Thesis Title Apoptosis of Macrophages from Tuberculosis and Normal Persons After Infecting with *Mycobacterium tuberculosis*

Author Ms. Worawan Watcharasamphankul

Degree Master of Science (Microbiology)

Thesis Advisory Committee Assist. Prof. Dr. Sumalee Pruksakorn Chairperson
Prof. Emeritus Dr. Sanit Makonkawkeyoon Member

Abstract

Tuberculosis (TB) remains the most frequent cause of death due to an infectious disease throughout the world. *Mycobacterium tuberculosis* is the causative agent of pulmonary tuberculosis and leads to an estimate of two to three million deaths worldwide each year. Nevertheless, the capacity of human immune response to eliminate *M. tuberculosis* or the virulence mechanisms used by the organisms to evade these defenses are only poorly understood. Results from several studies showed that host defense against *M. tuberculosis* infection may also occur by apoptosis of mycobacteria-infected macrophages with little or no tissue damage. However, *M. tuberculosis* has developed mechanisms to modulate inflammatory and apoptotic responses in order to survive in host cells. Study of the mechanisms that governs macrophage cell death during *M. tuberculosis* infection may contribute to improvement in the treatment and prevention of tuberculosis.

The objective of this work was to study the apoptosis of *M. tuberculosis*-infected macrophage in normal persons and tuberculosis patients in the present or absent of 10% pooled human AB serum. Monocytes were isolated by using gelatin/plasma-coated flasks method. The average percentages of viability of adherent cells in normal persons and tuberculosis patients were 98.40±0.06% and 97.80±0.42%, respectively. The average percentages of positive non-specific esterase staining in

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

normal persons and in tuberculosis patients were 92.83±0.39% and 89.68±1.20%, respectively.

Macrophages were infected with *M. tuberculosis* H37Ra or *M. tuberculosis* H37Rv in the absent or present of 10% pooled human AB serum with the multiplicity of infection (MOI) at 10 mycobacteria per macrophage. After incubation at 37°C, 5% CO_2 for 4 hours, macrophages were stained for acid-fast bacilli to determine the percentage of phagocytosis. The average percentages of phagocytosis of macrophages from normal persons to *M. tuberculosis* H37Ra and *M. tuberculosis* H37Rv were 13.87±0.24% and 12.00±1.06%, respectively. In the present of phagocytosis with 10% pooled human AB serum, the percentages of phagocytosis of *M. tuberculosis* H37Ra and *M. tuberculosis* H37Rv were 33.74±1.62 % and 32.57±1.22%, respectively. From tuberculosis patients macrophages, the average percentages of phagocytosis of *M. tuberculosis* H37Ra and *M. tuberculosis* H37Rv were 12.94±1.85% and 11.20±0.72%, respectively. The percentages of phagocytosis of *M. tuberculosis* H37Ra and *M. tuberculosis* H37Rv in the present of 10% pooled human AB serum were 32.50±0.58% and 30.06±1.18%, respectively. The average percentages of phagocytosis of *M. tuberculosis* H37Ra and *M. tuberculosis* H37Rv-ingested cells between normal persons macrophages and tuberculosis patients macrophages were not statistically different. The significant increased of percentages of phagocytosis of *M. tuberculosis* H37Ra and *M. tuberculosis* H37Rv in both normal persons and tuberculosis patients were found when 10% pooled human AB serum was presented during the infection period.

To determine the apoptosis of *M. tuberculosis*-infected macrophages in normal persons and tuberculosis patients, macrophages were infected with *M. tuberculosis* H37Ra or *M. tuberculosis* H37Rv at the multiplicity of infection (MOI) 10 mycobacteria per macrophage for 240 min in the absent or present of 10% pooled human AB serum. The apoptotic cells were detected by stained with AnnexinV FLUOS staining kit (Roche) and analyzed by fluorescence microscope.

In normal person, the percentages of apoptosis of *M. tuberculosis* H37Ra-infected cells and *M. tuberculosis* H37Rv-infected cells were 8.33±0.43 and 4.74±0.20, respectively, in the case of phagocytosis without 10% pooled human AB serum which were statistically different. However, in the case of phagocytosis with 10% pooled

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

human AB serum, the percentages of apoptosis of *M. tuberculosis* H37Ra-infected cell and *M. tuberculosis* H37Rv-infected cells were 6.89±1.45 and 4.46±0.15, respectively, which were not statistically different.

In tuberculosis patients, there was significant different in the number of the apoptotic cells when compared between *M. tuberculosis* H37Ra-infected cells and *M. tuberculosis* H37Rv-infected cells. The percentages of apoptosis of *M. tuberculosis* H37Ra-infected cells and *M. tuberculosis* H37Rv-infected cells were 12.94±3.12 and 5.30±1.46, respectively, and the uninfected cells control were 1.12±0.39, in the case of phagocytosis without 10% pooled human AB serum. Likewise, in the case of phagocytosis with 10% pooled human AB serum, the percentages of apoptosis of *M. tuberculosis* H37Ra-infected cells were12.13±1.02, *M. tuberculosis* H37Rv-infected cells were 5.49±0.98 and the uninfected cells control were 1.10±0.08, respectively.

In spite of this, there was no significantly different in the percent apoptosis of *M. tuberculosis* H37Ra or *M. tuberculosis* H37Rv-infected cells between normal persons and tuberculosis patients and the control of both groups was also no significantly different in the percent of apoptotic cells.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	การเกิดเอพอพโทซิสของแมคโครฝาจจากผู้ป่วยวัณโรคและคนปกติภายหลังติดเชื้อวัณโรค
ผู้เขียน	นางสาววรวรรณ วัชระสัมพันธ์กุล
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)
คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ผศ. ดร. สุมาลี พฤกษากร ประธานกรรมการ ศ. เกียรติคุณ ดร. สนิท มกรแก้วเกยูร กรรมการ

บทคัดย่อ

วัณโรคยังคงเป็นสาเหตุการเสียชีวิตเนื่องมาจากโรคติดเชื้อที่พบได้บ่อยที่สุดในโลก เชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* เป็นสาเหตุของวัณโรคปอดและนำมาซึ่งการเสียชีวิตประมาณ 2 - 3 ล้านคนในแต่ละปีทั่วโลก ถึงกระนั้นความสามารถในการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของมนุษย์เพื่อที่จะกำจัดเชื้อ *M. tuberculosis* หรือกลไกของตัวเชื้อที่ใช้ในการหลบหลีกจากภูมิคุ้มกันเหล่านี้ก็ยังไม่เป็นที่เข้าใจดีนัก ผลการทดลองจากหลายการศึกษาแสดงให้เห็นว่ากลไกในการตอบสนองต่อการติดเชื้อ *M. tuberculosis* อาจเกี่ยวข้องกับการเกิดเอพอพโทซิสของเซลล์แมคโครฝาจที่มีการติดเชื้อ *M. tuberculosis* โดยที่พบว่ามีการบาดเจ็บของเนื้อเยื่อเพียงเล็กน้อยหรือไม่มีเลย อย่างไรก็ตาม เชื้อ *M. tuberculosis* ได้มีการพัฒนากลไกเพื่อเปลี่ยนแปลงการตอบสนองในด้านการเกิดการอักเสบและการเกิดเอพอพโทซิสเพื่อที่จะสามารถอาศัยและมีชีวิตอยู่ได้ภายในเซลล์เจ้าบ้าน การศึกษากลไกที่เกี่ยวข้องกับการตายของเซลล์แมคโครฝาจที่มีการติดเชื้อ *M. tuberculosis* อาจนำมาซึ่งการปรับปรุงการรักษาและการป้องกันวัณโรคได้

ในการศึกษานี้มุ่งที่จะศึกษาการเกิดเอพอพโทซิสของเซลล์แมคโครฝาจที่แยกได้จากคนปกติและผู้ป่วยวัณโรคโดยนำมาทำให้เกิดการติดเชื้อ *M. tuberculosis* ในสภาวะที่มีหรือไม่มี ร้อยละ 10 ของ pooled human AB serum การเตรียมเซลล์ monocytes เตรียมโดยวิธี gelatin/plasma-coated flasks ค่าเฉลี่ยของเซลล์ที่มีชีวิตในคนปกติและในผู้ป่วยวัณโรคคิดเป็น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ร้อยละ 98.40±0.06 และ 97.80±0.42 ตามลำดับ ค่าเฉลี่ยของเซลล์ที่ให้ผลบวกต่อการย้อม non-specific esterase ในคนปกติคิดเป็นร้อยละ 92.83±0.39 และในผู้ป่วยวัณโรคคิดเป็นร้อยละ 89.68±1.20

ทำการผสมเซลล์แมคโครฝ่าจกับเชื้อ *M. tuberculosis* H37Ra หรือ *M. tuberculosis* H37Rv ในอัตราส่วนเชื้อต่อเซลล์ 10:1 หลังจากเก็บไว้ที่ 37°C, 5% CO_2 เป็นเวลา 4 ชั่วโมงในสภาวะที่มีหรือไม่มีร้อยละ 10 ของ pooled human AB serum ในระหว่างที่มีการจับกินเชื้อพบว่าแมคโครฝ่าจของคนปกติที่สามารถกินเชื้อ *M. tuberculosis* H37Ra และ *M. tuberculosis* H37Rv มีจำนวนคิดเป็นร้อยละ 13.87±0.24 และ 12.00±1.06 ตามลำดับ และในสภาวะที่มีการเติม pooled human AB serum ร้อยละ 10 พบว่าการกินเชื้อ *M. tuberculosis* H37Ra และ *M. tuberculosis* H37Rv มีจำนวนคิดเป็นร้อยละ 33.74±1.62 และ 32.57±1.22 ตามลำดับ แต่จากแมคโครฝ่าจของผู้ป่วยวัณโรคพบว่าเซลล์ที่มีการกิน *M. tuberculosis* H37Ra และ *M. tuberculosis* H37Rv คิดเป็นร้อยละ 12.94±1.85 และ 11.20±0.72 ตามลำดับ และในสภาวะที่มี pooled human AB serum ร้อยละ 10 พบว่าเซลล์ที่กินเชื้อ *M. tuberculosis* H37Ra และ *M. tuberculosis* H37Rv มีจำนวนคิดเป็นร้อยละ 32.50±0.58 และ 30.06±1.18 ตามลำดับ ค่าเฉลี่ยร้อยละของเซลล์ที่กินเชื้อ *M. tuberculosis* H37Ra และ *M. tuberculosis* H37Rv ในคนปกติและในผู้ป่วยวัณโรคไม่มีความแตกต่างกัน พบว่าร้อยละของเซลล์ที่กินเชื้อ *M. tuberculosis* H37Ra และ *M. tuberculosis* H37Rv เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในทั้งคนปกติและผู้ป่วยวัณโรคเมื่อมีการเติม ร้อยละ 10 ของ pooled human AB serum ในระหว่างที่มีการจับกินเชื้อ

ในการตรวจวัดการเกิดเอพอพโทซิสของแมคโครฝ่าจจากคนปกติและผู้ป่วยวัณโรค เตรียมโดยทำการผสมเซลล์แมคโครฝ่าจกับเชื้อ *M. tuberculosis* H37Ra หรือ *M. tuberculosis* H37Rv ในอัตราส่วนเชื้อต่อเซลล์ 10:1 เป็นเวลา 240 นาที ในสภาวะที่มีหรือไม่มีร้อยละ 10 ของ pooled human AB serum ในระหว่างที่มีการจับกินเชื้อ ทำการตรวจวัดเซลล์ที่เกิดเอพอพโทซิสโดยการย้อมด้วย AnnexinV FLUOS staining kit (Roche) และตรวจดูด้วยกล้อง fluorescence แมคโครฝ่าจของคนปกติในสภาวะที่เซลล์กินเชื้อโดยไม่มี ร้อยละ 10 pooled human AB serum พบว่าร้อยละของเซลล์ที่เกิดเอพอพโทซิสเมื่อมีการติดเชื้อ *M. tuberculosis* H37Ra คิดเป็น 8.33±0.43 และร้อยละของเซลล์ที่เกิดเอพอพโทซิส เมื่อมีการติดเชื้อ *M. tuberculosis* H37Rv คิดเป็น 4.74±0.20 ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ อย่างไรก็ตามในสภาวะที่เซลล์กินเชื้อโดยมีร้อยละ 10 ของ pooled human AB serum ไม่พบความแตกต่างที่มีนัยสำคัญของการเกิดเอพอพโทซิสของเซลล์ที่มีการติดเชื้อ *M. tuberculosis* H37Ra (6.89±1.45%) และ *M. tuberculosis* H37Rv (4.46±015%)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ในผู้ป่วยวัณโรคพบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของเซลล์ที่เกิดเอพอพโทซิสเมื่อเปรียบเทียบระหว่างเซลล์ที่มีการติดเชื้อ *M. tuberculosis* H37Ra และ *M. tuberculosis* H37Rv ในสภาวะที่เซลล์กินเชื้อโดยไม่มีร้อยละ 10 ของ pooled human AB serum การเกิดเอพอพโทซิสของเซลล์ที่มีการติดเชื้อ *M. tuberculosis* H37Ra คิดเป็นร้อยละ 12.94±3.12 และเซลล์ที่มีการติดเชื้อ *M. tuberculosis* H37Rv คิดเป็นร้อยละ 5.30±1.46 และเซลล์ที่ไม่ได้มีการติดเชื้อซึ่งใช้เป็นตัวควบคุมการทดลองคิดเป็นร้อยละ 1.12±0.39 เช่นเดียวกันนี้ ในสภาวะที่เซลล์กินเชื้อโดยมีร้อยละ 10 ของ pooled human AB serum การเกิด เอพอพโทซิสของเซลล์ที่มีการติดเชื้อ *M. tuberculosis* H37Ra คิดเป็นร้อยละ 12.13±1.02 และเซลล์ที่มีการติดเชื้อ *M. tuberculosis* H37Rv คิดเป็นร้อยละ 5.49±0.98 และเซลล์ที่ไม่ได้มีการติดเชื้อซึ่งใช้เป็นตัวควบคุมการทดลองคิดเป็นร้อยละ 1.10±0.08

อย่างไรก็ตามร้อยละของเซลล์ที่เกิดเอพอพโทซิสเมื่อมีการติดเชื้อ *M. tuberculosis* H37Ra และ *M. tuberculosis* H37Rv ไม่พบว่ามีความแตกต่างที่มีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบระหว่างคนปกติและผู้ป่วยวัณโรค และค่าร้อยละของการเกิดเอพอพโทซิสของเซลล์ควบคุมในทั้งสองกลุ่มก็ไม่มีความแตกต่างที่มีนัยสำคัญเช่นกัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved