

<b>Thesis Title</b>	Apoptosis and Nitroblue Tetrazolium (NBT) Reduction Activity of Neutrophils Infected with <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	
<b>Author</b>	Mr. Winyou Puckdee	
<b>Degree</b>	Master of Science (Microbiology)	
<b>Thesis Advisory Committee</b>	Dr. Volaluck Supajatura	Chairperson
	Prof. Emeritus Dr. Sanit Makonkawkeyoon	Member

## ABSTRACT

The knowledge of basic science in tuberculosis, the disease that caused by *Mycobacterium tuberculosis*, is essential for therapeutic, vaccine development and strategy for eradication. In *M. tuberculosis* infection, the innate immune response is the first defend mechanism and neutrophil is the first cell that arrived at the site of infection. After encounter with microorganism, neutrophil exhibits the typical early bactericidal responses including phagocytosis and generation of reactive oxygen intermediates (ROI). The difference of these functions after encounter the virulent (*M. tuberculosis* H37Rv) and non-virulent (*M. tuberculosis* H37Ra) strains was still unclear. In this study the nitroblue tetrazolium (NBT) reduction assay was done to measure oxidative burst, the process of generation of superoxide anion ( $O_2^-$ ) which essential in killing microorganism. The result revealed that the virulent strain of *M. tuberculosis* induced nitroblue tetrazolium reduction activity more than the non-virulent strain but not statistic significant ( $p > 0.05$ ). Therefore, the difference in virulence of mycobacteria was not influence in ROI production of neutrophils. Immune cells can regulate the inflammatory response by undergoing apoptosis or

undergo apoptosis following infection. Apoptosis of cells infected with intracellular pathogens may benefit the host by simultaneously eliminating the microorganism. The released apoptotic vesicles which carry microbial antigens will be introduced to antigen-presentation cells and acquired immunity subsequently. In this study, the apoptosis of neutrophil following infection by virulent or non-virulent strains of *M. tuberculosis* was also investigated. The apoptotic cell was detected by Annexin V-FITC immunostaining and counted by flow cytometer. *M. tuberculosis* could induce neutrophil apoptosis. Neutrophil infected with virulent strain show apoptotic change less than non-virulent strain, but the percentage of apoptotic cell and the kinetic of apoptosis were not significant difference ( $p > 0.05$ ).

Take together, human neutrophils infected with virulent or non-virulent strains of *M. tuberculosis* were not different in ROI production and percentage of apoptosis. The patient naturally infected with *M. tuberculosis* show difference in severity. The pathophysiology was vary from completely elimination of the microorganism with no symptom to chronic infection which caused death. These variety might be due to the virulent and strains of *M. tuberculosis*, the function of immune cells other than neutrophil, genetic and environment of host. Which valuable to have further study.

ชื่อวิทยานิพนธ์	การเกิดเอพอพโตซิสและความสามารถในการรีดิวซ์สารไนโตร บลูเตรอะโซเลียมของนิวโทรฟิลที่ติดเชื้อวัณโรค	
ผู้เขียน	นายวิญญู ภักดี	
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)	
คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ดร.พญ. วรลักษณ์ สัจจาตุระ ศ.เกียรติคุณ ดร.สนธิ มกรแก้วเกยูร	ประธานกรรมการ กรรมการ

### บทคัดย่อ

ความรู้พื้นฐานของโรควัณโรคซึ่งมีสาเหตุจากเชื้อแบคทีเรีย *Mycobacterium tuberculosis* มีความสำคัญในการพัฒนาวิธีการรักษา การพัฒนาวัคซีน และการวางแผนที่จะควบคุมและกำจัดโรคนี้ให้หมดไป เมื่อเชื้อเข้าสู่ร่างกาย ระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะจะเป็นด่านแรกในการต่อต้านการติดเชื้อ นิวโทรฟิลเป็นเซลล์แรกที่เข้ามาบริเวณที่มีการติดเชื้อ เมื่อนิวโทรฟิลพบกับเชื้อวัณโรค จะจับกินเชื้อและสร้างสารที่มีผลฆ่าเชื้อที่เรียกว่า reactive oxygen intermediates (ROI) ทำให้เชื้อตาย อย่างไรก็ตามจนถึงปัจจุบัน การทำงานและการเปลี่ยนแปลงของนิวโทรฟิลหลังกินเชื้อวัณโรคสายพันธุ์ก่อโรครุนแรง (H37Rv) หรือไม่รุนแรง (H37Ra) แตกต่างกันหรือไม่อย่างไร ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด ดังนั้นจึงได้ทำการวัดการสร้าง super oxide anion ( $O_2^-$ ) ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม ROI โดยใช้วิธีการรีดิวซ์สารไนโตรบลูเตรอะโซเลียม พบว่าการรีดิวซ์สารไนโตรบลูเตรอะโซเลียมของนิวโทรฟิลของคนปกติที่ติดเชื้อวัณโรคสายพันธุ์ก่อโรครุนแรงให้ค่าที่สูงกว่านิวโทรฟิลที่ติดเชื้อสายพันธุ์ก่อโรคไม่รุนแรงแต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แสดงให้เห็นว่าความรุนแรงที่แตกต่างกันของเชื้อไม่มีผลต่อการสร้างสารในกลุ่ม ROI ของนิวโทรฟิล เซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันสามารถควบคุมการเกิดการอักเสบได้โดยการตายแบบเอพอพโตซิส หรือเกิดเอพอพโตซิสภายหลังการติดเชื้อ การเกิดเอพอพโตซิสของเซลล์ที่ติดเชื้อจะทำให้เชื้อที่อยู่ภายใน

เซลล์ถูกทำลายไปพร้อมกัน นอกจากนั้นเมื่อเกิดเอพอพโตซิสจะเกิด apoptotic vesicles ซึ่งแอนติเจนของเชื้อจะถูกส่งผ่านไปให้เซลล์ที่ทำหน้าที่นำเสนอแอนติเจนให้กับเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะต่อไป ดังนั้นการเกิดเอพอพโตซิสของเซลล์ที่ติดเชื้อจึงเป็นการกำจัดเชื้อและป้องกันการเกิดโรคที่มีประสิทธิภาพอย่างหนึ่งของร่างกาย ในการศึกษานี้ได้ทำการเปรียบเทียบการเกิดเอพอพโตซิสของนิวโทรฟิลภายหลังการติดเชื้อวัณโรคสายพันธุ์ก่อโรครุนแรงและไม่รุนแรงว่ามีความแตกต่างกันหรือไม่ด้วย โดยการทำให้นิวโทรฟิลของคนปกติติดเชื้อวัณโรคในอัตราส่วนเซลล์ต่อเชื้อเท่ากับ 1 : 40 นาน 60 นาที แล้วทำการล้างเชื้อที่ไม่ถูกจับกินออก จากนั้นเลี้ยงเซลล์ที่ติดเชื้อออกเป็นระยะเวลาต่างๆ เพื่อดูจลศาสตร์ของการเกิดเอพอพโตซิส เมื่อครบเวลาทำการวัดการเกิดเอพอพโตซิสโดยวิธีการย้อมด้วย Annexin V-FITC และตรวจวัดด้วยเครื่อง flow cytometer ผลการศึกษาพบว่าการติดเชื้อวัณโรคในนิวโทรฟิลของคนปกติ ทำให้นิวโทรฟิลเกิดเอพอพโตซิส โดยจะเห็นได้จากลักษณะของเซลล์ที่เปลี่ยนแปลงไป มีการปรากฏขึ้นของ phosphatidylserine บนผิวของเซลล์ และพบว่านิวโทรฟิลที่ติดเชื้อวัณโรคสายพันธุ์ก่อโรครุนแรงให้เปอร์เซ็นต์การเกิดเอพอพโตซิสที่น้อยกว่านิวโทรฟิลที่ติดเชื้อสายพันธุ์ก่อโรคไม่รุนแรงแต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ถึงแม้ว่าการศึกษานี้จะแสดงให้เห็นว่าการกำจัดเชื้อวัณโรคสายพันธุ์ก่อโรครุนแรงและไม่รุนแรงโดยนิวโทรฟิลซึ่งเป็นด่านแรกของระบบภูมิคุ้มกันไม่มีความแตกต่างกัน ทั้งความสามารถในการสร้างสารในกลุ่ม ROI และการเกิดเอพอพโตซิสหลังจากติดเชื้อ แต่ในผู้ที่สัมผัสเชื้อตามธรรมชาติ มีอาการรุนแรงได้แตกต่างกันตั้งแต่สามารถกำจัดเชื้อหมดไปได้และไม่มีอาการ จนถึงกำจัดเชื้อไม่ได้ แสดงอาการเรื้อรังและรุนแรงถึงชีวิต ความแตกต่างเหล่านี้อาจขึ้นอยู่กับความรุนแรงของเชื้อตามธรรมชาติ สภาวะของภูมิคุ้มกันของร่างกายนอกเหนือจากนิวโทรฟิล และลักษณะทางพันธุกรรม สภาพของร่างกาย และสิ่งแวดล้อมของผู้สัมผัสเชื้อซึ่งควรได้รับการศึกษาต่อไป