

**THE MECHANISM OF PAROXYSMAL NOCTURNAL
HEMOGLOBINURIA CLONE DOMINANT: THE ROLE OF
APOPTOSIS OF NON-MUTATED CELLS IN THE
EXPANSION OF MUTATED CELLS**

RAJITA KUNYABOON

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE (IMMUNOLOGY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2006**

**ISBN 974-04-7483-7
COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY**

การศึกษากลไกการขยายตัวของ paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clone: บทบาทของ apoptosis ของเซลล์ปกติต่อการขยายตัวของเซลล์ PNH (THE MECHANISM OF PAROXYSMAL NOCTURNAL HEMOGLOBINURIA CLONE DOMINANT: THE ROLE OF APOPTOSIS OF NON-MUTATED CELLS IN THE EXPANSION OF MUTATED CELLS)

รจิตา กัญยานุญ 4436238 SIIM/M

วท.ม. (วิทยานิพนธ์)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : วันชัย วนะชิวาวิน, พ.บ., วว (อายุรฯ), โกวิท พัฒนาปัญญาสัตย์, Ph.D., จิรายุ เอื้อวรากุล, พ.บ., Ph.D.

บทคัดย่อ

Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) เป็นโรคที่มีความผิดปกติของ hematopoietic stem cell โดยมีลักษณะทางคลินิกที่สำคัญคือ เม็ดเลือดแดงแตกในกระแสเลือด (intravascular hemolysis) ความบกพร่องในการผลิตเม็ดเลือด (deficiency hematopoiesis) และปัญหาลิ่มเลือดอุดตัน (thrombosis) PIG-A gene มีความสำคัญเกี่ยวข้องในขั้นตอนแรกของการสังเคราะห์ glycosylphosphatidylinositol (GPI) ดังนั้นการเกิด mutation ของ PIG-A gene จึงเป็นผลทำให้เกิดการขาดหายไปของ membrane proteins บนผิวเซลล์ของ hematopoietic cells โดยเฉพาะอย่างยิ่ง การขาดหายไปของ CD55 (decay accelerating factor; DAF) และ CD59 (membrane inhibition of reactive lysis; MIRL) ซึ่งมีความสำคัญในการป้องกันการแตกของเซลล์เม็ดเลือดจากการกระตุ้นของ complement กลไกการขยายตัวของ PNH clone เป็นประเด็นที่น่าสนใจในปัจจุบัน การศึกษาครั้งนี้จึงได้ทำการทดลองเพื่อหาสาเหตุว่าเหตุใด PNH cells จึงสามารถขยายตัวและทดแทนการผลิตเม็ดเลือดในผู้ป่วย PNH ได้ โดยศึกษาอิทธิพลของการเกิด autoimmune ในผู้ป่วย

กลุ่มศึกษาประกอบด้วยผู้ป่วย PNH จำนวน 21 ราย และคนปกติจำนวน 35 ราย เลือดของทั้งผู้ป่วยและคนปกติจะถูกนำไปวิเคราะห์การเกิด apoptosis ในเม็ดเลือดขาวชนิด granulocyte การวิเคราะห์จำนวน CD8⁺ T cells NKT cells และ NK cells และการทดลองโดยการเพาะเลี้ยง hemopoietic progenitor cells

จากการศึกษาในผู้ป่วย PNH พบว่า granulocyte ปกติ (CD59⁺ granulocytes) มีการเกิด apoptosis มากกว่า PNH granulocytes (CD59⁻ granulocytes) โดย mononuclear cell (MNCs) อาจมีผลต่อการเกิด apoptosis ของ CD59⁺ granulocytes นี้ เนื่องจากพบการเพิ่มขึ้นของการเกิด apoptosis ของ CD59⁺ granulocytes อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกรเกิด apoptosis ของ CD59⁻ granulocytes หลังจากเลี้ยงเซลล์ในสภาวะที่มี MNCs เป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง นอกจากนี้ยังพบว่า CD59⁺ granulocytes ของผู้ป่วย PNH มีการเกิด apoptosis สูงกว่า CD59⁺ granulocytes ของคนปกติ ในการวิเคราะห์จำนวนของ CD8⁺ T cells NKT cells และ NK cells ไม่พบการเพิ่มขึ้นของเซลล์ทั้งสามชนิดในผู้ป่วย PNH และการทดลองเพาะเลี้ยง hemopoietic progenitor cells พบว่า CD8⁺ T cells อาจมีผลต่อการทำลาย hematopoietic stem cells โดยพบการยับยั้งการเจริญของ CFU-GM แต่ไม่พบการยับยั้งการเจริญของ BFU-E

การพบการเกิด apoptosis มากใน CD59⁺ granulocytes และความบกพร่องของการสร้างเม็ดเลือดในผู้ป่วย PNH แสดงให้เห็นว่าเซลล์ปกติ (non-mutated cells) ของผู้ป่วย PNH มีแนวโน้มที่จะถูกทำลาย และแสดงให้เห็นว่า PNH stem cells เองไม่มีข้อได้เปรียบในการเจริญเติบโต การศึกษาครั้งนี้พบความเป็นไปได้ของ autoreactive lymphocytes ที่อาจเป็นสาเหตุให้เกิด PNH ได้

THE MECHANISM OF PAROXYSMAL NOCTURNAL HEMOGLOBINURIA
CLONE DOMINANT: THE ROLE OF APOPTOSIS OF NON-MUTATED CELLS
IN THE EXPANSION OF MUTATED CELLS

RAJITA KUNYABOON 4436238 SIIM/M

M.Sc. (IMMUNOLOGY)

THESIS ADVISORS : WANCHAI WANACHIWANAWIN, M.D.,
KOVIT PATTANAPANYASAT, Ph.D., CHIRAYU U AUEWARAKUL, M.D.,
Ph.D.

ABSTRACT

Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) is an acquired hematopoietic stem cell disorder with various clinical manifestations including intravascular hemolysis, deficient hematopoiesis, and thrombosis. The PIG-A gene encodes a protein essential in the early step of glycosylphosphatidylinositol (GPI) biosynthesis. The mutation of the PIG-A gene results in a deficiency of GPI-linked membrane proteins in various hematopoietic cells, especially CD55 (decay accelerating factor; DAF) and CD59 (membrane inhibitor of reactive lysis; MIRL) which protect blood cells from complement mediated lysis. The mechanism by which a PNH clone expand is the major current concern. This study investigates how PNH cells deficient in GPI-linked proteins expand and contribute substantially to hematopoiesis in PNH patients by considering the hypothesis that the autoimmune process selects and destroys non-mutated cells.

Peripheral blood samples from 21 PNH patients and 35 healthy volunteers were subjected to apoptosis assay, analysis of the number of CD8⁺ T cells, NKT cells, and NK cells, and hemopoietic progenitor cell assay.

In PNH patients, CD59(+) granulocytes showed more apoptosis than CD59(-) granulocytes. Mononuclear cells (MNCs) were shown to affect the apoptosis of CD59(+) granulocytes as indicated by the significant increase in apoptosis of CD59(+) granulocytes compared with CD59(-) granulocytes in a culture conditioned with MNCs after 4 hours. The sensitivity to autologous MNCs of CD59(+) granulocytes from PNH patients was higher than that to CD59(+) granulocytes from normal controls. The analysis of the number of CD8⁺ T cells, NKT cells, and NK cells in PNH patients showed no significant increase of these cells. With hemopoietic progenitor cell assay, the CD8⁺ T cells were shown to be possibly responsible for the destruction of hematopoietic stem cells in PNH patients as demonstrated by the significant growth inhibition in the CFU-GM (but not in BFU-E).

The greater apoptosis of CD59(+) granulocytes and hemopoietic inhibition by the CD8⁺ T cells in PNH patients suggests the sensitivity to the destruction of non-mutated cells and growth disadvantage of PNH stem cells. In addition, these findings indicate the possible role of autoreactive lymphocytes in the pathogenesis of PNH.

KEY WORDS : APOPTOSIS / AUTOIMMUNE / HEMATOPOIETIC DEFECT /
PAROXYSMAL NOCTURNAL HEMOGLOBINURIA

163 P. ISBN 974-04-7483-7