

EFFECT OF IRON OVERLOADED HOST CELLS ON

***Burkholderia pseudomallei* INFECTION**



**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE
REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE (IMMUNOLOGY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY**

2008

COPYRIGHT OF MAHODOL UNIVERSITY

ผลกระทบจากภาวะธาตุเหล็กเกินในโฮสต์เซลล์ที่ถูกเหนี่ยวนำโดยธาตุเหล็ก ที่มีต่อการติดเชื้อ

Burkholderia pseudomallei

(EFFECT OF IRON OVERLOADED HOST CELLS ON *Burkholderia pseudomallei* INFECTION)

วริษา อมรฤทธิ์ 4836181 SIIM/M

วท.ม. (วิทยาศาสตรบัณฑิต)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: สุนีย์ กอปรศรีเศรษฐ์, Ph.D., โกวิท พัฒนาปัญญาสัตย์, Ph.D.,

จตุรพร จิตต์จำรูญโชคชัย, Ph. D.

บทคัดย่อ

Burkholderia pseudomallei เป็นเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคนิดหนึ่งซึ่งเป็นสาเหตุของการติดเชื้ออย่างรุนแรงในผู้ป่วยโรคเมลิออยโดซิส เหล็กเป็นสิ่งจำเป็นต่อการมีชีวิตอยู่ของสิ่งมีชีวิตรวมทั้งของเชื้อ *B. pseudomallei* ที่อาศัยภายในโฮสต์เซลล์ แต่อย่างไรก็ตามข้อมูลเกี่ยวกับบทบาทของธาตุเหล็กต่อการติดเชื้อ *B. pseudomallei* ยังมีอยู่น้อย งานวิจัยนี้จึงมีจุดประสงค์เพื่อจะศึกษาอิทธิพลของภาวะธาตุเหล็กเกินในโฮสต์เซลล์ที่ถูกเหนี่ยวนำโดยธาตุเหล็กที่มีผลต่อความสามารถของเชื้อในการบุกรุกเข้าสู่โฮสต์ความสามารถของเชื้อในการอยู่อาศัย และเพิ่มจำนวนภายในโฮสต์เซลล์ ตลอดจนความสามารถในการกระตุ้นให้เซลล์หลายตัวมารวมตัวกันเป็นเซลล์ขนาดใหญ่ที่เรียกว่า multinucleated giant cell formation (MNGC) ภายในโฮสต์เซลล์ การทำให้เกิดภาวะธาตุเหล็กเกินในโฮสต์เซลล์นั้น ทำโดยการเลี้ยง HeLa และ A549 ในอาหารสำหรับเลี้ยงเซลล์ที่มีการเติมสาร ferrous sulfate (FeSO_4) ที่ความเข้มข้น 10 mM และ 5 mM ตามลำดับ แล้วจึงวัด ferritin ภายในเซลล์โดยวิธี enzyme immunoassay เพื่อบ่งชี้ถึงภาวะเหล็กเกินของโฮสต์เซลล์ จากนั้นจึงทำให้เกิดการติดเชื้อด้วยเชื้อ *B. pseudomallei* จากผลการทดลองพบว่าความสามารถในการสร้าง plaque ของ HeLa ที่ถูกเหนี่ยวนำให้มีภาวะเหล็กเกิน ($1.75 \pm 0.02 \times 10^{-3}$) สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญกว่าของเซลล์ปกติ ($0.62 \pm 0.010 \times 10^{-3}$) เมื่อวัดความสามารถในการบุกรุกเข้าไปยังเซลล์พบว่า ประสิทธิภาพของเชื้อดังกล่าวที่มีต่อ A549 ที่มีภาวะเหล็กเกินนั้นเพิ่มขึ้น อย่างมีนัยสำคัญ 4.23 ± 0.14 เทียบกับในภาวะปกติ 0.43 ± 0.001 ตลอดจนพบว่าจำนวนของเชื้อดังกล่าวในโฮสต์เซลล์ที่ถูกเหนี่ยวนำให้มีภาวะเหล็กเกินมีการเพิ่มจำนวนขึ้นมากกว่าในเซลล์ปกติเมื่อเวลาผ่านไป นอกจากนี้การเกิด MNGC ที่พบในเซลล์ที่มีภาวะเหล็กเกินนั้นมีอัตราเกิดที่เร็วขึ้น รวมทั้งทำให้เกิด MNGC ที่มีขนาดใหญ่กว่าการติดเชื้อในเซลล์ที่มีภาวะปกติ ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้บ่งชี้ว่าภาวะที่มีธาตุเหล็กเกินของโฮสต์เซลล์นั้น ทำให้การเกิดพยาธิสภาพจากการติดเชื้อ *B. pseudomallei* เพิ่มขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากภาวะเหล็กเกินส่งเสริมการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรีย และ ทำให้การทำหน้าที่ของโฮสต์เซลล์เสียหาย ภาวะดังกล่าวจึงเป็นสาเหตุที่ทำให้การติดเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้มีความไวและรุนแรงมากขึ้น

**EFFECT OF IRON OVERLOADED HOST CELLS ON
Burkholderia pseudomallei INFECTION**

WARISA AMORNIRIT 4836181 SIIM/M
M.Sc. (IMMUNOLOGY)

THESIS ADVISORS: SUNEE KORBSRISATE (Ph.D.),
KOVIT PATTANAPANYASAT (Ph.D.),
CHUREEPORN CHITCHUMROONCHOKCHAI (Ph.D.)

ABSTRACT

Burkholderia pseudomallei is a pathogen that causes serious infection in melioidosis patients. This gram-negative facultative intracellular bacteria must obtain iron from hosts to support its life. However, little is known about the role of iron in *B. pseudomallei* infection. In this study, inducing iron overload in human epithelial cell lines, HeLa and A549 was effected and examined for the effect of iron overloaded host cells on the ability of *B. pseudomallei* to invade, survive and replicate, and induce multinucleated giant cell formation within infected host cells. Hosts were treated with ferrous sulfate (FeSO_4). Intracellular ferritin was measured by enzyme immunoassay to determine iron status before infecting with *B. pseudomallei*. Data from plaque formation assays demonstrated that HeLa cells loaded with 10 mM FeSO_4 were significantly susceptible to infection by *B. pseudomallei* ($1.75 \pm 0.02 \times 10^{-3}$) when compared with untreated cells ($0.62 \pm 0.010 \times 10^{-3}$). Invasion efficiency of *B. pseudomallei* to invade 5 mM FeSO_4 treated A549 cells was significantly higher than control (4.23 ± 0.14 vs. 0.43 ± 0.001). Additionally, kinetics of the number of intracellular *B. pseudomallei* in iron overloaded A549 cells was increased with time and greater than control condition. Multinucleated giant cell (MNGC) formation in iron overloaded A549 cells infected *B. pseudomallei* was faster and bigger than in the infected control cells. These findings suggest that the increased pathogenesis of *B. pseudomallei* may occur as a result of greater iron availability supporting *B. pseudomallei* growth or that iron overload may have detrimental effects on host cells leading to an increased susceptibility to infection.

KEY WORDS: Iron / *Burkholderia pseudomallei*

111 pp.