cells in PBML, total T cells and various T cell subpopulations from normal subjects are necessary for an understanding of cellular interactions in cell-mediated immune response. In this study, the number of IL2-producing cells and the levels of IL2 produced by PBML, total T cells and T cell subpopulations from healthy normal subjects and leprosy patients after stimulation with PHA-P were evaluated. PBML were prepared from healthy normal subjects

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

or from leprosy patients and further fractionated into total T cells or various T cell subpopulations namely CD8-depleted T cells, CD4-depleted T cells, Con A-T cells and Non Con A-T cells. Each fraction of cells was then cultured or co-cultured with monocytes in the presence of PHA-P in complete RPMI-1640 medium. After incubation, the culture fluids were collected and assayed for IL2 activity while the cells were harvested and determined for the number of IL2-producing cells. The level of IL2 activity was expressed in term of the mean±SE of units/ml and the number of IL2-producing cells was expressed in term of the mean±SE of colonies/10^6 cells. The results showed that, after stimulation with PHA-P, PBML from healthy normal subjects were able to secret IL2 at the concentration of 1.89±0.33 units/ml and to generate IL2-producing cells at 791.47±49.30 colonies/10^6 cells. The amount of IL2 produced by one IL2-producing cell from PBML was 2.19±0.27 x10^3 units/cell. In comparison with PBML and T cell subpopulations using student-t-test, it was found that, IL2 levels, number of IL2-producing cells and amount of IL2 produced by one IL2-producing cell from total T cells and CD8-depleted T cells were significantly higher ($p < 0.01$) than those from other populations. Total T cells could secreted IL2 at the concentration of 3.27±0.66 units/ml and produced IL2-producing cells at 1094.00±62.15 colonies/10^6 cells

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

which was about 196.80% and 138.22% of those produced by PBML, respectively. One IL2-producing cell from total T cells secreted 5.35±0.75 $\times 10^{-3}$ units/cell. CD8-depleted T cells secreted IL2 at the concentration of 2.78±0.50 units/ml and develope to IL2-producing cells at 1029.00±81.99 colonies/10^6 cells which were about 146.32% and 130.01% of those produced by PBML, respectively. The amount of IL2 produced by one IL2-producing cell from CD8-depleted T cells was 4.34±0.56 $\times 10^{-3}$ units/cell. However, CD4-depleted T cells were able to secrete IL2 0.77±0.18 units/ml or 2.13±0.50 $\times 10^{-3}$ units/cell and to generate IL2-producing cells 567.20±34.17 colonies/10^6 cells which were significantly lower quantity ($p < 0.01$) when compared to those from CD8-depleted T cells. When total T cells were separated into Non Con A-T cells and Con A-T cells by Con A-coated SRBC rosette technique, it was found that Non Con A-T cells were able to secrete IL2 1.55±0.31 units/ml or 3.70±0.52 $\times 10^{-3}$ units/cell and to generate IL2-producing cells 663.33±50.08 colonies/10^6 cells which were significantly higher ($p < 0.01$ and $p < 0.025$, respectively) than those of Con A-T cells (IL2 at 0.55±0.15 units/ml or 1.63±0.45 $\times 10^{-3}$ units/cell and IL2-producing cells at 488.50±44.54 colonies/10^6 cells). The results indicated that Con A-coated SRBC rosette technique was able to separate total T cells into Non Con A-T cells and Con A-T

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

cells which function, in according to IL2 production, as helper an suppressor T cells, respectively, as same as the standard method using anti-CD8 or anti-CD4 and complement. This study was also analysed the capability of PBML and total T cells from leprosy patients to secrete IL2 and to generate IL2-producing cells after stimulation with PHA-P. PBML from 5 lepromatous leprosy (LL) and 4 tuberculoid leprosy (TT) patients were able to secrete IL2 at 2.45±0.70 units/ml and 1.39±0.34 units/ml and to generate IL2-producing cells at 1002.80±91.70 colonies/10^6 cells and 866.50±131.70 colonies/10^6 cells, respectively. The amount of IL2 produced by one IL2-producing cell from PBML of LL and TT were 2.39±0.51 and 1.58±0.23 $\times 10^{-3}$ units/cell. Total T cells from LL and TT patients secreted IL2 at (mean) 2.22 and 2.53 units/ml and generated IL2-producing cells at 1159.00 and 1121.30 colonies/10^6 cells, respectively. The amount of IL2 generated by one IL2-producing cell from total T cells of LL and TT were 3.21 and 3.95 $\times 10^{-3}$ units/cell. The IL2 level, number of IL2-producing cells and the amount of IL2 produced by one IL2-producing cell generated by leprosy patients were not significantly different ($p > 0.01$) from those of healthy normal subjects.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การหาระดับอินเตอร์ลิวคิน 2 และจำนวนเซลล์ที่สร้างอินเตอร์ลิวคิน 2 จาก ที ลิมโฟซัยท์ ซับพอพพิวเลชันของคนปกติ

ชื่อผู้เขียน นางสาวจุรีย์รัตน์ ระดมกิจ

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชา จุลชีววิทยา

คณะกรรมการตรวจสอบวิทยานิพนธ์

รองศาสตราจารย์ ดร.สนิท มกรแก้วเกษร ประธานกรรมการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นิวัตน์ มลีกาญจน์ กรรมการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์วิชาญ วิทยาศัย กรรมการ

บทคัดย่อ

Interleukin 2 (IL2) เป็น lymphokine ที่มีบทบาทสำคัญมากตัวหนึ่ง ซึ่งถูกสร้างและหลั่งจาก T lymphocyte เมื่อถูกกระตุ้นด้วย antigen หรือ mitogen Interleukin 2 นี้มีความสำคัญต่อระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย โดยทำให้ T lymphocyte รวมทั้งเซลล์ชนิดอื่น ๆ ในระบบภูมิคุ้มกันมีการเพิ่มจำนวนและเจริญเต็มที่พร้อมที่จะทำหน้าที่ของตนเองได้ นอกจากนี้ยังมีบทบาทสำคัญในการทำให้เกิดการหลั่ง lymphokine ชนิดอื่น ๆ ในระหว่างที่มีการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันอีกด้วย ดังนั้นการศึกษาถึงระดับ Interleukin 2 และจำนวนเซลล์ที่สร้าง Interleukin 2 ใน PBML, total T cells และ T cell subpopulations ต่าง ๆ ของคนปกติโดยวิธีการที่ถูกต้องและแม่นยำ จึงมีความสำคัญและจำเป็นในการเข้าใจ ถึงการทำงานร่วมกันของเซลล์ชนิดต่าง ๆ ในการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันชนิดผ่านเซลล์ของร่างกาย ในการศึกษาครั้งนี้เป็นการหาระดับ Interleukin 2 และจำนวนเซลล์ที่สร้าง Interleukin 2 ใน PBML, total T cells และ T cell subpopulations ต่าง ๆ ของคนปกติและผู้ป่วยโรคเรื้อนเมื่อกระตุ้นด้วย PHA-P PBML ที่แยกได้จากคนปกติและผู้ป่วยโรคเรื้อนถูกแยกต่อไปออกเป็น total T cells และ T cell subpopulations ต่าง ๆ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ได้แก่ CD8-depleted T cells, CD4-depleted T cells, Con A-T cells และ Non Con A-T cells จากนั้นจึงนำเซลล์ในกลุ่มต่าง ๆ เหล่านี้มาบ่มกระตุ้นด้วย PHA-P และเพาะเลี้ยงใน complete RPMI-1640 medium หลังจากที่เพาะเลี้ยงจนครบเวลาแล้ว จึงเก็บส่วนของ culture fluids ไปตรวจวัดระดับ Interleukin 2 ที่หลั่งออกมา และเก็บส่วนของเซลล์ที่ถูกกระตุ้นแล้วไปหาจำนวนเซลล์ที่สร้าง Interleukin 2 ซึ่งผลการวัดระดับ Interleukin 2 และจำนวนเซลล์ที่สร้าง Interleukin 2 นำเสนอในรูปของ mean$\pm$SE ของ units/ml และ colonies/10^6 cells ตามลำดับ ผลการทดลองพบว่าเมื่อกระตุ้นด้วย PHA-P แล้ว PBML ของคนปกติสามารถหลั่ง Interleukin 2 ได้ 1.89$\pm$0.33 units/ml มีจำนวนเซลล์ที่สร้าง Interleukin 2 จำนวน 791.47$\pm$49.30 colonies /10^6 cells และเซลล์ที่สร้าง Interleukin 2 ได้นั้นหลั่ง Interleukin 2 2.19$\pm$0.27 x10^{-3} units/cell เมื่อเปรียบเทียบกับ PBML และ T lymphocyte subpopulations พบว่า ระดับ Interleukin 2, จำนวนเซลล์ที่สร้าง Interleukin 2 ได้ และปริมาณ Interleukin 2 ที่หลั่งโดย IL2-producing cell หนึ่งเซลล์ จาก total T cells และ CD8-depleted T cells สูงกว่าจากที่สร้างโดยเซลล์ในกลุ่มอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.01$) โดย Total T cells สามารถหลั่ง Interleukin 2 ได้ 3.72$\pm$0.66 units/ml และมีจำนวนเซลล์ที่สร้าง Interleukin 2 ได้ 1094.00$\pm$62.15 colonies/10^6 cells ซึ่งคิดเป็น 196.80% และ 138.22% เมื่อเปรียบเทียบกับของ PBML ตามลำดับ ซึ่งเซลล์ที่สร้าง Interleukin 2 ได้ใน total T cells หลั่ง Interleukin 2 ได้ 5.35$\pm$0.75 x10^{-3} units/cell ส่วน CD8-depleted T cells สามารถหลั่ง Interleukin 2 ได้ 2.78$\pm$0.50 units/ml และมีจำนวนเซลล์ที่สร้าง Interleukin 2 ได้ 1029.00$\pm$81.99 colonies/10^6 cells ซึ่งคิดเป็น 146.32% และ 130.01% เมื่อเปรียบเทียบกับของ PBML ตามลำดับ ซึ่งเซลล์ที่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สร้าง Interleukin 2 ได้ใน CD8-depleted T cells หลั่ง Interleukin 2 ได้ 4.34±0.56 x10^{-3} units/cell, นอกจากนี้ CD4-depleted T cells สามารถหลั่ง Interleukin 2 ได้ 0.77±0.18 units/ml หรือ 2.13±0.50 x10^{-3} units/cell และมีจำนวนเซลล์ที่สร้าง Interleukin 2 ได้ 567.20±34.17 colonies/10^6 cells ซึ่งมีปริมาณที่น้อยกว่าใน CD8-depleted T cells อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.01$) เมื่อ total T cells ถูกแยกออกเป็น subpopulations โดยใช้ Con A-coated SRBC rosette technique พบว่า Non Con A-T cells สามารถหลั่ง Interleukin 2 1.55±0.31 units/ml หรือ 3.70±0.52 x10^{-3} units/cell และมีจำนวนเซลล์ที่สร้าง Interleukin 2 ได้ 663.33±50.08 colonies/10^6 cells สูงกว่า Con A-T cells ซึ่งมีระดับ Interleukin 2 0.55±0.15 units/ml หรือ 1.63±0.45 x10^{-3} units/cell และจำนวนเซลล์ที่สร้าง Interleukin 2 ได้ = 488.50±44.54 colonies/10^6 cells อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.01$ และ $p < 0.025$ ตามลำดับ) ผลการทดลองนี้แสดงว่า การแยก T cell subpopulations โดยใช้ Con A-coated SRBC rosette นั้น สามารถแยก total T cells ออกเป็น Non Con A-T cells และ Con A-T cells ซึ่งมีแบบแผนของการหลั่ง Interleukin 2 คล้ายกับ helper (CD8-depleted T) และ suppressor/cytotoxic (CD4-depleted T) cells ที่แยกโดยการใช้วิธีมาตรฐานที่ใช้ anti-CD8 หรือ anti-CD4 ร่วมกับคอมพลีเมนต์ นอกจากนี้ในการศึกษาครั้งนี้ยังได้ศึกษาถึงความสามารถในการหลั่ง Interleukin 2 และจำนวนเซลล์ที่สร้าง Interleukin 2 ได้ ใน PBML และ total T cells จากผู้ป่วยโรคเรื้อน ผลการทดลองพบว่า PBML จากผู้ป่วยโรคเรื้อนชนิด lepromatous (LL) และชนิด tuberculoid (TT) สามารถหลั่ง Interleukin 2 ได้ 2.45±0.70 และ 1.39±0.34 units/ml และมีจำนวนเซลล์ที่สร้าง Interleukin 2 ได้เท่ากับ 1002.80±91.70 และ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

866.50±131.70 colonies/10^6 cells ตามลำดับ ส่วนปริมาณ Interleukin 2 ที่สร้างโดย IL2-producing cell หนึ่งเซลล์ โดย PBML ในคนไข้ LL และ TT นั้นเป็น 2.39±0.51 และ 1.58±0.23 x10^{-3} units/cell ตามลำดับ ใน total T cells พบว่าค่า mean ของระดับ Interleukin 2 ในคนไข้ LL และ TT เป็น 2.22 และ 2.53 units/ml ส่วนค่า mean ของจำนวนเซลล์ที่สร้าง Interleukin 2 เป็น 1159.00 และ 1121.30 colonies/10^6 cells ซึ่งมีปริมาณ Interleukin 2 ที่สร้างโดย IL2-producing cell หนึ่งเซลล์ โดย total T cells ในคนไข้ LL และ TT เป็น 3.21 และ 3.95 x10^{-3} units/cell เมื่อเปรียบเทียบกับคนปกติจะเห็นว่าความสามารถในการหลั่ง Interleukin 2, จำนวนเซลล์ที่สร้าง Interleukin 2 และปริมาณ Interleukin 2 ที่หลั่งโดย IL2-producing cell หนึ่งเซลล์ ในผู้ป่วยโรคเรื้อนไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากคนปกติ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved