การปรับเปลี่ยนการตอบสนองทางด้านภูมิคุ้มกันของดับบลิวเอฟเทน(ทีซีดีโอ)และผลจากการทำงานร่วมกับ *พอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิส*

นาย ชัช เจิมณรงค์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาปริทันตศาสตร์ ภาควิชาปริทันตวิทยา
คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2543

ISBN 974-334-251-6

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I19497209

IMMUNOMODULATION OF WF10(TCDO) AND ITS EFFECT WITH *PORPHYROMONAS GINGIVALIS*

MR. Chat Jermnarong

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science in Periodontics

Department of Periodontology

Faculty of Dentistry

Chulalongkorn University

Academic Year 2000

ISBN 974-334-251-6

Thesis Title	: Immunomodulation of WF10(TCDO) and its effect with *Porphyromonas gingivalis*
By	: Mr. Chat Jermnarong
Department	: Periodontology
Thesis Advisor	: Dr. Rangsini Mahanonda
Thesis Co-advisor	: Dr. Sathit Pichyangkul

.....

Accepted by the Faculty of Dentistry , Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirement for the Master's Degree

.....Dean of Faculty of Dentistry

(Associated Professor Surashith Kiatpongsan)

THESIS COMMITTEE

.....Chairman

(Associated Professor Naulchavee Hongprasong)

.....Thesis Advisor

(Dr. Rangsini Mahanonda)

.....Thesis Co-advisor

(Dr. Sathit Pichayangkul)

.....Member

(Assistant Professor Dr. Paitoon Sanvarinda)

.....Member

(Assistant Professor Dr. Mano Kuratana)

ชัช เจิมณรงค์ : การปรับเปลี่ยนการตอบสนองทางด้านภูมิคุ้มกันของดับบลิวเอฟเทน(ทีซีดีโอ)และผลจากการทำงานร่วมกับ*พอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิส* (IMMUNOMODULATION OF WF10(TCDO) AND ITS EFFECT WITH *PORPHYROMONAS GINGIVALIS*) อ.ที่ปรึกษา: ทพญ. ดร. รังสินี มหานนท์, อ. ที่ปรึกษาร่วม: ดร. สาธิต พิชญางกูร,76 หน้า. ISBN 974-334-251-6.

ดับบลิวเอฟเทน เป็น สารประกอบทีซีดีโอ(เตตระคลอโรเด็คคะออกซิเจน) ที่ประกอบด้วย คลอไรท์และออกซิเจน มีคุณสมบัติเฉพาะที่ถูกอ้างโดยผู้ผลิต; อ็อกโซ่ เค็มมี่ คือ ด้านชีวเคมีและเภสัชวิทยา ลักษณะเด่นที่สำคัญของดับบลิวเอฟเทน คือ มีความสามารถกระตุ้นเซลล์ที่ทำหน้าที่จับกินและทำลายสิ่งแปลกปลอม, เพิ่มการสมานการหายของแผล และยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย จากการศึกษานี้ได้อธิบายถึงผลของการปรับเปลี่ยนการตอบสนองทางด้านภูมิคุ้มกันของดับบลิวเอฟเทนเพียงลำพังกับผลการทำงานร่วมกับพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิส ในโมโนนิวเคลียร์เซลล์จากเลือดของคนปกติ(ในสภาพที่ยังไม่ได้แยกเป็นกลุ่มเซลล์ชนิดต่าง ๆ และที่แยกเฉพาะกลุ่มต่าง ๆ) ดับบลิวเอฟเทนที่ระดับความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษ จะเพิ่มระดับการแสดงของ ซีดี69 บนเซลล์นิวเคลียสชนิดต่าง ๆ และยังชักนำให้มีการผลิตของอินเตอร์ลูคิน–12(พี40), ทีเอ็นเอฟ–อัลฟ่า และอินเตอร์ฟีรอน–แกมม่า ในระดับปานกลาง เมื่อทำงานร่วมกับ*พอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิส* ดับบลิวเอฟเทน เพิ่มการชักนำของ*พอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิส* ทำให้มีการผลิตของทีเอ็นเอฟ–อัลฟ่าเพิ่มขึ้น, แต่ลดการชักนำของ*พอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิส* ทำให้มีการผลิตอินเตอร์ลูคิน–1เบต้าลดลงอย่างมาก จากทั้งหมดนี้ การศึกษานี้ไม่มีข้อมูลเพียงพอที่จะสรุปถึงผลของการบำบัดรักษาของดับบลิวเอฟ-เทนในโรคปริทันต์อักเสบ แต่มีข้อมูลที่น่าสนใจถึงผลการปรับเปลี่ยนการตอบสนองทางด้านภูมิคุ้มกันของดับบลิวเอฟเทนต่อการชักนำการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของพอร์ไฟโรโมแนส-จินจิวาลิส การศึกษาเพิ่มเติมเพื่อเรียนรู้ว่า ดับบลิวเอฟเทนมีผลอย่างไรกับพอร์ไฟโรโมแนส-จินจิวาลิส ในการขบวนชักนำให้เกิดพยาธิสภาพ เป็นเรื่องจำเป็นก่อนที่นำมาใช้จริงในทางคลินิก

ภาควิชา ปริทันตวิทยา ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา ปริทันตศาสตร์ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา 2543 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4076105032 : MAJOR PERIODONTICS
KEY WORD: WF10 / TCDO / *PORPHYROMONAS GINGIVALIS*
CHAT JERMNARONG : IMMUNOMODULATION OF WF10(TCDO) AND ITS EFFECT WITH *PORPHYROMONAS GINGIVALIS*. THESIS ADVISOR : DR. RANGSINI MAHANONDA. THESIS CO-ADVISOR : DR. SATHIT PICHYANGKUL.
76 pp. ISBN 974-334-251-6.

WF10 is a chlorite-oxygen compound TCDO(tetrachlorodecaoxygen) with unique biochemical and pharmacological properties cliamed by the manufacturer; OXO chemie. The key features of WF10 are the ability to activate phagocytic cells, enhance wound healing and inhibit bacterial growth. Thus, the compound may have therapeutic application in periodontitis. Here, we describe the immunomodulatory effects of WF10 alone and in combination with *Porphyromonas gingivalis* in peripheral blood mononuclear cell cultures. WF10 at the non-toxic concentration up-regulated CD69 expression on different mononuclear cell subsets and also induced moderate amount of IL-12 (p40), TNF-α, and IFN-γ production. When combined with *Porphyromonas gingivalis*, WF10 enhanced *Porphyromonas gingivalis*-induced TNF-α production, but greatly down-regulated *Porphyromonas gingivalis*-induced IL-1β production. Overall, our study does not provide enough information to draw any conclusions on therapeutic effect of WF10 in peridontitis, but it does provide an interesting data on the immunomodulatory effect of WF10 on *Porphyromonas gingivalis*-induced immune activation. Further study is required to better understand how WF10 effects *Porphyromonas gingivalis*-induced pathological process before the compound could find its place in clinical application.

ภาควิชา ปริทันตวิทยา ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา ปริทันตศาสตร์ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา 2543 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my gratitude and appreciation to my advisor, Dr. Rangsini Mahanonda, for her guidance, encouragement, supervision, suggestions and kindness throughout the course of my Master degree program. I am extremely indebted to my co-advisor, Dr. Sathit Pichyangkul, Department of Immunology and Medicines, US Army Medical Component, AFRIMS, for providing the laboratory facilities and for his grateful guidance, supervision, valuable technical advice and correction of this thesis.

I wish to thank my thesis committee members; Assoc. Prof. Nophadol Suppipat, Assoc. Prof. Naulchavee Hongprasong, Assoc. Prof. Chanin T.Vitaya, Assist. Prof. Dr. Paitoon Sanvarinda and Assist. Prof. Dr. Mano Kuratana for their suggestions and kindness in being committee members.

Sincere appreciation is expressed to Mr. Kosol Yongvanitchit for their grateful advice and technical assistance. I also would like to Mr. Nophadol Sa-Ard-Iam for his assistance in making appointment with donors and perparing this manuscript.

I would like to acknowledge research grant from the Graduate School, Chulalongkorn University for the partial financial support for this study. My sincere appreciation is also extended to the staff of Periodontology, Department, Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University for their kindness, guidance and encouragement. Finally, I would like to express my appreciation to my father, mother, and my brother, and my brother for their love, caring, understanding and encouragement.

TABLE OF CONTENTS

Page

Abtract (Thai).....iv

Abtract (English).....v

Acknowledgements.....vi

Table of contents.....vii

List of tables.....x

List of figures.....xii

Abbreviations.....xiii

Chapter

1. Introduction.....1

1.1 Background of present study.....1

1.2 Objectives.....3

1.3 Hypothesis.....4

1.4 Field of research.....4

1.5 Criteria inclusions.....4

1.6 Limitation of research.....5

1.7 Application and expectation of research.....5

2. Literature review.....6

2.1 Introduction.....6

2.2 Etiology: Plaque microorganisms.....6

2.2.1 *Porphyromonas gingivalis*.....7

2.3 Pathogenesis: Host response to plaque Microorganisms.....10

Page

2.3.1 Th1 and Th2 cytokines.....11

2.3.2 Inflammatory cytokines.....14

2.4 WF10.....15

3. Materials and methods

3.1 Medium and reagents.....18

3.1.1 Culture media.....18

3.1.2 Monoclonal antibodies.....18

3.2 Subject selection.....19

3.3 Bacterial preparation.....19

3.4 Peripheral blood mononuclear cell (PBMC).....20

3.5 Treatment of PBMC with WF10.....20

3.6 Treatment with *P. gingivalis* and WF10.....20

3.7 Phynotypic analysis of activated cells by flow cytometry.....21

3.8 Statistic analysis.....22

4. Results

4.1 Activation of mononuclear cell populations in WF10 stimulated PBMC cultures.....23

4.2 Cytokines production by PBMC stimulated with WF10.....25

4.3 TNF-α production by PBMC stimulated with *P. gingivalis* and WF10.....27

4.4 IL-1β production by PBMC stimulated with *P. gingivalis* and WF10.....30

Page

5. Discussion and Conclusion.....33

References.....38

Appendix.....56

Biography.....62

LIST OF TABLES

Table Page

1. Summary of TCDO formulations.....1

2. Monoclonal antibodies used for flow cytometric analysis.....18

3. Effect of WF10 on CD69 expression in PBMC cultures.....23

4. TNF-α production by PBMC stimulated with *P. gingivalis* and WF10..28

5. IL-1β production by PBMC stimulated with *P. gingivalis* and WF10....31

6. Effect of WF10 on CD69 expression in PBMC cultures of subject A...56

7. Effect of WF10 on CD69 expression in PBMC cultures of subject B...56

8. Effect of WF10 on CD69 expression in PBMC cultures of subject C...57

9. Effect of WF10 on CD69 expression in PBMC cultures of subject D...57

10. Cytokine production by WF10-treated PBMC of subject A.....58

11. Cytokine production by WF10-treated PBMC of subject B.....58

12. Cytokine production by WF10-treated PBMC of subject C.....59

13. Cytokine production by WF10-treated PBMC of subject D.....59

14. TNF-α production(pg) by PBMC stimulated with *P. gingivalis* and WF10 of subject E.....60

15. TNF-α production(pg) by PBMC stimulated with *P. gingivalis* and WF10 of subject F.....60

16. IL-1β production(pg) by PBMC stimulated with *P. gingivalis* and WF10 of subject G.....61

17. IL-1β production(pg) by PBMC stimulated with *P. gingivalis* and WF10 of subject H.....61

LISTS OF FIGURES

Figure Page

1. Representative histogram of CD69 expression on lymphocyte subsets in response to WF10.....24

2. Cytokines production by WF10-treated PBMC.....26

3. TNF-α production in PBMC cultures stimulated with *P. gingivalis* and WF10.....29

4. IL-1β production in PBMC cultures stimulated with *P. gingivalis* and WF10.....32

ABBREVIATIONS

CD	cluster of differentiation
DNA	deoxyribonucleic acid
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FCS	fetal calf serum
FITC	fluorescein isothiocyanate
γδ T-cells	gamma delta T-cells
GCF	gingival crevicular fluid
IFN-γ	interferon gamma
Ig	immunoglobulin
IL	interleukin
LPS	lipopolysaccharide
mAbs	monoclonal antibodies
mRNA	messenger ribonucleic acid
NK cells	natural killer cells
PBA	polyclonal B-cell activation
PBMC	peripheral blood mononuclear cells
PBS	phosphate-buffered saline
PE	phycoerythrin
S.E.	standard error
Th1	T-helper 1
Th2	T-helper 2
TNF-α	Tumor necrosis factor alpha