

**ROLE OF MACROPHAGE ON THE APOPTOSIS OF
ERYTHROID PRECURSOR CELLS: AN *IN VITRO* STUDY**

TIPPARAT PENGLONG

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
(CLINICAL PATHOLOGY)**

**FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY**

2007

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

บทบาทของแมคโครฟาจต่อการเกิดอะพอพโตซิสของเซลล์เม็ดเลือดแดงตัวอ่อนในหลอดทดลอง
(ROLE OF MACROPHAGE ON THE APOPTOSIS OF ERYTHROID PRECURSOR
CELLS: AN *IN VITRO* STUDY)

ทิพรรัตน์ เฟื่องหลัง 4737059 RACP/M

วท.ม. (พยาธิวิทยาคลินิก)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: พรณีย์ บุตรเทพ, Ph.D., สุทัศน์ ฟูเจริญ, M.D.,

ม.ล. เสาวรส สวัสดิวัฒน์, Ph.D.

บทคัดย่อ

ธาลัสซีเมียเป็นโรคพันธุกรรมที่มีความผิดปกติของการสร้างสายโกลบินซึ่งเป็นส่วนประกอบของฮีโมโกลบินในเซลล์เม็ดเลือดแดง เม็ดเลือดแดงจำนวนมากจะตายตั้งแต่ยังเป็นเซลล์ตัวอ่อนเนื่องจากถูกกระตุ้นโดยกระบวนการอะพอพโตซิส การศึกษาที่ผ่านมามีพบว่าไซโตโครม c เป็นแหล่งสำคัญของการเกิดและการตายของเซลล์เม็ดเลือดแดง หลายการศึกษาแสดงให้เห็นว่าในไซโตโครม c ของผู้ป่วยธาลัสซีเมียมีเซลล์แมคโครฟาจมากกว่าในไซโตโครม c ของคนปกติ และเซลล์แมคโครฟาจในไซโตโครม c ของผู้ป่วยธาลัสซีเมียจะอยู่ในสภาวะที่ถูกกระตุ้น จึงมีการหลั่งสารหรือมีการแสดงออกของโปรตีนบนผิวเซลล์ได้มากมาย โปรตีนที่มีความสำคัญตัวหนึ่งคือ FasL ซึ่งสามารถไปกระตุ้นเซลล์ให้เกิดการตายแบบอะพอพโตซิสได้ การศึกษานี้จึงได้ศึกษาบทบาทของเซลล์แมคโครฟาจต่อการเกิดอะพอพโตซิสของเซลล์เม็ดเลือดแดงตัวอ่อนในหลอดทดลอง และศึกษาการตายของเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับ Fas-FasL ในผู้ป่วยธาลัสซีเมียเทียบกับคนปกติ โดยการเพาะเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดแดงตัวอ่อนร่วมกับแมคโครฟาจในอัตราส่วนต่างๆ กันแล้ววัดปริมาณเซลล์เม็ดเลือดแดงที่มีการแสดงออกของ phosphatidylserine บนผิวเซลล์ซึ่งแสดงถึงการเกิดอะพอพโตซิส ร่วมกับการวัดการแสดงออกของ Fas บนผิวเม็ดเลือดแดงและ FasL บนผิวแมคโครฟาจโดยใช้โฟลไซโตมิเตอร์ ผลการศึกษาพบว่าแมคโครฟาจมีบทบาทต่อการเกิดอะพอพโตซิสของเซลล์เม็ดเลือดแดงทั้งในคนปกติและผู้ป่วยธาลัสซีเมีย โดยเปรียบเทียบกับเม็ดเลือดแดงตัวอ่อนที่ไม่ได้เพาะเลี้ยงร่วมกับแมคโครฟาจพบว่าในวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยงเม็ดเลือดแดงต่อแมคโครฟาจ 1:1 ส่วนมีเปอร์เซ็นต์ของเม็ดเลือดแดงตัวอ่อนที่เกิดอะพอพโตซิสเพิ่มขึ้น $8.1 \pm 6.46\%$ และ $12.78 \pm 3.06\%$ ในคนปกติและผู้ป่วยธาลัสซีเมียตามลำดับ นอกจากนี้การแสดงผลออกของ Fas บนผิวเม็ดเลือดแดงและ FasL บนผิวแมคโครฟาจไม่สัมพันธ์กับการเกิดอะพอพโตซิสของเม็ดเลือดแดงที่เพิ่มมากขึ้น และยังพบอีกว่าเม็ดเลือดแดงที่เกิดอะพอพโตซิสไม่ได้มีการแสดงออกของ Fas ทุกเซลล์ ผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าแมคโครฟาจมีบทบาทต่อการเกิดอะพอพโตซิสของเซลล์เม็ดเลือดแดงและการตายของเม็ดเลือดแดงตัวอ่อนนี้อาจเกี่ยวข้องกับกลไกอื่นนอกเหนือจาก Fas-FasL

ROLE OF MACROPHAGE ON THE APOPTOSIS OF ERYTHROID PRECURSOR CELLS: AN *IN VITRO* STUDY

TIPPARAT PENGLONG 4737059 RACP/M

M.Sc. (CLINICAL PATHOLOGY)

THESIS ADVISORS: PUNNEE BUTTHEP, Ph.D., SUTHAT FUCHAROEN, M.D.,
M.L. SAOVAROS SVASTI, Ph.D.**ABSTRACT**

Thalassemia is an inherited disorder of hemoglobin synthesis. The accumulation of unbound globin chains is the cause of the intramedullary destruction of immature red cells (ineffective erythropoiesis). The ineffective erythropoiesis is in part due to accelerated apoptosis of the thalassemic erythroid precursors. Erythrokinetic studies performed in β -thalassemic patients have provided clear evidence that the bone marrow is the main site of erythroid cell death. The increased macrophages, both in the number and the activation state in thalassemic bone marrow suggest an important role of macrophages in erythroid apoptosis. Thus this work aims to study the role of macrophage on the apoptotic change of erythroid precursor cells by co-culture erythroid precursor cells with activated macrophages. The results showed that macrophages can induce apoptosis of erythroid cells as the percent change of apoptotic erythroid cells after co-culture with macrophages is increased in a dose dependent manner. In comparison to the control without macrophages, the percent change in β -thalassemia apoptotic erythroid cells on the 7th day of co-culture at 1:1 erythroid/macrophage ratio was increased for $8.1 \pm 6.46\%$ and $12.78 \pm 3.06\%$ in normal and β -thalassemia/HbE, respectively. The Fas-FasL apoptosis pathway examined by flow cytometer showed that percentages of Fas positive erythroid cells in normal and FasL positive macrophages, both normal and β -thalassemia/HbE, did not correlate with the increasing apoptosis due to the increasing ratios of macrophages and erythroid co-culture. Moreover, Fas was not detected in all apoptotic erythroid cells. Thus, the results indicated that macrophages play a role in the apoptosis of both normal and thalassemia erythroid cells, and other pathways may also be mediated, besides Fas-FasL.

**KEY WORDS: APOPTOSIS / ERYTHROPOIESIS / FAS-FASL / MACROPHAGE
/ THALASSEMIA**

101 pp.