EFFECTS OF CYTOKINES ON NITRIC OXIDE MEDIATED ERYTHROID PROGENITOR CELLS APOPTOSIS IN β-THALASSEMIA/HEMOGLOBIN E AND ANEMIA OF CHRONIC DISEASE

WASINEE KHEANSAARD

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE (MEDICAL TECHNOLOGY) FACULTY OF GRADUATE STUDIES MAHIDOL UNIVERSITY 2010

Copyright by Mahidol University

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

EFFECTS OF CYTOKINES ON NITRIC OXIDE MEDIATED ERYTHROID PROGENITOR CELLS APOPTOSIS OF β-THALASSEMIA/HEMOGLOBIN E AND ANEMIA OF CHRONIC DISEASE

WASINEE KHEANSAARD 5036541 MTMT/M

M.Sc. (MEDICAL TECHNOLOGY)

THESIS ADVISORY COMMITTEE: DALINA TANYONG, Ph.D., SUMANA MAS-OODI, M.D., CHOTIROS PLABPLUENG, Ph.D.

ABSTRACT

Anemia in β-thalassemia/hemoglobin E and rheumatoid arthritis anemia from chronic diseases are cause by different pathology. Ineffective erythropoiesis and apoptosis are the major causes of anemia. However, there has been incomplete information on the mechanism. The purpose of this study was to investigate the mechanism underlying the pathogenesis of these diseases, focusing on cytokine-induced nitric oxide production mediated by erythroid progenitor cell apoptosis of β-thalassemia/HbE and anemia from chronic disease. In this study, erythroid progenitor cells from healthy subjects, β-thalassemia/HbE and anemia from chronic diseases were cultured with cytokines, interleukin-1β, tumor necrosis factor-α, and interferon-γ at 2, 20 and 40 ng/ml concentration for 14 days. The effect of cytokines on total cell count and cell viability were then studied by trypan blue staining, and cell apoptosis was analyzed by flow cytometry. Moreover, the effect of cytokine on nitric oxide mediated cell apoptosis was examined by measuring nitric oxide production by Griess method and iNOS mRNA expression by Real-time PCR, respectively. The results showed that cytokines increased apoptosis of erythroid progenitor cells as determined by reduction of cell count, and cell viability, and induction of cell apoptosis. In addition, increased amounts of nitric oxide production and iNOS mRNA expression were found in erythroid cells cultured with cytokine, especially 20 ng/ml IFN-γ. Finally, percent apoptosis was reduced after an inducible nitric oxide synthase inhibitor, SMT treatment. It is the conclusion that cytokines could induce apoptosis in erythroid progenitor cells, and nitric oxide might be mediated in an apoptotic signaling pathway, which could play a role in pathogenesis of β-thalassemia/HbE and anemia due to chronic disease.

KEY WORDS: β-THALASSEMIA/HEMOGLOBIN E/ APOPTOSIS/ CYTOKINES/ NITRIC OXIDE

124 pages

Copyright by Mahidol University

ผลของไซโตคายน์ต่อการสร้างไนตริกออกไซด์ที่ทำให้เกิดการตายแบบอะพอพโตซิสในเซลล์เม็ดเลือดแดงตัวอ่อนของผู้ป่วยเบต้าธาลัสซีเมีย/ฮีโมโกลบินอี และภาวะโลหิตจางในโรคเรื้อรัง

EFFECTS OF CYTOKINES ON NITRIC OXIDE MEDIATED ERYTHROID PROGENITOR CELLS APOPTOSIS OF β-THALASSEMIA/HEMOGLOBIN E AND ANEMIA OF CHRONIC DISEASE

วศินี เขียนสอาด 5036541 MTMT/M

วท.ม. (เทคนิคการแพทย์)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์: ดลินา ตันหยง, Ph.D., สุมนา มัสอูดี, M.D., โชติรส พลับพลึง, Ph.D.

บทคัดย่อ

โลหิตจางในเบต้าธาลัสซีเมีย/ฮีโมโกลบินอีและภาวะโลหิตจางในโรคเรื้อรังโดยเฉพาะโรคข้ออักเสบรูมาตอยด์มีกลไกการดำเนินโรคที่แตกต่างกัน การสร้างเม็ดเลือดแดงบกพร่องและการตายของเซลล์เม็ดเลือดแดงแบบอะพอพโตซิสเป็นสาเหตุใหญ่ของภาวะโลหิตจาง อย่างไรก็ตามยังไม่มีข้อมูลที่ชัดเจนเกี่ยวกับกลไกดังกล่าว จุดประสงค์ของการวิจัยครั้งนี้ต้องการศึกษาผลของไซโตคายน์ต่อการสร้างไนตริกออกไซด์ที่ทำให้เกิดการตายแบบอะพอพโตซิสในเซลล์เม็ดเลือดแดงตัวอ่อนของผู้ป่วยเบต้าธาลัสซีเมีย/ฮีโมโกลบินอีและภาวะโลหิตจางในโรคเรื้อรังเปรียบเทียบกับคนปกติ โดยทำการเพาะเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดแดงตัวอ่อนจากผู้ป่วยเบต้าธาลัสซีเมีย/ฮีโมโกลบินอี, ภาวะโลหิตจางในโรคเรื้อรัง และคนปกติกับไซโตคายน์ชนิด interleukin-1β, tumor necrosis factor-α, และinterferon-γ ที่ความเข้มข้น 2, 20 และ40 ng/ml เป็นเวลา 14 วันแล้วศึกษาผลของ จำนวนเซลล์ทั้งหมด, จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่โดยวิธีย้อมสี trypan blue และการตายของเซลล์แบบอะพอพโตซิสโดยวิธีโฟลไซโตเมทรี นอกจากนี้ยังทำการศึกษาบทบาทของไนตริกออกไซด์ต่อการกระตุ้นให้เกิดการตายแบบอะพอพโตซิสของเซลล์ โดยทำการศึกษาปริมาณของไนตริกออกไซด์โดยวิธี Griess assay และการแสดงออกของ iNOS mRNA โดยวิธี Real-time PCR ผลการศึกษาพบว่าไซโตคายน์สามารถทำให้เกิดการตายแบบอะพอพโตซิสเพิ่มขึ้นในเซลล์เม็ดเลือดแดงตัวอ่อนของผู้ป่วยเบต้าธาลัสซีเมีย/ฮีโมโกลบินอี, ภาวะโลหิตจางในโรคเรื้อรังและคนปกติตามลำดับ โดยเซลล์ที่เพาะเลี้ยงด้วยไซโตคายน์โดยเฉพาะ 20 ng/ml IFN-γ มีจำนวนเซลล์ทั้งหมดและจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ลดลง และพบการตายของเซลล์แบบอะพอพโตซิสมากที่สุด นอกจากนี้เซลล์ที่ถูกกระตุ้นให้เกิดการตายแบบอะพอพโตซิสโดยไซโตคายน์มีปริมาณของไนตริกออกไซด์และการแสดงออกของยีน iNOS มากกว่ากลุ่มที่ไม่เติมไซโตคายน์ เมื่อทดสอบด้วยการใช้ iNOS inhibitor พบว่าสามารถยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์และการตายของเซลล์แบบอะพอพโตซิสได้ จากผลการศึกษาสามารถสรุปว่าไซโตคายน์ทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงตัวอ่อนตายแบบอะพอพโตซิสได้ และไนตริกออกไซด์น่าจะมีบทบาทสำคัญในขบวนการตายแบบอะพอพโตซิสในเซลล์เม็ดเลือดแดงตัวอ่อนของผู้ป่วยเบต้าธาลัสซีเมีย/ฮีโมโกลบินอีและภาวะโลหิตจางในโรคเรื้อรัง

Copyright by Mahidol University

124 หน้า