

การพัฒนา dendritic cells จากเซลล์โมโนไซต์ของมนุษย์ เพื่อศึกษาภูมิคุ้มกันต่อเชื้อแบคทีเรีย *Burkholderia pseudomallei*

มนรัตน์ ปันศิริ^{1,3}, ดารารรรณ รินชัย^{2,3*}, กาญจนา เลิศมิ่งมงคลชัย³

บทคัดย่อ

Burkholderia pseudomallei (*B. pseudomallei*) เป็นแบคทีเรียแกรมลบที่เป็นสาเหตุของโรคmelioidosis ซึ่งเป็นโรคติดต่อที่พบการระบาดมากในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และตอนเหนือของทวีปออสเตรเลีย โรคmelioidosisนี้ มีอาการแสดงที่หลากหลาย ตั้งแต่ไม่แสดงอาการ ถึงแสดงอาการ เรื้อรัง และอาการเฉียบพลัน ปัจจุบันความรู้เกี่ยวกับกลไกการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันในมนุษย์ของเชื้อ *B. pseudomallei* ยังมีการศึกษาอยู่น้อย การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อทำการสร้าง dendritic cells (DCs) จากเซลล์ monocyte ของมนุษย์ในหลอดทดลอง ที่เรียกว่า Monocyte-derived dendritic cells (MoDCs) เพื่อเป็นต้นแบบในการศึกษาการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ *B. pseudomallei* จากผลการศึกษาโดยใช้วิธี immunomagnetic bead sorting จากตัวอย่างเลือดจากผู้บริจาคโลหิต สามารถแยกเซลล์โมโนไซต์ (CD14+ cells) ที่มีความบริสุทธิ์ถึง ร้อยละ 95 และมีการพัฒนาไปเป็น MoDCs พบการแสดงออกของแอนติเจนชนิด HLA-DR และ CD11c บนผิวเซลล์เพิ่มมากขึ้น จากการตรวจด้วยวิธี Flow cytometry และพบการแสดงออกของ CD 14 ที่ลดลง เมื่อกระตุ้นด้วยไซโตไคน์ชนิด GM-CSF และ IL-4 นอกจากนี้ยังได้ทำการทดสอบความสามารถของ MoDCs ในการสร้าง IL-6 โดยการกระตุ้นด้วยเชื้อ *B. pseudomallei* ที่ทำให้ตายด้วยความร้อน (heat killed *B. pseudomallei*) หรือ lipopolysaccharide จากเชื้อ *Escherichia coli* และทำการตรวจด้วยวิธี Sandwich ELISA พบว่าเชื้อ *B. pseudomallei* สามารถกระตุ้นให้ MoDCs สร้าง IL-6 ออกมาในส่วนไอของน้ำเลี้ยงเซลล์ แสดงถึงการพัฒนาไปสู่การทำหน้าที่อย่างสมบูรณ์ของ DCs ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นถึงความสามารถในการพัฒนาวิธีการสร้าง DCs ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการศึกษาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ *B. pseudomallei* ต่อไป

คำสำคัญ: Dendritic cells, Monocytes, Monocyte derived dendritic cells, *Burkholderia pseudomallei*

¹นักศึกษาปริญญาโท หลักสูตรวิทยาศาสตรการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์

²นักศึกษาปริญญาเอก หลักสูตรชีวเวชศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น

³ศูนย์วิจัยและพัฒนาการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ (ศวป.) คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

* ผู้รับผิดชอบบทความ

Generation of dendritic cells from human monocytes to study immune response against *Burkholderia pseudomallei*

Maneerat Pinsiri^{1,3}, Darawan Rinchai^{2,3*}, Ganjana Lertmemongkolchai³

Abstract

Burkholderia pseudomallei (*B. pseudomallei*) is a major causative agent of melioidosis in southeast Asia and northern Australia. Clinical manifestations range from asymptomatic, sub-acute and chronic infections to acute sepsis. However, the mechanism of immune response to *B. pseudomallei* is known very little. This study aimed to generate monocyte derived dendritic cells (MoDCs) from human peripheral blood samples as a model to study immune response to *B. pseudomallei*. By using immune-magnetic bead sorting, monocytes (CD14+ cells) were isolated from peripheral blood and the purity of obtained monocytes was approximately 95%. Moreover, the monocytes differentiated into “immature” DC by GM-CSF and IL-4 activation as evidenced by their surface phenotypes assayed by flow cytometry eg. HLA-DR and CD11c upregulation whilst CD14 downregulation. When MoDCs were collected and stimulated with heat killed- *B. pseudomallei* or lipopolysaccharide from *E. coli* for 24 or 48 hours, the results indicated the highest levels of IL-6 induced by *B. pseudomallei* and it was comparable between 24 and 48 hours. In conclusion, we demonstrated the generation of MoDCs which could be used for further study of immune responses to *B. pseudomallei* and other pathogens.

Keywords: Dendritic cells, Monocytes, Monocyte derived dendritic cells, *Burkholderia pseudomallei*

¹Master degree student in Medical sciences, Faculty of Associated Medical Sciences,

²Ph.D candidate in Biomedical sciences, Graduate School, Khon Kaen University

³Centre for Research and Development of Medical Diagnostic Laboratories (CMDL), Faculty of Associated Medical Sciences, Khon Kaen University

*Corresponding author (e-mail: rawan112002@yahoo.com)

บทนำ

Dendritic cells (DCs) เป็นเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายซึ่งทำหน้าที่เป็น antigen presenting cell (APC) มีบทบาทสำคัญในการตอบสนองต่อการติดเชื้อ โดยเฉพาะในช่วงแรกของการติดเชื้อ และเป็นกลไกสำคัญในการควบคุมการทำงานที่สัมพันธ์กันของระบบภูมิคุ้มกันแบบ innate immune response และแบบ adaptive immune response ในสภาวะปกติ DCs ทำหน้าที่เสมือนยามของร่างกาย เมื่อพบกับสิ่งแปลกปลอมจะทำการจับกินและย่อยสิ่งแปลกปลอมเหล่านั้น⁽¹⁾ พร้อมกับเดินทางไปสู่ต่อมน้ำเหลืองเพื่อนำเสนอแอนติเจนของสิ่งแปลกปลอมให้กับ T lymphocyte ที่อยู่ในต่อมน้ำเหลืองเพื่อกระตุ้นให้ร่างกายกำจัดสิ่งแปลกปลอมเหล่านั้น โดยในขณะที่เดินทางไปสู่ต่อมน้ำเหลือง DCs จะมีการพัฒนาโมเลกุลที่จำเป็นในการกระตุ้นการทำงานของ lymphocyte และกระตุ้นการทำงานของเซลล์ lymphocyte ด้วย 3 กลไก คือ 1. กลไก MHC-complex และ T-cell receptor 2. การกระตุ้นผ่าน co-stimulatory molecules และ 3. กลไกการกระตุ้นผ่านทาง cytokine receptor⁽²⁾ การศึกษาการทำงานของ DCs โดยการแยกเซลล์ชนิดดังกล่าวออกมาโดยตรงจากร่างกายนั้นทำได้ยาก เนื่องจากเซลล์นี้มีปริมาณที่น้อยมากในกระแสเลือด จึงได้มีการพยายามสร้าง DCs ในหลอดทดลองขึ้น โดยได้มีการพยายามที่จะนำ DCs ที่เป็น conventional DCs ที่อยู่ตามเนื้อเยื่อต่างๆ หรือการแยกเซลล์เม็ดเลือดขาวโมโนไซต์จากส่วนต่างๆ ในร่างกาย เช่น จากน้ำล้างปอด หรือส่วนของเม็ดเลือดขาวจากกระแสเลือดมากระตุ้นด้วย cytokine 2 ชนิด คือ granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) และ interleukin-4 (IL-4) เพื่อให้เกิดการกระตุ้นการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็น DCs ที่เรียกว่า monocyte-derived dendritic cells (MoDCs)⁽³⁾ ซึ่งโดยวิธีนี้จะทำให้ได้ DCs ในปริมาณที่เพิ่มมากขึ้นเพื่อใช้ในการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อไป

B. pseudomallei เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่เป็นสาเหตุของโรค melioidosis ซึ่งพบและรายงานครั้งแรกที่กรุงย่างกุ้ง ประเทศพม่า ในปี ค.ศ. 1911 โดย Alfred Whitmore และ CS Krishnaswami⁽⁴⁾ โดยมีพื้นที่ระบาดอยู่ในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และพบมากอย่างยิ่งในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยและทางตอนเหนือของทวีปออสเตรเลีย⁽⁵⁾ อาการของโรคนี้มีหลากหลาย

ตั้งแต่ไม่แสดงอาการ ถึงแสดงอาการ เรื้อรัง และอาการเฉียบพลัน⁽⁶⁾ การวินิจฉัยทางคลินิกของโรคนี้ทำได้ยากเนื่องจากมีอาการแสดงเหมือนกับโรคติดเชื้ออื่นๆ และการศึกษาเกี่ยวกับการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ *B. pseudomallei* ในมนุษย์ยังมีอยู่น้อย การศึกษานี้จึงมีจุดประสงค์เพื่อสร้างเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด DCs เพื่อใช้ในการศึกษาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของมนุษย์ ต่อเชื้อ *B. pseudomallei* เพื่อเป็นตัวอย่างในการศึกษาประโยชน์ในการรักษา วินิจฉัยและการพัฒนาวัคซีนต่อไป

วัสดุและวิธีการศึกษา

การแยกโมโนไซต์ ด้วยวิธี immuno-magnetic bead sorting และการตรวจวัดความบริสุทธิ์

การศึกษานี้ได้ใช้ตัวอย่าง buffy coat จากอาสาสมัครสุขภาพดีที่ได้จากงานคลังเลือด โรงพยาบาลศรีนครินทร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ซึ่งโครงการวิจัยได้ผ่านการรับรองจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น เลขที่ HE470506

โดยเริ่มแยก monocyte จาก peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) ด้วยวิธี density gradient centrifugation โดยการใช้ Ficoll-Hypaque (1.077 g/ml) ปริมาตร 15 ml และตัวอย่างเลือดที่เจือจางด้วย Phosphate buffered saline (PBS) ในอัตราส่วน 1:2 ปริมาตร 30 ml ปั่นด้วยความเร็วรอบ 400 g, 20 °C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำ PBMCs ที่ได้มาผ่านกระบวนการแยก monocyte โดยใช้ immuno magnetic bead cell sorting (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) แบบ positive selection และส่วนหนึ่งจะถูกแบ่งเพื่อตรวจวัดความบริสุทธิ์ด้วยวิธี flow cytometry โดยใช้ CD14 monoclonal antibody ที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสง Fluorescein isothiocyanate (FITC) จากนั้นจึงนำ monocyte ที่มีความบริสุทธิ์มากกว่า ร้อยละ 95 ไปใช้ในการสร้าง DCs ในหลอดทดลองเพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

การสร้าง Dendritic cells ในหลอดทดลอง (in-vitro Dendritic cells generation)

Monocyte ที่แยกให้บริสุทธิ์ แล้วจะนำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด RPMI 1640 (Gibco, Grand Island, NY) ที่เติมมีการเติม Fetal Bovine Serum (FBS) ที่ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ และเติม Granulocyte Monocyte-Colony

Stimulating Factor (GM-CSF) และ Interleukin-4 (IL-4) (PeproTech, Rocky Hill, NJ) ความเข้มข้น 300 U/ml และ 200 U/ml ตามลำดับ⁽³⁾ โดยเลี้ยง monocyte ในถาดเลี้ยงชนิด 24 หลุม ในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C และมีปริมาณ 5 % CO₂ โดยเติมเซลล์ monocytes จำนวน 10⁶ เซลล์ ใน RPMI 1640 ปริมาตร 1 ml ทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยง โดยนำอาหารเลี้ยงออกปริมาตร 500 µl จากนั้นเติมอาหารใหม่ลงไป 500 µl โดยทำการเปลี่ยนในทุกๆ 2 วัน เมื่อครบ 6 วันจึงเก็บเซลล์ที่ได้ไปตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของแอนติเจนบนผิวเซลล์ชนิด CD14, CD11c และ HLA-DR เพื่อตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงไปเป็น DCs โดยใช้คอนจูเกตที่จำเพาะได้แก่ CD14-FITC, CD11c-PE และ HLA-DR-PE (BD Biosciences) ด้วยวิธี flow cytometry

การเลี้ยงเชื้อ *B. pseudomallei* และการทำให้ตายด้วยความร้อน (Growth of *B. pseudomallei* and heat inactivation)

เชื้อ *B. pseudomallei* สายพันธุ์ K96243 ที่แยกได้จากผู้ป่วยและนำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Luria-Bertani (LB) ชนิดเหลว ในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นทำการนับปริมาณเชื้อด้วยวิธีนับจำนวนโคโลนี ส่วนการทำให้เชื้อตายด้วยความร้อนนั้นทำโดย ปั่นอาหารเลี้ยงที่มีเชื้อแบคทีเรียเจือจางอยู่ จากนั้นล้างด้วย PBS 3 ครั้ง เจือจางเชื้อ *B. pseudomallei* ที่ได้ด้วย PBS ในอัตราส่วน 1:10 และทำให้ตายด้วยความร้อน 70 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นตรวจสอบการมีชีวิตรอดของเชื้อ โดยเติมเชื้อแบคทีเรียที่ผ่านการทำให้ตายด้วยความร้อน ปริมาตร 50 µl ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ชนิดเหลวปริมาตร 5 ml บ่มในตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 7 วัน จากนั้น นำอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ชนิดเหลว ปริมาตร 200 µl ไปเลี้ยงบนอาหาร LB ชนิดแข็ง อีกเป็นเวลา 7 วัน⁽⁷⁾ หากไม่มีเชื้อ *B. pseudomallei* เจริญ จึงนำเชื้อที่ผ่านการทำให้ตายด้วยความร้อนไปใช้งานต่อไป

การศึกษาความสมบูรณ์และประสิทธิภาพการทำงานของ DCs ที่สร้างขึ้น

Dendritic cell ที่ได้จะถูกกระตุ้นด้วยเชื้อ *B. pseudomallei* ที่ทำให้ตายด้วยความร้อน (HkBs) ในอัตราส่วน 1:10 (DCs : HkBs = 1:10), 1 µg/ml lipopolysaccharide (LPS) จากเชื้อ *Escherichia coli* และ 10 µg/ml IL-12 ร่วมกับ IL-15 สำหรับใช้เป็น positive control เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง

ในตู้เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 °C และมีปริมาณ 5 % CO₂ จากนั้นทำการเก็บส่วนใสของน้ำเลี้ยงเซลล์ที่ถูกกระตุ้นเพื่อนำไปตรวจหาไซโตไคน์ (cytokine) หลักที่สร้างจาก DCs ซึ่งได้แก่ IL-6 นอกจากนี้ในส่วนของเซลล์ DCs จะถูกทำการย้อมด้วยเทคนิค immunofluorescence และการตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Flow cytometry เพื่อการแสดงผลของแอนติเจนบนผิวเซลล์ ได้แก่ CD14, HLA-DR และ CD11c เพื่อการพัฒนาไปเป็น DCs ที่สมบูรณ์

การตรวจหาไซโตไคน์ชนิด IL-6 ด้วยวิธี Sandwich ELISA

ทำการเคลือบ ELISA plate ด้วยแอนติบอดีต่อ IL-6 ของมนุษย์ ที่เจือจาง 1:250 ใน 0.1 M carbonate-bicarbonate buffer (pH 9.6) เติมน้ำในเพลท ELISA ปริมาตร 50 µl นำไปบ่มที่ 37 °C 3 ชั่วโมง หรือ 4 °C ช้ามคืน จากนั้น block เพลทด้วย 10 % FBS อบที่อุณหภูมิห้อง 60 นาที จากนั้นทำการเติมสารมาตรฐาน (standard) IL-6 ที่ทราบความเข้มข้นเริ่มจาก 0 ถึง 600 pg/ml และส่วนใสของน้ำเลี้ยงเซลล์ที่เจือจาง ใน PBS ที่มี 0.05 % Tween 20 โดยมี culture medium เป็น negative control นำเพลทไปวางไว้ที่ อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 120 นาที ทำการล้างส่วนเกินออกไปด้วย PBS ที่มี 0.05 % Tween 20 จำนวน 3 ครั้ง จากนั้นเติม 1:250 ของ anti-IL-6 conjugated HRP-Biotin (BD Biosciences) ผสมกับ 1:250 avidin ที่เจือจางใน 10 % FBS ลงไปหลุมละ 50 µl วางไว้ที่อุณหภูมิ ห้องเป็นเวลา 60 นาที ทำการล้างส่วนเกินออกไปด้วย PBS ที่มี 0.05 % Tween 20 จำนวน 3 ครั้ง จากนั้นเติม Tetramethylbenzidine (TMB), hydrogen peroxide (H₂O₂) ซึ่งเป็น substrate เป็นเวลา 30 นาที อ่านผลที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง ELISA reader (Sunrise, Tecan, Crailsheim, Germany)

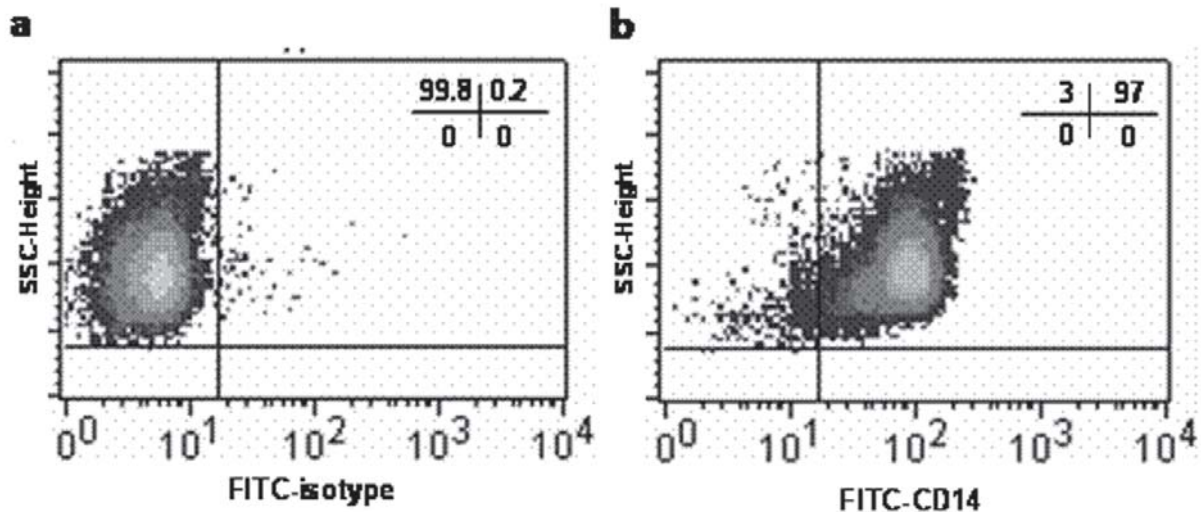
ผลการศึกษา

ความบริสุทธิ์ของเซลล์ชนิด monocyte หลังการแยกด้วยวิธี immuno-magnetic bead sorting

การแยกเซลล์เพื่อนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไปของการศึกษานี้ ใช้วิธี immuno magnetic bead sorting แบบ positive selection ผู้วิจัยทำการแยก monocyte จาก PBMCs จากนั้น monocyte ที่แยกได้ส่วนหนึ่งเพื่อทดสอบความบริสุทธิ์ โดยย้อมด้วย CD14 monoclonal antibody และตรวจนับ

เซลล์ที่เรืองแสงด้วยวิธี flow cytometry จากการศึกษาพบว่าได้เซลล์ monocyte ที่มีความบริสุทธิ์ประมาณร้อยละ 96-98 (รูปที่ 1) ซึ่งจะเห็นว่าเซลล์ที่แยกได้มีความบริสุทธิ์สูง

และมีการปนเปื้อนของเซลล์อื่นๆในปริมาณเล็กน้อย เซลล์ monocyte ที่แยกได้จึงมีความเหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการศึกษาต่อไป



รูปที่ 1 ความบริสุทธิ์ของเซลล์ monocytes โดยการย้อมแอนติเจนชนิด CD14 ที่แสดงอยู่บนผิวเซลล์ ภายหลังการแยกเซลล์ ด้วยวิธี immuno magnetic bead sorting แบบ positive selection

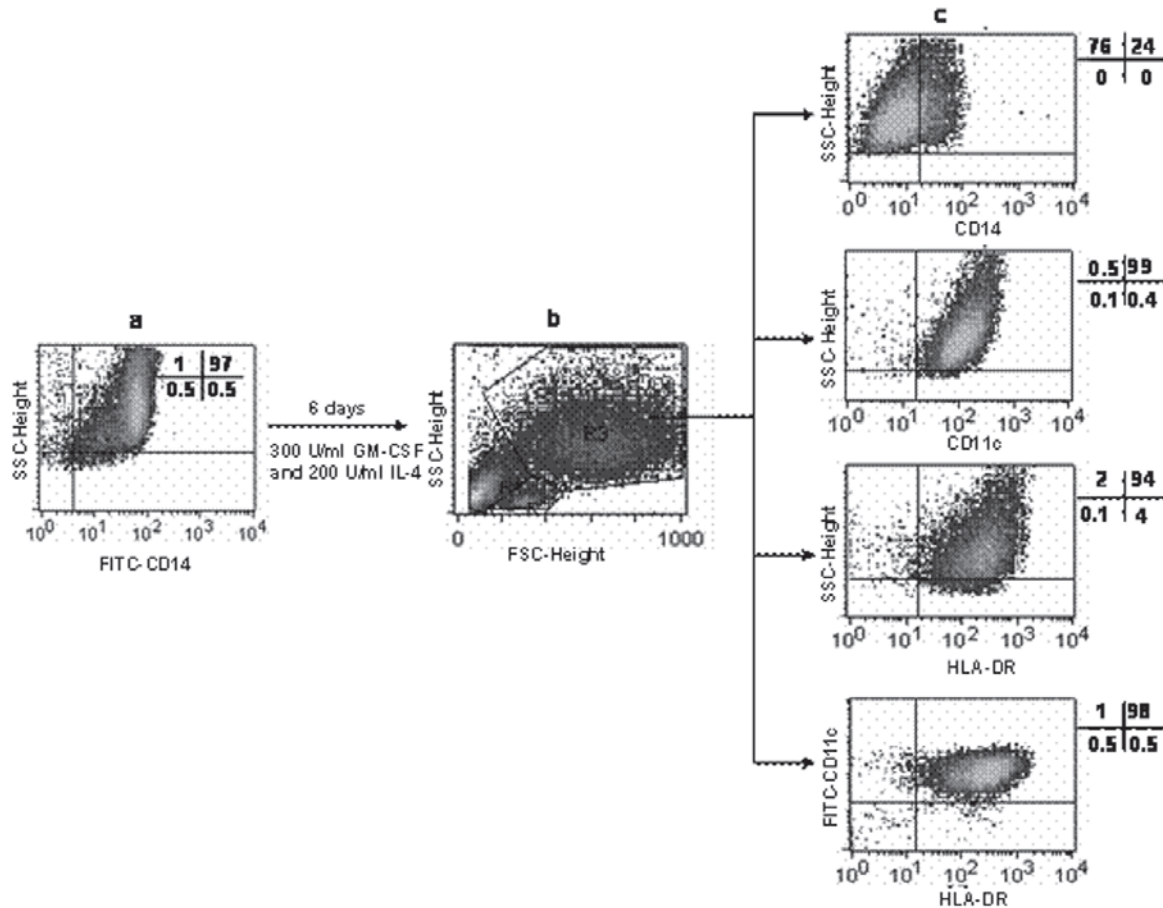
การเปลี่ยนแปลงของ monocyte ไปสู่ DCs ในหลอดทดลอง

ภายหลังการแยก monocyte ด้วยวิธี immune magnetic bead sorting และได้เซลล์ที่มีความบริสุทธิ์มากกว่าร้อยละ 95 แล้วจึงนำเซลล์มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด RPMI 1640 ที่มีการเติม 10 % FBS และเติม GM-CSF และ IL-4 ความเข้มข้น 300 U/ml และ 200 U/ml เป็นเวลา 6 วัน ทำการเก็บเซลล์และแบ่งส่วนหนึ่งไปตรวจวัดความเปลี่ยนแปลงจาก monocyte ไปสู่ MoDCs โดยการย้อมโมเลกุลบนผิวเซลล์ชนิด CD11c, HLA-DR, CD14 และตรวจวัดด้วยวิธี flow cytometry พบว่า เซลล์ที่ได้มีการแสดงออกของโมเลกุลบนผิวเซลล์ชนิด CD14 ซึ่งเป็นโมเลกุลที่จำเพาะกับ monocyte ลดลงจากร้อยละ 97.6 เหลือเพียงร้อยละ 23 (รูปที่ 2a และ 2c) และมีการสร้างโมเลกุลบนผิวเซลล์ชนิด CD11c ร่วมกับ HLA-DR ประมาณร้อยละ 98 (รูปที่ 2c) ซึ่งโมเลกุลทั้งสองชนิดบนผิวเซลล์นี้มีความจำเพาะต่อ DCs ผลการศึกษานี้สามารถสรุปได้ว่าการเปลี่ยนแปลงจากเซลล์ชนิด monocyte ไปเป็น DCs ภายในหลอดทดลองหลังจากการเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยง

เนื้อเยื่อที่เติมสาร GM-CSF และ IL-4 ลงไป และ DCs ที่ได้นี้ในขั้นตอนนี้จะนำไปใช้ในการศึกษากลไกการกระตุ้นเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันด้วยเชื้อ *B. pseudomallei* ต่อไป

การสร้าง IL-6 ของ MoDCs

วิธีการตรวจวัดการสร้างไซโตไคน์ IL-6 ซึ่งเป็นไซโตไคน์ที่สำคัญของ DCs เป็นหนึ่งในวิธีที่จะสามารถบอกถึงการพัฒนาของ monocyte ไปเป็น DCs จากผลการศึกษาครั้งนี้พบว่า DCs ที่ถูกกระตุ้นด้วย ด้วยเชื้อ *B. pseudomallei* ที่ถูกทำให้ตายด้วยความร้อน (HkBs) สามารถถูกกระตุ้นให้สร้างไซโตไคน์ IL-6 ในระดับที่มากกว่า DCs ที่ถูกกระตุ้นด้วยไซโตไคน์ IL-12 ร่วมกับ IL-15 หรือ DCs ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ของเชื้อ *E. coli* นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณไซโตไคน์ IL-6 ที่ตรวจวัดได้ ณ เวลา 24 และ 48 ชั่วโมงนั้นไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังรูปที่ 3 จากผลการศึกษา นี้ได้แสดงถึงการพัฒนาไปเป็นเซลล์ DCs ที่สามารถทำหน้าที่ได้อย่างสมบูรณ์



รูปที่ 2 การเปลี่ยนแปลงของเซลล์ monocyte ไปเป็น DCs (a)ปริมาณเซลล์ชนิด monocyte หลังการแยกด้วยวิธี immuno magnetic beads ในวันที่ 1 ด้วยการย้อม CD14 ติดฉลากด้วยสารเรืองแสง FITC และตรวจนับด้วยวิธี flow cytometry ซึ่งมีจำนวน monocyte 97.6 % (b) ขนาด และปริมาณแกรนูล ภายในเซลล์ ในวันที่ 6 หลังจากเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ ที่มี GM-CSF และ IL-4 ความเข้มข้น 300 และ 200 U/ml ตามลำดับ (c) การเปลี่ยนแปลงของแอนติเจนบนผิวเซลล์ ในวันที่ 6 โดยทำการย้อม แอนติเจนชนิด CD14 และการย้อม CD11c ร่วมกับ HLA-DR ซึ่งเป็นแอนติเจนที่จำเพาะ กับ DCs

วิจารณ์และสรุปผลการศึกษา

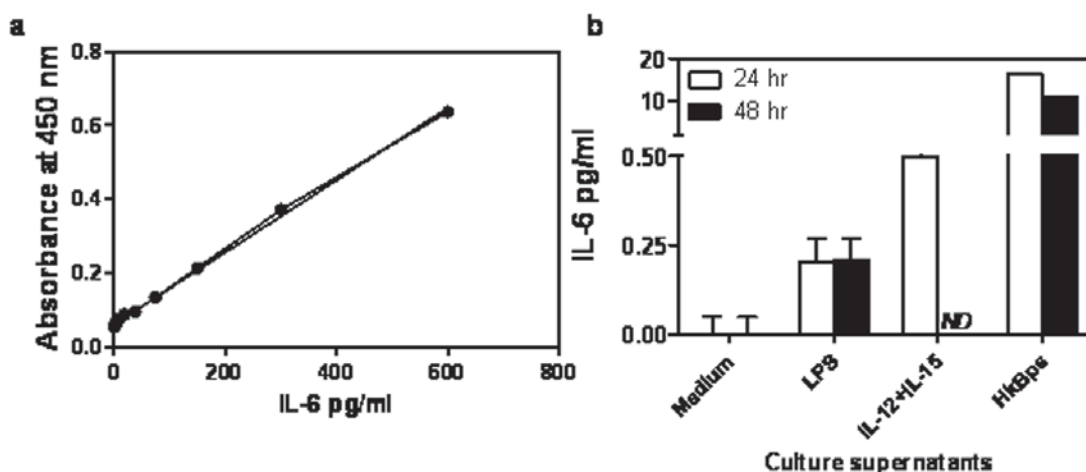
การสร้าง DCs ในหลอดทดลองมีประโยชน์อย่างมาก ในการที่จะศึกษาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ *B. pseudomallei* และเชื้ออื่นๆ เนื่องจากการแยก DCs จากร่างกาย โดยตรงนั้นทำได้ยาก และได้เซลล์ออกมา ในปริมาณน้อย ดังนั้นจึงใช้ MoDCs ทดแทนเพื่อเป็นต้นแบบ ในการศึกษาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน และการคัดเลือก แอนติเจนของเชื้อ *B. pseudomallei* เนื่องจาก DCs มีความไวสูงในการที่จะใช้ในการศึกษาและค้นหาแอนติเจน เพื่อประโยชน์ในการพัฒนาวัคซีน⁽⁷⁾

จากการศึกษาของ Healey และคณะ ในปี 2005 ได้ ทำการสร้าง MoDCs จากเซลล์ไขกระดูกของหนูทดลอง และ นำมากระตุ้นด้วยเชื้อ *B. pseudomallei* (DCs-pulsed *B. pseudomallei*) จากนั้นฉีดกระตุ้นหนูทดลองเป็นจำนวน สองครั้ง (prime-Boost immunizations) พบว่าหลังจาก ทำการฉีด (challenge) ด้วยเชื้อ *B. pseudomallei* เข้าไปหนู มีอัตราการรอดชีวิตมากขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม นอกจากนี้ หนูที่ได้รับการกระตุ้นด้วย DCs-pulsed *B. pseudomallei* ยังมีการพัฒนาภูมิคุ้มกันทั้งด้านสารน้ำ (humoral immunity) และ ทางด้านเซลล์ (cellular immunity) ได้ดีกว่าหนูที่ไม่เคยได้ รับการกระตุ้น⁽⁸⁾

ดังนั้นการศึกษานี้จึงได้ทำการสร้าง MoDCs จาก monocyte ของอาสาสมัครสุขภาพดี เพื่อนำไปสู่การศึกษาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ *B. pseudomallei* และเพื่อประโยชน์ในการศึกษาพัฒนาวัคซีน โดยการสร้าง DCs จากเซลล์ monocyte ของมนุษย์ภายในหลอดทดลองทำได้โดยการกระตุ้น monocyte ด้วย GM-CSF และ IL-4 ที่ความเข้มข้น 300 และ 200 U/ml ตามลำดับ⁽³⁾ และตรวจวัดความเปลี่ยนแปลงของเซลล์ด้วยการตรวจปริมาณโมเลกุลบนผิวเซลล์ชนิด CD11c ร่วมกับ HLA-DR ซึ่งจำเพาะกับ DCs พบว่าเมื่อเลี้ยงเซลล์ monocyte ครบ 6 วัน MoDCs มีปริมาณโมเลกุลบนผิวเซลล์ชนิด CD11c และ HLA-DR เพิ่มขึ้น ในขณะที่ CD14 ซึ่งจำเพาะกับเซลล์ monocyte ลดลง และจากผลการศึกษากการกระตุ้น MoDCs ด้วยเชื้อตาย (HkBs) สามารถพัฒนาไปเป็น mature DCs โดยสามารถถูกกระตุ้นให้มีการสร้างไซโตไคน์ IL-6 ได้ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมาของ Presicce และคณะในปี 2009 พบว่า MoDCs มีการแสดงออกของโมเลกุล HLA-DR, CD11c, CD80 และ CD86 เพิ่มมากขึ้น และเมื่อทำการกระตุ้นให้เกิดการพัฒนาไปเป็น mature DCs สามารถถูกกระตุ้นให้สร้าง proinflammatory cytokines ได้แก่ IL-6, IL-12p70 และ TNF- α ⁽⁹⁾ นอกจากนี้ Bagheri และคณะในปี 2008 พบว่าการกระตุ้น MoDCs ด้วย PPD (purified protein derivative) สามารถทำให้ MoDCs พัฒนาไปเป็น mature DCs

และมีการแสดงออกของโมเลกุล HLA-DR, CD80, CD83, CD86 และ CD40 บนผิวเซลล์เพิ่มขึ้น⁽¹⁰⁾ และ mature DCs สามารถสร้างไซโตไคน์ ซึ่งได้แก่ IL-6, IL-12, TNF- α และ IL-10^(10, 11) ซึ่งกลไกในการกระตุ้นการสร้างสามารถเกิดจากการที่ตัวเชื่อมมีโมเลกุลที่สามารถจับกับที่รับ (receptor) ที่อยู่บนผิวของ DCs แล้วเกิดการกระตุ้น เช่น Toll like receptor 4 (TLR4) ซึ่งจะสามารถจับได้กับ LPS ของเชื้อแล้วเกิดการกระตุ้นการสร้าง IL-6^(12, 13) และนอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบปริมาณของการสร้าง IL-6 ที่กระตุ้นด้วยตัวเชื่อมจะมีปริมาณมากกว่าการกระตุ้นด้วย LPS หรือ IL-12 ร่วมกับ IL-15 เนื่องจากเชื่อมมีส่วนประกอบต่างๆหลายส่วน ที่สามารถจับและกระตุ้นให้เซลล์ DCs สร้างไซโตไคน์ได้มากกว่า ตัวอย่างเช่น LPS สามารถกระตุ้นผ่าน TLR4 หรือ flagellin เกิดการกระตุ้นผ่าน TLR5 เป็นต้น^(12, 13) ส่วนการกระตุ้นของ IL-12 ร่วมกับ IL-15 นั้นจะสามารถกระตุ้น DCs ผ่าน cytokine receptors ที่อยู่บนผิวเซลล์ และเกิดการส่งสัญญาณให้มีการสร้างไซโตไคน์เกิดขึ้น^(14,15)

การศึกษานี้ได้แสดงให้เห็นถึงวิธีการสร้าง DCs ซึ่งจะนำไปสู่การพัฒนาการศึกษาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ *B. pseudomallei* หรือเชื้ออื่นๆ ซึ่งจะมีประโยชน์ในการคัดเลือกแอนติเจนที่จะนำมาใช้ในการตรวจวินิจฉัยหรือพัฒนาวัคซีนเพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกันของร่างกายต่อไป



รูปที่ 3 การสร้างสาร IL- 6 ของ DCs จากการกระตุ้นด้วยตัวเชื้อที่ถูกทำให้ตายด้วยความร้อน (HkBs), Lipopolysaccharile (LPS) และ IL-12+IL15 เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ทำการตรวจวัดโดยวิธี Sandwich ELISA (a) standard curve (b) ปริมาณ IL-6

กิตติกรรมประกาศ

มณีนรัตน์ ปิ่นศิริ ได้รับทุนสนับสนุนการศึกษาจาก ศูนย์วิจัยและพัฒนาการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ (ศวป.) คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น และदारारวรรณ รินชัย ได้รับทุนสนับสนุนจากโครงการกาญจนาภิเษก สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

เอกสารอ้างอิง

1. Sallusto F, Cella M, Danieli C, Lanzavecchia A. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J Exp Med* 1995; 182: 389-400.
2. Ueno H, Klechevsky E, Morita R, Asford C, Cao T, Matsui T, et al. Dendritic cell subsets in health and disease. *Immunol Rev* 2007; 219: 118-42.
3. Vincent MS, Leslie DS, Gumperz JE, Xiong X, Grant EP, Brenner MB. CD1-dependent dendritic cell instruction. *Nat Immunol* 2002; 3: 1163-8.
4. Whitmore A, Krishnaswami CS. An account of the discovery of a hitherto underscribed infective disease occurring among the population of Rangoon. *Indian Med Gazette* 1912; 47: 262-7.
5. Chaowagul W, White NJ, Dance DA, Wattanagoon Y, Naigowit P, Davis TM, et al. Melioidosis: a major cause of community-acquired septicemia in northeastern Thailand. *J Infect Dis* 1989; 159: 890-9.
6. Leelarasamee A. Recent development in melioidosis. *Curr Opin Infect Dis* 2004; 17: 131-6.
7. Elvin SJ, Healey GD, Westwood A, Knight SC, Eyles JE, Williamson ED. Protection against heterologous *Burkholderia pseudomallei* strains by dendritic cell immunization. *Infect Immun* 2006; 74: 1706-11.
8. Healey GD, Elvin SJ, Morton M, Williamson ED. Humoral and cell-mediated adaptive immune responses are required for protection against *Burkholderia pseudomallei* challenge and bacterial clearance postinfection. *Infect Immun* 2005; 73: 5945-51.
9. Presicce P, Giannelli S, Taddeo A, Villa ML, Della Bella S. Human defensins activate monocyte-derived dendritic cells, promote the production of proinflammatory cytokines, and up-regulate the surface expression of CD91. *J Leukoc Biol* 2009; 28: 1-8.
10. Bagheri K, Delirez N, Moazzeni SM. PPD extract induces the maturation of human monocyte-derived dendritic cells. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2008; 30: 91-104.
11. Bohnenkamp HR, Noll T. Development of a standardized protocol for reproducible generation of matured monocyte-derived dendritic cells suitable for clinical application. *Cytotechnology* 2003; 42: 121-31.
12. Takeda K, Akira S. TLR signaling pathways. *Semin Immunol* 2004; 16: 3-9.
13. Kawai T, Akira S. TLR signaling. *Cell Death Differ* 2006; 13: 816-25.
14. Blanco P, Palucka AK, Pascual V, Banchereau J. Dendritic cells and cytokines in human inflammatory and autoimmune diseases. *Cytokine Growth Factor Rev* 2008; 19: 41-52.
15. Kawasaki T, Choudhry MA, Schwacha MG, Bland KI, Chaudry IH. Effect of interleukin-15 on depressed splenic dendritic cell functions following trauma-hemorrhage. *Am J Physiol Cell Physiol* 2009; 296: C124-30.