การวิเคราะห์ปริมาณเซลล์ลิมโฟไซต์จากเลือดสายสะดือรกของคนที่ปนในเลือดแกะ ด้วยเทคนิคโฟลวไซโทเมตรีและเทคนิคฟิช

นางสาว สุกัญญา สุวรรณมณีรัตน์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์
หลักสูตรวิทยาศาสตร์การแพทย์
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2545

ISBN 974-17-2992-8

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I 21013676

QUANTITATIVE DETECTION OF HUMAN UMBILICAL CORD BLOOD LYMPHOCYTES IN HUMAN – SHEEP CHIMERISM BY FLOW CYTOMETRY AND FISH

Miss Sukanya Suwamaneerut

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Medical Science
Program of Medical Science
Faculty of Medicine
Chulalongkorn University
Academic Year 2002

ISBN 974-17-2992-8

Thesis Title	QUANTITATIVE DETECTION OF HUMAN UMBILICAL CORD BLOOD LYMPHOCYTES IN HUMAN-SHEEP CHIMERISM BY FLOW CYTOMETRY AND FISH
By	Miss Sukanya Suwanmaneerut
Department	Medical Science
Thesis Advisor	Assistant Professor Teera Wacharaprechanont , MD.
Thesis Co-advisor	Associate Professor Pornthep Tiensiwakul , Ph.D.

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

..... Dean of Faculty of Medicine

(Professor Pirom Kamolratanakul, M.D.)

Thesis Committee

..... Chairman

(Associate Professor Vilai Chentanez, M.D.Ph.D.)

..... Thesis Advisor

(Assistant Professor Teera Wacharaprechanont, M.D.)

..... Thesis Co-advisor

(Associate Professor Pornthep Tiensiwakul, Ph.D.)

..... . Member

(Associate Professor Apiwat Mutirangura, M.D.Ph.D.)

..... Member

(Associate Professor Tada Sueblingvong, M.D.Ph.D.)

สุกัญญา สุวรรณมณีรัตน์ : การวิเคราะห์ปริมาณเซลล์ลิมโฟไซต์จากเลือดสายสะดือรกของคนที่ปนในเลือดแกะ ด้วยเทคนิคโฟลวไซโทเมตรี และเทคนิคฟิช (QUANTITATIVE DETECTION OF HUMAN UMBILICAL CORD BLOOD LYMPHOCYTES IN HUMAN-SHEEP CHIMERISM BY FLOW CYTOMETRY AND FISH) อ. ที่ปรึกษา : ผ.ศ. น.พ. ธีระ วัชรปรีชานนท์,อ.ที่ปรึกษาร่วม ร.ศ. ดร. พรเทพ เทียนสิวากุล;108 หน้า.ISBN 974-17-2992-8

การปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือด CD34 จากเลือดสายสะดือทารกของคนไปสู่ลูกแกะในครรภ์ เป็นตัวอย่างจำลองของการพัฒนาไปสู่ทางเลือกใหม่ในการรักษาโรคตั้งแต่ในครรภ์ เช่น โรคเลือดหรือภูมิคุ้มกันบกพร่องแต่กำเนิด การตรวจหาเซลล์ผู้ให้ภายหลังการปลูกถ่ายนั้นมีมาตรฐานในการตรวจหลายวิธี การศึกษาครั้งนี้เพื่อพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ตรวจหาเซลล์ลิมโฟไซต์ของคน (ผู้ให้) ในเลือดแกะ (ผู้รับ) ภายหลังการปลูกถ่ายด้วยเทคนิคโฟลวไซโทเมทรี ซึ่งใช้โมโนโคลนัลแอนติบอดีของหนูที่จำเพาะกับเซลล์ลิมโฟไซต์ของคน (CD45) และเทคนิคฟิช โดยใช้ Probe CEP 16 ที่จำเพาะต่อโครโมโซมคู่ที่ 16 ของคน โดยการเก็บตัวอย่างเลือดสายสะดือทารกของคนจากโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ และเลือดแกะ เพื่อแยกเอาเซลล์ลิมโฟไซต์แล้วนำมาผสมในหลอดทดลองที่อัตราส่วนเซลล์คน : เซลล์แกะ 1:100 1:500 1:1,000 1:5,000 และ 1:10,000 แล้วนำไปวิเคราะห์ตรวจหาเซลล์ลิมโฟไซต์ของคน ผลการศึกษาเปรียบเทียบการตรวจหาเซลล์ลิมโฟไซต์ของคน ทั้งเทคนิคโฟลวไซโทเมทรีและเทคนิคฟิชไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่อัตราส่วน 1:100 - 1:1,000 (ค่า p >0.05) ที่ระดับความเข้มข้นต่ำที่อัตราส่วน 1:5,000 และ 1:10,000 พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ(ค่า p <0.05) จากการเปรียบเทียบตรวจหาเซลล์ทั้งสองวิธี พบว่าเทคนิคฟิชมีค่าความผันแปรในการตรวจหาน้อยกว่าเทคนิคโฟลวไซโทเมทรี ผลการศึกษาถึงวิธีการตรวจหาเซลล์ลิมโฟไซต์ของคนในระดับหลอดทดลอง ได้นำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจหาเซลล์ผู้ให้ของคนภายหลังการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือด CD34 จากเลือดสายสะดือทารกของคนไปสู่ช่องท้องของลูกแกะที่มีอายุครรภ์ 48-54 วัน ภายหลังลูกแกะคลอดได้อายุครบ 10 วัน และ 1 เดือน จึงทำการเก็บตัวอย่างเลือดของลูกแกะมาวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ลิมโฟไซต์ของคนด้วยเทคนิคโฟลวไซโทเมทรีพบว่ามีปริมาณน้อย อยู่ในช่วง 0.03% ถึง 0.63 % ทั้งนี้ปริมาณเซลล์ลิมโฟไซต์ของคนลดลงและไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (ค่า p >0.05)

หลักสูตร วิทยาศาสตร์การแพทย์ ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา 2545 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4275264030 : MAJOR MEDICAL SCIENCE

KEYWORDS : HUMAN - SHEEP CHIMERISM / HUMAN UMBILICAL CORD BLOOD / FLOW CYTOMETRY / FISH

SUKANYA SUWANMANEERUT : QUANTITATIVE DETECTION OF HUMAN UMBILICAL CORD BLOOD IN HUMAN – SHEEP CHIMERISM BY FLOW CYTOMETRY AND FISH. THESIS ADVISOR : ASSIT. PROF. TEERA WATCHARAPRECHANONT,M.D., THESIS CO-ADVISOR : ASSOC.PROF. PORNTHEP TIENSIWAKUL,PH.D.,108 pp. ISBN 974-17-2992-8

In utero transplantation of hematopoietic stem cell (HCS) from human umbilical cord blood (UCB) into preimmune fetal sheep is a model for study of prenatal therapy for congenital hematologic and immunologic disorders. Varieties of methods have been utilized to detect donor cells engraftment after transplantation. This study proposed a design for the analysis of donor cell chimerism by Flow Cytometry (FCM) using mouse anti-human CD 45 monoclonal antibody specific to human lymphocytes compared with FISH analysis using DNA probe "CEP16", specific to human chromosome 16. UCB was obtained from the pregnant women at King Chulalongkorn Memorial Hospital. The human and sheep lymphocytes were mixed in the test tube at different ratios of 1:100, 1:500,1:1,000,1:5,000 and 1:10,000. Comparing the results of both techniques, there was no significant difference at ratio between 1:100 - 1:1,000 ($p>0.05$). But at lower concentration (1:5,000 and 1:10,000), there was significant difference of variation by FCM ($p<0.05$). FISH analysis was shown to produce less variation than FCM. This *in vitro* approach was applied for detection of human donor cells in recipient lambs after in utero transplantation. Blood samples were drawn at 10 days and 1 month after birth. The results showed low percentages of donor cells in sheep peripheral blood ranging from 0.03%-0.63% (microchimerism). There were slightly decreases and no significant differences at the interval at 10 days and 1 month after birth by FCM ($p >0.05$).

Department - Student's signature Sukanya Suwanmaneerut

Field of study Medical Science Advisor's signature

Academic 2002 Co-Advisor's signature

ACKNOWLEDGEMENT

My sincere gratitude and appreciate was given to my advisor, Assistant Professor Dr. Teera Wacharaprechanont, Department of Obstetrics and Gynecology for kindness, invaluable advises, helpful guidance and suggestions.

I am also extremely grateful to co-advisor, Associated Professor Dr. Pornthep Tiensiwakul, Department of Hematology, who introduced the author to the use of Flow Cytometry analysis by thorugh kindness for permission to use the laboratory facilities and guidance with valuable suggestions for this study.

I would like to express my deep gratitude to Associate Professor Dr.Tada Sueblinvong for serving as committee and giving valuable advises. I am wholeheartedly grateful to my mentor, Associate Professor Dr. Apiwat Mutirangura for many of his kind many suggestions, encouragement and supervision throughout.

I also give my special thank to Associate Professor Somchai Chanpongsang for good coordinate with the animals cared for facility at the Faculty of Veterinary Chulalongkorn University. I greatly appreciate the opportunity to work with Ms. Jiraporn Ngiemwijawat , the Andrology unit, Department of Obstetrics and Gynecology for her suggestion in FISH techniques, include permission to use the fluorescence microscope.

This thesis would not have been successful without the Molecular Biology Research Fund, Department of Research Affairs, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University.

Furthermore, it has been a great pleasure to be in the graduate program in the Department Cell biology and Molecular Genetics, Faculty Medical Science not only because of the remarkable education but manifold sincere and helpful friends.

Finally, the thesis would never have been completed without the encouragement, love fulfillment and patience of my family, especially during of doing this thesis who stood by me all the time, thank you very much.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

TABLE OF CONTENTS

Page

Abstract (Thai)..... iv

Abstract (English)..... v

Acknowledgement..... vi

Table of Contents..... vii

List of Tables..... ix

List of Figures..... x

List of Abbreviations..... xiii

Chapter

I. Introduction..... 1

II.Theory and Literature review..... 14

III. Materials and Methods..... 37

IV.Results..... 54

V. Discussion and Conclusion..... 81

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

TABLE OF CONTENTS (CONTINUED)

Page

References.....85

Appendices

Appendix A.....94

Appendix B.....97

Appendix C.....100

Appendix D.....104

Biography.....108

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF TABLE

Table Page

1. Congenital hematologic disease successfully treated by postnatal HSC transplantation and potentially amenable to in utero HSC transplantation..... 1
2. The incidence of major thalassemia in Thailand..... 3
3. Sources of stem cell for transplantation..... 19
4. Advantages of In utero HSC Transplantation..... 21
5. Summary of the end results of in vivo studies in sheep chimeras after in utero transplantation.....63
6. Percent counted lymphocytes data found in mixed-different dilutions by Flow Cytometry analysis..... 71
7. Percent counted lymphocytes data found in mixed-different dilutions by FISH analysis..... 74
8. Comparison of the percent human lymphocytes in mixed-different dilutions between by the two methods..... 77
9. Percent of donor cells engraftment data found in lamb chimeras at 10 days and 1 month.....79

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF FIGURES

Figure Page

1. Prevalence of thalassemia hemoglobinopathies in Thailand, 1998.....2
2. The pictures of liver and spleen enlargement in β - Thalassemia patient and blood smear of peripheral blood in β - Thalassemia.....3
3. Animal models of HSC transplantation and their applicability to human transplantation 5
4. The human–sheep models for in utero transplantation.....7
5. Commitment and differentiation from pluripotent hematopoietic cells in the bone marrow (BM)..... 14
6. Phenotypical heterogenity of human hematopoietic stem cell.....15
7. Source of donor HSC transplantation : Adult bone marrow.....16
8. Source of donor HSC transplantation : Fetal liver..... 17
9. Sources of donor HSC transplantation : Umbilical cord blood..... 18
10. Procedure of autologous transplantation..... 21
11. Schematic of normal hematopoietic and immunologic ontogeny.....22
12. Pattern of hematological recovery after HSC transplantation.....24
13. Diagram illustrating of Flow Cytometry..... 26
14. The picture of the cell scatters the laser light and emit fluorescence , provide with information about the cells' size, internal complexity and relative fluorescence intensity..... 26
15. Flow Cytometry analysis of WBC population such as monocyte , lymphocyte and granulocyte.....27
16. The picture of Catcher tube in sheath stream and sample stream.....28
17. Diagram illustrating of Fluorescence *in situ* hybridization (FISH).....29
18. CEP 16 recognize the satellite DNA of the centromeric region of the human chromosome 16 (16q11.2 , locus D 16Z3).....30

LIST OF FIGURES (CONTINUED)

Figure Page

19. Microbubble technique for HSC transplantation..... 33
20. Flow Cytometry analysis of the positive control and the negative control.....55
21. Flow Cytometry and histogram analysis of mixed human and sheep lymphocytes ratios at 1:100, 1:500, 1:1,000, 1:5,000 and 1:10,000..... 58
22. FISH analysis on a positive and negative control..... 59
23. FISH analysis on artificial mixtures dilution of 1:100, 1:500, 1:1,000, 1:5,000, and 1:10,000..... 62
24. The picture of survival chimeras sheep after birth..... 64
25. Flow Cytometry analysis of negative control, positive control and chimeric sheep no. 40A3 at 10 days and 1 month after birth..... 65
26. Histogram analysis of negative control, positive control and chimeric sheep no. 40A3 at 10 days and 1 month after birth.....66
27. Flow Cytometry analysis of negative control, positive control and chimeric sheep no. 41J2 at 10 days and 1 month after birth.....67
28. Histogram analysis of negative control, positive control and chimeric sheep no. 41J2 at 10 days and 1 month after birth..... 68
29. The picture of detection of human donor cells from chimeric sheep by FISH analysis..... 69
30. Percent the actual measure of human and sheep lymphocytes from mixed experiment at various dilutions detected by Flow Cytrometry analysis..... 71
31. The bar graph represented of mixed experiment between human and sheep lymphocytes at various dilutions by Flow Cytometry analysis..... 71
32. Scatter plot of measurement CD 45+ cells after mixed at various dilution (1:100 – 1:10,000) by Flow Cytometry.....73

LIST OF FIGURES (CONTINUED)

Figure Page

33. Percent the actual measure of human and sheep lymphocytes from mixed experiment at various dilutions detected by FISH analysis..... 75
34. The bar graph represented of mixed experiment between human and sheep lymphocytes at various dilutions by FISH analysis.....75
35. Scatter plot of Measurement of CD 45+ cells after mix at various dilution (1:100 – 1:10,000) by FISH.....76
36. The bar graph of comparison between the percent of human lymphocytes between Flow Cytometry and FISH analysis at various dilutions (1:100, 1:500, 1:1,000,1:5,000 and1:10,000).....78
37. Scatter plot of the percent of human lymphocyte ($CD45^{+}$) by Flow Cytometry analysis compared with that of percent human lymphocytes by FISH analysis.....78
38. The bar garph of comparison between the percent of donor cells engraftment in two chimeric lambs at 10 days and 1 month detected by Flow Cytometry analysis..... 80
39. Scatter plot of the percent of donor cells in human – sheep chimeras lambs no. 40A3 and 41J2 at 10 days and 1 month by Flow Cytometry analysis..... 80

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF ABBREVIATIONS

Ab	Antibody
Ag	Antigen
BMT	Bone Marrow Transplantation
BSA	Bovine Serum Albumin
CD	Cluster Designation
CV	Coefficient of Variation
$^{\circ}$C	Degree Celsius
DAPI	4, 6 – bis (2- imidazxolinyl 4H,5H)-2-Phenylindol
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNA	Deoxyribonucleic acid
DW	Deionized water
FACS	Fluorescence activated cell sorter
FCM	Flow Cytometry
FISH	Fluorescence in *situ* hybridization
FITC	Fluorescence isothiocyanate - conjugated
g	Gram
GVHD	Graft Versus Host Disease
h	Hour
HLA	Human Leukocyte Antigen (Histocompatibility Antigens)
HSC	Hematopoietic stem cells
Ig	Immunoglobulin
L	Liter
M	Molar
Mab	Monoclonal antibody
MACS	Magnetic cell sorting
MHC	Major histocompatibility complex
min	Minute

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ml	Millititer
μ	Micrometer
PB	Peripheral blood
PBS	Phosphate buffer saline
PCR	Polymerase chain reaction
PerCP	Peridinin Chlorophyll protein
pH	The negative logarithm of the concentration of hydrogen ion
RBC	Red blood cell
RNase	Ribonuclease A
rpm	Revolution per minute
SCID	Severe combined immuno deficiency
SSC	Side scatter
WBC	White blood cell

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย