

**IMMUNOPHENOTYPES, CYTOKINE PRODUCTION, AND  
CYTOTOXIC ACTIVITY OF NATURAL KILLER CELLS  
IN HIV-1 INFECTED CASES**

**SUJIN ASSAWAWITOONTIP**

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT  
OF THE REQUIREMENTS FOR  
THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY  
(MEDICAL MICROBIOLOGY)  
FACULTY OF GRADUATE STUDIES  
MAHIDOL UNIVERSITY  
2005**

**ISBN 974-04-6071-2  
COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY**

IMMUNOPHENOTYPES, การผลิตสารไซโตไคน์, และการทำลายเซลล์แปลกปลอม ของเซลล์ NATURAL KILLER ในผู้ติดเชื้อเอชไอวี ไทยปี 1 (IMMUNOPHENOTYPES, CYTOKINE PRODUCTION, AND CYTOTOXIC ACTIVITY OF NATURAL KILLER CELLS IN HIV-1 INFETED CASES)

สุจินต์ อัสวีทฤทธิ์ 4037136 SIMM/ D

ปร.ด. (จุลชีววิทยาการแพทย์)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : พิไลพันธ์ พุทธิวัฒนะ, ปร.ด., โกวิท พัฒนาปัญญาสัตย์, Ph.D., ประเสริฐ เอื้อวรากุล, M.D., Dr. med., จิตรพร วรรณสุด, Ph.D.

#### บทคัดย่อ

โครงการวิจัยนี้ เน้นการศึกษา ชนิด จำนวนและการทำงานของเซลล์เอ็นเคในผู้ติดเชื้อเอชไอวี และการศึกษาที่ยังได้สร้างค่าอ้างอิงมาตรฐานของเซลล์ลิมโฟไซท์ชนิดอื่น ๆ อีกด้วย ได้แก่ เซลล์ $CD3^+$ ,  $CD4^+$  และ  $CD8^+$  T cells,  $CD19^+$  B cells,  $CD16^+$ ,  $CD56^+$  และ  $CD16^+/CD56^+$  NK cells และอัตราส่วน  $CD4/CD8$  ในคนไทยที่มีสุขภาพแข็งแรง ไม่มีการติดเชื้อเอชไอวี จำนวน 125 คน การศึกษา lymphocyte immunophenotypes โดยวิธี flow cytometry พบว่าคนไทยมีปริมาณ  $CD4^+$  T cells น้อยกว่าชาวคอเคเซียน ซึ่งคล้ายกับที่มีผู้เคยรายงานไว้ในคนไทยหรือชาวมองโกลอยด์ในประเทศอื่น ในแง่การศึกษาเซลล์เอ็นเค ได้พบว่าชาวไทยมีจำนวนเซลล์นี้มากกว่าชาวคอเคเซียน และเพศหญิงมีปริมาณ  $CD3^+$  T cells สูงกว่าในเพศชาย แต่ในเพศชายมีปริมาณ เซลล์เอ็นเค สูงกว่าในเพศหญิง และเซลล์เอ็นเคประมาณร้อยละ 86 มีโมเลกุลของ  $CD16$  และ  $CD56$  อยู่บนเซลล์เดียวกัน และการศึกษาความผันแปรทางอายุ พบว่าจำนวนของเซลล์ $CD4$  จะเพิ่มขึ้นร้อยละ 1.1 เมื่ออายุมากขึ้นทุก10 ปี

งานวิจัยได้ทำการวิเคราะห์หาการเปลี่ยนแปลงจำนวนของ immune cells ชนิดต่างๆ เมื่อจำนวน  $CD4^+$  T cells เปลี่ยนแปลงไป โดยทำการศึกษาในผู้ติดเชื้อเอชไอวี 2 กลุ่ม คือกลุ่มที่มี  $CD4^+$  T cells <14% และ  $\geq 14%$  และพบว่าเมื่อจำนวน  $CD4^+$  T cells ลดลง จำนวน $CD8^+$  T cells และเซลล์เอ็นเค จะเพิ่มขึ้น แต่จำนวน B cells จะไม่มีการเปลี่ยนแปลง

การศึกษาความสามารถของเซลล์ในการสร้างสารไซโตไคน์ และคีโมไคน์ โดย flow cytometry ในเม็ดเลือดขาวของผู้ไม่ติดเชื้อเอชไอวี จำนวน 10 คน และผู้ติดเชื้อจำนวน 28 คน ด้วยการกระตุ้นด้วย PMA และ ionomycin แสดงให้เห็นว่า ทั้งเซลล์เอ็นเค และ $CD8^+$  T cells เป็นแหล่งสำคัญในการผลิตสารอินเตอร์เฟอรอนแกมมา และ MIP- $\beta$  ในขณะที่เซลล์ซึ่งสร้างสารRANTES และ MIP- $\alpha$  ส่วนใหญ่เป็น  $CD8^+$  T cells และเซลล์ของคอนปกติ และผู้ติดเชื้อเอชไอวี ไม่มีความแตกต่างกันในด้านความสามารถในการผลิตสารไซโตไคน์ และคีโมไคน์

จากการศึกษาการทำลายเซลล์แปลกปลอม โดยเซลล์เอ็นเค (NK cell cytotoxicity assay) ในคนปกติจำนวน 69 ราย และผู้ติดเชื้อเอชไอวี 107 ราย ด้วยวิธีการปลดปล่อยสารโครเมียม-51 จากเซลล์เป้าหมาย K562 โดยวัดเป็นค่า lytic unit (LU20)/ $10^6$  PBMCs พบว่าค่าเฉลี่ย  $LU20 \pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานในคนปกติคือ  $10.5 \pm 8.4$  และค่าที่ได้ไม่มีความแตกต่างทางด้านเพศ และการศึกษาชี้แจงว่าการทำงานของเซลล์เอ็นเค ในผู้ติดเชื้อเอชไอวีลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับคนปกติ อย่างไรก็ตาม การศึกษาในผู้ป่วยเอชไอวี ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ  $CD4^+$  T cells และการทำงานของเซลล์เอ็นเค ในการทำลายเซลล์แปลกปลอม

การศึกษานี้ชี้แนะว่าเซลล์เอ็นเค น่าจะเป็นเซลล์ที่ตีในการป้องกันและควบคุมการดำเนินโรคในผู้ติดเชื้อเอชไอวี นอกเหนือไปจากเซลล์  $CD8^+$  และนิวทรอฟิลซึ่ง แอนติบอดี การศึกษาคิดตามผู้ป่วยอย่างต่อเนื่อง จะให้ข้อมูลที่ชัดเจนขึ้น

**IMMUNOPHENOTYPES, CYTOKINE PRODUCTION, AND CYTOTOXIC ACTIVITY OF NATURAL KILLER CELLS IN HIV-1 INFECTED CASES**

SUJIN ASSAWAWITOONTIP 4037136 SIMM/D

Ph.D. (MEDICAL MICROBIOLOGY)

THESIS ADVISORS: PILAIPAN PUTHAVATHANA, Ph.D., KOVIT PATTANAPANYASAT, Ph.D., PRASERT AUEWARAKUL, M.D.,Dr.med., CHITRAPORN KARNASUTA, Ph.D.

**ABSTRACT**

This research emphasized the investigation of NK cell numbers and their function in HIV-1 infected cases. In addition, the lymphocyte immunophenotype reference ranges of CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup>T cells, CD19<sup>+</sup>B cells, CD16<sup>+</sup>, CD56<sup>+</sup> and CD16<sup>+</sup>/CD56<sup>+</sup>NK cells and CD4/CD8 ratios were established in a total of 125 HIV seronegative healthy Thai adults. Flow cytometric analyses demonstrated relatively lower CD4<sup>+</sup>T counts, but a higher NK cell count in Thais as compared to Caucasians. Our study was supported by other groups of investigators on Thai and other Mongoloid people. Statistical analyses showed that females had a significantly higher total CD3<sup>+</sup>T cells, but lower NK cell counts as compared to males ( $p < 0.05$ ); and approximately 86% of NK cells carried both CD16 and CD56 molecules on the same cell. Regarding age variation, an increase of 1.1% of CD4<sup>+</sup>T cells per decade was seen. We also studied the changes in lymphocyte subsets in correlation with the level of CD4<sup>+</sup>T cell count in HIV seropositive subjects with CD4<sup>+</sup>T cells <14 or  $\geq 14\%$ . The results showed that a decrease in CD4<sup>+</sup>T cell count had resulted in an increase in number of CD8<sup>+</sup>T cells and NK cells. Meanwhile, the change on CD4<sup>+</sup>T cell count had no effect on level of CD19<sup>+</sup>B cell count.

A three color flow cytometric analysis was used to detect intracellular cytokine/chemokine production in 10 HIV seronegative and 28 HIV seropositive subjects. It was revealed upon stimulation with PMA and ionomycin that both NK and CD8<sup>+</sup>T cells were important sources of IFN- $\gamma$  and MIP-I $\beta$ ; whereas RANTES and MIP-I $\alpha$  were mainly produced by CD8<sup>+</sup>T cells. Moreover, the study demonstrated that HIV seronegative and seropositive subjects are not different in the ability to produce chemokine/cytokine.

NK cell cytotoxic activity assay was performed in 69 HIV seronegative and 107 HIV seropositive subjects by using a standard <sup>51</sup>chromium release assay against K-562 target cells and its cytotoxic activity was expressed as lytic unit (LU20) per 10<sup>6</sup>PBMCs. The results showed that NK cell cytotoxic activity in HIV seronegative subjects had no difference by sex with an average LU20 of 10.5 $\pm$ 8.4. A decrease in NK cytotoxic activity was observed in the late stage of HIV infection i.e., in subjects with CD4<sup>+</sup>T cells <14% as compared to HIV seronegative subjects. However, level of CD4<sup>+</sup>T cell count in HIV infected cases had no correlation with level of NK cell cytotoxic activity. Collective data from this study suggested that NK cells may be an alternative to CD8<sup>+</sup>T cells and neutralizing antibodies in the prevention against HIV disease progression. A longitudinal study is needed in order to explore this point of view.

KEY WORDS: IMMUNOPHENOTYPES/ CYTOKINE/ CYTOTOXIC ACTIVITY/ NK CELLS/ HIV  
128 P. ISBN 974-04-6071-2