บทคัดย่อ

โรคปริทันต์อักเสบมีลักษณะของการมีทีเซลล์และบีเซลล์อย่างหนาแน่นภายในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันของเหงือก และมีความเกี่ยวข้องกับแบคทีเรียแกรมลบในคราบจุลินทรีย์ใต้เหงือก *พอร์ไพโรโมแนส จินจิวาลิส* เป็นเชื้อหลักในการก่อโรค วัตถุประสงค์ของการวิจัยนี้เพื่อทำการสร้างทีเซลล์ลายส์และทีเซลล์โคลนจากเหงือกที่มีความสัมพันธ์กับแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคปริทันต์ (*พอร์ไพโรโมแนส จินจิวาลิส*) ในผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบขั้นรุนแรงและตรวจสอบฟีโนไทป์บนผิวเซลล์ คุณสมบัติจำเพาะ รวมทั้งชนิดของไซโตคายน์ ตอนเริ่มงานวิจัยไม่สามารถเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาวจากเหงือกได้ และเซลล์จากเหงือกตายภายใน 2 สัปดาห์ ในระหว่างนั้นสามารถสร้างทีเซลล์ลายส์จากเลือดจำนวน 2 ลายส์ของผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบขั้นรุนแรงจำนวน 2 คน โดยเริ่มที่กระตุ้นด้วยแอนติเจน และเลี้ยงต่อไปในไฟโตฮีแมกกลูตินิน อินเตอร์ลูคิน-2 และบีเซลล์ลายส์ ที่ทำให้เปลี่ยนแปลงโดยอิพสตายน์-บาร์ ไวรัส (เป็นเซลล์ที่มีความสามารถในการส่งผ่านแอนติเจน) ทำการทดสอบความจำเพาะของแต่ละลายส์เป็นระยะๆ โดยวิธีโพรลิเฟอเรชัน จากการวิเคราะห์โดยใช้โฟล ไซโตเมตรี พบว่า เซลล์ลายส์หนึ่งมี ทีเซลล์ชนิดที่เป็น ซีดี4 เป็นหลัก ส่วนอีกเซลล์ลายส์หนึ่งมีทีเซลล์ชนิด ซีดี8 เป็นหลัก อย่างไรก็ตามการวัดไซโตคายน์ที่สร้างจากเซลล์ลายส์ทั้งสอง โดยใช้วิธีอิไลซ่า พบว่าผลิตอินเตอร์เฟอรอนแกมมา แต่ไม่ผลิตอินเตอร์ลูคิน-4 หลังจากทำการกระตุ้นด้วย *พอร์ไพโรโมแนส จินจิวาลิส* จากความพยายามที่จะเลี้ยงทีเซลล์ที่มีความจำเพาะต่อแอนติเจนจากเหงือกของผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบ สุดท้ายเราสามารถสร้างได้หนึ่งทีเซลล์ลายส์ และหนึ่งทีเซลล์โคลนจากผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบขั้นรุนแรง โดยการหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการตอบสนองของทีเซลล์โดยใช้ เดนไดร์ติคเซลล์ ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีความสามารถส่งผ่านแอนติเจนได้เป็นอย่างดีเยี่ยม เดนไดร์ติคเซลล์ที่เปลี่ยนแปลงมาจากโมโนไซต์ที่เกาะติดจานเพาะเลี้ยงโดย จีเอ็ม-ซีเอสเอฟ และ อินเตอร์ลูคิน-4 นำเดนไดร์ติคเซลล์ ที่เตรียมได้มาสร้างทีเซลล์ที่มีความจำเพาะโดยกระตุ้นด้วย *พอร์ไพโรโมแนส จินจิวาลิส* แล้วนำไปเพาะเลี้ยงร่วมกับทีเซลล์จากเหงือกในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีอินเตอร์ลูคิน-2 แล้วกระตุ้นต่อเป็นระยะด้วยเดนไดร์ติคเซลล์ที่ได้รับการกระตุ้นด้วยแอนติเจน พบว่าทีเซลล์ลายส์จากเหงือกประกอบด้วย ทีเซลล์ชนิด ซีดี4 87% และ ซีดี8 3 % และแสดงความจำเพาะต่อ *พอร์ไพโรโมแนส จินจิวาลิส* เป็นอย่างดี การสร้างโคลนจากทีเซลล์ลายส์จากเหงือกทำด้วยวิธีลิมิต ไดลูชั่น สามารถโคลนได้ 5 โคลน มี 3 โคลนไม่เสถียรและตายในที่สุด ส่วน 2 โคลนที่เหลือเสถียร แต่หลังจากการทดสอบความจำเพาะ มีเพียง 1 โคลนเท่านั้นที่แสดงการตอบสนองที่ดีต่อ *พอร์ไพโรโมแนส จินจิวาลิส* โคลนที่ได้จากเหงือกนี้ผลิตไซโตคายน์แบบเดียวกับเซลล์ที่มีความจำเพาะต่อแอนติเจนที่ได้จากเลือด ได้แก่ อินเตอร์เฟอรอนแกมมาจำนวนมาก แต่ไม่ผลิตอินเตอร์ลูคิน-4 ดังนั้นผลของทีเซลล์ลายส์ที่มีความจำเพาะต่อแอนติเจนจากเลือดและเหงือกของผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบขั้นรุนแรงสนับสนุนบทบาทของไซโตคายน์ทีเอช1 ในการเกิดโรคปริทันต์อักเสบ อย่างไรก็ตาม ยังมีความจำเป็นในการพัฒนาและสร้างทีเซลล์โคลนเอมาศึกษาเพิ่มเติม โดยจะมีนิสิตปริญญาเอกดำเนินงานวิจัยชิ้นนี้ต่อ

Abstract

Periodontitis is characterized by dense infiltrations of T and B cells within the gingival connective tissue in association with Gram negative bacteria in subgingival plaque. *Porphyromonas gingivalis* has been implicated as a major pathogen. The aims of the present study was to establish and characterize human gingival T cell lines (TCLs) and clone (TCC) reactive with periodontopathic bacteria, *P.gingivalis* in severe periodontitis patients and also to investigate these cells in terms of their surface phenotypes, specificity and cytokine profiles. At the beginning of the project, growing gingival lymphocytes was not a success and the gingval cells died within two weeks. In the meantime two peripheral blood TCLs reactive with *P.gingivalis* derived from two patients with severe adult periodontitis were established. They were initially grew in antigen stimulated culture and subsequently maintained in Phytohemagglutinin, interleukin-2 and Epstein – Barr Virus (EBV) transformed B lymphoblastoid cell lines (antigen presenting cells). The specificity of each peripheral blood TCL was assessed periodically by proliferation assay. Flow cytometric analysis showed that the majority of one peripheral TCL were CD4+ cells whereas the other were CD8+ cells. However, both of them produced IFN-γ but no IL-4 after stimulation with *P.gingivalis* as measured by ELISA. Attempts have been made to grow antigen specific T cells from periodontitis tissues. Finally, we could obtain one gingival TCL and TCC from a severe periodontitis patient by trying to optimize T cell response in culture using dendritic cells (DC), the most potent professional antigen presenting cells. DC were derived from adherent monocytes using Granulocyte macrophage- colony stimulating factor (GM-CSF) and IL-4. To generate antigen specific T cells, *P.gingivalis* pulsed monocyte-derived DC were co-cultured with gingival T cells and then expanded in culture medium containing IL-2. Stimulation process was repeated periodically with antigen pulsed DC. The gingival TCL consisted of 87% CD4+ and 3%CD8+ and showed good specificity to *P.gingivalis* Cloning from this gingival TCL were carried out by limit dilution technique. Five clones were obtained and 3 of which were not stable and died. The other 2 clones are stable but after testing specificity, only one clone showed good response to *P.gingivalis*. This gingival clone also produced similar cytokine pattern to those antigen specific cells derived from peripheral blood ie. high IFN-γ production but not IL-4. Hence, the results of antigen specific T cells from both peripheral blood and gingival tissue of severe periodontitis patients seem to suggest the role of Th1 cytokine in the pathogenesis of periodontitis. However, more gingival T cell clones need to be generated. At present the work is being continued by a PhD student.

Key words: T cells, *Porphyromonas gingivalis*, periodontitis, cytokines