

Thesis Title Natural Killer Cell Activity in Healthy Donors and Patients with Systemic Lupus Erythematosus (SLE) and Scleroderma

Author Mrs. Chaisuree Suphavitai

M.Sc. Master of Science in Microbiology

Examining Committee :

Assist.Prof.Dr.Vicharn Vithayasai	Chairman
Assist.Prof.Dr.Prakong Vithayasai	Member
Assist.Prof.Dr.Niwat Maneekarn	Member
Assoc.Prof.Dr.Sanit Makonkawkeyoon	Member

Abstract

The systemic lupus erythematosus (SLE) and scleroderma are autoimmune diseases with the abnormalities of immune system in both cell-mediated immunity (CMI) and humoral-mediated immunity (HMI) as well as some other defense mechanisms. The abnormality in the production of and the response to interferon (IFN) and/or interleukin 2 (IL 2), which are the NK cell activity modulators, were also observed. Although there were numerous reports revealed the defect of NK activities in the SLE patients but the information of NK activity in scleroderma patients was scanty available and the accumulated evidences of both the SLE and scleroderma patients were in controversy. This study was designed to determine and to evaluate the NK activity in the SLE patients and scleroderma patients at various conditions and stages of the diseases in comparison to those of the healthy control subjects. Their peripheral blood mononuclear leukocyte (PBML) were separated from heparinized blood by Ficoll-Hypaque centrifugation and tested for NK activity by tritiated thymidine incorporation method. The NK activity of each group of subjects was expressed in term of the mean $\pm$ SD of percent killing and of lytic unit (LU)/10<sup>6</sup> PBML.

The results showed that the mean±SD of the absolute number of null cells from 35 healthy control subjects were 464.33±278.56 cells/cu.mm., and the NK activity of their PBML were 78.40±9.98 % killing and 41.04±13.09 LU/10<sup>6</sup> PBML respectively. The mean±SD of NK activity in male and female healthy control subjects were not different. The study of 52 SLE patients found that the mean±SD of the absolute number of their null cells was 649.84±360.62 cells /cu.mm. and their NK activity were 68.08±20.67 % killing and 36.68±21.64 LU/10<sup>6</sup> PBML respectively. The absolute number of their null cells was lied in the normal range or even slightly higher. Their NK activity as expressed in term of percent killing was significantly lower than those of healthy control subjects (p<0.01). However, when the SLE patients were re-grouping according to the disease activity (A<sub>0</sub>, A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> and A<sub>3</sub>) and corticosteroid and/or other immunosuppressive drug treatment and then the NK activity of each group was analysed individually. It was found that about 20-25% of SLE patients at any disease activity showed NK activity lower than normal. The mean±SD of the absolute number of null cells at any stages of the disease remained at the normal level. The mean±SD of NK activity of the patients at an inactive stage (A<sub>0</sub>) and mildly active stage (A<sub>1</sub>) expressed either in term of %killing or lytic unit/10<sup>6</sup> PBML were not differ from those of healthy control subjects. The NK activity of the patients at moderately active stage (A<sub>2</sub>) was also normal as expressed in term of %killing and only slightly lower than of healthy control subjects when expressed in term of lytic unit/10<sup>6</sup> PBML (0.025<p<0.05). Nevertheless, the patients at severely active stage (A<sub>3</sub>) showed the NK activity expressed either by %killing or lytic unit/10<sup>6</sup> PBML significantly lower than those of healthy control subjects (p<0.001). In addition, when the data were analysed in connection with corticosteroid and/or other immunosuppressive drug treatment it was found that the corticosteroid treatment alone had no effect on the NK activity of SLE patients. However, when the patients

were treated with corticosteroid in combination with other immunosuppressive drugs the mean $\pm$ SD of NK activity of the patients was significantly lower than those of healthy control subjects ( $p < 0.001$ ). It was found that this group of patients who did not received either corticosteroid or other immunosuppressive drug had normal NK activity. Particularly, when the patients at severely active stage ( $A_3$ ) were analysed, it was found that the number of patients that showed the defect of NK activity were increased to 100% as expressed by %killing and 75% as expressed by lytic unit/ $10^6$  PBML.

The study of 23 scleroderma (SA) patients showed the pattern of NK activity similar to those of SLE patients, i.e., the absolute number of their null cells were slightly higher than those of healthy control subjects and only about 22% of SA patients showed NK activity lower than normal. However, there was an interesting observation that the NK activity in SA patients was affected by corticosteroid treatment whereas this was not observed in SLE patients when the SA patients were treated with corticosteroid the number of patients that showed the defect of NK activity were increased to 36% as expressed in term of lytic unit/ $10^6$  PBML and 57% in term of %killing.

In conclusion, the present study indicated that SLE patients who did not receive immunosuppressive drug treatment had normal NK activity. Regardless of the disease activity, even at the severely active stage, there were only 25% of the patients had NK activity lower than normal. When the patients were treated with other immunosuppressive drug in addition to corticosteroid, the number of patients that showed the defect of NK activity were increased. Similarly, scleroderma patients who did not receive corticosteroid treatment were also showed normal NK activity. However, their NK activity was depressed when they were treated with corticosteroid.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ ความสามารถของแท่งเจอร์รัล คิลเลอร์เซลล์ ในคนปกติ และผู้ป่วยด้วยโรคเอส-แอล-อี และ สเคลอโรเดอริมา

ชื่อผู้เขียน นาง นายสุวิทย์ ศุภวิไล

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา

คณะกรรมการตรวจสอบวิทยานิพนธ์

ผศ.นพ. วิชาญ	วิทยาศาสตร์	ประธานกรรมการ
ผศ. พญ. ประคอง	วิทยาศาสตร์	กรรมการ
ผศ. ดร. นิวัฒน์	มณีภาฏจน	กรรมการ
รศ. ดร. สนิท	มกรแก้วเกษร	กรรมการ

### บทคัดย่อ

โรค systemic lupus erythematosus (SLE) และ scleroderma (SA) จัดเป็น autoimmune disease ซึ่งมีความผิดปกติของระบบ immune ทั้ง cell-mediated immunity (CMI) และ humoral-mediated immunity (HMI) และมีความผิดปกติของ defense mechanism อื่นๆ ด้วย พบว่าทั้งสองโรคมีความผิดปกติในการสร้างและการตอบสนองต่อ interferon (IFN) และ interleukin 2 (IL 2) ซึ่งสารสองชนิดนี้สามารถเพิ่ม activity ของ NK เซลล์ได้ มีรายงานเป็นจำนวนมากที่รายงานเกี่ยวกับความผิดปกติของ NK เซลล์ในผู้ป่วย SLE แต่รายงานเกี่ยวกับ ความผิดปกติของ NK เซลล์ในผู้ป่วย scleroderma ยังมีน้อย นอกจากนี้ข้อมูลที่มีอยู่ในขณะนี้เกี่ยวกับ NK activity ในผู้ป่วย SLE และผู้ป่วย SA ยังไม่มีข้อสรุปที่แน่นอน ฉะนั้นงานวิจัยครั้งนี้จึงได้ศึกษา NK activity ในผู้ป่วย SLE และ ผู้ป่วย SA โดยคำนึงถึงยาที่ผู้ป่วยได้รับ และ ความรุนแรงของโรคมาใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูลเกี่ยวกับ NK activity ของผู้ป่วยด้วย การศึกษาได้แบ่งผู้ป่วยเป็นกลุ่มย่อยตามความรุนแรงของโรค หรือขนาดของ corticosteroid และ/หรือ immunosuppressive drugs อื่นๆ ที่ผู้ป่วยได้รับ ได้ศึกษา NK activity ใน peripheral blood mononuclear leukocyte (PBML) ที่ได้จากการปั่นแยกเลือดของผู้ป่วยด้วย Ficoll-Hypaque โดยวิธี tritiated thymidine incorporation และแสดงค่าของ NK activity เป็น percent killing และ lytic unit (LU)/10<sup>6</sup> PBML

ผลการศึกษพบว่า mean±SD ของ absolute number ของ null cells ในคนปกติเท่ากับ 464.33±278.56 cells/cu.mm. และ NK activity เท่ากับ 78.40±9.98

%killing และ  $41.04 \pm 13.09$  LU/ $10^6$  PBML ตามลำดับ พบว่าค่าทั้งหมดที่ทำได้ในผู้ป่วยและผู้หญิงไม่แตกต่างกัน การศึกษาในผู้ป่วย SLE 52 ราย พบว่า absolute number ของ null cells เท่ากับ  $649.84 \pm 360.62$  cells/cu.mm. และ NK activity เท่ากับ  $68.08 \pm 20.67$  %killing และ  $36.68 \pm 21.64$  LU/ $10^6$  PBML ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าค่า absolute number ของ null cells ของผู้ป่วย SLE จะอยู่ในระดับปกติหรืออาจสูงกว่าปกติเล็กน้อย ส่วนค่า NK activity นั้นพบว่าจะต่ำกว่าค่าของ NK activity ในคนปกติอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.01$ ) อย่างไรก็ตามเมื่อได้จัดแบ่งกลุ่มผู้ป่วย SLE ตามความรุนแรงของโรค ( $A_0$ ,  $A_1$ ,  $A_2$  และ  $A_3$ ) และตามการรักษาด้วยยา corticosteroid และ/หรือ immunosuppressive อื่นๆ แล้วหลังจากนั้นจึงวิเคราะห์ NK activity ของแต่ละกลุ่ม พบว่าประมาณ 20-25% ของผู้ป่วย SLE ในทุก stage ของโรคจะมี NK activity ต่ำกว่าค่า NK activity ของคนปกติ ค่า mean $\pm$ SD ของ absolute number ของ null cells ในทุก stage ของโรคจะมีค่าปกติ ค่า mean $\pm$ SD ของ NK activity ของผู้ป่วยในระยะ inactive ( $A_0$ ) และ mildly active ( $A_1$ ) จะไม่แตกต่างจากค่า NK activity ของคนปกติไม่ว่าจะแสดงเป็นค่า %killing หรือ lytic unit/ $10^6$  PBML ก็ตาม ส่วน NK activity ของผู้ป่วยในระยะ moderately active ( $A_2$ ) นั้นถ้าแสดงเป็นค่า %killing จะมีค่าไม่แตกต่างจากค่าของคนปกติ แต่ถ้าแสดงค่าเป็น lytic unit/ $10^6$  PBML พบว่าต่ำกว่าปกติเล็กน้อย ( $0.025 < p < 0.05$ ) อย่างไรก็ตามผู้ป่วยในระยะ severely active ( $A_3$ ) จะมีค่า NK activity ต่ำกว่าคนปกติอย่างมีนัยสำคัญ ไม่ว่าจะแสดงค่าเป็น %killing หรือ lytic unit/ $10^6$  PBML ก็ตาม ( $p < 0.001$ ) ผู้ป่วยในกลุ่มนี้ที่ไม่ได้รับการรักษาด้วย corticosteroid มีค่า NK activity เท่าคนปกติ นอกจากนี้เมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์ร่วมกับข้อมูลการรักษาผู้ป่วยด้วยยา corticosteroid และ/หรือ immunosuppressive drugs อื่นๆ พบว่าการรักษาด้วยยา corticosteroid เพียงอย่างเดียวจะไม่มีผลต่อ NK activity ของผู้ป่วย SLE แต่เมื่อไหร่ก็ตามเมื่อผู้ป่วยได้รับการรักษาด้วยยา corticosteroid ร่วมกับ immunosuppressive drugs อื่นๆ จะพบว่าค่า mean $\pm$ SD ของค่า NK activity จะต่ำกว่าของคนปกติอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.001$ ) โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อวิเคราะห์ผู้ป่วยในระยะ severely active ( $A_3$ ) พบว่าจำนวนผู้ป่วยที่มีความผิดปกติของค่า NK activity จะเพิ่มจำนวนขึ้นเป็น 100% ถ้าแสดงค่าของ NK activity เป็น %killing และ 75% ถ้าแสดงค่าเป็น lytic unit/ $10^6$  PBML

การศึกษา NK activity ในผู้ป่วย scleroderma จำนวน 23 คนพบว่าค่า NK activity ของผู้ป่วย scleroderma จะคล้ายๆ กับค่า NK activity ของผู้ป่วย SLE นั่นคือ

พบว่าค่า absolute number ของ null cells จะมีค่าสูงกว่าในคนปกติเล็กน้อย และพบว่าประมาณ 22% ของผู้ป่วย SLE ที่ไม่ได้รับการรักษาด้วย corticosteroid จะมีค่า NK activity ต่ำกว่าในคนปกติ อย่างไรก็ตามมีข้อสังเกตที่น่าสนใจคือ การรักษาผู้ป่วยด้วยยา corticosteroid จะมีผลต่อค่า NK activity ของผู้ป่วยในขณะที่ยานี้จะไม่มีผลต่อ NK activity ในผู้ป่วย SLE เลย พบว่าเมื่อผู้ป่วย scleroderma ได้รับการรักษาด้วยยา corticosteroid จะทำให้จำนวนผู้ป่วยที่มีค่า NK activity ต่ำกว่าค่าปกติเพิ่มขึ้นเป็น 36% ถ้าแสดงค่าเป็น lytic unit/ $10^6$  PBML และ 57% ถ้าแสดงค่าเป็น %killing

สรุปผลจากการศึกษาครั้งนี้บ่งชี้ว่าผู้ป่วย SLE ที่ไม่ได้รับการรักษาด้วย immunosuppressive drugs จะมี NK activity ในระดับปกติ จะมีผู้ป่วยเพียง 25% เท่านั้นที่มี NK activity ต่ำกว่าปกติ ทั้งนี้ไม่ว่าจะอยู่ในระยะใดของโรคก็ตาม แม้แต่ในระยะที่แสดงอาการรุนแรงที่สุด ถ้าผู้ป่วยได้รับการรักษาด้วยยา immunosuppressive อย่างอื่นเพิ่มเติมจาก corticosteroid จะพบว่าจำนวนผู้ป่วยที่มี NK activity ผิดปกติเพิ่มมากขึ้น ในทำนองเดียวกับผู้ป่วย scleroderma ที่ไม่ได้รับการรักษาด้วย corticosteroid จะพบว่า มี NK activity ปกติ อย่างไรก็ตามถ้าผู้ป่วย scleroderma ได้รับการรักษาด้วย corticosteroid จะทำให้ NK activity ของผู้ป่วยเหล่านั้นลดลงได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่  
Copyright© by Chiang Mai University  
All rights reserved