

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: MRG5580024

ชื่อโครงการ: การศึกษาโปรตีโอมของปฏิกิริยาระหว่างเชื้อวัณโรคและเซลล์แมคโครฟาจของคนระหว่างการรักษาด้วยยาต้านวัณโรค

ชื่อนักวิจัย: นายเกียรติไชย พักศรี และคณะ

E-mail address: kiatichai@kku.ac.th

ระยะเวลาโครงการ: 2 ปี

มีการประมาณการว่าหนึ่งในสามของประชากรโลกติดเชื้อวัณโรคแบบแอบแฝง หรือเรียกว่า Latent Tuberculosis infection (LTBI) ปัจจุบันยังไม่มีตัวบ่งชี้ทางชีวภาพที่สามารถบอกถึงสภาวะปราศจากเชื้อของผู้ป่วยภายหลังการรักษาได้ คณะผู้วิจัยจึงมีวัตถุประสงค์ในการศึกษาและวิเคราะห์หาตัวชี้วัดสภาวะปราศจากเชื้อ (clearance stage) จากเซลล์ภายหลังการใช้ยาต้านเชื้อวัณโรค โดยใช้แมคโครฟาจที่ติดเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) เป็นต้นแบบ แล้วเปรียบเทียบโปรตีนที่ถูกสร้างขึ้นในระยะติดเชื้อมีกับสภาวะปราศจากเชื้อ ด้วยวิธีตัดโปรตีนด้วยเอนไซม์ trypsin ในเจล (in-gel tryptic digestion) ต่อด้วยการทำ liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC MS/MS) โดยนำโปรตีนรวมนอกเซลล์ (จากน้ำเลี้ยงเซลล์) และ โปรตีนรวมในเซลล์ (องค์ประกอบในเซลล์จากการทำให้แตกแล้ว) โดยใช้เซลล์แมคโครฟาจชนิด THP-1 (จำนวน 3×10^6 เซลล์) ที่ติดเชื้อวัณโรคสายพันธุ์ H37Rv ด้วยอัตราส่วนระหว่างเชื้อและเซลล์ 1:1 ซึ่งเชื้อในเซลล์ถูกฆ่าด้วยยาสกัดส่วน isoniazid 3 ไมโครกรัม และ ยา rifampicin 9 ไมโครกรัม จากนั้นโปรตีนรวมจึงถูกเก็บมาวิเคราะห์ในวันที่ 1 (สภาวะติดเชื้อ) และวันที่ 5 หลังจากเติมยาแล้ว (สภาวะปราศจากเชื้อ) โดยสภาวะปราศจากเชื้อวัดจากการไม่พบ MTB ในเซลล์แมคโครฟาจ จากนั้นจึงเตรียมโปรตีนที่สกัดได้เพื่อวิเคราะห์ด้วย LC MS/MS ผลการศึกษาพบว่า มีชนิดของโปรตีนภายในเซลล์จากการทดลอง 3 ซ้ำ และอีก 1 ตัวอย่างโปรตีนรวมจากสามซ้ำของการทดลองรวมกันที่แตกต่างกันระหว่างสภาวะติดเชื้อและปราศจากเชื้อ ในส่วนภายในเซลล์ จำนวน 5,142 ชนิด และภายนอกเซลล์จำนวน 2,680 ชนิด โดยมีโปรตีนที่พบเฉพาะสภาวะติดเชื้อ (ไม่พบในสภาวะปราศจากเชื้อ) อย่างน้อย 2 ใน 4 ซ้ำ จากภายนอกเซลล์ 4 ชนิด และภายในเซลล์จำนวน 18 ชนิด และมีโปรตีนที่พบเฉพาะสภาวะปราศจากเชื้อ (ไม่พบในสภาวะติดเชื้อ) อย่างน้อย 2 ใน 4 ซ้ำ จากภายนอกเซลล์จำนวน 9 ชนิด และภายในเซลล์ 12 ชนิด โดย CAECAM18 และ ras GTPase เป็นโปรตีนที่มีแนวโน้มที่ดีในการใช้เป็นตัวบ่งชี้สภาวะปราศจากเชื้อวัณโรค เนื่องจากพบซ้ำๆ ในการทดลองพบปริมาณสูง และเป็นโปรตีนที่มีหน้าที่สัมพันธ์กับการติดเชื้อวัณโรค โปรตีนเหล่านี้อาจจะสามารถนำมาเป็นตัวชี้วัดสภาวะปราศจากเชื้อวัณโรคภายหลังจากการรักษาได้

คำสำคัญ *Mycobacterium tuberculosis*, ติดเชื้อวัณโรคแอบแฝง, comparative proteomic, LC MS/MS, clearance marker

Abstract

Project Code: MRG5580024

Project Title: Proteomic study of host-*Mycobacterium tuberculosis* interaction during anti-tuberculous drugs treatment in human macrophage

Investigator: kiatichai Faksri et. al

E-mail Address: kiatichai@kku.ac.th

Project Period: 2 years (2012-2014)

One-third of the world population was infected with *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) and was defined as latent tuberculosis infection (LTBI). So far, no biomarker for determining the clearance stage of MTB infection after treatment. We aim to analyze the potential biomarkers indicating the clearance stage of MTB infection by using macrophage infection model. Comparative proteomic analysis between MTB infection stage and clearance stage were performed by using in-gel tryptic digestion followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (GeLC MS/MS). Extracellular (culture supernatant) and intracellular (cell lysate) proteomes from activated THP-1 macrophages (3×10^6 cells) infected with MTB H37Rv strain (MOI = 1) and treated with 3 μg of isoniazid and 9 μg of rifampicin for 1 day (infection stage) and 5 days (clearance stage) post infection were extracted, processed for GeLC MS/MS. Clearance stage was defined as the condition with no viable MTB from infected macrophages. Three different proteomes from 3 independent experiments and one pooled sample from those were analyzed. There were overall 5,142 and 2,680 protein elements were found in intracellular and extracellular proteome, respectively, in at least one experiment from all independent experiments. There were 4 extracellular and 18 intracellular that uniquely found in the infection stage (at least 2 in 4 replica experiments) and were not found in non-infection control conditions. There were 9 extracellular and 12 intracellular proteins in the clearance stage. CAECAM18 and ras GTPase were promising to use as MTB clearance biomarker due to their consistent results from independent experiments, presence with high quantity and the associated function to MTB infection. These proteins were the potential biomarkers to indicate the clearance stage of MTB infection after anti-tuberculous treatment.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*, latent *Mycobacterium tuberculosis* infection, comparative proteomic, LC MS/MS, clearance marker