

**ROLE OF CD34⁺ HEMATOPOIETIC STEM CELLS AND
MESENCHYMAL STROMAL CELLS ON AVIAN INFLUENZA
VIRUS (H5N1) PATHOGENESIS**



MAYTAWAN THANUNCHAI

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF
DOCTOR OF PHILOSOPHY (MICROBIOLOGY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY**

2013

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

ROLE OF CD34⁺ HEMATOPOIETIC STEM CELLS AND MESENCHYMAL STROMAL CELLS ON AVIAN INFLUENZA VIRUS (H5N1) PATHOGENESIS

MAYTAWAN THANUNCHAI 5036237 SCMI/D

Ph.D. (MICROBIOLOGY)

THESIS ADVISORY COMMITTEE: ARUNEE THITITHANYANONT, M.D.,
PRASERT AUEWARAKUL, M.D., Ph.D., SATHIT PICHYANGKUL, Ph.D.**ABSTRACT**

Avian influenza A H5N1 virus continues to cause a global threat to human health. Major complications of H5N1 infection are the systemic spread with uncontrolled replication and host cytokine responses leading to gross pathology-like sepsis. The clinical data suggests almost half of the fatal cases were associated with hyperactivation of cytokines which might be correlated with reactive hemophagocytosis. Moreover, the presence of abnormal hematologic findings such as lymphopenia, thrombocytopenia, and pancytopenia were diagnosed in severe cases. These increase interest in exploring bone marrow (BM) dissemination, which direct infection of BM cells remains elusive. The BM compartment contains two stem cell types, which are hematopoietic stem cells (HSCs) and mesenchymal stromal cells (MSCs) with possessing stem-like and immunomodulatory properties. Our investigation demonstrated that CD34⁺ HSCs and MSCs were susceptible to H5N1 infection. H5N1 virus could productively infect and induce cell deaths in both cell types. By contrast, these aspects were not found in human influenza virus infection. Reverse genetics analyses demonstrated that hemagglutinin played a role in the infection of MSCs. We also investigated host response following H5N1 infection of CD34⁺ HSCs and MSCs. We found that inflammatory cytokines were not induced in H5N1-infected cells. We next investigated whether infection affects the immunomodulatory function of MSCs. We noted a consequent dysregulation of MSCs-mediated immune modulation from high cytokine and chemokine production in H5N1-infected MSCs/Monocytes co-culture. These findings provide a better understanding of H5N1 pathogenesis in terms of host tropism and systemic spread.

**KEY WORDS: H5N1/SYSTEMIC INFECTION/BONE MARROW/
HEMATOPOIETIC STEM CELL/MESENCHYMAL STROMAL
CELL**

108 pages

Copyright by Mahidol University

การศึกษบทบาทของ CD34⁺ HEMATOPOIETIC STEM CELLS และ MESENCHYMAL STROMAL CELLS
ต่อการเกิดพยาธิสภาพของไวรัสไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1
ROLE OF CD34⁺ HEMATOPOIETIC STEM CELLS AND MESENCHYMAL STROMAL CELLS ON
AVIAN INFLUENZA VIRUS (H5N1) PATHOGENESIS

เมธาวรรณ ชาญไชย 5036237 SCMI/D

ปร.ศ. (จุลชีววิทยา)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์: อรุณี ธิติชัยญานนท์, M.D., ประเสริฐ เอื้อวรากุล, M.D., Ph.D., สาธิต
พิชญางกูร, Ph.D.

บทคัดย่อ

เชื้อไวรัสไข้หวัดนก (H5N1) เป็นเชื้อที่มีความรุนแรงในการก่อโรค และ มีการระบาดอย่างต่อเนื่อง
ในหลายทวีปทั่วโลก การติดเชื้อ H5N1 ในผู้ป่วยส่วนใหญ่จะเป็นแบบแพร่กระจาย เนื่องจากการตรวจพบ
ปริมาณเชื้อที่สูงในอวัยวะต่างๆรวมทั้งในกระแสเลือด จากผลการตรวจวิเคราะห์ทางโลหิตวิทยาทั้งในผู้ป่วยติดเชื้อ
ที่มีอาการรุนแรง พบความผิดปกติของทั้งรูปร่างและจำนวนของเม็ดเลือด นอกจากนี้จากการศึกษาการเกิด
พยาธิสภาพในไขกระดูกของผู้ป่วยที่เสียชีวิต พบแอนติเจนของไวรัสในเซลล์ต้นกำเนิดในไขกระดูก หลักฐาน
ต่างๆเหล่านี้ ทำให้เกิดสมมติฐานที่ว่า เชื้อ H5N1 อาจมีการแพร่กระจายเข้าไปสู่ไขกระดูก เนื่องจากไขกระดูกเป็น
แหล่งสำคัญที่ประกอบไปด้วยเซลล์ต้นกำเนิดสำหรับสร้างเซลล์เม็ดเลือดและเนื้อเยื่อชนิดต่างๆ ดังนั้นการที่เซลล์
ต้นกำเนิดถูกรุกรานโดยไวรัส อาจจะทำให้เกิดพยาธิสภาพที่รุนแรงในไขกระดูกได้ สมมติฐานดังกล่าวได้นำไปสู่
การศึกษาในหลอดทดลองโดยเริ่มต้นจากการแยกเซลล์ต้นกำเนิดซึ่งมี 2 ชนิด คือเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือด
(Hematopoietic Stem Cells; HSCs) และ เซลล์ต้นกำเนิดที่ไม่ใช่เม็ดเลือด (Mesenchymal Stromal Cells; MSCs)
ผลการทดลองเบื้องต้นพบว่า ไวรัสสามารถเข้าและเพิ่มจำนวนใน HSCs และ MSCs และยังสามารถทำลายเซลล์
ทั้งสองชนิดนี้โดยเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบ apoptosis ปัจจัยหนึ่งที่ทำให้เชื้อ H5N1 เข้าสู่เซลล์ได้ดีคือ
Hemagglutinin ที่อยู่บนผิวของไวรัส นอกจากนี้ยังได้ศึกษาการตอบสนองของเซลล์หลังจากได้รับเชื้อเข้าไป โดย
การทดสอบปริมาณการหลั่ง cytokine พบว่า HSCs และ MSCs ไม่สามารถผลิต cytokine ได้ แต่อย่างไรก็ตาม
เซลล์ MSCs ซึ่งมีคุณสมบัติลดการตอบสนองของภูมิคุ้มกัน สามารถหลั่งสาร cytokine และ chemokine ในปริมาณ
สูงเมื่อเลี้ยงร่วมกันกับเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน (ในการศึกษานี้คือโมโนไซต์) ในสถานะที่มีเชื้อ H5N1 จึงเป็นไปได้
ว่าเชื้อ H5N1 สามารถเปลี่ยนคุณสมบัติของการลดระบบภูมิคุ้มกันมาเป็นการทำให้เกิดปฏิกิริยาตอบสนองทาง
ภูมิคุ้มกันที่รุนแรงมากขึ้น การศึกษานี้สามารถอธิบายการเกิดพยาธิสภาพของไวรัสไข้หวัดนกในไขกระดูก ที่อาจ
นำไปสู่สภาวะเม็ดเลือดต่ำอย่างผิดปกติและการอักเสบจากการหลั่ง cytokines ได้