

สัญญาเลขที่ BRG 4580019

โครงการ “การศึกษานาบทาพของภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ. ในตริกอกอลไซด์, ต่อการเพิ่มจำนวน
ของไวรัสไข้เลือดออกและพยาธิสภาพของโรค”

รายงานฉบับสมบูรณ์

ระยะเวลาการดำเนินงาน

สิงหาคม 2545 – กันยายน 2548

โดย

นางสาวศุขรีดา อุนบล

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

สัญญาเลขที่ BRG 4580019

โครงการ “การศึกษาบทบาทของภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ. ในตริกออกไซด์, ต่อการเพิ่มจำนวน
ของไวรัสไข้เลือดออกและพยาธิสภาพของโรค”



รายงานฉบับสมบูรณ์

ระยะเวลาการดำเนินงาน

สิงหาคม 2545 – กันยายน 2548

โดย

นางสาวสุชธิดา อุบล

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

สรุปรายงานผลการศึกษาระดับสมบูรณ (Executive summary)

วัตถุประสงค์

ไวรัสไข้เลือดออกใช้โมโนไซต์/แมคโครฟาจ เป็นเซลล์เป้าหมายที่สำคัญในการเพิ่มจำนวนในผู้ป่วย เป็นที่ทราบกันว่าเซลล์ดังกล่าวสร้างอนุโมลิสระ, ไนตริกออกไซด์, เป็นจำนวนมาก และ ใช้อนุโมลิสระดังกล่าวเป็น innate defense ที่สำคัญ บทบาทของอนุโมลิสระในการติดเชื้อไวรัส ไข้เลือดออกยังไม่มีรายงานการศึกษา ดังนั้นโครงการวิจัยนี้จึงเสนอที่จะศึกษาบทบาทไนตริกออกไซด์ต่อการเพิ่มจำนวนและพยาธิสภาพของโรค โดยแบ่งการศึกษาออกเป็นสองส่วนคือ

1. การศึกษาในหลอดทดลอง เพื่อจะตอบคำถามดังต่อไปนี้
 - 1.1 ไนตริกออกไซด์มีบทบาทต่อการเพิ่มจำนวนของไวรัสไข้เลือดออกอย่างไร
 - 1.2 ถ้าไนตริกออกไซด์มีบทบาทต่อการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสกลไก ดังกล่าวเกิดขึ้นโดยผ่านขบวนการใด หรือในทางตรงข้ามถ้าบทบาทเป็นไป ในทางส่งเสริมการเพิ่มจำนวน กลไกดังกล่าวเกิดผ่านขบวนการใด
2. การศึกษาใน specimens จากผู้ป่วย
 - ศึกษาความสำคัญของไนตริกออกไซด์ต่อปริมาณไวรัสในกระแสเลือดและ ความสัมพันธ์ของไนตริกออกไซด์ต่ออาการของโรค
 - ศึกษาปัจจัยที่เป็นตัวกำหนดการสร้างไนตริกออกไซด์ใน โมโนไซต์/แมคโคร ฟาจ ที่ติดเชื้อไวรัสไข้เลือดออก

ผลการทดลอง

จากการศึกษาบทบาทของไนตริกออกไซด์ต่อการเพิ่มจำนวนของไวรัสไข้เลือดออกใน หลอดทดลองโดยใช้ SNAP เป็นตัวสร้างไนตริกออกไซด์ (nitric oxide donor) ให้กับ neuroblastoma cells ที่ได้รับเชื้อไวรัสไข้เลือดออกพบการทำงานของไนตริกออกไซด์ดังนี้คือ

1. ไนตริกออกไซด์ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสไข้เลือดออก โดยการยับยั้งนั้นแปรผันโดยตรงกับปริมาณไนตริกออกไซด์ คือ ถ้าปริมาณไนตริกออกไซด์มากการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสก็มีสูง
2. เพื่อทดสอบบทบาทของไนตริกออกไซด์ต่อไวรัสที่แยกมาจากผู้ป่วย DF และ DHF อย่างละ 20 ราย จะพบว่า 70% ของไวรัสที่แยกจากผู้ป่วย DF และ 50% ของไวรัสที่แยกจากผู้ป่วย DHF ถูกยับยั้งโดยไนตริกออกไซด์ แต่เมื่อทดสอบค่าทางสถิติไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ
3. เมื่อติดตามดูบทบาทของไนตริกออกไซด์ในแต่ละขั้นตอนของการเพิ่มจำนวนของไวรัสพบว่าไนตริกออกไซด์ยับยั้งการสร้าง RNA หรือยับยั้ง transcription ของ

ไวรัส นอกจากนี้ยังพบว่าการสร้างโปรตีนของไวรัสลดลงอย่างมีนัยสำคัญ แต่จากการศึกษาช่วงเวลาของการลดลงของการสร้างโปรตีนทำให้สันนิษฐานว่า ปริมาณการสร้างโปรตีนที่ลดลงนั้น เป็นผลมาจากการสร้าง RNA ที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ

จากบทบาทของไนตริกออกไซด์ที่พบในการศึกษาดังกล่าว ทางโครงการวิจัยจึงทำการศึกษาคู่เพื่อการทำงานของไนตริกออกไซด์ในระดับโมเลกุล กล่าวคือ ไนตริกออกไซด์อาจจะยับยั้งการเพิ่มจำนวนไวรัสให้เล็ดออกด้วยกลไกหลัก 3 กลไกคือ

1. ยับยั้ง uncoating process : ขั้นตอนนี้โครงการไม่ได้ทำการศึกษานอกจากสารที่จะมีคุณสมบัติในการยับยั้งขบวนการดังกล่าวต้องมีความสามารถในการยับยั้งความเป็นกรดของ endosome SNAP ที่ใช้ในการทดลองนี้เตรียมให้อยู่ในสภาพที่มี pH เป็นกลางคือประมาณ 7-7.5 จึงไม่ควรทำลายสภาพความเป็นกรดของ endosome
2. ยับยั้งการทำงานของ RNA polymerase: เนื่องจากพบว่าการสร้าง RNA หรือ transcription ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ทางโครงการจึงทำการทดลองเพื่อดูบทบาทของไนตริกออกไซด์ต่อการทำงานของ RNA polymerase ของไวรัสให้เล็ดออก (NS5)
3. ยับยั้งการทำงานของ protease: เนื่องจากพบการสร้างโปรตีนลดลงทางโครงการจึงทำการศึกษารolesของไนตริกออกไซด์ต่อการทำงานของ protease ของไวรัสให้เล็ดออก (NS3)

ผลการทดลองในส่วนนี้พบว่าไนตริกออกไซด์มีผลยับยั้งการทำงานของ RNA polymerase ซึ่งทดสอบโดยใช้ cellular replicase complex และการใช้ in vitro replicase assay โดยการใช้ purified NS5 และเมื่อทดสอบบทบาทของไนตริกออกไซด์ต่อ NS3 โดยการใช้ enzyme-coupled NTPase assay และ NTPase assay by TLC ไม่พบว่าไนตริกออกไซด์มีผลต่อการทำงานของ NS3 กล่าวโดยสรุปคือ ไนตริกออกไซด์ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสให้เล็ดออกโดยยับยั้งการทำงานของ NS5 หรือ RNA polymerase

จากข้อมูลที่กล่าวมาข้างต้นจึงได้ทำการศึกษาคู่เพื่อดูบทบาทของไนตริกออกไซด์ในการติดเชื้อไวรัสในผู้ป่วย เพื่อดูความสำคัญของไนตริกออกไซด์ต่อความรุนแรงของโรค จึงทำการศึกษความสัมพันธ์ของไนตริกออกไซด์กับอาการของโรค โดยแบ่งกลุ่มผู้ป่วยเป็น primary DF, primary DHF, secondary DF และ secondary DHF ไม่พบการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญในกลุ่มผู้ป่วย primary DF, DHF และ secondary DF แต่กลับพบปริมาณไนตริกออกไซด์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญในระหว่าง fever day และ defervescent day ในผู้ป่วย secondary DHF และเมื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณไนตริกออกไซด์ ในผู้ป่วย secondary DHF และปริมาณ viral load ในระหว่าง fever day, defervescent day และ convalescent day พบการแปรผัน

ระหว่าง viral load และ ปริมาณไนตริกออกไซด์ใน fever day และ defervescent day ข้อมูลนี้แสดงให้เห็นว่าไนตริกออกไซด์เป็นปัจจัยหนึ่งที่ควบคุม viral load ในผู้ป่วย

เนื่องจากการทดลองการสร้างไนตริกออกไซด์พบเฉพาะใน secondary DHF ทางโครงการจึงตั้งของสันนิษฐานว่า enhancing antibody อาจจะเป็นปัจจัยที่ส่งผลให้การสร้างไนตริกออกไซด์ในผู้ป่วยกลุ่มดังกล่าวลดลง เปิดโอกาสให้ไวรัสเพิ่มจำนวนในเซลล์โมโนไซต์/แมคโครฟาจได้ดีขึ้น ปริมาณ viral load ที่เพิ่มขึ้นส่งผลให้เกิด severe infection จึงทำการทดลองโดยใช้ THP-1 cells เพื่อพิสูจน์บทบาทของ enhancing antibody ต่อการสร้างไนตริกออกไซด์ในเซลล์โมโนไซต์/แมคโครฟาจ ผลการทดลองพบว่า การติดเชื้อไวรัสไข้เลือดออกโดยผ่านทางการทำงานของ enhancing antibody จะทำให้ลดการสร้างไนตริกออกไซด์อย่างมีนัยสำคัญ และขบวนการลดการสร้างไนตริกออกไซด์เกิดจากการกระตุ้นการสร้าง IL-10 และลดการสร้าง IL-12, IFN- γ และยับยั้งการทำงานของ STAT-1 และ IRF-1 gene

ผลการทดลองโดยสรุปคือ ไนตริกออกไซด์หรืออนุมูลอิสระ มีบทบาทสำคัญในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสไข้เลือดออกในเซลล์ โมโนไซต์/แมคโครฟาจ โดยยับยั้งการทำงานของ RNA polymerase ของไวรัสไข้เลือดออก ในผู้ป่วย secondary DHF ซึ่งเป็นผู้ป่วยที่มีอาการรุนแรง และอาจเสียชีวิตได้ถ้าไม่ได้รับการรักษาที่ถูกต้อง ผู้ป่วยในกลุ่มนี้จะมีปริมาณ viral load สูงกว่าผู้ป่วยในกลุ่มอื่น กลไกหนึ่งที่ทำให้ผู้ป่วยในกลุ่มนี้มี viral load สูงคือการสร้างไนตริกออกไซด์ในเซลล์โมโนไซต์/แมคโครฟาจ ถูกยับยั้งโดย enhancing antibody ซึ่งพบในผู้ป่วยกลุ่มดังกล่าว ดังนั้นไนตริกออกไซด์จึงเป็น defense mechanism ที่สำคัญในการกำหนดอาการรุนแรงของโรคไข้เลือดออก

สัญญาเลขที่ BRG 4580019

โครงการ “การศึกษานาบทาของภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ, ในตริกออกไซด์,
ต่อการเพิ่มจำนวนของไวรัสไข้เลือดออกและพยาธิสภาพของโรค”

รายงานความก้าวหน้าของโครงการในรอบ 1 ปี

ระยะเวลาดำเนินการวิจัย
สิงหาคม 2545 – กรกฎาคม 2546

โดย

นางสาวสุทธิดา อุบล และ คณะฯ
ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

“งานวิจัยนี้ยังไม่เสร็จสมบูรณ์โปรดอย่านำไปอ้างอิง”

สรุปรายงานความก้าวหน้าในรอบ 1 ปี

(Executive summary)

วัตถุประสงค์

การศึกษายาทบาทของไนตริกออกไซด์ ในช่วง 1 ปีแรกวางแผนเป้าหมายเพื่อจะตอบคำถามดังนี้คือ nitric oxide ที่สร้างขึ้นในหลอดทดลอง มีบทบาทต่อการเพิ่มจำนวนของไวรัสไข้เลือดออกที่แยกมาจากคนไข้หรือไม่, ถ้า nitric oxide มีบทบาทต่อการเพิ่มจำนวนยาทบาทนั้นเป็นไปในทิศทางใด (กดการเพิ่มหรือส่งเสริมการเพิ่มจำนวน), nitric oxide มีบทบาทต่อ DF และ DHF isolates แตกต่างกันหรือไม่ และ nitric oxide มีบทบาทต่อขั้นตอนใดใน replication cycle ของไวรัสไข้เลือดออก

การทดลองและผลการทดลอง

เพื่อจะตอบคำถามข้างต้น โครงการได้ทำการศึกษาโดยใช้เซลล์ mouse neuroblastoma cells (N18 cell) ซึ่งเป็นเซลล์ที่ไวรัสไข้เลือดออกเพิ่มจำนวนได้ดี และเซลล์ดังกล่าวในสถานะที่ติดเชื้อไวรัสสร้าง nitric oxide ในระดับที่ไม่สามารถตรวจสอบได้ จึงเหมาะที่จะใช้เป็น target เซลล์ เนื่องจากผู้วิจัยสามารถควบคุมปริมาณของ nitric oxide ที่จะเติมลงในหลอดทดลองได้ตามต้องการ ดำเนินการทดลองโดย infect เซลล์ N18 ด้วย DF และ DHF isolates และเติม nitric oxide donor (SNAP) หรือ control compound (NAP) ที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน เก็บเซลล์และ supernate มาทำการศึกษาหาปริมาณไวรัสใน supernate ด้วย plaque assay, Tagman RT-PCR, ตรวจสอบความสามารถของ nitric oxide ในการลดการเพิ่มจำนวนในขั้นตอน transcription ด้วย RT-PCR

ผลการทดลองสรุปได้ดังนี้คือ

1. nitric oxide มีบทบาทในการกดการเพิ่มจำนวนของไวรัสไข้เลือดออกที่แยกจากคนไข้
2. บทบาทในการกดการเพิ่มจำนวนของ DF และ DHF isolates เท่าที่การทดลองดำเนินการได้ในขณะนี้พบว่า DF sensitive ต่อ nitric oxide มากกว่า DHF แต่อย่างไร จำนวน population ก่อนข้างน้อยกำลังดำเนินการต่อ
3. พบบทบาทของ nitric oxide ต่อการสร้าง RNA ของไวรัส

รายงานผลการวิจัยที่ดำเนินการในรอบ 1 ปีแรก

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาบทบาทของภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ, ไนตริกออกไซด์, ต่อการเพิ่มจำนวนของไวรัสไข้เลือดออก โดยในช่วง 1 ปีแรกมุ่งทำการศึกษาในหลอดทดลองเพื่อจะตอบคำถามดังต่อไปนี้

1. nitric oxide จาก exogenous nitric oxide donor มีบทบาทต่อการเพิ่มจำนวนของไวรัสไข้เลือดออกที่แยกมาจากคนไข้หรือไม่
2. ถ้า nitric oxide มีบทบาทต่อการเพิ่มจำนวนบทบาทนั้น เป็นไปในทิศทางที่กีดการเพิ่มจำนวนหรือส่งเสริมการเพิ่มจำนวน
3. ขั้นตอนในการเพิ่มจำนวนของไวรัสขั้นตอนใดที่ถูก effect โดย nitric oxide
4. nitric oxide มีผลต่อ DF และ DHF isolates ในลักษณะเดียวกันหรือไม่

การดำเนินการวิจัย

1. การแยกเชื้อไวรัสไข้เลือดออกจาก serum ผู้ป่วย: ทำการแยกเชื้อไวรัส 2 วิธีคือ
 - 1.1 แยกเชื้อไวรัสจาก serum โดยใช้ C6/36 cells : นำ serum คนไข้มาทำให้เจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ C6/36 ในอัตราส่วน 1:100 แล้วจึง inoculate ลงบน C6/36 ติดตามคุณลักษณะของเซลล์ที่เปลี่ยนแปลงไปเพื่อเก็บไวรัสใน supernate เมื่อ CPE เกิดอยู่ในช่วง 90-100%
 - 1.2 แยกไวรัสจาก serum โดยใช้ยุง : ฉีด serum จำนวน 10 μ l ลงในยุง *Toxorhynchitis splendens* ติดตามยุงเหล่านี้จนพบยุงบางส่วนเริ่มตาย นำยุงมาบดและปั่นแยก cell debris เก็บ supernate ที่ได้มา inoculated ลงใน C6/36 และติดตามดูการเกิด CPE เก็บไวรัสใน supernate เมื่อ CPE ประมาณ 90-100% ตรวจหาปริมาณไวรัสที่แยกได้โดย plaque assay
2. การสร้าง nitric oxide โดย N18 cells เมื่อได้รับ nitric oxide donor:

นำ N18 cell cultures มา treat ด้วย nitric oxide donor ที่ความเข้มข้น 50, 75 และ 100 μ M และเก็บ supernate ในช่วงเวลาต่างๆ กัน เพื่อหาปริมาณ NO_3/NO_2 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ด้วย Griess reagent
3. การศึกษา toxicity ของ nitric oxide ต่อ N18 cells โดย MTT assay และ trypan blue exclusion

Trypan blue exclusion : เลี้ยง N18 cells ใน 6 well tissue culture plate และเติม nitric oxide donor (SNAP) ที่ความเข้มข้น 50, 75 และ 100 μ M ทดสอบ viability ของเซลล์โดยย้อมด้วย trypan blue dye และวัดจำนวน viable cells ซึ่งเป็นเซลล์ที่ไม่ติดสี

MTT assay : เลี้ยงเซลล์ N18 ใน 96 well plate ภายหลังจาก treat เซลล์ด้วย SNAP ที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อการ treatment ครบ 0, 12, และ 24 ชั่วโมง เติม 50 μ l of MTT solution (1 mg MTT in 1 ml PBS) ลงในแต่ละ หลุม incubated ที่ 37°C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เทอาหาร

เลี้ยงเซลล์ออกและเติม 150 μ l of DMSO เพื่อละลาย MTT-formazan product และวัดความเข้มของสีที่ 540 nm

4. การศึกษาบทบาทของ nitric oxide ต่อการเพิ่มจำนวนของไวรัสไข้เลือดออก :

นำ N18 cells มาเลี้ยงใน 6 well culture plate และทำการ inoculated culture ด้วยไวรัส ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน และจึง treat เซลล์ที่ได้รับเชื้อด้วย SNAP หรือ control compound (NAP หรือ media) เก็บ supernate ไปหาปริมาณไวรัสด้วย plaque assay หรือ TagMan RT-PCR

5. ศึกษาบทบาทของ nitric oxide ต่อ transcription ของไวรัสไข้เลือดออก :

นำ N18 cells ที่ได้รับเชื้อไวรัสและ treat SNAP หรือ media มาหาปริมาณการสร้าง RNA ของไวรัส โดยใช้ RT-PCR ดังขั้นตอนดังต่อไปนี้

- 5.1 การแยก cytoplasmic RNA โดยใช้ Urea-SDS extraction นำเซลล์ที่ได้จากการ treat มา lyse ด้วย lysis buffer (100 mM TRIS-HCl, 0.15 M NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.655 NP-40) ปั่นแยก nuclei ออกจาก cell lysate ที่ความเร็ว 800 g 5 นาที สกัด RNA ออกจาก cell lysate โดยใช้ urea buffer (10 mM TRIS-HCl, 7 M urea, 1% [W/V] SDS, 0.35 M NaCl, 10 mM (DTA) ตามด้วย phenol: chloroform: isoamyl alcohol extraction (50:50:1) ตกตะกอน RNA ใน aqueous phase โดยใช้ isopropanol RNA ที่ตกตะกอนได้นำมาละลายใน DEPC-H₂O นำบางส่วนของ RNA ที่ได้ไปใช้ในการสร้าง cDNA
- 5.2 การสร้าง cDNA strand : นำ 10 μ g of RNA มาผ่านขบวนการ reverse transcription ซึ่ง reverse transcription reaction ประกอบด้วย 10 μ g RNA template, 0.5 mM DTT, 1 mM of each deoxynucleotide triphosphate, 1 unit RNase inhibitor, 2.5 units of AMV reverse transcriptase, randomhexamers และ reverse transcription specific buffer นำ reaction ไป incubated ที่ 42°C เป็นเวลา 1 ชม และหยุดปฏิกิริยาโดยการเติม stop solution หรือ การทำให้เจือจางโดย 100 μ l of d H₂O cDNA ที่ได้จะถูกนำไปเป็น template สำหรับ PCR amplification
- 5.3 การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมโดย PCR Reaction : นำ cDNA ที่ได้มา amplify โดยใช้ 50 μ l PCR Reaction ซึ่งประกอบไปด้วย 5 μ g cDNA, 200 μ M of each deoxynucleotide triphosphate mixed, 1 μ M of each specific primers, 1.25 units of Tag polymerase และ PCR buffer นำ Reaction ที่ incubate ในเครื่อง Gene Amp PCR system โดยใช้ขั้นตอนในการ amplify prM gene ของไวรัสไข้เลือดออกดังนี้ predenaturation 95°C 1 นาที, annealing 55°C 30 วินาที, extension 72°C 30 วินาที

และ polymerization 72°C 3 นาที ในการทดลองครั้งนี้ใช้ β -actin gene เป็น internal control

54. Confirm ผล RT-PCR ที่ได้โดย blotting and hybridization:

นำ PCR product ที่ได้มาแยกโดย agarose gel electrophoresis ทำการ denature และ neutralize PCR product ใน agarose gel และ transfer PCR product ลงบนแผ่นเมมเบรน โดยใช้ capillary transfer method ทำการ immobilize PCR product กับแผ่นเมมเบรนโดยใช้ UV-crosslinking และทำการ hybridize PCR product โดยใช้ 32 P-labelled specific probe คือ prM gene.. ภายหลัง hybridization ล้างแผ่นเมมเบรนด้วย 2xSSC, 10% SDS และ 0.1xSSC, 0.1% SDS และ autoradiograph บน X-ray film

- 5.5 ตรวจระดับการสร้าง prM gene โดยเปรียบเทียบกับ β -actin gene :

นำผล hybridization ที่ปรากฏบนแผ่น X-ray film มาอ่านความเข้มขึ้นโดยเครื่อง densitometer แล้วนำค่ามาคำนวณเปรียบเทียบระหว่างความเข้มขึ้นของ prM gene คือ β -actin gene โดยคำนวณออกมาเป็นค่าร้อยละ

6. การหาปริมาณ copy number ของสารพันธุกรรมของไวรัสไข้เลือดออกโดย TagMan-RT-PCR (real-time fluorogenic RT-PCR):

เลี้ยงไวรัสไข้เลือดออกใน N18 cells แล้วจึงเติม nitric oxide เก็บ supernate ที่เวลาต่างๆ กัน และนำมาหาปริมาณไวรัสที่เพิ่มจำนวนใน culture นั้นด้วยการหาปริมาณ copy number ของสารพันธุกรรม โดยมีขั้นตอนคร่าวๆ ดังนี้ สกัด RNA จาก supernate และนำมาเข้าสู่ขบวนการ reverse transcription โดยใช้ dengue anti-sense primer cDNA product ที่ได้จะนำมาเป็น template ใน PCR reaction โดยเตรียม 50 μ l PCR reaction ดังนี้ 2 μ l cDNA template, 5 μ l 10x Tagman buffer, 2 μ l 2.5 M dNTP, 4 μ l of 25 mM $MgCl_2$, 0.2 μ M sense primer, 0.06 μ M anti-sense primer, 0.02 μ M internal fluorogenic probe, และ 1.25 units Ampli Tag Gold DNA polymerase PCR condition คือ 95°C 5 นาที และ 95°C 15 วินาที และ 60°C 1 นาที จำนวน 40 cycle PCR amplification โดยเครื่อง Gene detection system 7700 (PE ABI) จำนวนสารพันธุกรรมจะคำนวณโดยเปรียบเทียบกับ standard โดย dengue genomic copy standard ได้รับจาก WRAIR.

ผลการทดลอง

1. การแยกไวรัสจาก serum ผู้ป่วย : ดำเนินการแยก 2 วิธีคือ
 - 1.1 แยกไวรัสโดยใช้ C6/36 cells : ทำการแยกโดยนักศึกษาในห้องปฏิบัติการของหัวหน้าโครงการ โดยการ dilute serum ด้วยอาหารเลี้ยงไวรัสในอัตราส่วน 1:100 (serum: อาหารเลี้ยงเซลล์) และเติม 1 ml ของ serum ที่ dilute แล้วลงบน monolayer culture

ของ C6/36 cells incubate ประมาณ 1 ชม. เติม media และเลี้ยงเซลล์ดังกล่าวที่ 37°C พบว่าเซลล์ตายหมดภายใน 24 ชม. คาดว่าเป็นผลมาจากการทำงานของ complement ที่อยู่ใน serum วิธีการนี้จึงใช้ในการแยกไวรัสจาก serum ผู้ป่วยไม่ได้ แต่ในห้องปฏิบัติการบางแห่งสามารถใช้วิธีการนี้ได้

- 1.2 แยกไวรัสโดยใช้bung : ฉีด serum เข้าไปใน Toxorhynchitis splendens ปล่อยให้ไวรัสเพิ่มจำนวนในbung (ขั้นตอนนี้ดำเนินการโดยเจ้าหน้าที่ของ AFRIMS) และเพิ่มปริมาณไวรัสจากbungที่บดโดยใช้ C6/36 cells พบว่าวิธีการนี้ใช้แยกไวรัสได้ดี ไวรัสที่ใช้ในการศึกษาในโครงการวิจัยนี้ทั้งหมดแยกโดยใช้วิธีการนี้ และเมื่อหาปริมาณไวรัสที่ amplified ใน C6/36 เซลล์ โดย plaque assay พบว่าปริมาณไวรัสอยู่ในช่วงระหว่าง 10^5 - 10^7 PFU/ml

2. ทดสอบ toxicity ของ nitric oxide คือ mouse neuroblastoma cell:

เพื่อทำการทดสอบว่า SNAP มีบทบาทต่อการทำงานของเซลล์และ cell viability หรือไม่ จึงทำการเลี้ยง N18 cells ใน culture ที่มี SNAP มีความเข้มข้น 50, 75 และ 100 μM และสถานะที่มี NAP มีความเข้มข้น 100 μM และติดตามการทำงานของ mitochondria ด้วย MTT assay และติดตาม cell viability โดยใช้ trypan blue exclusion จากผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 1 และ 2 พบว่า cell viability ในทุก condition ไม่มีความแตกต่างกัน รวมทั้งการทดสอบผลของ nitric oxide คือการทำงานของ mitochondria ก็พบว่า SNAP และ NAP ที่ใช้ในการศึกษาไม่มีบทบาทต่อการทำงานของ mitochondria จึงสรุปได้ว่า SNAP ที่ใช้ในการทดลองตั้งแต่ 50-100 μM ไม่มีผลต่อ cell viability และการทำงานของ mitochondria

3. วัดปริมาณ nitric oxide ที่สร้างโดย mouse neuroblastoma cell ในสถานะที่ treat ด้วย SNAP ที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน :

เก็บ supernate จาก N18 culture ที่ treat ด้วย SNAP ที่ 50, 75 และ 100 μM มาตรวจหาปริมาณ stable product ของ nitric oxide (NO_3/NO_2) โดย Griess reagent ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 3 คือ ปริมาณ NO_3/NO_2 เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาของการ treat เซลล์ ซึ่งแสดงให้เห็นว่ามีการสร้าง nitric oxide ออกมาจึงเกิด accumulation ของ NO_3/NO_2 และพบว่าปริมาณ nitric oxide ที่สร้างออกมานั้นขึ้นกับปริมาณ SNAP ที่ใส่ลงใน culture คือ culture ที่ treat ด้วย SNAP 50 μM สร้าง nitric oxide ได้ต่ำสุดเมื่อเทียบกับ culture ที่ treat ด้วย 75 และ 100 μM SNAP

4. ศึกษากระบวนการสร้าง nitric oxide โดย N18 cells ในสถานะที่ติดเชื้อไวรัส :

เพื่อให้แน่ใจว่าในสถานะที่ติดเชื้อการสร้าง nitric oxide จะไม่เปลี่ยนแปลงจึงทำการทดสอบโดย infect N18 cells ด้วยไวรัสที่ MOI 0.1, 1.0 และ 10 เปรียบเทียบกับการสร้าง nitric oxide จากเซลล์ปกติ โดยเซลล์ที่ถูก infect และเซลล์ปกติจะได้รับ SNAP ที่ความเข้มข้น

50 μM เก็บ supernate ในเวลาต่างๆ กัน และตรวจหาปริมาณ NO_3/NO_2 ผลการทดสอบดังแสดงในรูปที่ 4 พบว่าในสถานะที่ติดเชื้อ N18 cells ยังคงสร้าง nitric oxide ได้ในปริมาณเทียบเท่ากับเซลล์ปกติ

5. ศึกษาบทบาทของ nitric oxide คือ kinetic of replication:

เพื่อทดสอบบทบาทของ nitric oxide ต่อการเพิ่มจำนวนของไวรัสใช้เลือกออกทำการ infect N18 cells ด้วยไวรัสที่ MOI 1 และ treat เซลล์ที่ติดเชื้อด้วย SNAP 50 μM หรือ NAP 50 μM หรือ อาหารเลี้ยงเซลล์ปกติ เก็บ supernate ทุกๆ 3 ชม และนำไปหาปริมาณไวรัสโดย plaque assay ดังแสดงในรูปที่ 5 SNAP 50 μM ให้ปริมาณ nitric oxide มากพอที่จะ delay การเพิ่มจำนวนไวรัสประมาณ 3 ชั่วโมง แต่ในระยะท้ายของการทดลองไวรัสสามารถเพิ่มจำนวนขึ้นมาถึงระดับเดียวกับการเพิ่มจำนวนในสถานะที่ไม่มี nitric oxide

เพื่อให้แน่ใจว่า nitric oxide มีบทบาทในการกดการเพิ่มจำนวนของไวรัส ไม่เพียงแต่ delay การเพิ่มจำนวนเท่านั้น จึงทำการศึกษาโดยใช้ SNAP ที่ความเข้มข้นสูงขึ้น โดย treat เซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสด้วย SNAP ที่ความเข้มข้น 50, 75 และ 100 μM และตรวจหาปริมาณไวรัสที่ released ออกมาใน supernate โดยเปรียบเทียบกับเซลล์ติดเชื้อที่ไม่ได้รับ nitric oxide ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 6 SNAP 100 μM ให้ปริมาณ nitric oxide ซึ่งกดการเพิ่มจำนวนของไวรัสได้อย่างสมบูรณ์ เมื่อติดตามการเพิ่มจำนวนถึงชั่วโมงที่ 36 หลังการติดเชื้อ SNAP 75 μM สามารถ delay และ suppress การเพิ่มจำนวนของไวรัสอย่างมีนัยสำคัญ แต่ไม่สามารถกดการเพิ่มจำนวนได้อย่างสมบูรณ์ ในขณะที่ 50 μM SNAP สามารถ delay การเพิ่มจำนวน

6. ประสิทธิภาพในการกดการเพิ่มจำนวนของไวรัสขึ้นอยู่กับจำนวนไวรัส:

จากผลการทดลองในข้อ (5) พบว่าการกดการเพิ่มจำนวนของไวรัสขึ้นอยู่กับปริมาณ nitric oxide ในการทดลองนี้ได้ทดสอบประสิทธิภาพของการกดการเพิ่มจำนวนโดยใช้ปริมาณไวรัสแตกต่างกันกล่าวคือ infect N18 cells ด้วยไวรัสที่ MOI 0.1, 1.0 และ 10 และ treat infected cells ด้วย SNAP ที่ความเข้มข้น 50 μM ติดตาม kinetic ของการเพิ่มจำนวนที่เวลาต่างๆ กันหลังจาก infect จนถึง 36 ชั่วโมง โดยใช้ plaque assay ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 7 พบว่า 50 μM SNAP สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสที่ MOI 0.1 ได้อย่างสมบูรณ์ในช่วงการทดลอง 36 ชม. ในขณะที่ 50 μM SNAP ไม่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนของไวรัสใน culture ซึ่ง infect ด้วยไวรัสที่ MOI 10

7. ศึกษาความแตกต่างของการกดการเพิ่มจำนวนของไวรัสที่แยกมาจากผู้ป่วย DF และ DHF:

ทำการทดสอบความสามารถของ nitric oxide ในการกดการ replication ของไวรัสที่แยกมาจากผู้ป่วย DF และ DHF ว่าไวรัสจากผู้ป่วยเหล่านี้ susceptible ต่อ inhibitory effect ของ nitric oxide แตกต่างกันหรือไม่ ทำการศึกษาเบื้องต้นโดยใช้ DF และ DHF อย่างละ 1 isolate มา infect ลงบน N18 cells และ treat เซลล์ที่ได้รับเชื้อไวรัสด้วย SNAP ที่ความเข้มข้น

50, 75 และ 100 μM และเก็บ supernate ที่เวลาต่างๆ นำมาศึกษา kinetic of replication โดย plaque assay ดังแสดงในรูปที่ 8 พบว่า DF isolate ที่ใช้ในการทดลองนี้ susceptible ต่อบทบาทของ nitric oxide มากกว่า DHF isolate แต่อย่างไรก็ดีผลการทดลองอาจจะขึ้นอยู่กับ isolate นั้น ๆ จึงต้องทำการศึกษาเพิ่มขึ้นโดยตั้งเป้าที่จะศึกษายาทบาทของ nitric oxide คือ DF และ DHF อย่างละ 30 isolates ขณะนี้ได้ดำเนินการศึกษาไปได้อย่างละ 13 isolates โดยการหาปริมาณไวรัสใน supernate ด้วย TagMan RT-PCR แทนการใช้ plaque assay และได้แสดงตัวอย่างผลการทดลองของ 3 isolates ที่ความเข้มข้นของ SNAP 50 μM มาให้พิจารณาในรูปที่ 9 ซึ่งจะพบว่า DF isolates ทั้งสามตัว susceptible คือ inhibitory effect ของ nitric oxide ในขณะที่ DHF ทั้ง 3 isolate สามารถเพิ่มจำนวนได้ตามปกติในสภาวะที่มี 50 μM SNAP แต่อย่างไรก็ตามในขณะนี้ไม่สามารถยืนยันได้ว่าไวรัสจาก DHF patients และไวรัสจาก DF patients ตอบสนองต่อบทบาทของ nitric oxide ไม่เหมือนกัน

8. Nitric oxide กดการสร้าง RNA ของไวรัสเลือดออก:

เพื่อค้นหาว่า nitric oxide กดการเพิ่มจำนวนของไวรัสไข้เลือดออก โดยมีผลต่อขั้นตอนใดใน replication cycle เนื่องจากมีรายงานการศึกษาใน RNA ไวรัสชนิดอื่นๆ เช่น Japanese Encephalitis virus ว่า nitric oxide ยับยั้งขบวนการ transcription ดังนั้นในเบื้องต้นจึงทำการศึกษายาทบาทของ nitric oxide คือ RNA synthesis ของไวรัสเลือดออก โดยการใช้ RT-PCR โดยใช้ primer ที่จำเพาะคือ prM gene

เพื่อทดสอบว่าการทำ RT-PCR ของ prM gene ได้ผลดีจึงทำการทดลองโดยนำเอาเซลล์ที่ได้รับเชื้อไวรัสมาสกัด RNA และผ่านขั้นตอน RT-PCR ซึ่งจะได้ product ที่มีขนาด 115 bps ดังแสดงในรูปที่ 10 เป็นการยืนยันว่าเทคนิค RT-PCR ในห้องปฏิบัติการของหัวหน้าโครงการใช้ได้ผลดี จึงดำเนินการทดลองต่อไปโดยการ infect N18 cells ด้วย DF และ DHF isolate และ treat เซลล์ที่ได้รับเชื้อด้วย 50 μM และ 75 μM SNAP และจึงเก็บ infected cells ที่เวลาต่างๆ กัน นำเซลล์ที่เก็บไว้มาสกัด RNA และเข้าขบวนการ RT-PCR เพื่อหาปริมาณ prM gene ของไวรัสไข้เลือดออก โดยในการทดลองนี้ใช้ β -actin gene เป็น internal control ปริมาณการแสดงออกของ prM gene ในแต่ละช่วงเวลาคำนวณออกในค่า folding คือ β -actin gene ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 11 และ 12

ผลการทดลองในรูปที่ 11 แสดงการกดการสร้าง RNA ของ DF isolate พบว่าที่ 50 μM SNAP จะพบการสร้าง RNA ในชั่วโมงที่ 10 ซึ่งล่าช้าไปกว่าสภาพปกติประมาณ 2 ชั่วโมงและปริมาณ RNA ที่สร้างขึ้นในสภาวะที่มี 50 μM SNAP ต่ำกว่าใน culture ที่ไม่มี SNAP ในขณะที่ infected cells ซึ่งได้รับ 75 μM SNAP สามารถตรวจพบการสร้าง RNA ในปริมาณต่ำๆ ที่เวลา 16 ชั่วโมง หลังจากการได้รับไวรัส เมื่อนำแผ่น X-ray film ไปอ่านความเข้มของแต่ละ band โดยเครื่อง densitometer และนำค่า intensity ของแต่ละ band มาหาอัตราส่วน

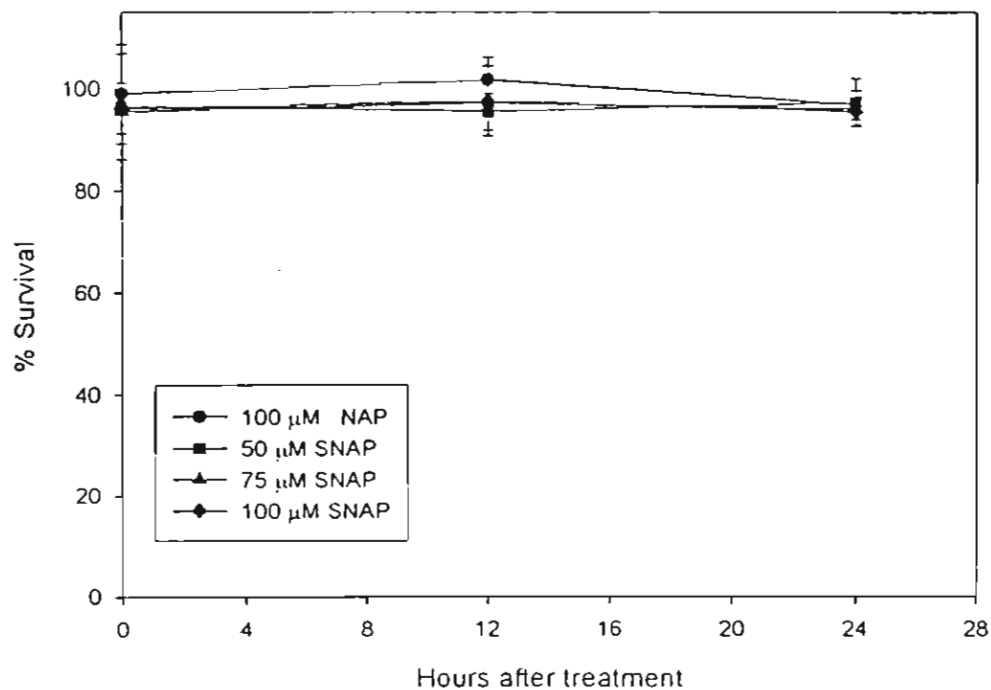


Figure 1 Effect of SNAP on N18 cell mitochondrial function. N18 cells were repeatedly treated every 4 hours with 50 μM or 75μM or 100μM of SNAP or 100 μM of NAP during the first 12 hours of cultured period. Mitochondrial functions were determined by MTT assay after NO treatment at 0, 12 and 24 hours of cultured period.

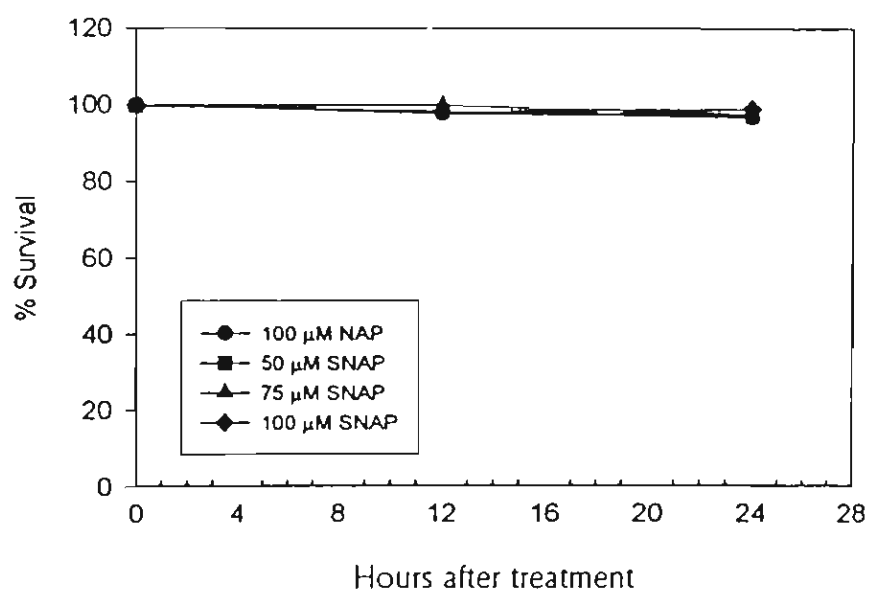


Figure 2 Effect of SNAP on N18 cell viability. N18 cells were repeatedly treated every 4 hours with 50 μ M or 75 μ M or 100 μ M of SNAP or 100 μ M of NAP during the first 12 hours of cultured period. Trypan blue exclusion test was performed to evaluate the survival percentage of SNAP treated N-18 cells at 0, 12 and 24 hours. of cultured period.

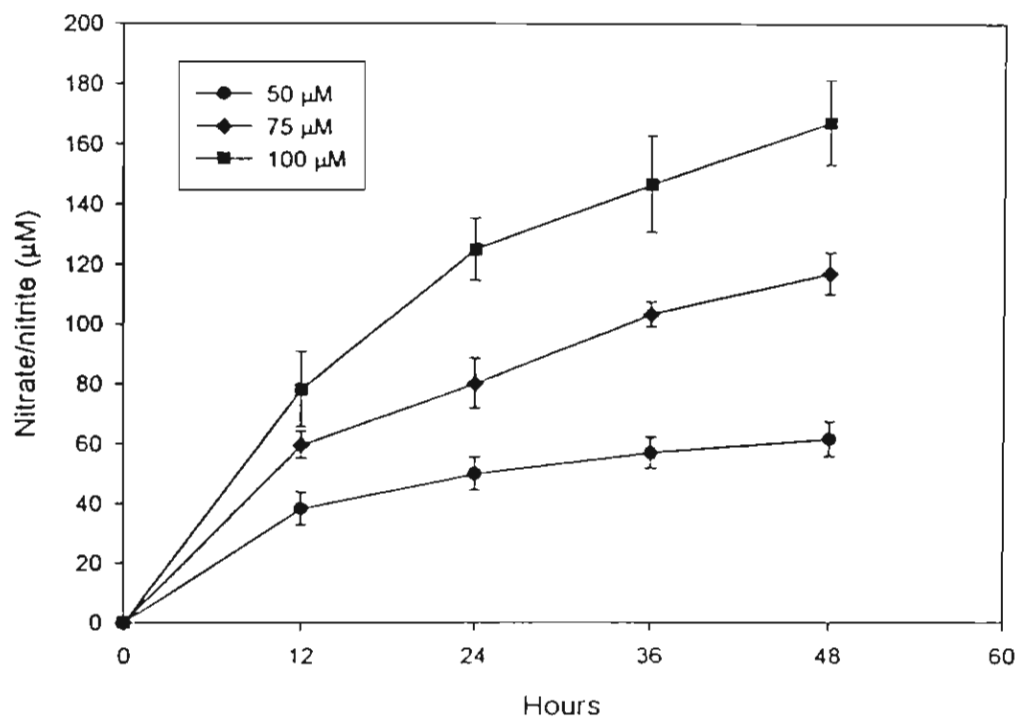


Figure 3' The level of NO generated from N-18 cultures after treatment with 50 or 75 or 100 μM SNAP. SNAP was added to the culture every 4 hours in the first 12 hours period. The concentrations of nitrate/nitrite in culture were determined at 0, 12, 24, 36, and 48 hours by Greiss reagent. ($n = 3$; mean $\pm$ SD)

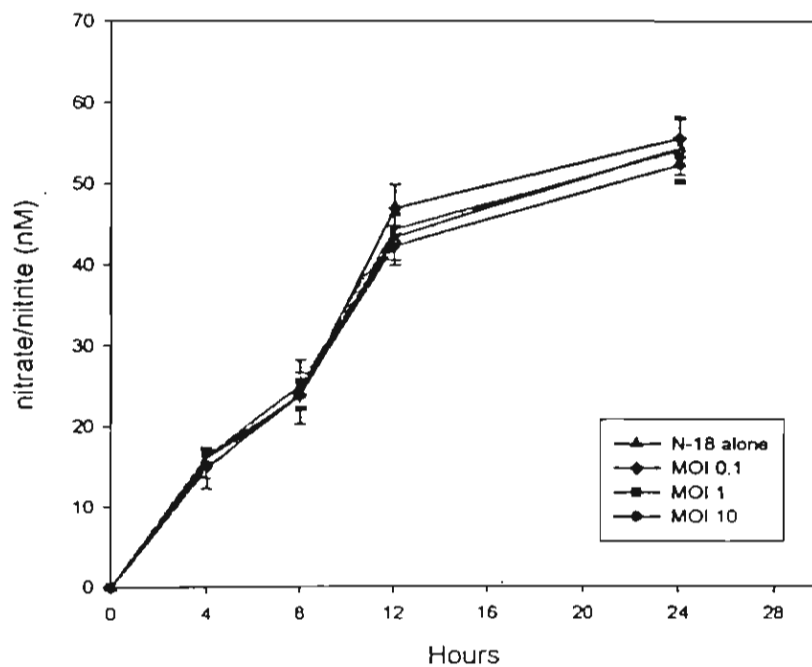


Figure 4. The level of NO production in uninfected N18 cells and dengue infected N18 cultures at the MOI of 0.1, 1 and 10. All cultured were treated with 50 μ M SNAP and NO released was determined by Greiss reagent (n = 3; mean $\pm$ SD)

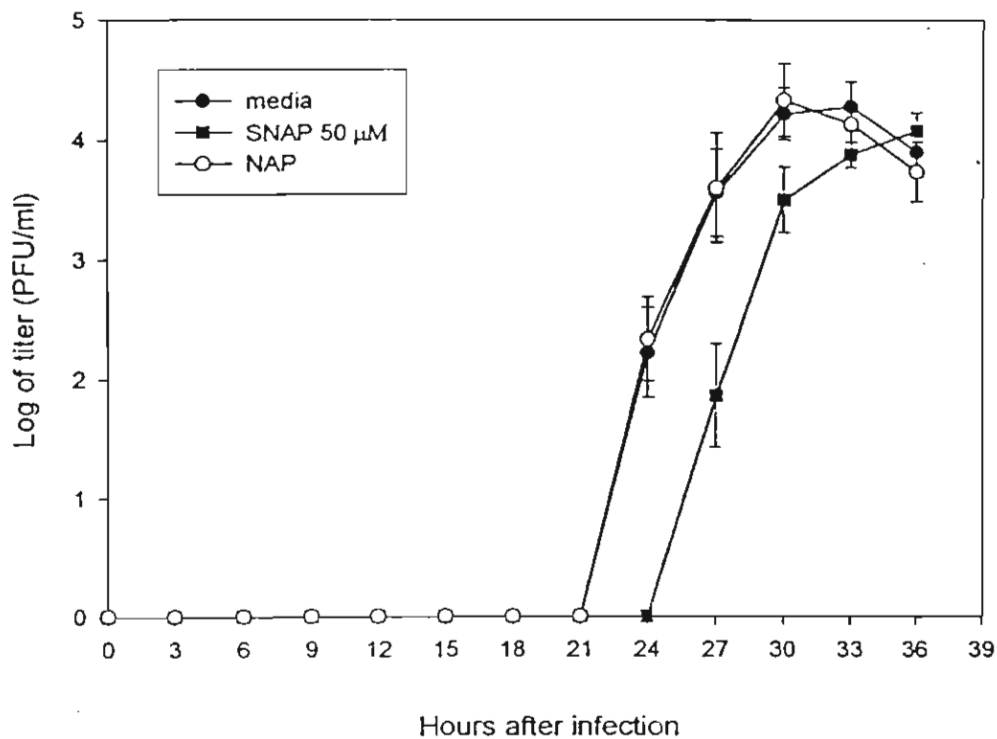


Figure 5 The inhibitory effect of NO on the synthesis of viral progeny from dengue virus infected N18 cells. Cells were infected at the MOI of 1 and were cultured in the presence of 50 μ M SNAP, 50 μ M NAP or medium alone. The kinetics of viral replication from these cultures were determined by plaque assay and presented as log off titer (PFU/ml) ($n = 3$; mean $\pm$ SD)

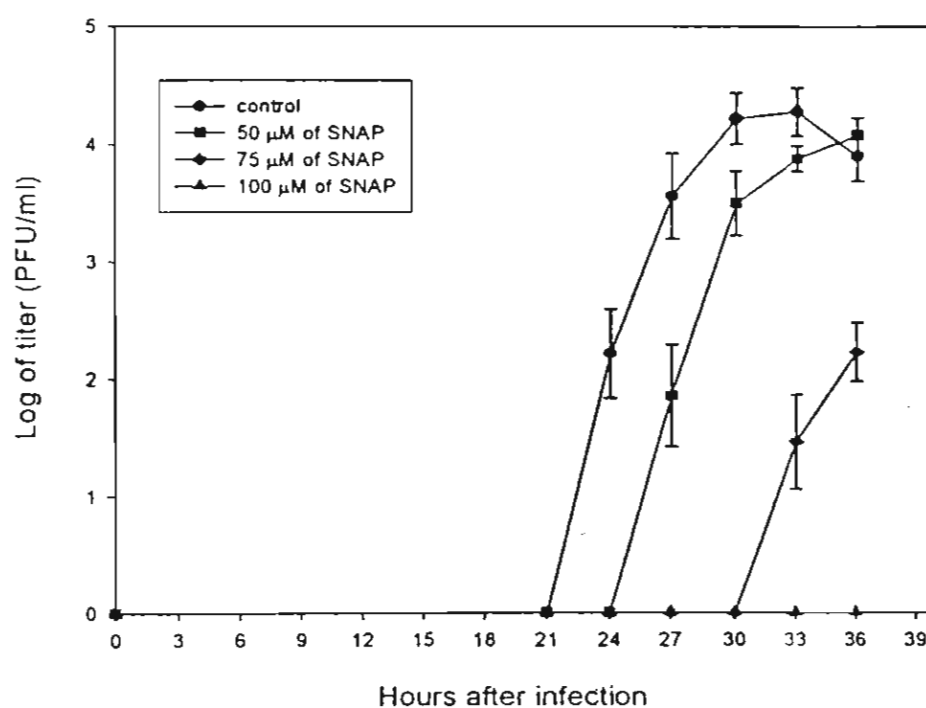


Figure 6 Effect of NO at various concentrations on dengue virus replication.

N18 cells were infected with dengue virus at the MOI of 1. The infected cultures were treated with various doses of SNAP for every 4 hour time point until 12 hr post infection. Culture supernatant was then harvested at the marked intervals. The titer of viral progeny was determined by plaque assay on LLC-MK2 cells. (n = 3; mean $\pm$ SD)

The effect of SNAP on dengue replication at different MOI

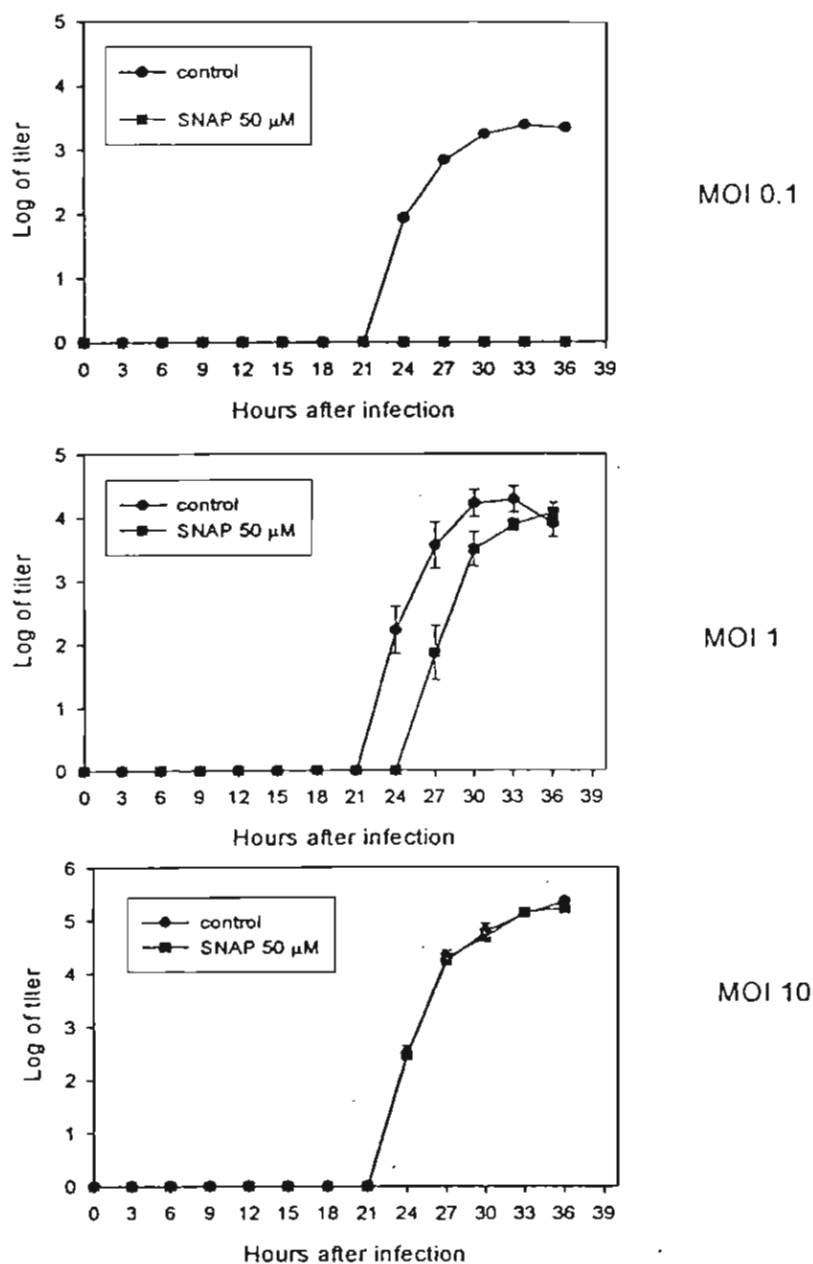


Figure 7 The effect of 50 μ M SNAP concentration on dengue virus replication at different MOI. N18 cultures were infected with dengue virus at the MOI of 0.1 or 1 or 10 and were treated with 50 μ M SNAP. The kinetics of viral replication was compared.

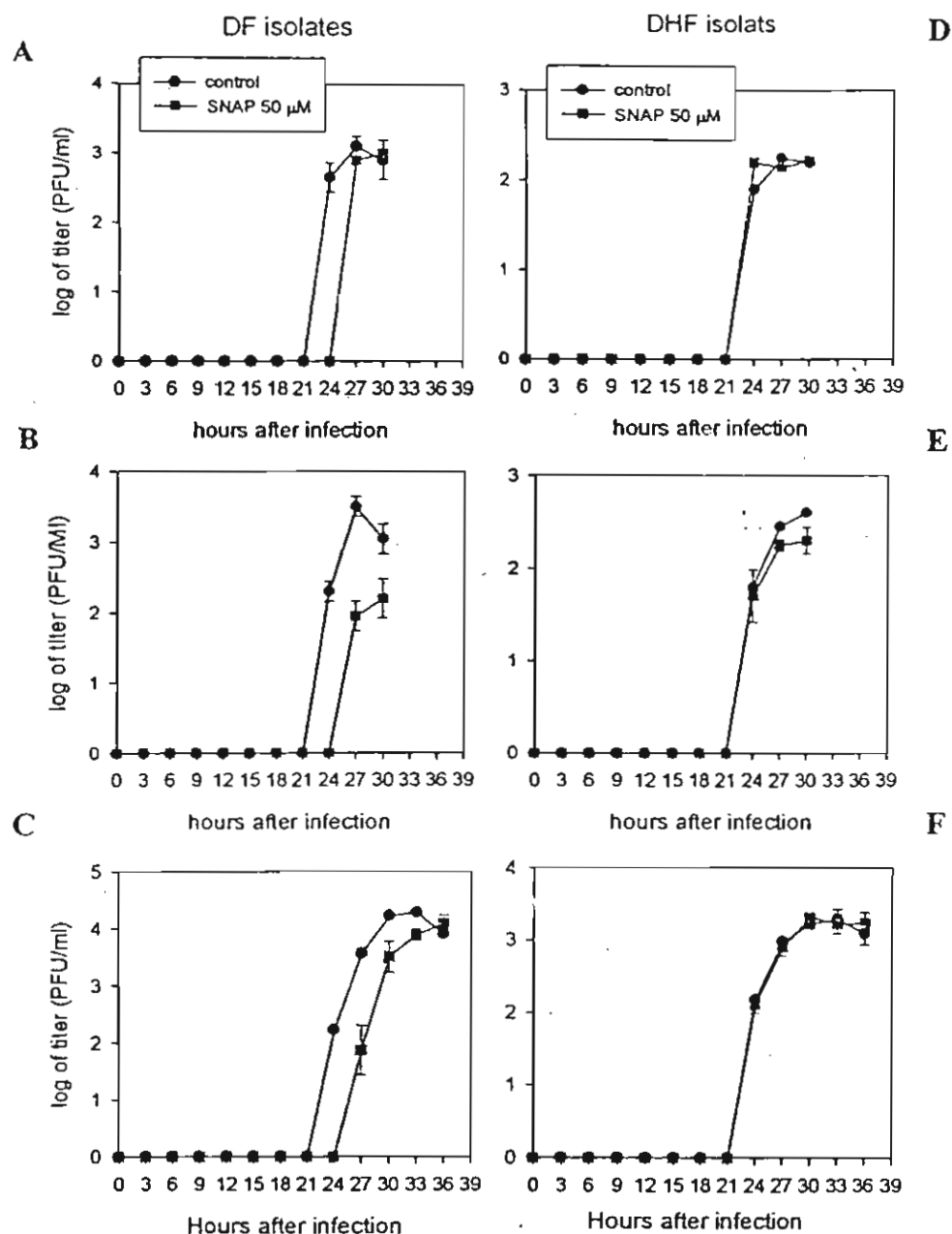
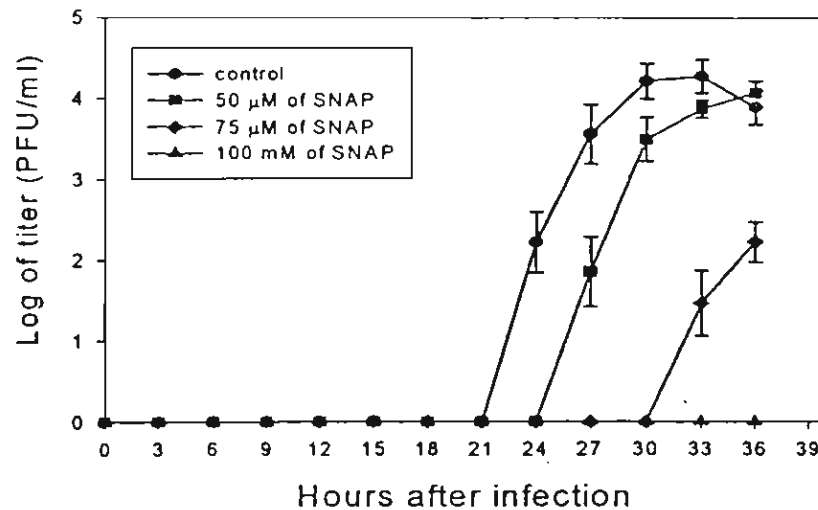


Figure 9. The inhibitory effect of NO on the replication of dengue virus obtained from 3 different isolates. N18 cultures were infected with DF (A, B and C) or DHF isolates (D, E and F) at the MOI of 1. Each culture was treated with 50 μ M of SNAP for every 4 hr time interval until 12 hr post infection. The kinetic of replication of each isolate was determined. (n = 3; mean $\pm$ SD)

A) DF isolate



B) DHF isolate

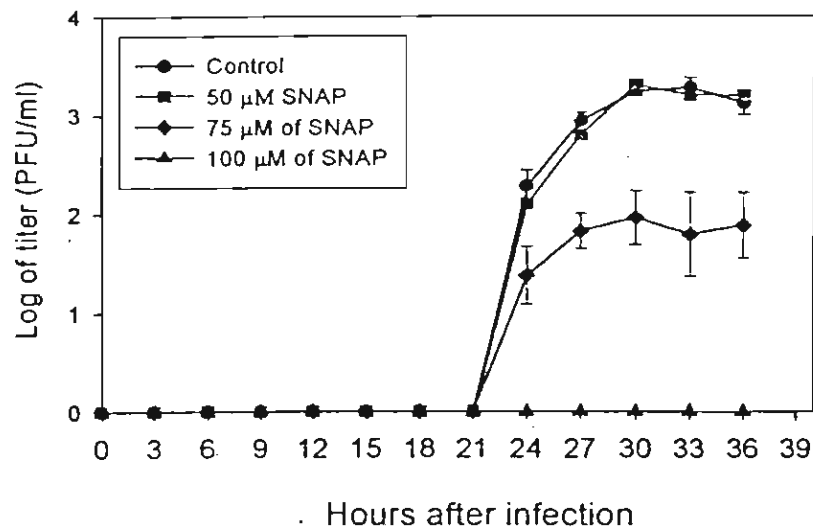


Figure 8 The suppressive effect of NO on replication of DF (C) and DHF (F) isolates were investigated at various concentrations of SNAP. N18 cells were infected with DF (A) or DHF (B) isolate. The culture of each isolates was treated with 50 or 75 or 100 μ M SNAP and replenished every 4 hr until 12 hr. The kinetics of viral replication was performed by plaque assay. (n = 3; mean $\pm$ SD)

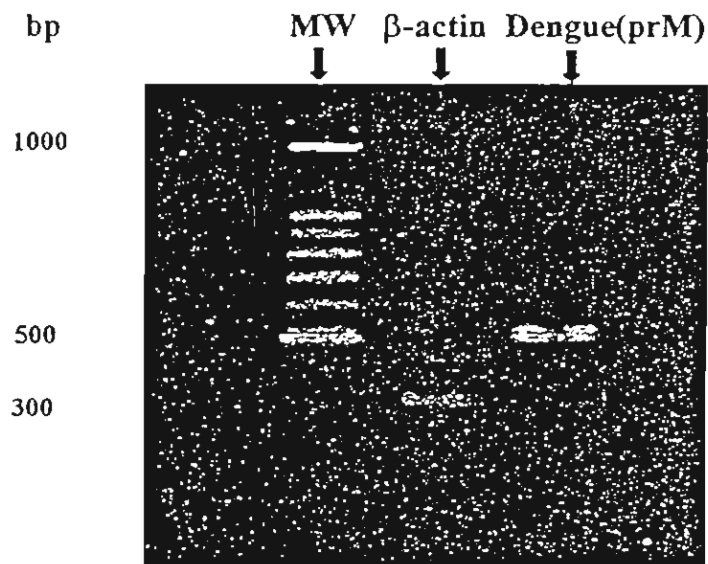


Figure 10 RT-PCR amplification of dengue viral RNA and β -actin. Dengue virus gene and β -actin gene were amplified using gene specific primer pairs. The amplified products were analyzed by 1.8% agarose-gel electrophoresis. Lane MW is DNA standard size marker.

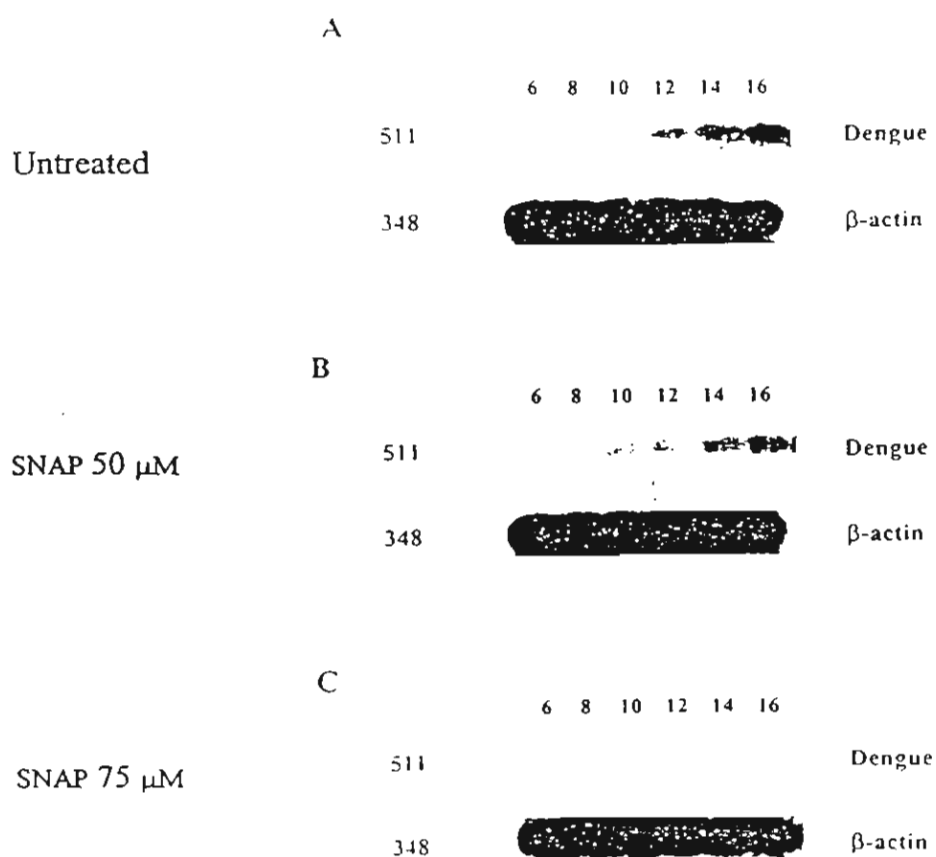


Figure 11 Expression of prM mRNA from DF infected N18 culture. By using RT-PCR, the level of prM gene expression from untreated cell (A) or treated with 50 μ M SNAP (B) or 75 μ M SNAP (C) were studied at 6, 8, 10, 12, 14 and 16 hours after infection (lanes 1 to 6, respectively). The amount of cDNA used at each time point was standardized to the level of the β -actin gene.

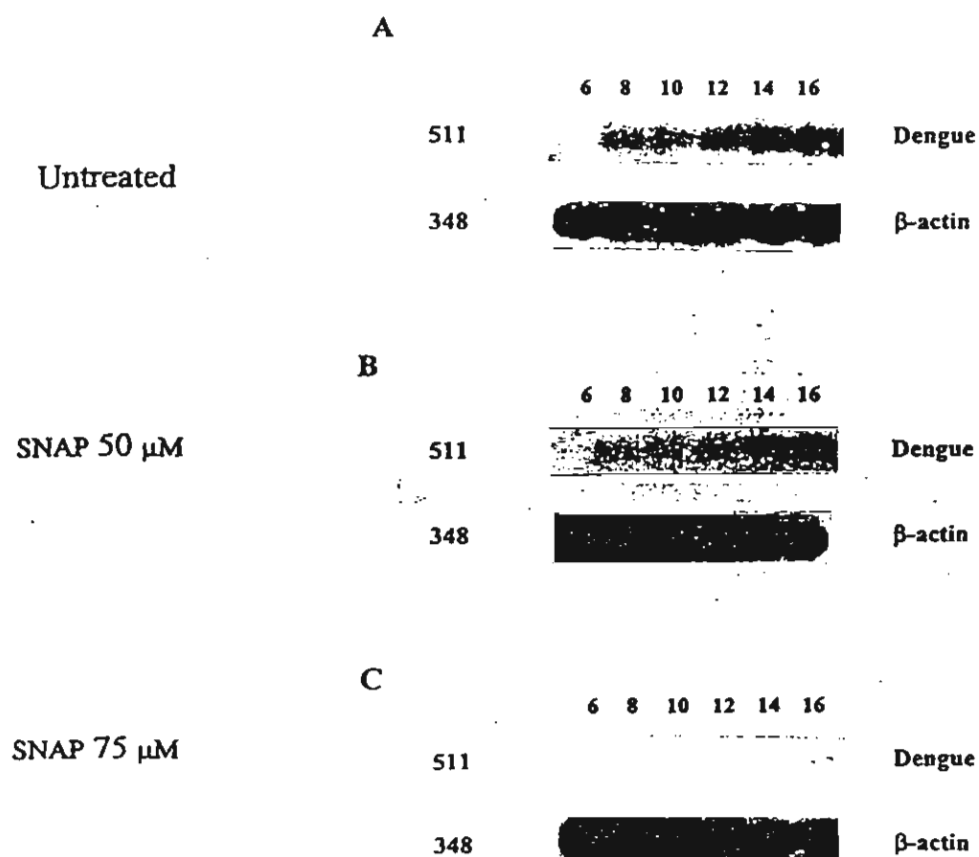


Figure 13 Expression of prM mRNA from DHF isolated N18 cultures. By using RT-PCR, the level of prM gene expression from untreated cell (A) or treated with 50 μ M SNAP (B) or 75 μ M SNAP (C) were studied at 6, 8, 10, 12, 14 and 16 hours after infection (lanes 1 to 6, respectively). The amount of cDNA used at each time point was standardized to the level of the β -actin gene

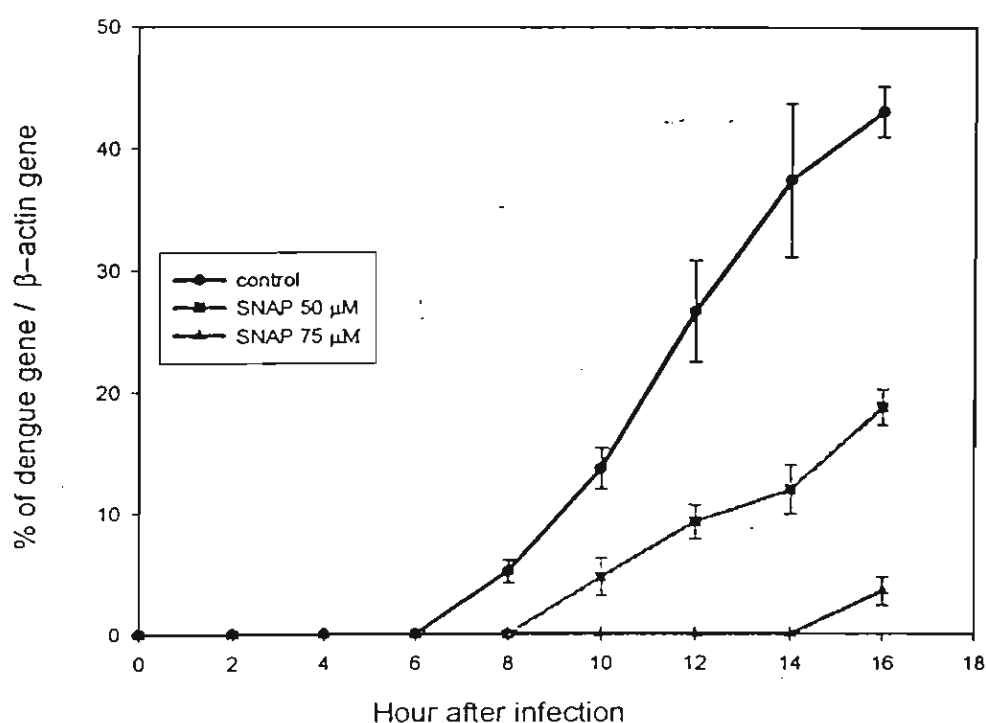


Figure 12 Densitometry analysis of prM genomic RNA synthesis from DF isolate infected N18 cell. The infected culture was untreated or treated with 50 or 75 μ M of SNAP. Cells were then harvested at 0, 2, 4, 6, 8, 10, 14 and 16 hours after infection and the levels of expression were studied by using RT-PCR and substantially analyzed by densitometry. The levels of expression were shown as percentages of dengue genomic RNA/ β -actin ratio. (n = 2; mean $\pm$ SD)

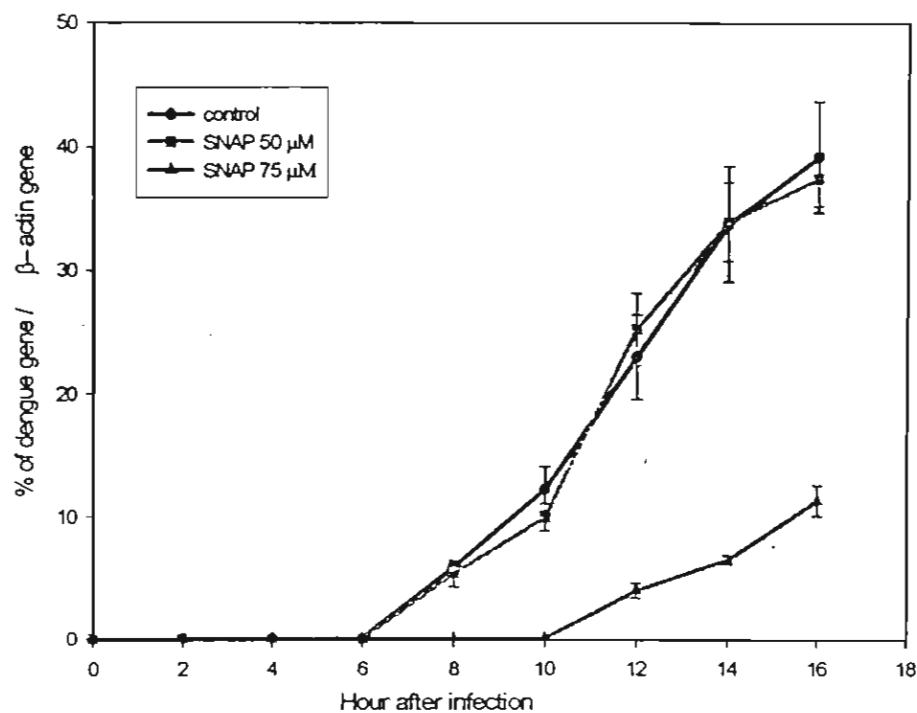


Figure 14 Densitometry analysis of prM genomic RNA synthesis from DHF isolate infected N18. The infected culture was untreated or treated with 50 or 75 μ M of SNAP. Cells were then harvested at 0, 2, 4, 6, 8, 10, 14 and 16 hours after infection and the levels of expression were studied by using RT-PCR and substantially analyzed by densitometry. The levels of expression were shown as percentages of dengue genomic RNA/ β -actin ratio. (n = 2; mean $\pm$ SD)

สัญญาเลขที่ BRG 4580019

โครงการ “การศึกษาบทบาทของภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ, ไนตริกออกไซด์, คอการเพิ่มจำนวนของ
ไวรัสไข้เลือดออกและพยาธิสภาพของโรค”

รายงานความก้าวหน้า

ระยะเวลาดำเนินการวิจัย
สิงหาคม 2546 – สิงหาคม 2547

นางสาว สุชธิดา อุบล และคณะ
ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

“งานวิจัยนี้ยังไม่เสร็จสมบูรณ์ โปรดอย่านำไปอ้างอิง”

สรุปรายงานความก้าวหน้าในรอบปีที่ 2

(Executive Summary)

วัตถุประสงค์

งานวิจัยในรายปีที่ 2 วางเป้าหมายเพื่อจะตอบคำถามต่อเนื่องจากผลการทดลองในรอบปีที่ 1 คือ ศึกษาถึงบทบาทของไนตริกออกไซด์ต่อการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสไข้เลือดออกในระดับโมเลกุล บทบาทของไนตริกออกไซด์คือ DF และ DHF isolates แตกต่างกันหรือไม่ และเริ่มต้นศึกษามบทบาทของไนตริกออกไซด์ต่อพยาธิสภาพในผู้ป่วย

สรุปการทดลองและผลการทดลอง

โครงการได้ทำการทดสอบและพบการกกดการเพิ่มจำนวนของไวรัสไข้เลือดออกอยู่ในขั้นตอนของการสร้าง viral genomic RNA จึงศึกษามบทบาทของไนตริกออกไซด์ต่อการทำงานของ RNA polymerase ในหลอดทดลองพบอนุมูลอิสระดังกล่าว suppress การทำงานของ viral RNA polymerase (NS5) จากการศึกษาบทบาทไนตริกออกไซด์คือ DF และ DHF isolates พบว่าไวรัสที่แยกจากผู้ป่วย DF susceptible คือ inhibitory effect ของไนตริกออกไซด์มากกว่า DHF isolates นอกจากนี้ได้เริ่มทำการศึกษาในระยะปีที่ 3 คือติดตามความสัมพันธ์ระหว่างอาการของโรค, ปริมาณไวรัสในกระแสเลือดและปริมาณไนตริกออกไซด์ในกระแสเลือด ยังหาข้อสรุปไม่ได้เนื่องจากเพิ่งเริ่มต้นดำเนินการ

รายงานผลการวิจัยที่ดำเนินการในปีที่ 2

วัตถุประสงค์

ในปีที่ 2 ทำการศึกษาบัพทของไนตริกออกไซด์เพื่อตอบคำถามดังต่อไปนี้

1. จากการศึกษาในปีแรกพบไนตริกออกไซด์ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสในหลอดทดลอง โดยขั้นตอนของการยับยั้งพบว่าอยู่ในขั้นตอนของ RNA synthesis จึงได้ตั้งคำถามคือว่า ไนตริกออกไซด์ยับยั้งการสร้าง RNA เนื่องมาจากอนุโมลิสารดังกล่าวยับยั้งการทำงานของ viral RNA polymerase ใช่หรือไม่
2. การศึกษาต่อเนื่องจากปีที่ 1 คือ ไวรัสที่แยกได้จากผู้ป่วย DF และ DHF จะตอบสนองต่อ inhibitory effect ของ ไนตริกออกไซด์เหมือนกันหรือแตกต่างกัน ซึ่งอาจนำมาใช้เป็น marker ในการค้นหา diversity ของไวรัสไข้เลือดออกในธรรมชาติ
3. เริ่มเก็บ specimens จากผู้ป่วย DF และ DHF และศึกษาลักษณะการติดเชื้อ เพื่อใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ของปริมาณไวรัส, ความรุนแรงของโรค, และปริมาณไนตริกออกไซด์

การดำเนินการวิจัยและผลการทดลอง

1. เพื่อจะตอบคำถามในข้อที่ 1: สมมติฐานของคำถามที่ 1 คือ ไนตริกออกไซด์ยับยั้งการสร้าง genomic RNA ของไวรัสไข้เลือดออก โดยกการทำงานของ viral RNA polymerase (NS5) ได้ทำการศึกษากการทำงานของ NS5 ในหลอดทดลองในสภาวะที่มีและไม่มีไนตริกออกไซด์ โดยการทดลองในครั้งนี้ใช้บัพทของไนตริกออกไซด์คือ NS3 (viral protease) เป็น negative control ในการทดสอบบัพทของไนตริกออกไซด์คือ NS5 activity ทำการทดสอบสองส่วนคือ ศึกษาบัพทของ NS5 โดยใช้ endogenous replicase complex และส่วนที่ 2 ใช้ purified NS5
 - 1.1 ศึกษาบัพทของไนตริกออกไซด์คือ NS5 และการสร้าง viral RNA โดยใช้ endogenous replicative complex โดยดำเนินการทดลองตามการศึกษาใน Virology 140, 68-79 (1985), Virology 157, 330-337 (1987) และ Arch. Virol 128, 111-121, 1993

ขั้นตอนการทดลองโดยสรุปคือ ทำการ infect เซลล์ด้วย DV2 (ไวรัสไข้เลือดออก serotype 2) เลี้ยงเซลล์ที่ติดเชื้อประมาณ 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นเก็บเซลล์ นำเซลล์ pellet ที่ได้ไป lyse และแยกเอาส่วนของ nuclei ทั้งไปเก็บส่วนของ cytoplasm มาใช้ทดสอบ ทั้งนี้เพราะ replicase complex ของ DV2 อยู่ใน cytoplasm แล้วจึงนำมาทดสอบ viral RNA polymerase โดยใช้ปฏิกิริยาในหลอดทดลองด้านล่าง

RNA –dependent RNA polymerase assay using endogenous RNA

Stock	Final concentration of reagent	50 μ l
500mM	50 mM Tris-HCl, pH8.0	5
100mM	10 mM magnesium acetate	
75mM	7.5 mM potassium acetate	
1.0mg/ml	60 μ g/ml AMD (sigma)	3
500mM	10 mM 2-mercaptoethanol	1
200mM	5 mM phosphoenolpyruvate	1.25

1231.35 unit/ml	3 units/ml Pyruvate kinase	0.2
40U/ μ l	40 units of RNAsin (Promega)	1
2.5 mM each	0.5 mM rA, C, U-TP	8
10 μ Ci/ μ l	10 μ Ci 32 P-GTP	1
	Nuclease-free water	

Making the master mix all reagent and aliquot to each tube 25 μ l/tube

	20 μ g Vero cell extract	
	SNAP at indicated concentration	

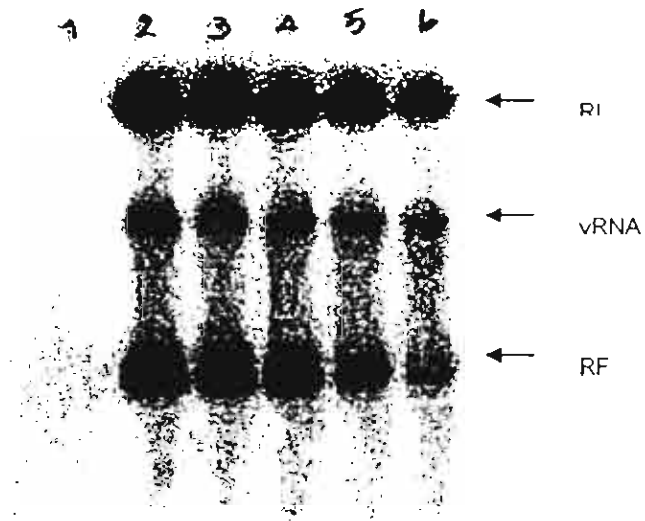
-Incubated at 37°C for 1 hr –

Stop reaction with 100 mM EDTA 5 μ l, then adding TNE-SDS (50 mM Tris-acetate, pH 7.6, 0.1 M Sodium acetate, 1 mM EDTA, 2% SDS) equal volume to disrupt the membrane. Extract viral RNA with RNeasy kit (Qiagen).

RNA extraction

1. Add TNE-2TSDS 55 μ l mix by pipette, stand for 10 min
2. Add RLT 350 μ l mix by pipette
3. Add (95-100%) EtOH 250 μ l mix by pipette
4. Apply 700 μ l to the column, spin 30s
5. Transfer to new tube and add RPE 500 μ l, spin 30s
6. Add RPE 500 μ l, spin 4 min
7. Transfer to new 1.5 ml-tube add nuclease-free water 50 μ l and spin 1 min (using centrifuge at 4°C)
8. Add water 50 μ l and spin 1 min
9. Add 3M sodium acetate 10 μ l and (95-100%) EtOH 275 μ l
10. Put on dry ice more than 30 min
11. Spin down at 4°C for 15 min, discard all supernatant (wipe out with Kimwipe tissue)
12. Resuspend with loading buffer (7M Urea, 1xTBE, 0.5% Bromophenol blue) 10 μ l.
13. Run on 7M Urea/3% PAGE gel at 150V for 2.0 hr.
14. Dry at 80°C for 1.30 hr and expose to X-ray film overnight.

ผลการทดลอง : พบว่าถ้าใช้ endogenous replicase complex (endogenous vRNA และ NS5) จะพบว่าไนตริกออกไซด์ ที่ความเข้มข้น 15 mM ขึ้นไป ก่อกำหนดการทำงานของ endogenous NS5 ได้ชัดเจน โดยดูจากปริมาณการสร้าง vRNA และ Replicative form ดังแสดงในรูปที่ 1 และ 2 ความเข้มข้นของ RF, RI และ vRNA ในแต่ละการทดลองได้นำไป scan ด้วย densitometer และทำการคำนวณความเข้มข้นและ plot เป็นกราฟ ดังแสดงในรูปที่ 3 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าไนตริก ไซค์ที่ผลิตจาก SNAP 15 mM ก่อกำหนดการสร้าง vRNA และ RF



Lane 1. negative control (uninfected cells)

Lane 2. positive control (infected cells in the absent of SNAP)

Lane 3. infected cells in the present of 0.1 uM SNAP

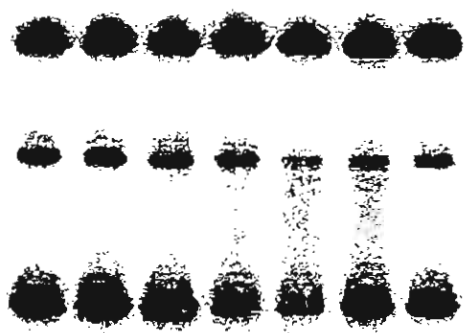
Lane 4. infected cells in the present of 5 uM SNAP

Lane 5. infected cells in the present of 10 uM SNAP

Lane 6 infected cells in the present of 18 uM SNAP

Fig. 1. RdRp assay using endogenous replicase complex

RdRp assay using endogenous vRNA (02-12-2004)



Lane	1	2	3	4	5	6	7	8
SNAP(mM)	-	1	5	10	15	15	-	N
NAP(mM)	-	-	-	-	-	-	15	N
DTT(mM)	-	-	-	-	-	15	-	N

N stands for negative control (uninfected cell)

Fig. 2 RdRp assay using endogenous replicase complex in the present of various concentrations of SNAP

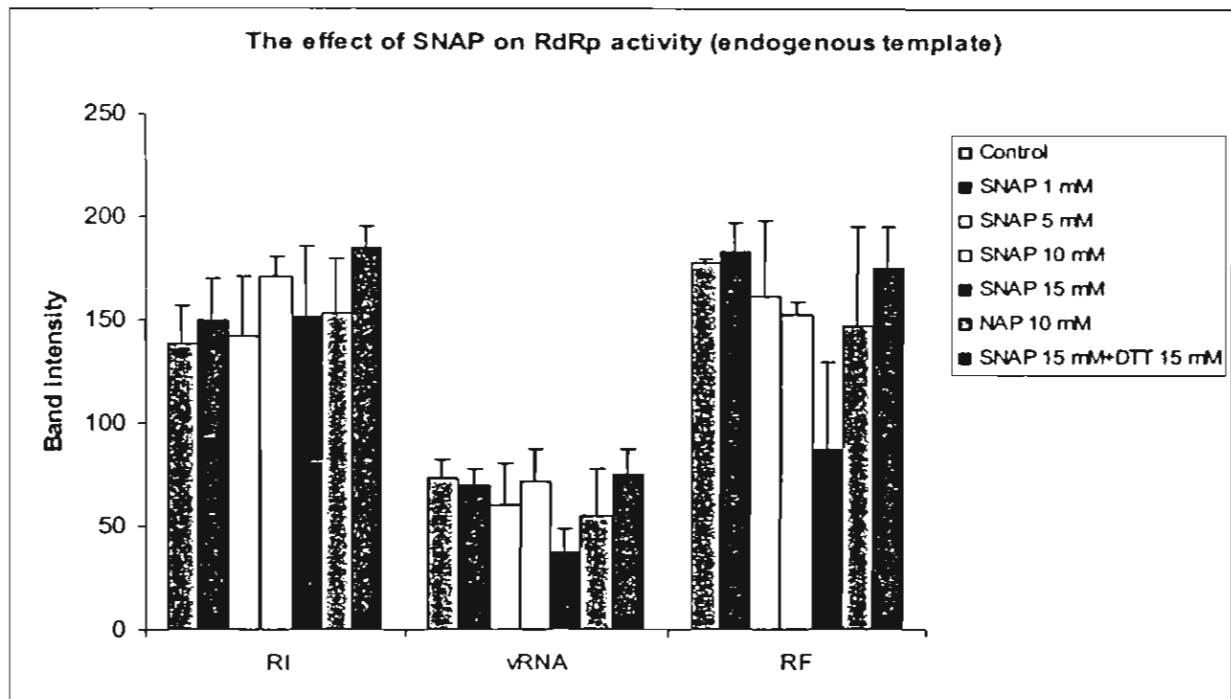


Fig.3 An inhibitory effect of SNAP on RdRp activity were plotted based on intensity of RI, vRNA and RF products

- 1.2 เนื่องจากการทดลองในข้อ 1.1 เป็นการทดสอบบทบาทของไนตริกออกไซด์คือ replicas complex ซึ่งเป็น mixture ของ cellular extract ผลการทดลองอาจจะไม่จำเพาะเจาะจง จึงได้ทำการทดลองในลักษณะเดียวกัน แต่ใช้ purified vRNA และ purified NS5 โดยผสมปฏิกิริยาในหลอดทดลองดังแสดงด้านล่างนี้

RdRp assay using purified NSS5

Prepare the reaction mixture in 0.5 ml microcentrifuge tube.

Reagent	Volume (μ l)
5X RdRp Buffer*	10
ATP, GTP, UTP (2.5 mM each)	10
CTP cold (125 μ M)	4
RNase inhibitor (20U)	0.5
32 P-CTP (10 μ Ci/ μ l)	1
RNase-Free water	Up to 50 μ l

-Making the master mix all reagent above and aliquot to each tube

RNA template (0.1 μ g/ μ l)	5
Enzyme NS5 (200 ng/3 μ l)	3
SNAP (113.51 mM)	As indicated
DTT (100 mM)	As indicated

Note; All reagents diluted with RNase-Free water

*5XRdRp Buffer (pH 8.0)

250 mM Tris-HCl

250 mM (NaCl)

25 mM $MgCl_2$

-Incubate at 25°C for 1.30 hr in PCR machine-

Samples include;

- Negative control: no exogenous RNA
- Positive control (without SNAP)

Extraction RNA product from RdRp reaction (Ambion, acid phenol/chloroform solution)

1. Add acid phenol/chloroform into each sample 50 μ l, Vortex briefly.
2. Spin down for 2 minutes by small centrifuge.
3. Take supernatant 40 μ l of each sample (Exactly the same amount for each sample) and transfer to 1.5 ml tube.

4. Add Yeast tRNA (10 $\mu\text{g/ml}$) 3-5 μl .
5. Add 5 μl of 3 M sodium acetate, pH 5.2.
6. Add 100% EtOH to 2.5 volumes (150-200 μl), mix in shield box several times.
7. Put sample in dry ice for more than 30 minutes to precipitate RNA.
8. Spin down at 4°C for 15 minutes.
9. Remove the ethanol and dry the pellet with kimwipe tissue.
10. Add 50 μl of RNase-Free water.
11. Spin through Bio-Rad P-30 column at 1680xg for 2 minutes (to remove unincorporated nucleotide).
12. Add 5 μl of 3 M NaOAc, pH 5.2 (1:3).
13. Add 100% EtOH 2.5 volumes (150-200 μl)
14. Put in dry ice for more than 30 minutes.

Pre run 1X MOPS/EDTA buffer at 75V, 30 minutes

15. Spin down the sample at 4°C for 15 minutes.
16. Remove the ethanol and dry with kimwipe tissue.
17. Dissolve RNA pellet with 2.2 μl buffer A and mix by pipette gently.
18. Add 4.8 μl F/F (2.2 M formaldehyde/50% formamide final concentration), mix by pipette.
19. Incubate at 70°C for 10 minutes in heat box.
20. Place on ice for 1 minute and add 1.5 μl loading dye.
21. Run on 1.5% agarose gel (Formaldehyde-agarose gel)

Run RNA gel

1. Load sample into each well.
2. Run at 100V for 3 hours or until the lead dye is $\frac{1}{4}$ of the end of gel.

Dry gel by vacuum pump

1. Place gel on filter paper, wrap with saran wrap.
2. Put in vacuum and turn on the machine.
3. Set to 80°C for 1.20 hours.
4. Wait until the machine cool down. Peel off the wrap.
5. Expose to X-ray film (hypersensitive film)
6. Develop the film.

ผลการทดลอง : ใน in vitro assay โดยใช้ purified RNA template และ purified NSS จะได้ RNA product ออกมา 2 รูปแบบคือ 1X และ 2X product โดยที่ 1x product จะเป็นผลของ initiation activity ของ RNA polymerase ในขณะที่ 2x product เป็นผลของ elongation activity จากผลการทดลองในรูปที่ 4 และ 5 พบว่าทั้ง elongation product และ initiation product จะถูก suppress เมื่อมีไนตริกออกไซด์ โดยการ suppress ใน 1x product จะขึ้นอยู่กับปริมาณของไน

คริกออกไซด์อย่างชัดเจน ส่วน 2x product จะพบการ suppress มาก เฉพาะเมื่อใช้ในคริกออกไซด์ที่ความเข้มข้น 15 mM ถ้าใช้น้อยกว่านี้จะไม่พบการ suppress ของ 2x product

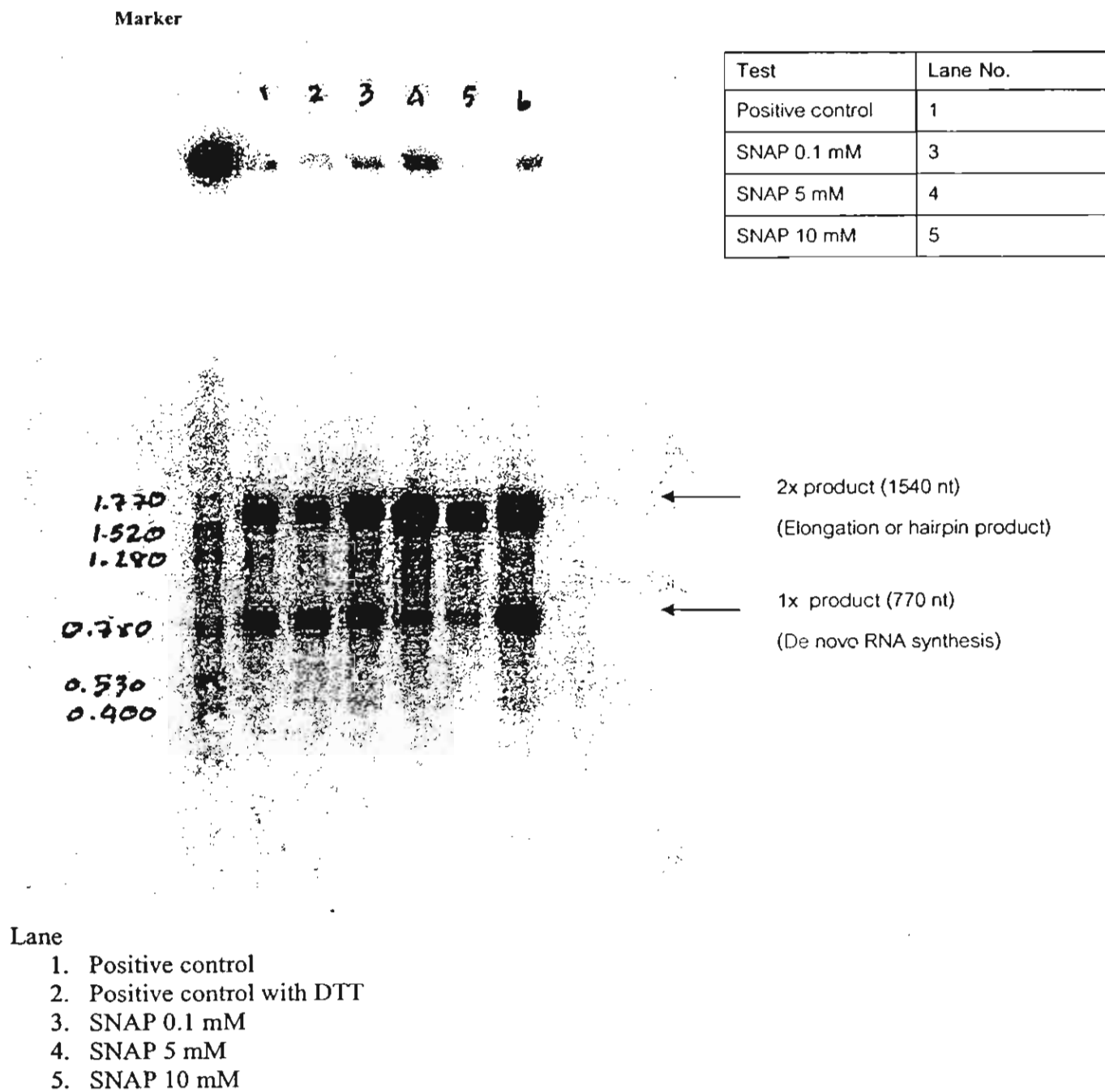


Fig.4 Gel electrophoresis of RdRp assay products using purified NS5 and template

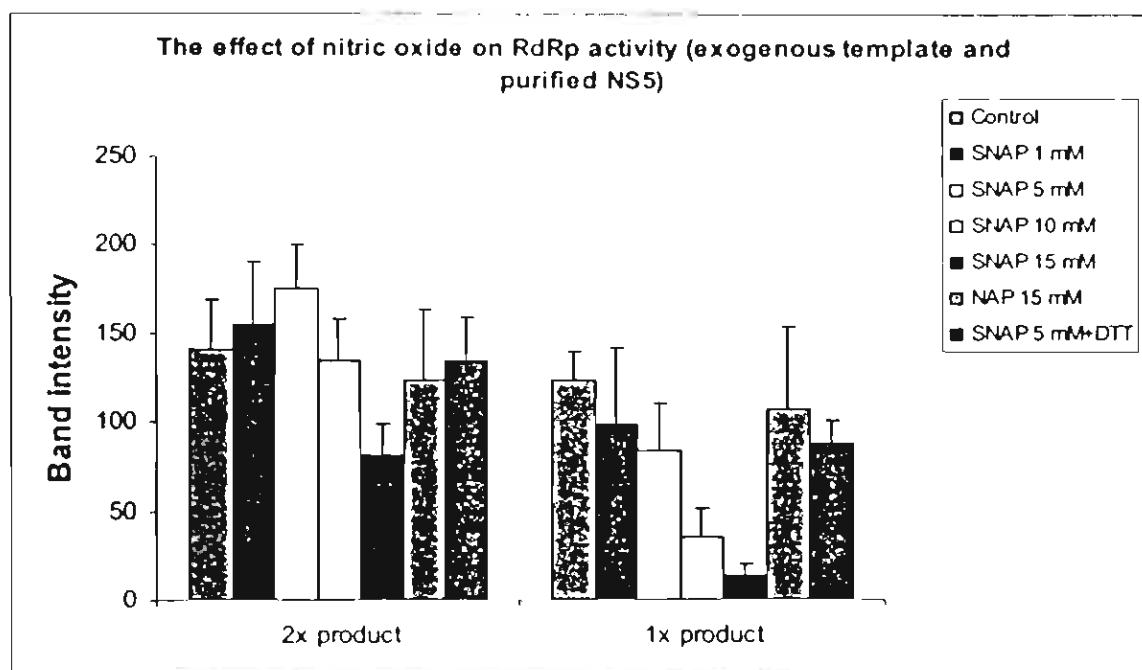
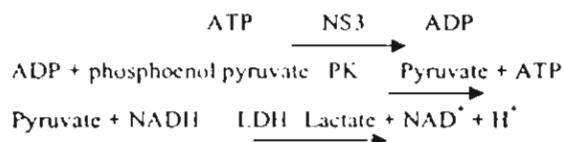


Fig. 5 Suppressive effect of SNAP on purified NS5. The intensity of products were plotted

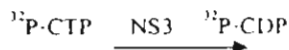
- 1.3 ในการศึกษานี้ได้ทดสอบบทบาทของไนตริกออกไซด์ต่อการทำงานของ NS3 (viral protease) เพื่อใช้เป็น Negative control: โดยใช้เทคนิค Enzyme-coupled NTPase assay และ NTPase assay by TLC

Enzyme-couple NTP assay (J. Virology 73 : 3108 (1999) หลักการของการทดลองคือ NS3 จะทำการ hydrolyse ATP ให้กลายเป็น ADP และต่อจากนั้น Pyruvate kinase จะใช้ ADP เพื่อจะสร้าง Pyruvate จาก phosphoenol pyruvate และท้ายสุด LDH จะเป็นตัวเปลี่ยน pyruvate และ NADH ให้ได้ NAD⁺ ดังปฏิกิริยาต่อไปนี้



นำปฏิกิริยานี้ไปวัด OD340 จะพบ oxidation ของ NADH ซึ่งเป็นการวัด activity ของ LDH การทดลองนี้เป็นการวัด NS3 activity ทางอ้อม ผลการทดลองดังแสดงในกราฟรูปที่ 6 กล่าวคือ ความเข้มข้นของ ไนตริกของไซด์จาก SNAP 0.1-1 mM ไม่มีบทบาทต่อ NS3 activity แต่ถ้าเพิ่มความเข้มข้นเป็น 2-5 mM พบว่า slope ของ curve เปลี่ยนไปเมื่อเทียบกับ slope ของ NS3 activity เมื่อไม่มี SNAP เนื่องจากปฏิกิริยานี้เกี่ยวข้องกับ enzyme หลายตัวคือ NS3, PK และ LDH ดังนั้น slope ที่เปลี่ยนไปอาจจะมาจากการทำงานของ PK หรือ LDH โดยไม่เกี่ยวข้องกับ NS3 ดังนั้นเพื่อเป็นการ confirm ว่า ไนตริกออกไซด์ไม่มีผลต่อ NS3 โดยตรง จึงทำการศึกษาโดยใช้ NTPase assay โดย TLC

NTPase assay by TLC : เป็นการวัดความสามารถของ NS3 ในการเปลี่ยน CTP ให้กลายเป็น CDP



นำ NS3 มา incubate ร่วมกับ SNAP ที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน (1, 5, 10 mM) ที่อุณหภูมิ 30°C ประมาณ 30 นาที แล้วจึงเติม 8 μl ของ Reaction mixture โดยใช้ total reaction mixture เป็น 25 μl

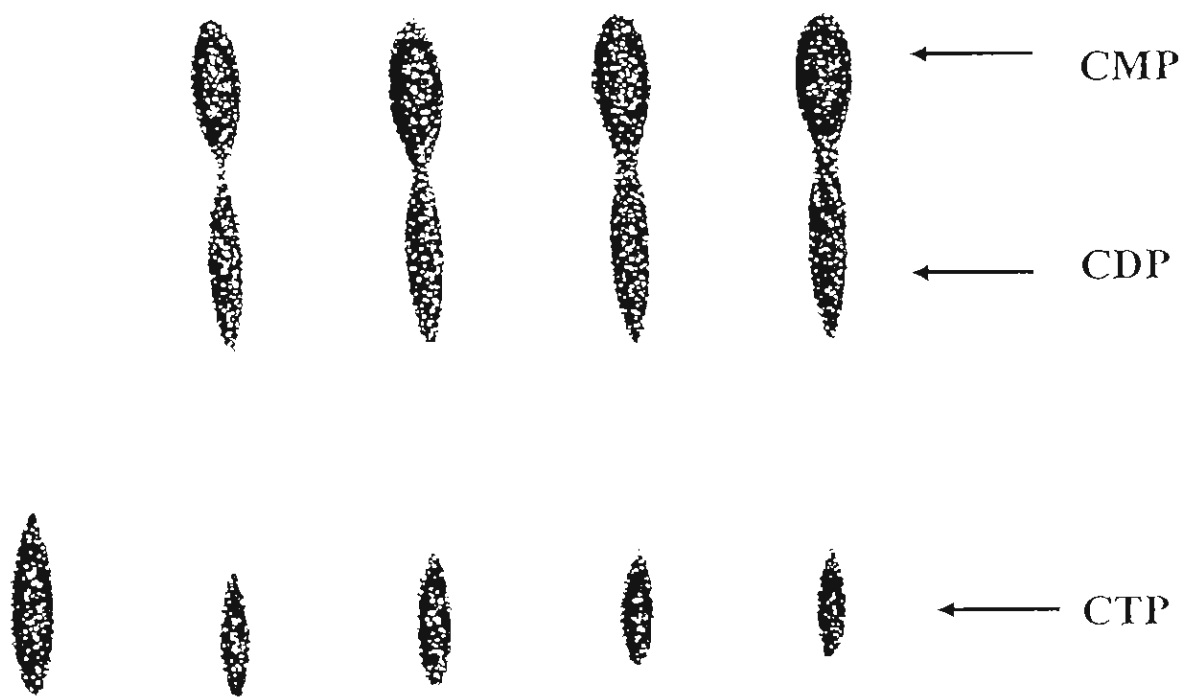
10X NTPase buffer	2.5 μl
1 mg/ml BSA	2.5 μl
³² P-CTP	0.5 μl
Water	Very depend on the volume of SNAP

Incubate อีกครั้งที่ 30°C ประมาณ 30 นาที นำ product ที่ได้ไป run TLC plate (Thin layer chromatography, CEI cellulose) แล้วจึงประกบกับแผ่น film ผลดังแสดงในรูปที่ 7

ผลการทดลอง : ไนตริกออกไซด์เมื่อทำปฏิกิริยาโดยตรงกับ NS3 ไม่มีผลต่อ hydrolysis activity ของ NS3

สรุปผลการศึกษาในการตอบคำถามข้อที่ 1 คือไนตริกออกไซด์มีบทบาทยับยั้งการสร้าง viral RNA โดยการทำงานของ viral RNA polymerase (NS5) และไม่มีบทบาทต่อการทำงานของ viral protease (NS3) ดังนั้นการที่พบไนตริกออกไซด์กีดขวางการสร้าง NS1 protein จากการทดลองในปีที่ 1 จึงเนื่องมาจากไนตริกออกไซด์กีดขวางการสร้าง NS1 gene จึงส่งผลให้การสร้างโปรตีนลดลงตามอัตราการสร้าง NS1 gene ที่ลดลง

Result

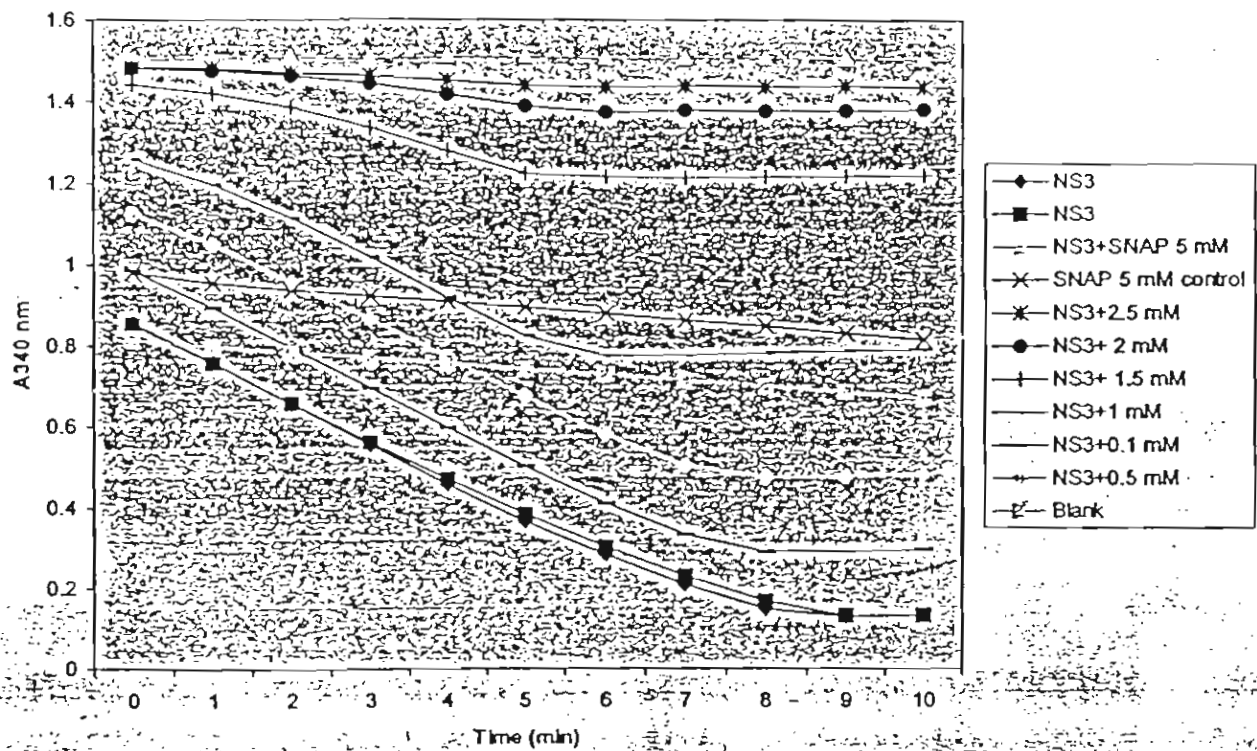


Control 0 mM SNAP 1 mM SNAP 5 mM SNAP 10 mM SNAP

7/2/2567 11:50 AM 11/2/2567 11:50 AM 11/2/2567 11:50 AM 11/2/2567 11:50 AM 11/2/2567 11:50 AM
CTP และ CDP

Result

Enzyme-couple NTPase assay

[illegible]

2. การศึกษาเพื่อตอบคำถามในข้อที่ 2 : ไวรัสที่แยกได้จากผู้ป่วย DF และ DHF ตอบสนองต่อ inhibitory effects ของไนคริกออกไซด์ เหมือนกันหรือไม่ ได้ทำการแยกเชื้อไวรัสจากคนไข้ DF 20 ราย และ DHF 20 ราย นำไวรัสจากคนไข้เหล่านี้มาเลี้ยงในเซลล์ N18 ในสภาพที่มีไนคริกออกไซด์ (SNAP 50 μ M และ 75 μ M) และติดตามปริมาณไวรัสที่ผลิออกในในน้ำเลี้ยงเซลล์ที่เวลาต่างๆ กัน ในรูปที่ 7 แสดงตัวอย่างของไวรัสที่แยกจากผู้ป่วย ซึ่งตอบสนองและไม่ตอบสนองต่อ inhibitory effect ของไนคริกออกไซด์กล่าวคือ รูปที่ 7-A ไวรัส ถูกยับยั้งการเพิ่มจำนวนถ้าใช้ SNAP 75 μ M แต่ถ้าใช้ SNAP 50 μ M จะไม่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนของไวรัส ในขณะที่รูป 7-B แสดงการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสอีก isolate หนึ่ง ทั้งในสภาพที่มี SNAP 50 μ M และ 75 μ M

จากการศึกษาบทบาทของ SNAP 50 μ M และ 75 μ M ต่อการเพิ่มจำนวนของไวรัส DF20 และ DHF 20 พบผลการทดสอบโดยสรุปในตารางที่ 1

Virus	n	% suppression	
		50 μ M	75 μ M
DF	20	70	100
DHF	20	50	100

ผลการทดลองพบว่าไวรัสที่แยกได้จากผู้ป่วย DF จะ susceptible ต่อ SNAP ที่ความเข้มข้น 50 μ M มากกว่าไวรัสที่แยกได้จากผู้ป่วย DHF ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นถึงความหลากหลายของไวรัสในธรรมชาติโดยใช้ไนคริกออกไซด์ marker และระดับของความ susceptible ที่แตกต่างกันนี้อาจจะเป็นอีกเหตุผลหนึ่งที่อธิบายว่าทำไม viral load ในผู้ป่วย DF จึงต่ำกว่าในผู้ป่วย DHF

3. การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง viral load, ความรุนแรงของโรคและปริมาณไนคริก ออกไซด์ โดยดำเนินการเก็บ specimens จากผู้ป่วยที่มารับการรักษาจากสถาบันสุขภาพเด็กมหาราชินี ภายใต้การควบคุมดูแลของ พ.ญ. ศิริเพ็ญ กัลยาณรุ่ง และคณะ โดยเลือกที่ส่งมาจะได้รับการแยกเป็น plasma และ PBMC ในส่วนของ PBMC จะใช้ในการศึกษาระดับของ cNOS gene expression ซึ่งจะดำเนินการในปีที่ 3 ในส่วนของ plasma ได้นำมาใช้ในการทดลองดังนี้

3.1 ศึกษาพยาธิสภาพว่าเป็นการติดเชื้อในลักษณะ primary หรือ secondary infection โดยใช้การหาปริมาณ antibody ต่อเชื้อ DEN 1-4 และ JEV โดยการใช้ HI test เลือกจากผู้ป่วยที่เก็บทั้ง 3 ครั้ง (วันแรกที่เข้ารับการรักษา, วันไข้ลด, 30 วันหลังไข้ลด) จะนำมาหาปริมาณ antibody ถ้าปริมาณ antibody ในครั้งที่ 1, 2 ค่ากว่า 1:10 ต่อ DEN 1-4 และ JEV จะนำ plasma นั้นไปทำ neutralization test ใน cell culture ถ้าพบว่า negative จะสรุปว่าคนไข้รายนั้นเป็น primary infection

3.2 การตรวจ serotype ของไวรัสก่อโรค เพื่อเป็นการจำแนกว่าผู้ป่วยรายนั้นๆ ติดเชื้อ DEN serotype ใด นำ plasma ไป inoculated ลงในเซลล์ C6/36 เลี้ยงไวรัสไปเป็นเวลา 7 วัน นำเซลล์ที่ติดเชื้อมาขย้อมด้วย monoclonal Ab ต่อ DEN2, 2, 3, 4 และ JEV ผลการทดลองดังแสดงในตารางคนไข้ 36 ราย พบว่า (ดังตารางที่แนบมา)

12 รายเป็น primary infection (8 DF and 4 DHF)

24รายเป็น secondary infection (9 DF and 15 DHF)

พบการติดเชื้อ DEN 1, 2, 3 แต่ไม่พบ DEN-4

3.3 นำ plasma มาหาปริมาณไนตริกออกไซด์ โดยดูจากค่า NO_2/NO_3 ใน plasma ซึ่งเป็น stable product ของไนตริกออกไซด์ ทำการตรวจปริมาณ NO_2/NO_3 โดย Griess Reagent โดยทำการเปลี่ยน $\text{NO}_2 \rightarrow \text{NO}_3$ และหาปริมาณ NO_2 ทั้งหมดใน plasma ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 8 พบว่าในการติดเชื้อแบบ primary infection ไม่ว่าจะเป็นการติดเชื้อแบบ DF หรือ DHF ปริมาณไนตริกออกไซด์ใน plasma ไม่แตกต่างกัน แต่จะพบความแตกต่างของระดับไนตริกออกไซด์ในคนไข้ secondary infection โดยพบว่าคนไข้ DHF มีปริมาณ NO_2/NO_3 ในเลือดต่ำกว่าคนไข้ DF ในช่วงที่มีอาการไข้ แต่ใน convalescent phase ผู้ป่วยเหล่านี้มีระดับ NO_2/NO_3 ไม่แตกต่างกัน

3.4 หาปริมาณ viral load ใน plasma โดย Tagman Real time -PCR หาปริมาณ genomic RNA ของไวรัสใน plasma โดยคำนวณออกมาเป็น copy number โดย standard copy number ได้รับจาก Dr. Houn, Walter Reed Army Institute of Research โดยคัดเลือกเฉพาะ specimens ที่เป็น secondary DHF มาหาปริมาณไวรัสในวันที่มีไข้ และวันที่หายจากอาการ (convalescent phase) ดังแสดงในรูปที่ 9 ผลการทดลองพบว่าปริมาณไวรัสในเลือดแปรผกผัน กับปริมาณไนตริกออกไซด์ในเลือด แต่อย่างไรก็ดีการทดลองในรูปที่ 8 และ 9 ยังคงดำเนินการทดลองต่อ เพื่อให้ปริมาณคนไข้มากขึ้น เพียงพอที่จะนำมาทดสอบความแตกต่างทางสถิติ

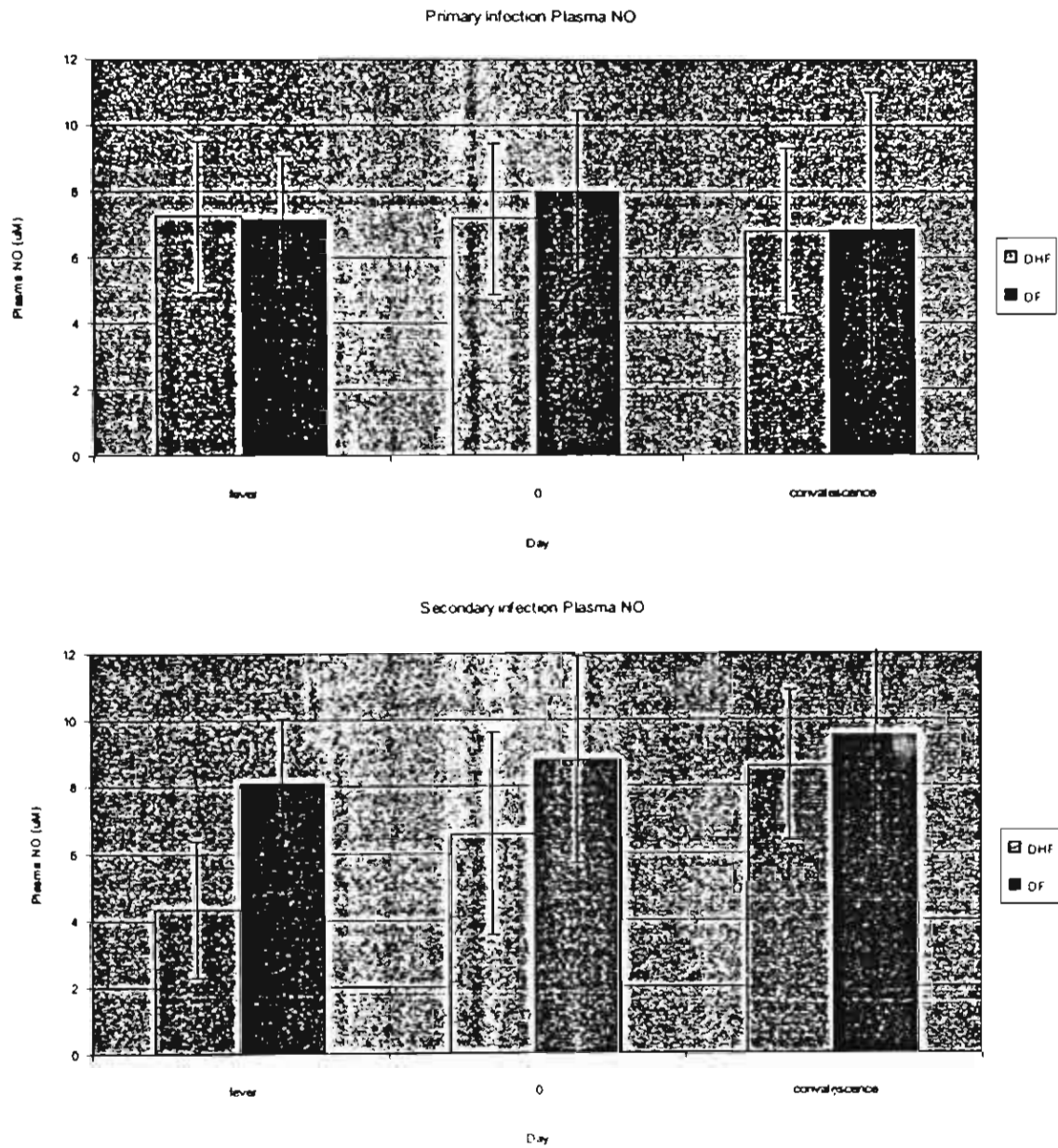


Fig. 8 Level of plasma NO₂/NO₃ in primary and secondary DF and DHF

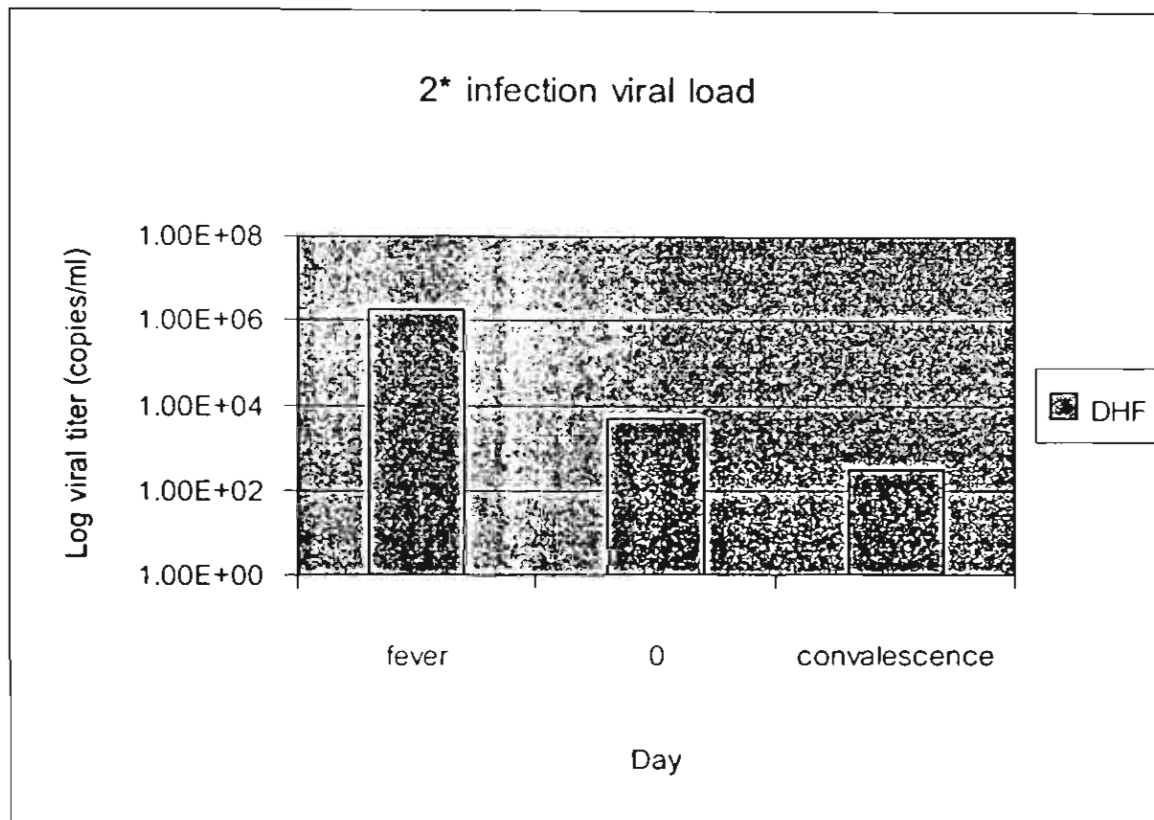


Fig. 9 Viral load in secondary DHF

สรุปผลการศึกษาในปีที่ 2

ผลการศึกษาข้างต้นสรุปได้ดังนี้

1. ในครีออกไซด์มีบทบาทยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสไข้เลือดออกในหลอดทดลอง โดยพบว่าการยับยั้งเกิดขึ้นในขบวนการสร้าง viral genome เนื่องมาจากในครีออกไซด์ยับยั้งการทำงานของ viral RNA polymerase
 2. ไวรัสไข้เลือดออกในธรรมชาติค่อนข้างอ่อนแอ ในครีออกไซด์แตกต่างกันโดยไวรัสที่ก่อให้เกิดอาการ DF จะ susceptible ต่อ ในครีออกไซด์มากกว่าไวรัส DHF
 3. คนไข้ในกลุ่ม primary infection ไม่ว่าจะมีอาการ DF หรือ DHF ไม่มีความแตกต่างในการผลิตในครีออกไซด์ แต่คนไข้ในกลุ่ม secondary infection ซึ่งมีพยาธิสภาพแบบ DHF จะผลิตในครีออกไซด์ต่ำกว่าคนไข้ในกลุ่มอื่นๆ โดยเฉพาะคนไข้ secondary infection ที่มีพยาธิสภาพเป็น DF ทำให้ตั้งสมมุติฐานว่า enhancing antibody อาจจะมีบทบาทต่อการยับยั้งการสร้างในครีออกไซด์ในผู้ป่วย secondary DHF
- งานที่จะดำเนินการศึกษาในปีที่ 3

1. เก็บ specimens จากคนไข้เพิ่มขึ้น และทำการศึกษาเหมือนข้อ 3.2, 3.3 และ 3.4 เพื่อให้ได้ปริมาณคนไข้มากพอที่จะทำการทดสอบทางสถิติ
 2. ศึกษาบทบาทของ enhancing antibody ต่อการแสดงออกของในครีออกไซด์ในระดับโมเลกุล
- กิจกรรมอื่นๆ ที่เกี่ยวข้อง
1. เสนอผลงานวิจัยเรื่อง Inhibition of Dengue Viral Replication by Mycophenolic acid and Ribavirin ในการประชุม Seventh International Symposium on Positive-Strand RNA virus (ดั่งเอกสารแนบ)
 2. เสนอผลงานวิจัยเรื่อง Differential suppression of dengue virus replication by nitric oxide ในที่ประชุม The 52nd Annual Meeting of the American Society of Tropical Medicine and Hygiene (ดั่งเอกสารแนบ)

สัญญาเลขที่ BRG 45 80019

โครงการ “การศึกษาบทบาทของภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ, ในกรณีของไวรัส, ต่อการเพิ่มจำนวนของไวรัส
ไข้เลือดออกและพยาธิสภาพของโรค”

รายงานความก้าวหน้าของโครงการในปีที่ 3

ระยะเวลาดำเนินการศึกษาวิจัย

กันยายน 2547 – กันยายน 2548

นางสาวสุรัชดา อุบล

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

รายงานวิจัยนี้ยังไม่เสร็จสมบูรณ์โปรดอย่านำไปอ้างอิง

สัญญาเลขที่ **BRG 45 80019**

โครงการ “การศึกษาบทบาทของภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ, ในคริกอกไซด์, ต่อการเพิ่มจำนวนของไวรัส
ไข้เลือดออกและพยาธิสภาพของโรค”

รายงานความก้าวหน้าของโครงการในรอบ 6 เดือน

รายงานในช่วงตั้งแต่ : วันที่ 16 สิงหาคม 2547 – 15 กุมภาพันธ์ 2548

หัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน : รองศาสตราจารย์ ดร. ศุภธิดา อุบล

หน่วยงาน : ภาควิชาจลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

1. การดำเนินงาน ☐ ได้ดำเนินงานตามแผนงานที่ได้วางไว้ทุกประการ
☐ ได้เปลี่ยนแปลงแผนงานที่ได้วางไว้ดังนี้คือ

2. สรุปผลการดำเนินงาน

วัตถุประสงค์ของการดำเนินงานในปีที่ 1 เพื่อตอบคำถามดังนี้

-nitric oxide จาก exogenous nitric oxide donor มีบทบาทต่อการเพิ่มจำนวนของไวรัสไข้เลือดออกที่แยกจากคนไข้หรือไม่

-ถ้า nitric oxide มีบทบาทต่อการเพิ่มจำนวน บทบาทนั้นเป็นไปในทิศทางที่ลดการเพิ่มจำนวนหรือส่งเสริมการเพิ่มจำนวน

-ไวรัสที่แยกจากผู้ป่วย DF และ DHF คอบสนองต่อ nitric oxide ในลักษณะเดียวกันหรือไม่

สรุปผลการศึกษาในปีที่ 1 พบว่า

-nitric oxide มีบทบาทในการลดการเพิ่มจำนวนของไวรัสไข้เลือดออกที่แยกจากผู้ป่วย

-บทบาทในการลดการเพิ่มจำนวนของ DF และ DHF isolates ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ถึงแม้ว่า DF จะค่อนข้างไวต่อบทบาทของ nitric oxide มากกว่า DHF isolates

-nitric oxide มีผลต่อการสร้าง RNA และ protein (E, NS) ของไวรัส แต่คาดว่าผลต่อการสร้างโปรตีนนั้นเนื่องมาจากการกีดขวางการสร้าง RNA จึงทำให้การสร้างโปรตีนลดลงด้วย

วัตถุประสงค์ของการดำเนินงานในปีที่ 2 เพื่อตอบคำถามดังนี้

-nitric oxide ขยับยั้งการสร้าง RNA เนื่องมาจากอนุมูลอิสระดังกล่าวขยับยั้งการทำงานของ viral RNA polymerase หรือไม่

-เก็บ specimens จากผู้ป่วย DF และ DHF และศึกษาลักษณะการติดเชื้อ เพื่อใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ของปริมาณไวรัส, ความรุนแรงของโรค, และปริมาณ nitric oxide

สรุปผลการศึกษานี้พบที่ 2 พบว่า

-ทดลองบทบาทของ nitric oxide ต่อการทำงานของ viral RNA polymerase โดยใช้ replicative complex ซึ่งอยู่ใน infected cell lysate พบว่า nitric oxide ขยับยั้งการทำงานของ viral RNA polymerase

-ทดสอบบทบาทของ nitric oxide ต่อการทำงานของ purified viral RNA polymerase (purified NS5) พบว่าขยับยั้งการทำงานของ NS5

จากการทดลองทั้งสองวิธีสนับสนุนซึ่งกันและกันว่า nitric oxide กดการทำงานของ RNA polymerase ของไวรัสให้เล็ดลอดส่งผลให้เกิดการขยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยง

-เก็บ specimens จากผู้ป่วยและศึกษาคุณสมบัติของ specimens เหล่านั้นพบว่าผู้ป่วยทั้ง DF และ DHF มีการติดเชื้อทั้งแบบ primary และ secondary infected

วัตถุประสงค์ในการศึกษาปีที่ 3 : วัตถุประสงค์หลัก 2 ข้อคือ

-ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณไนตริกออกไซด์, viral load พยาธิสภาพของโรค (DF หรือ DHF)

-ศึกษาปัจจัยที่เข้ามาเกี่ยวข้องกับปริมาณการสร้างไนตริกออกไซด์ในผู้ป่วย DHF และ DF

ขั้นตอนการดำเนินการวิจัย

เพื่อตอบคำถามวัตถุประสงค์ข้อที่ 1 การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง viral load ปริมาณไนตริกออกไซด์ และอาการของโรคโดยดำเนินการเก็บ specimens จากผู้ป่วยที่เข้ามารับการรักษาจากสถาบันสุขภาพเด็กมหาราชนิ ภายใต้การควบคุมดูแลของ พญ. ศิริเพ็ญ ถัลยานรุธ และคณะ โดยเลือดที่ส่งมาจะได้รับการแยกเป็น plasma และ PBMC ของ PBMC จะใช้ในการศึกษาระดับของ iNOS gene expression ในส่วนของ plasma จะนำมาหาปริมาณ NO₂/NO₃ และ viral load เป็นการทำการทดลองต่อจากปีที่ 2 เพื่อให้ปริมาณคนไข้มากพอที่จะทำการทดสอบค่าทางสถิติ

1. การศึกษาระดับการแสดงออกของ inducible nitric oxide gene โดยใช้เทคนิค RT-PCR : นำ PBMC จำนวนหนึ่งล้านเซลล์มาสกัด RNA โดยใช้ column chromatography (Nucleospin II, clontech) และนำ RNA ที่ได้มาเปลี่ยนให้เป็นสาย cDNA โดยใช้ oligo dT primer และ reverse transcriptase และนำ cDNA ที่ได้มาใช้ในขบวนการ polymerase chain reaction โดยใช้ primers ดังแสดงด้านล่าง

iNOS primers ชุดที่ 1 (J. Dermatol Sci 2002 Sep; 29(3):201-5)

Forward primer : 5'ACG-TGC-GTT-ACT-CCA-CCA-ACA-A-3'

Reverse primer : 5'CAT-AGC-GGA-TGA-GCT-GAG-CAT-T3'

iNOS primers ชุดที่ 2 (J.Dent. Res. 2002 Apr; 81(4):236-40)

Forward primer : 5'ATG-GAA-CAT-CCC-AAA-TAC-GA--3'

Reverse primer : 5'GTC-GTA-GAG-GAC-CAC-TTT-GT-3'

ผลการทดลอง ไม่ประสบผลสำเร็จในการ amplify iNOS โดย PCR อาจจะเนื่องมาจากว่าปริมาณ PBMC ที่ได้จากผู้ป่วยมีจำนวนน้อยมาก (ไม่เกินสามล้านเซลล์) จึงทำให้ปริมาณ RNA ของ iNOS gene ที่สกัดได้ต่ำมากๆ ส่งผลให้สูญหายระหว่างการสกัดหรือ การแสดงออกของ iNOS gene ใน monocyte ของผู้ป่วยไม่ sustain โดยเชื่อว่าไม่ได้เนื่องมาจากขั้นตอนการทดลองผิดพลาด ทั้งนี้เพราะได้ทดลอง PBMC จากคนปกติ แล้วกระตุ้นด้วย LPS ดังแสดงในรูปภาพที่ 1 เป็นการทดลองดูการแสดงออกของ iNOS gene ใน PBMC เมื่อกระตุ้นด้วย LPS ให้เป็น positive control ในกรณีนี้ใช้ PBMC จำนวน 10×10^6 cell สามารถตรวจสอบการแสดงออกของ iNOS gene ได้ชัดเจน ทั้งนี้เพราะสามารถใช้เซลล์จำนวนมากในการทดลอง แต่เมื่อเปลี่ยนมาใช้ PBMC ของผู้ป่วยเด็กซึ่งมีจำนวนไม่เกิน 3×10^6 cells ไม่ประสบผลสำเร็จ โดยได้ทำการทดลองกับ primer ทั้ง 2 ชุด จึงคาดว่าน่าจะมาจากจำนวนเซลล์เริ่มต้นต่ำเกินไป และเนื่องจากโครงการเจาะเลือดจากผู้ป่วยเด็กซึ่งจำนวนเลือดที่ได้จำกัด จึงไม่สามารถที่จะได้ปริมาณ PBMC มากกว่านี้จึงทำให้การติดตาม iNOS gene expression ใน PBMC ไม่สามารถดำเนินการได้ จึงจำเป็นที่จะต้องทำการหาปริมาณ nitric oxide ในรูปของ NO_2/NO_3 ใน plasma เท่านั้น

2. การหาปริมาณ NO_2/NO_3 ใน plasma : ทำการหาปริมาณ stable product ของไนตริกออกไซด์ หรือ NO_2/NO_3 โดยใช้ Griess reagent โดยทำการเปลี่ยน $\text{NO}_3 \rightarrow \text{NO}_2$ และหาปริมาณ NO_2 ทั้งหมดใน plasma โดยแบ่งกลุ่มผู้ป่วยเป็น primary และ secondary infection และแบ่งกลุ่มย่อยลงไปตามอาการของ dengue fever (DF) หรือ dengue hemorrhagic fever (DHF)

กลุ่มอาการ		จำนวนผู้ป่วย			NO_2/NO_3 (mean $\pm$ SD)		
		D1	D2	D3	D1	D2	D3
primary infection	DF	11	11	9	6.69 $\pm$ 1.84	8.17 $\pm$ 1.27	6.93 $\pm$ 4.95
	DHF	6	6	5	7.7 $\pm$ 2.08	7.79 $\pm$ 1.94	8.89 $\pm$ 2.89
Secondary	DF	20	18	18	7.99 $\pm$ 2.08	9.23 $\pm$ 2.29	10.85 $\pm$ 3.14
	DHF	23	22	18	4.15 $\pm$ 1.97	6.57 $\pm$ 2.51	9.15 $\pm$ 1.86

ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 1 ผู้ป่วยในกลุ่ม primary infection ที่มีอาการ DF และ DHF รวมทั้งผู้ป่วย DF ในกลุ่ม secondary infection จะมีระดับของ NO_2/NO_3 หรือปริมาณ plasma nitric oxide ก่อนข้างคงที่ในช่วง fever day, defervescent day และ convalescent day ในขณะที่ผู้ป่วยในกลุ่ม DHF ของ secondary infection จะพบปริมาณ nitric oxide ใน plasma ค่ำ ในช่วง fever day และเพิ่มสูงขึ้นในช่วง defervescence และ convalescence ในช่วง convalescence ผู้ป่วยในแต่ละกลุ่มมีปริมาณ nitric oxide ใน plasma ไม่แตกต่างกัน ในขณะที่ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจะพบในช่วง fever day กล่าวคือผู้ป่วยในกลุ่ม DHF-secondary infection มีปริมาณ nitric oxide ใน plasma ค่ำมากที่สุดเมื่อทำการทดสอบความแตกต่างทางสถิติเปรียบเทียบกับระดับ NO_2/NO_3 กลุ่ม DF และ DHF primary infection และ DF-secondary infection พบค่า $P \leq 0.002$

2. ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณไวรัสในกระแสเลือด (viral load) และปริมาณ nitric oxide ใน plasma : ปริมาณ genomic RNA ของไวรัสใน plasma โดยใช้ Real time RT-PCR โดยการสกัด RNA จาก plasma ในปริมาณ 100 μl โดยการใช้ Virus RNA extraction kit (Nucleospin) และนำ RNA ที่ได้ไปใช้เป็น template ในการทำ reverse transcription ตามวิธีการของ Tag Man Reverse Transcription kit cDNA ซึ่งเป็นผลจากการทำ reverse transcription จะนำมาใช้เป็น template สำหรับ PCR amplification โดยใช้ primers ที่จำเพาะสำหรับไวรัสไข้เลือดออกแต่ละ serotype และใช้ internal fluorogenic probe ตามวิธีการของ Dr. Houngh และคณะ (Houngh HH and et al J. Virol Methods 95:19-32, 2001) จำนวน copy number ของ genomic RNA ของไวรัสคำนวณจาก genomic copy standard ของไวรัสไข้เลือดออกแต่ละ serotype ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จาก Dr. Houngh HH., Walter Reed Army Institute of Research, USA

ผลการศึกษาความสัมพันธ์ของปริมาณ nitric oxide และ viral load ของผู้ป่วยแต่ละกลุ่มแสดงในรูปที่ 2 A-D พบความแตกต่างอย่างชัดเจนในกลุ่มของผู้ป่วย DHF-secondary infection กล่าวคือ ปริมาณ nitric oxide ในช่วง fever day แปรผกผันกับปริมาณ viral load และเมื่อพิจารณาค่าเฉลี่ยของ viral load ใน fever day จะพบว่าผู้ป่วยในกลุ่ม DHF-secondary infection มีปริมาณ viral load สูงกว่าผู้ป่วยในกลุ่ม primary infection และ DF-secondary infection ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก nitric oxide เป็นปัจจัย กลุ่มผู้ป่วย DHF-secondary infection จะพบความสัมพันธ์แบบผกผัน (reversed correlation) ระหว่างปริมาณ nitric oxide และ viral load ได้อย่างชัดเจน เมื่อเทียบกับผู้ป่วยในกลุ่มอื่นๆ ดังแสดงในรูปที่ 3 กล่าวคือในช่วง fever day และ defervescent day ปริมาณไนตริกออกไซด์ต่ำในขณะที่ปริมาณไวรัสสูง และในช่วง convalescent day ปริมาณไนตริกออกไซด์สูงปริมาณไวรัสลดลงแสดงให้เห็นว่าไนตริกออกไซด์เป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำหน้าที่ควบคุมปริมาณไวรัสในผู้ป่วย

สรุปผลการทดลองในช่วง 6 เดือนแรกของปีที่ 3

ศึกษาปริมาณ NO_2/NO_3 ใน plasma ของผู้ป่วยไข้เลือดออกจำนวน 4 กลุ่มคือ DF และ DHF ใน primary infection, DF และ DHF ใน secondary infection โดยแบ่งการศึกษาออกเป็นสามระยะคือ fever day, defervescent day และ convalescent day พบว่าในกลุ่มของ DHF-secondary infection ในช่วง fever day มีการสร้าง NO_2/NO_3 ค่ำสุด และปริมาณจะเพิ่มมากขึ้นเข้าสู่ระดับใกล้เคียงกับผู้ป่วยกลุ่มอื่นๆ ในช่วงหายไข้ (defervescence) และ 30 วัน หลังจากหายไข้ (convalescence) และเมื่อ

พิจารณาความสัมพันธ์ของปริมาณ nitric oxide ใน plasma และปริมาณไวรัสในกลุ่ม DHF-secondary infection พบว่าแปรผกผันกัน ทำให้ตั้งสมมุติฐานว่าน่าจะมีปัจจัยบางอย่างใน DHF-secondary infection ที่มีบทบาทในการกดการสร้าง nitric oxide และรวมถึง immune mediators ตัวอื่นๆ นักวิจัยทางด้านไวรัสใช้เลือดออกเชือกกันว่าผู้ป่วย DHF-secondary infection เป็นกลุ่มที่มี enhancing antibody และเป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้เกิดอาการของโรครุนแรง ดังนั้นโครงการวิจัยส่วนที่เหลือจึงต้องการจะพิสูจน์ว่า enhancing antibody มีบทบาทเป็นตัวกดการสร้าง nitric oxide ในผู้ป่วย DHF-secondary infection หรือไม่

งานที่จะดำเนินการศึกษาในช่วง 6 เดือนสุดท้าย

1. ตรวจหา enhancing antibody activity ใน acute และ convalescent sera ของผู้ป่วย DF และ DHF จำนวน 22 ราย
2. ศึกษาบทบาทของ enhancing antibody ในการสร้าง nitric oxide ใน human monocytic cell line ที่ได้รับเชื้อไวรัสไข้เลือดออก

กิจกรรมอื่นๆ ที่เกี่ยวข้อง

1. เสนอผลงานวิจัยจำนวน 3 เรื่องในที่ประชุม First Asian Regional Dengue Research Network Meeting ระหว่างวันที่ 18-20, October 2004, กรุงเทพฯ
 - 1.1 Takol Chareonsirisuthigul, Siriphen Kalayanaroj and Sukathida Ubol. Reverse correlation between viral load and plasma nitric oxide in secondary DHF patients.
 - 1.2 Takumpanya, R., Chareonsirisuthigul, T., Kalayanaroj, S., Charnsilpa, V., Mammen, P.M., Jr., Padsnanabhan, R. And Ubol, S., Nitric oxide radical : From an in vitro experiment to dengue patients.
 - 1.3 Rababert, J., Bhamrapavati, S., Wasi, C. And Ubol, S. Differential in cytokines/chemokine receptor genes expression in PBMC infected with virulent and attenuated clone of DEN-2 virus.
2. เสนอผลงานในที่ประชุม 53rd Annual Meeting of the American Society of Tropical Medicine and Hygiene, ระหว่างวันที่ 7-11, 2004, Folorida, USA

Sukathida Ubol, Ratee Takumpanya, R. Padmanabhan, Nitric oxide radical suppresses dengue virus RNA-dependent RNA polymerase activity.
3. คีพิมพ์บทความในวารสารวิชาการต่างประเทศ
 - 3.1 Weeravan Charnsilpa, Ratee Takumpanya, Timothy P. Endy, Mammen P. Mammen, Jr., Daniel H. Libraty and sukathiday Ubol. 2005. Nitric oxide radical suppresses replication of wild-type dengue-2 viruses in vitro. J. Med. Virol. (in press) คานเอกสารตอบรับที่แนบมา
 - 3.2 Ratee Takumpunya, Sukathida Ubol, Huo-Shu Houng, Craig E. Cameron, and R. Padmanabhan. Inhibition of Dengue viral replication by Mycophenolic acid and Ribavirin submitted to Virology today.

- 3.3 Takhampunya, R., Padmanabhan, R., Houng, H.S., and Ubol S.
A molecular mechanism of dengue viral replication suppression
by nitric oxide radical. Manuscript in preparation.

ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัยในช่วง 6 เดือนสุดท้าย

เพื่อตอบคำถามข้อที่ 1 คือ ตรวจหา enhancing antibody activity ใน acute และ convalescent sera ของผู้ป่วย DF และ DHF โครงการได้คัดเลือกผู้ป่วย DF จำนวน 8 ราย และผู้ป่วย DHF จำนวน 8 ราย ขั้นตอนในการศึกษาคือ การทดสอบ enhancing activity ใน sera ผู้ป่วยโดยใช้ undiluted sera ทั้งนี้เนื่องจาก enhancing phenomenon ที่พบในผู้ป่วยนั้นเกิดในสภาวะที่ sera ไม่ได้รับการเจือจาง ดังนั้นโครงการจึงทำการทดสอบ enhancing activity โดยไม่มีการเจือจาง sera ตามขั้นตอนดังนี้คือ

การตรวจหา enhancing activity ใน sera ผู้ป่วย โดยใช้ THP-1 cells (human monocyte cells)

1. นำ sera ของผู้ป่วยไปทำการ inactivate ที่ 56°C 30 นาที
2. ผสม 100 μl ของ sera ร่วมกับ 100 μl ของ 10^6 PFU/ml of DV-2 16681 แล้วนำไป incubated ที่ 4°C เป็นเวลา 30 นาที โดยใช้ D2-16681 ผสมกับ non-dengue immune sera เป็น negative control
3. ภายหลังจาก incubate นำส่วนผสมของ sera และไวรัสไป inoculate ลงบน THP-1 โดยใช้ปริมาณไวรัสเริ่มต้นคือจำนวนเซลล์เท่ากับ 0.1 PFU
4. incubate เซลล์และ Ab-DV-16681 ที่ 37°C เป็นเวลา 2 hr และล้างส่วนของไวรัสที่ไม่ได้เกาะกับเซลล์ออกโดยใช้ PBS
5. เติมน้ำ media และ incubated ที่ 37°C
6. เก็บ supernate ทุก 24 ชม. เป็นเวลา 5 วัน และหาปริมาณไวรัสใน supernate โดยตรวจหาจำนวน RNA copy number ด้วยเทคนิค real-time RT-PCR

ผลการทดลอง

ในการทดลองนี้ได้หา enhancing activity ในผู้ป่วยที่ได้รับเชื้อ DV-1 และ DV-2 ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4, 5 กล่าวคือ acute sera ที่ได้รับจากผู้ป่วยโดยไม่ทำการเจือจางมี enhancing activity ในขณะที่ convalescent sera ซึ่งไม่ได้รับการเจือจางแสดง neutralizing activity พบทั้งในผู้ป่วยที่ได้รับ DV-1 และ DV-2 แสดงให้เห็นว่าในขณะที่เกิด acute infection ในผู้ป่วย secondary DHF ผู้ป่วยเหล่านั้นมี enhancing antibody อยู่ในร่างกาย แต่อย่างไรก็ดี การทดลองนี้ศึกษาในผู้ป่วยกลุ่มละ 8 ราย เท่านั้น ถ้าศึกษาในประชากรที่มากกว่านี้ข้อมูลอาจจะเหมือนเดิมหรือมีการเปลี่ยนแปลง แต่อย่างไรก็ดี ข้อมูลเบื้องต้นนี้แสดงให้เห็นว่า acute sera ของผู้ป่วย secondary DHF มี enhancing activity ทางโครงการจึงดำเนินการศึกษาค้นคว้าเพื่อจะตอบคำถามที่ 2 คือ enhancing antibody มีบทบาทในการสร้างในครีโอกไกต์ใน human monocytic cells ที่ได้รับเชื้อไวรัสไข้เลือดออกอย่างไร

วิธีการวิจัย

ในการทดลองใช้ convalescent sera จากผู้ป่วย DHF จากการติดเชื้อ DV-3 นำมาทำให้เจือจางที่ 1:10000 เพื่อใช้เป็น enhancing antibody ในการทดลอง การที่เลือกใช้ antibody จากผู้ป่วยดังกล่าวเพราะได้ทำการทดสอบ antibody นี้ใน PBMC และพบว่า antibody นี้ เมื่อนำไปเจือจางที่ 1:10000 – 1:100000 จะให้ enhancing activity ได้ชัดเจนต่อการเพิ่มจำนวนของ DV-2

การศึกษานำมาของ enhancing antibody ต่อการสร้างในครีโอกไกต์ใน THP-1 ที่ได้รับเชื้อ DV-2 (DV-2-ADE infection)

ผสม 100 μl ของ 1:10000 hyperimmune serum จากผู้ป่วย DV-3 ผสมกับ 100 μl ของ 10^6 PFU/ml ของ DV-2 นำไป incubate ที่ 4°C 30 นาที แล้วจึง inoculate ส่วนผสมของ Ab-DV-2 ลงไป

บน monolayer culture ของ THP-1 โดยให้ปริมาณไวรัสเริ่มต้นต่อปริมาณ THP-1 เซลล์เท่ากับ 0.1 PFU/cells incubate ที่ 37°C ประมาณ 2 ชม. ล้างไวรัสส่วนที่ไม่เกาะกับเซลล์ออกแล้วจึงเติม media ลงไป นำ infected THP-1 ไปเลี้ยงในตู้บ่ม 37°C และเก็บ supernate รวมทั้งเซลล์เพื่อการศึกษาปริมาณไวรัส ใน supernate โดยการหาจำนวน RNA ด้วยวิธี real-time RT-PCR, หาปริมาณ IL-10, IL-12 และ INF- γ รวมทั้งการแสดงออกของ IRF-1 gene และการ activate STAT-1 ซึ่งเป็น transcription factor ของ iNOS gene

การศึกษาปริมาณ RNA ของ DV-2 โดย real-time RT-PCR

ดังที่นำเสนอในรายงานการศึกษารอบ 6 เดือนแรกของปีที่ 3

การศึกษาปริมาณ IL-10, IL-12 และ IFN- γ โดย ELISA

ในการศึกษานี้ใช้ ELISA kit จากบริษัท Quantikine ELISA kit (R&D system, Inc) ขั้นตอนในการทดลองคือ เติม 200 μ l ของ samples และ standard ลงในแต่ละหลุมที่มี polyclonal antibody ต่อ cytokine แต่ละชนิดหรืออยู่ แล้ว incubate ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 2 ชม. ล้างด้วย washing buffer 2 ครั้ง แล้วจึงเติม 200 μ l ของ polyclonal antibody ต่อ cytokine หรือ secondary antibody ซึ่งมีเอ็นไซม์หรืออยู่ นำไป incubate ประมาณ 2 ชม ที่อุณหภูมิห้อง ล้างเพื่อกำจัด unbound secondary antibody หลังจากนั้นจึงเติม substrate ปริมาณของ cytokine แต่ละชนิดขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสีที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาของเอ็นไซม์และ substrate คำนวณความเข้มข้นโดยใช้เทียบกับความเข้มข้นของ standard ในการทดลอง

การศึกษาการแสดงออกของ IL-10 และ IRF-1 gene โดยการใช้ RT-PCR

นำเซลล์ที่ได้จาก D2-ADE infection ในช่วงเวลาต่างๆ กันมาแยก RNA โดยใช้ TRIZOL (invitrogen, CA, USA) นำ RNA ที่ได้ไปเปลี่ยนเป็น cDNA โดยขบวนการ reverse transcription และนำ cDNA นั้นไปเพิ่มปริมาณโดย PCR โดยใช้ specific primers ดังต่อไปนี้

IL-10 : sense 5' GTG GAG CAG GTG AAG AAT GCC 3'
Anti-sense 5' AGC TAT CCC AGA GCC CCA GAT 3'

IRF-1: sense 5' TTC CCT CTT CCA CTC GGA GT 3'
Anti-sense 5' GAT ATC TGG CAG GGA GTT CA 3'

β -actin: sense 5' TGG AAT CCT GTG GCA TCC ATG AAA C 3'
anti-sense 5' TAA AAC GCA GCT CAG TAA CAG TCC G 3'

คำนวณปริมาณการแสดงออกของ gene แต่ละชนิด โดยเปรียบเทียบปริมาณ PCR product แต่ละ gene กับปริมาณ PCR product ของ actin gene

การศึกษาการกระตุ้น STAT-1 โดยการใช้เทคนิค immunoblotting

นำเซลล์ lysate จาก D2-ADE infection และ D2-infection มาแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้า (electrophoresis) แล้วจึง transfer โปรตีนลงบนแผ่นเมมเบรน และทำการย้อมแผ่นเมมเบรนนั้นด้วย antibody ซึ่ง specific ต่อ phosphorylated STAT-1 หรือ active form ของ STAT-1 และคำนวณ

ปริมาณการกระตุ้น STAT-1 โดยดูจากความเข้มของ band ที่เกิดขึ้นที่เวลาต่างๆ กันภายหลังการได้รับเชื้อ เปรียบเทียบกับความเข้มของ band ของ house keeping protein หรือ actin โดยคำนวณออกมาเป็นร้อยละ ของอัตราส่วน STAT-1/actin

ผลการทดลอง

1. **Enhancing antibody** ยับยั้งการสร้างในครีออกไซด์ จากการที่ infect เซลล์ THP-1 ในสภาวะที่มี antibody (D2-ADE infection) และในสภาวะที่ไม่มี antibody (D2- infection) แล้วติดตามปริมาณไวรัสที่สร้างใน supernate รวมทั้งหาปริมาณในครีออกไซด์ ใน supernate พบว่าการติดเชื้อแบบ D2-ADE infection ให้ปริมาณไวรัสที่สูงกว่าการติดเชื้อแบบ D2-infection ดังแสดงในรูปที่ 6 แสดงว่าการติดเชื้อในสภาวะที่มี enhancing antibody จะเกิดขบวนการสนับสนุนการเพิ่มจำนวนของไวรัส ในขณะที่ปริมาณการสร้างในครีออกไซด์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 7) และการลดลงของในครีออกไซด์นี้ไม่ใช่เนื่องมาจากปริมาณไวรัสที่เพิ่มขึ้น ทั้งนี้เพราะทางโครงการได้ทดลอง D2-infection โดยใช้ไวรัสในปริมาณต่างๆ กันคือ MOI 0.1, 1.0 และ 10 ที่ MOI 10.0 ปริมาณไวรัสที่ผลิตจากเซลล์นั้นสูงกว่า D2-ADE infection โดยที่ปริมาณการสร้างในครีออกไซด์ไม่แตกต่าง (รูปที่ 8) แสดงให้เห็นว่าการกีดการสร้างในครีออกไซด์ใน D2-ADE infection เป็นผลมาจากการทำงานของ enhancing antibody

สรุปผลการทดลองคือ การติดเชื้อในสภาวะที่มี enhancing antibody (D2-ADE infection) แอนติบอดีดังกล่าวทำให้ไวรัสเพิ่มจำนวนได้มากกว่าปกติ (D2-infection) และการสร้างในครีออกไซด์จากเซลล์ที่ติดเชื้อต่ำกว่าปกติ แสดงให้เห็นว่า enhancing antibody อาจจะส่งเสริมการเพิ่มจำนวนของไวรัสโดยยับยั้ง anti-viral mechanism เช่น ยับยั้งการสร้างอนุภาคนิวเคลียสหรือในครีออกไซด์ ซึ่งทางโครงการพบว่า อนุภาคนิวเคลียสสามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสให้เล็ดลอดได้เป็นอย่างดี โดยการนำงานของในครีออกไซด์นั้นออกฤทธิ์ที่ NS5 หรือ RNA polymerase ของไวรัสให้เล็ดลอด (ผลการศึกษาก่อนปี 1 และ ปีที่ 2) และได้ทำการตีพิมพ์บางส่วนลงใน J. Med. Virology 2005, 77:89-95

2. การศึกษากลไกที่ enhancing antibody ยับยั้ง anti-viral mechanism ส่งผลให้ไวรัสเพิ่มจำนวนได้ดีกว่าปกติ

จากการศึกษาของนักวิจัยกลุ่มอื่นๆ พบว่า IL-10 เป็น cytokine ซึ่งยับยั้งการสร้างในครีออกไซด์ใน activated macrophage ในขณะที่ cytokine IL-12 และ IFN- γ ส่งเสริมให้ activated macrophage สร้างในครีออกไซด์เพิ่มขึ้น ดังนั้นโครงการวิจัยจึงทำการศึกษาก่อนปี 1, IL-10, IL-12 และ IFN- γ ใน THP-1 cells ที่ได้รับเชื้อไวรัสในลักษณะ D2-ADE infection เปรียบเทียบกับ D2-infection

การศึกษาก่อนปี 1 ปริมาณการสร้าง IL-10 ใน supernate โดย ELISA และการแสดงออกของ IL-10 gene โดย RT-PCR ดังแสดงในรูปที่ 9 การติดเชื้อแบบ D2-ADE infection ส่งเสริมการแสดงออกของ IL-10 gene และการสร้าง IL-10 ใน supernate อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับ D2-infection

การศึกษาก่อนปี 2 ปริมาณ IL-12 และ IFN- γ ใน supernate ของ D2-ADE infection และ D2-infection โดย ELISA ดังแสดงในรูปที่ 10 พบว่า D2-ADE infection จะกีดการสร้าง IL-12 และ IFN- γ อย่างมีนัยสำคัญ

สรุปผลการทดลอง แสดงให้เห็นว่า enhancing antibody ส่งเสริมการสร้าง cytokine (IL-10) ซึ่งยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ และยับยั้งการสร้าง IL-12 และ IFN- γ ซึ่งเป็น cytokine ในกลุ่มที่ส่งเสริมการผลิตไนตริกออกไซด์

เพื่อทำการศึกษายบทบาทของ enhancing antibody ต่อการยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ในระดับโมเลกุล ทางโครงการจึงทำการศึกษากลไกของ enhancing antibody คือการกระตุ้น STAT-1 และ IRF-1 ทั้งสองตัวนี้ทำหน้าที่เป็น transcription factor ของ iNOS gene กล่าวคือ เมื่อได้รับสัญญาณจากไซโตพลาสซึม STAT-1 จะถูกกระตุ้นให้กลายเป็น activated STAT-1 หรือ phosphorylated STAT-1 ซึ่งจะทำการเร่งการแสดงออกของ IRF-1 gene โปรตีนที่ได้ออก IRF-1 gene (IRF-1) จะจับกับ regulatory domain ของ iNOS gene และสร้าง iNOS หรือ inducible nitric oxide synthase ซึ่งมีเอ็นไซม์ที่ทำหน้าที่ catalyst การสร้างไนตริกออกไซด์จาก L-arginine ผลลัพธ์คือมีการสร้างไนตริกออกไซด์เพิ่มมากขึ้น

โครงการจึงทำการศึกษาเพื่อจะดูว่าการติดเชื้อในลักษณะ D2-ADE infection มีผลต่อการกระตุ้น STAT-1 หรือการแสดงออกของ IRF-1 gene อย่างไร โดยเปรียบเทียบปริมาณ phosphorylated STAT-1 ใน THP-1 ที่ได้รับเชื้อลักษณะ D2-ADE infection และ D2-infection ดังแสดงในรูปที่ 11 ศึกษา kinetics ของการกระตุ้น STAT-1 ที่เวลาต่างๆ ภายหลังจากได้รับเชื้อ พบว่าภายใน 24 ชม หลังการติดเชื้อแบบ D2-infection พบการกระตุ้น STAT-1 อย่างมหาศาล ในขณะที่การติดเชื้อแบบ D2-ADE infection การกระตุ้น STAT-1 กล่าวคือ แทบจะไม่พบ phosphorylated STAT-1 เลย ผลการทดลองแสดงว่า enhancing antibody กดการทำงานของ STAT-1

บทบาทของ enhancing antibody คือการแสดงออกของ IRF-1 gene การศึกษาการแสดงออกของ IRF-1 gene ในช่วงเวลาต่างๆ กัน เปรียบเทียบระหว่าง D2-ADE infection และ D2-infection พบว่าการติดเชื้อในสภาวะที่มี enhancing antibody การแสดงออกของ IRF-1 gene ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ดังแสดงในรูปที่ 12

สรุปผลการวิจัยในช่วง 6 เดือนหลังของปีที่ 3

โครงการวิจัยพบว่าผู้ป่วย secondary DHF มีปริมาณไวรัสในกระแสโลหิตสูงกว่าผู้ป่วยในกลุ่มอื่น และสาเหตุหนึ่งก็เนื่องมาจากปริมาณไนตริกออกไซด์ซึ่งผู้ป่วย secondary DHF มีน้อยกว่าผู้ป่วยในกลุ่มอื่นๆ (DF และ primary DHF) อย่างมีนัยสำคัญ กลไกที่ทำให้ปริมาณไนตริกออกไซด์ในผู้ป่วย secondary DHF ต่ำ เนื่องมาจากการทำงานของ enhancing antibody จากการศึกษาโครงการพบว่า การติดเชื้อไวรัสเด็งกีในสภาวะที่มี enhancing antibody แอนติบอดีดังกล่าวจะยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ โดยกลไกการยับยั้งผ่านขบวนการส่งเสริมการสร้าง IL-10 และการกดการสร้าง IL-12, IFN- γ ซึ่งการเพิ่มปริมาณของ IL-10 นั้น ทำให้ IL-10 จับกับ receptor บนผิวเซลล์และส่งผลให้มีการยับยั้งการ activate STAT-1 และ IRF-1 ซึ่งเป็น transcription factor ของ iNOS gene ส่งผลให้ไม่มีการแสดงออกของ iNOS gene จึงไม่มีการสร้างไนตริกออกไซด์

กิจกรรมอื่นๆ ที่เกี่ยวข้อง

1. เสนอผลงานในที่ประชุมนานาชาติในลักษณะ Oral presentation เรื่อง Dengue virus enhancing antibody suppresses anti-viral radical production via an inhibition of iNOS gene

transcription factor, STAT-1 ในการประชุม The 2nd Meeting on Dengue network ณ ประเทศสิงคโปร์ เมื่อวันที่ 27-30 กันยายน 2548 (ตาม abstract ที่แสดง)

2. เสนอผลงานในที่ประชุมของประเทศไทยในลักษณะ Oral presentation เรื่อง Nitric oxide and dengue virus : from an in vitro experiments to dengue patients. ตามโปรแกรมที่แนบมา

3. การตีพิมพ์บทความในวารสารวิชาการต่างประเทศ

3.1 Weerawan Charnsilpa, Ratree Takumpanya, Trimothy P. Endy, Mammen P. Mammen Jr., Daniel H. Libraty and Sukathida Ubol. 2005 Nitric oxide radical suppresses replication of wild-type dengue-2 virus in vitro. J. Med. Virol. 77:89-95.

3.2 Ratree Takhumpunya, Sukathida Ubol, Huo-Shu Houg, Gaig E. Cameron, and R. Padmanabhan. Inhibition of dengue viral replication by Mycophenolic acid and Ribavirin. Manuscript นี้ได้เคยส่งไปยัง Virology แล้วทาง Journal ของให้ทำการทดลองเพิ่มทางโครงการจึงได้ทำการทดลองเพิ่มและ authors ทั้งหมดลงความเห็นว่าจะเปลี่ยนวารสารที่จะลงพิมพ์ จึงส่งไปยัง J. of General Virology เมื่อเดือนตุลาคม ที่ผ่านมา

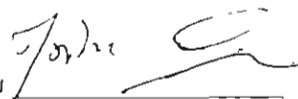
3.3 Ratree Takhumpunya, Padmanabham R., and Ubol S. A molecular mechanism of dengue viral replication suppression by nitric oxide radical. (Manuscript in preparation)

3.4 Charoensirisuthigul, T., Kalayanaroj, S., and Ubol S., A mechanism of ADE –infection enhances dengue virus replication in human monocytic cells (Manuscript in preparation)

4. ท่านได้รับอุปสรรคหรือไม่ : ไม่มี

5. ความคิดเห็นอื่นๆ : ไม่มี

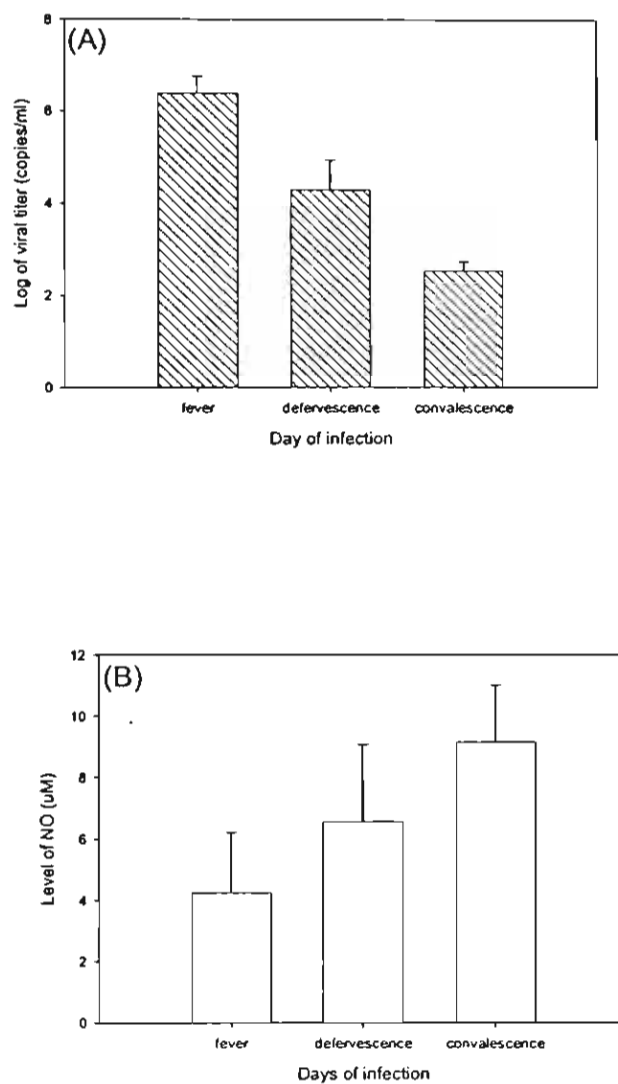
ลงนาม



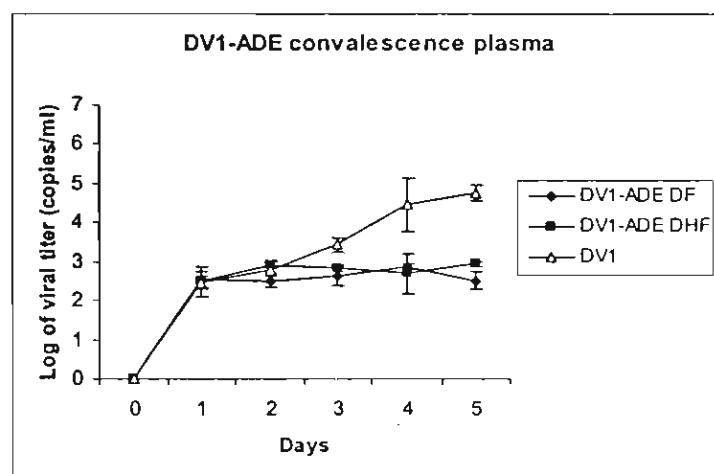
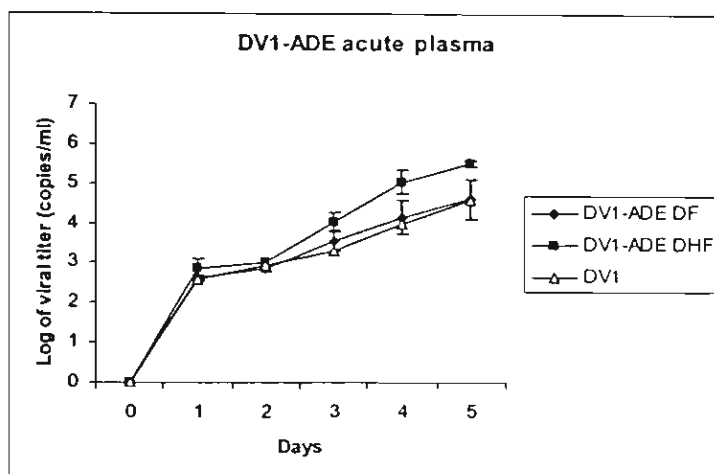
(รศ. ดร. สุขธิดา อุบล)

หัวหน้าโครงการฯ

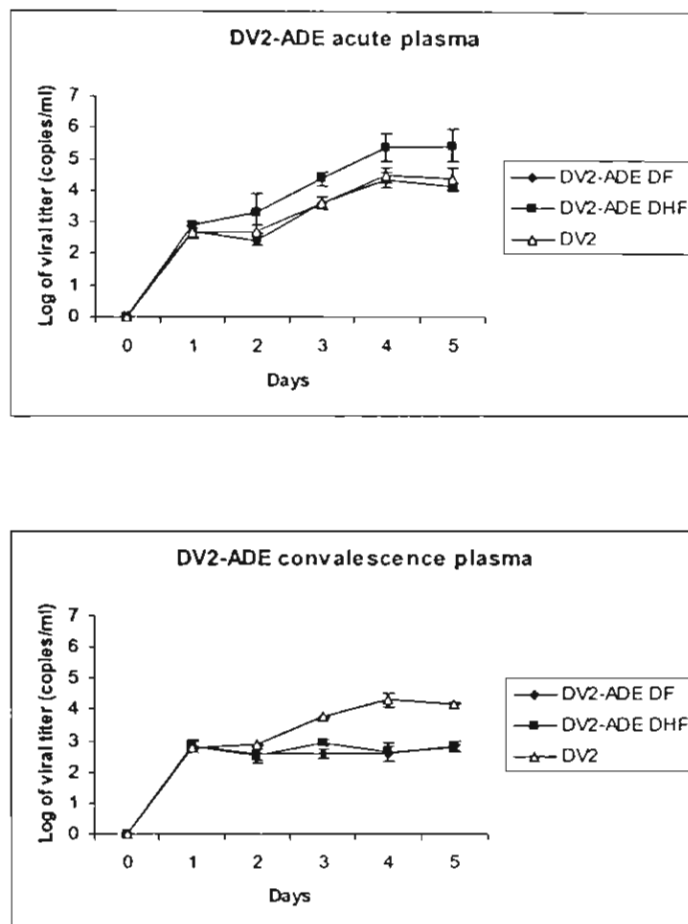
วันที่ 9 ธันวาคม พ.ศ. 2548



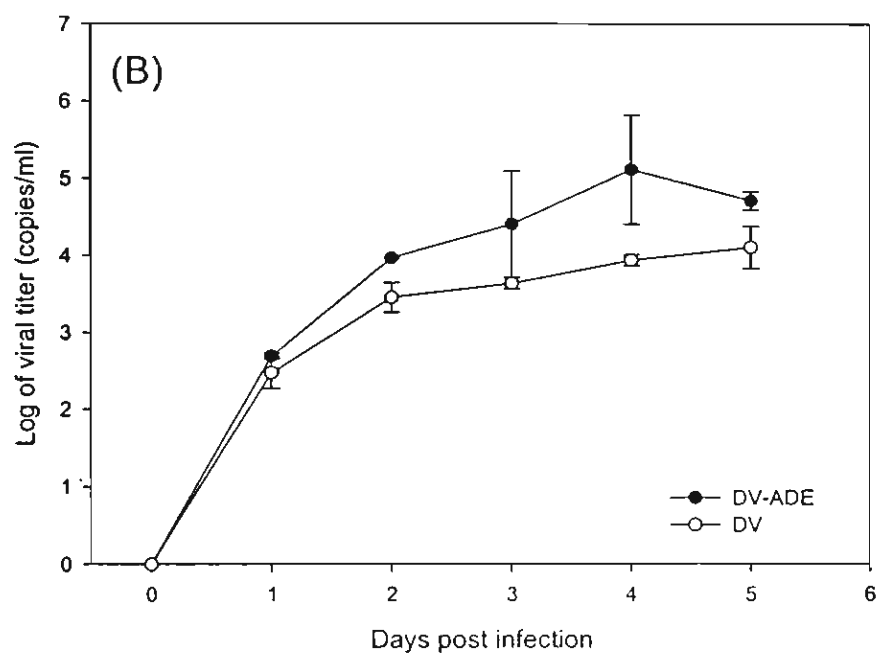
รูปที่ 3. แสดงความสัมพันธ์แบบผกผันระหว่างปริมาณไนตริกออกไซด์ใน plasma ของผู้ป่วย secondary DHF และปริมาณไวรัส ใน plasma



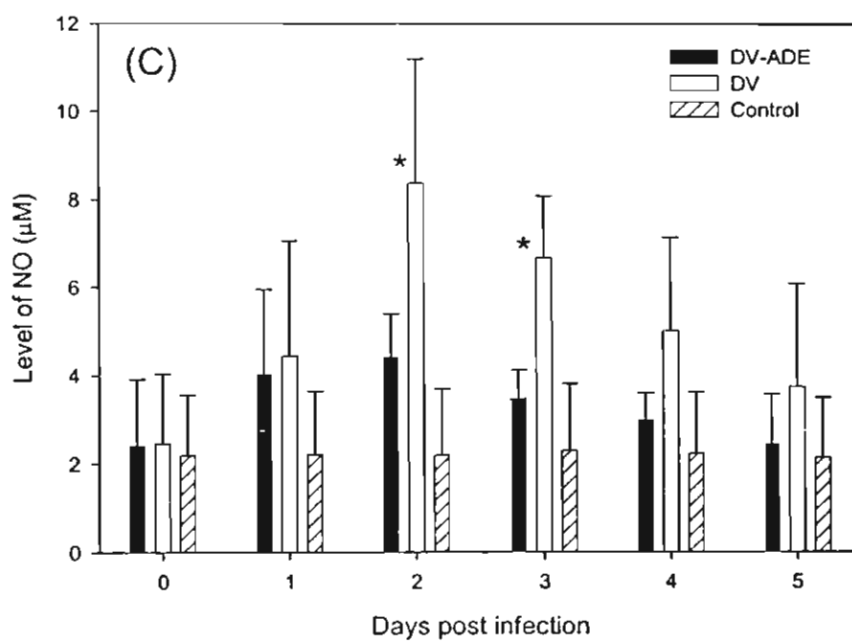
รูปที่ 4 การตรวจหา enhancing activity ใน acute sera และ convalescent sera ของผู้ป่วย secondary DF และ DHF ซึ่งได้รับเชื้อ DV-1



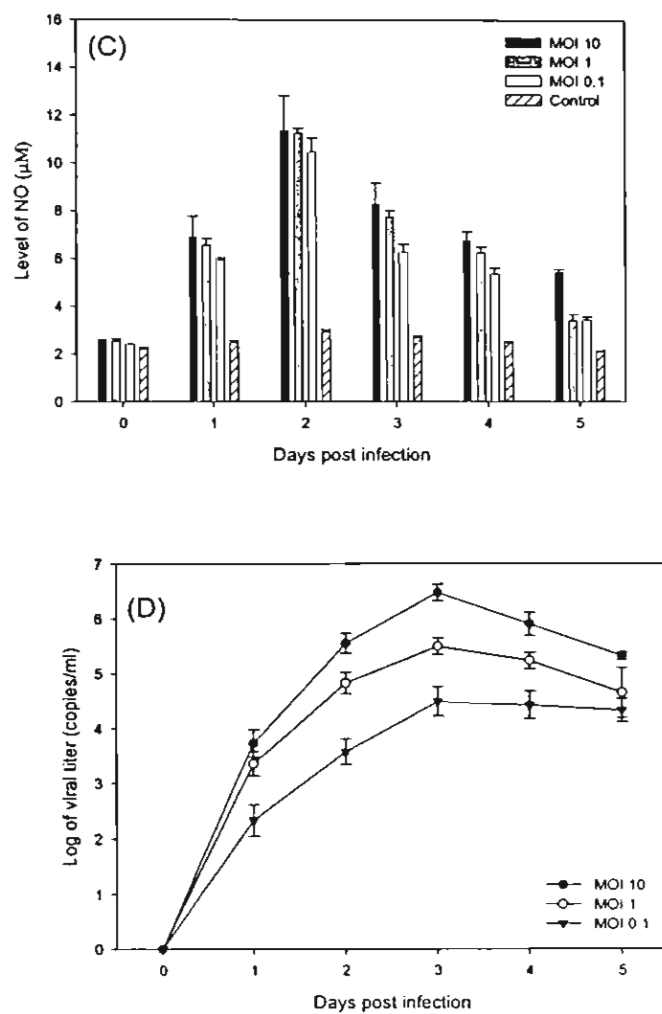
รูปที่ 5. การตรวจหา enhancing activity ใน acute และ convalescent sera ของผู้ป่วย secondary DF และ DHF ซึ่งได้รับเชื้อ DV-2



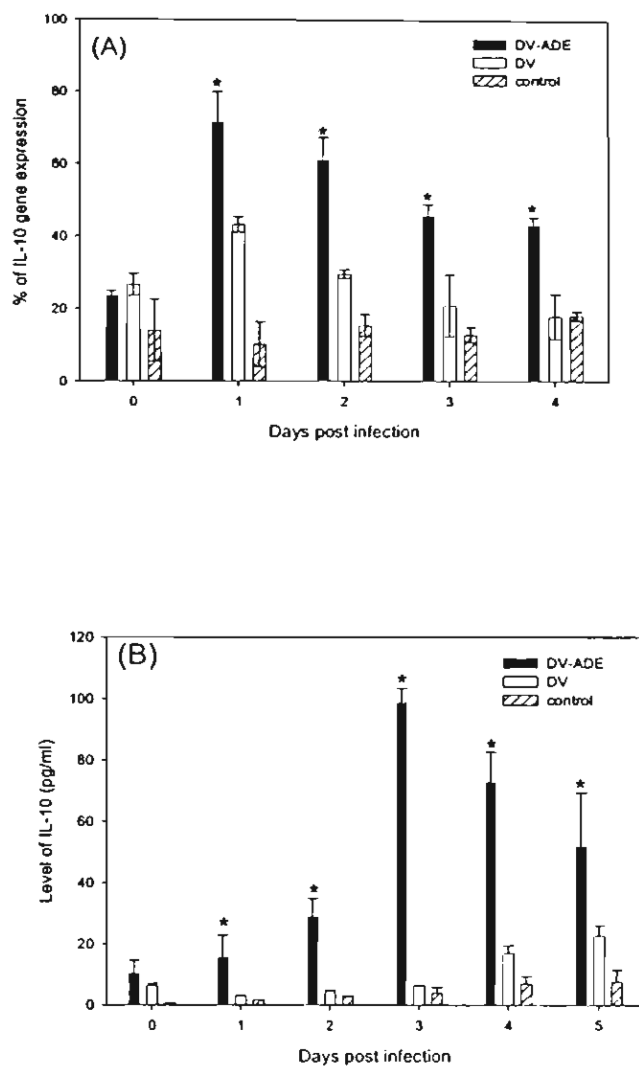
รูปที่ 6. การเพิ่มจำนวนของไวรัสไข้เลือดออกใน THP-1 เซลล์ในสภาวะที่มีและไม่มี enhancing antibody (D2-ADE infection และ D2-infection)



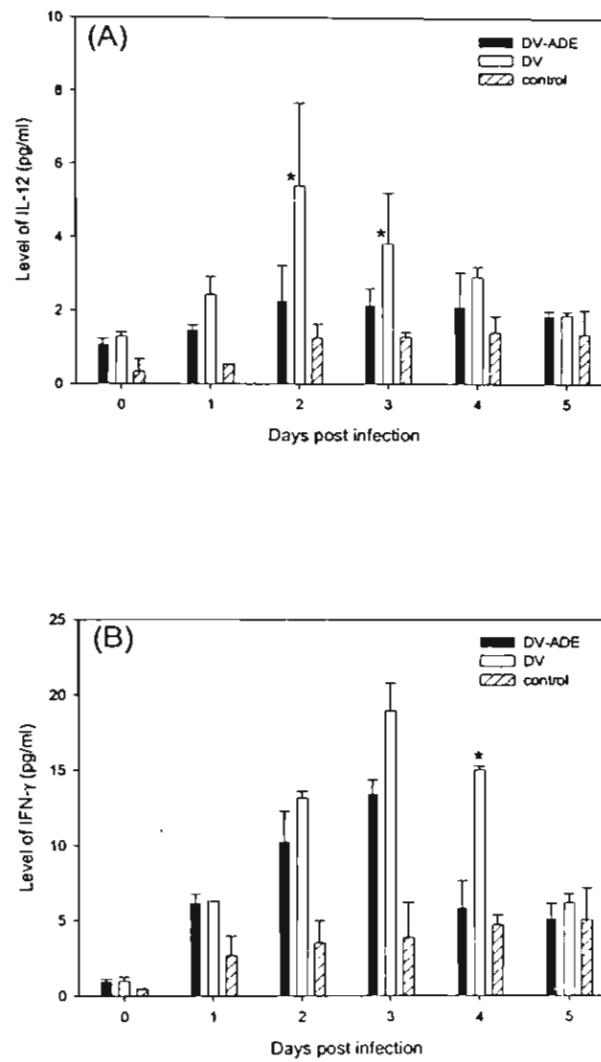
รูปที่ 7. Enhancing antibody ทดการสร้างไนตริกออกไซด์ ในเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสไข้เลือดออก



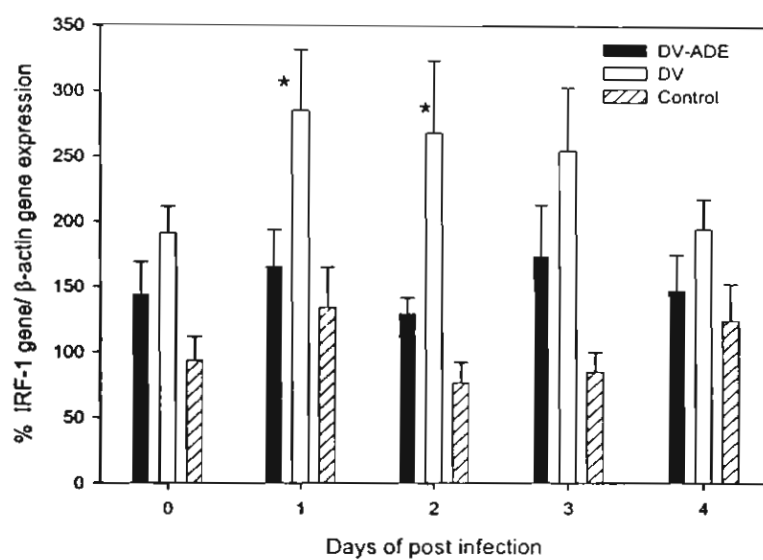
รูปที่ 8. ปริมาณไวรัสที่ผลิตใน THP-1 จากการติดเชื้อโดยไม่อาศัย enhancing antibody ไม่มีผลลดการสร้างไนตริกออกไซด์



รูปที่ 9. ปริมาณการแสดงออกของ IL-10 gene และการสร้าง IL-10 ใน supernate ของ THP-1 cell ที่ได้รับเชื้อแบบ D2-ADE infection และ D2-infection



รูปที่ 10 การศึกษาปริมาณการสร้าง IL12 และ IFN- γ ใน DV-ADE infection และ DV infection โดย ELISA assay



รูปที่ 12 การแสดงออกของ IRF-1 gene ใน THP-1 เมื่อได้รับเชื้อในลักษณะ D2-ADE infection และ D2-infection

Deadline: June 1st, 2005

Submit to: asiandengue@orient-explorer.com or Fax: (+65) 6339-9536

ABSTRACT

Title: Dengue virus enhancing antibody suppresses an anti-viral radical production via an inhibition of iNOS gene transcription factor, STAT-1

Authors: Sukathida Ubol, Takol Charoensirisuthigul and Siripen Kalayanaroj

Title/Department: Associate
Professor, Dept. Microbiology

Institution: Mahidol University,
Faculty of Science

Address: 272 RAMA VI Rd. Rachatewee, Bangkok 10400, Thailand

Phone/E-Mail: 66-2-201-5674,

scsul@mahidol.ac.th

Country: Thailand

Target cells of dengue virus(DV), monocyte and cells in macrophage lineage, are professional nitric oxide producer. Recent investigation by our group has shown that nitric oxide is strong inhibitor of DV replication due to its ability to block DV-RNA dependent RNA polymerase activity. To elaborate an *in vitro* effect of nitric oxide into natural dengue virus infection, the relationship between plasma nitric oxide and viral load in DV-infected patients was investigated. Plasma was obtained from DF and DHF patients of both primary and secondary infection. Level of nitric oxide was determined by Griess's reagent while viral load was investigated by Real Time RT-PCR. Result showed that plasma nitric oxide of secondary-DHF patients was significantly suppressed while viral load of this group of patient was significantly higher than other studied groups. Since this phenomenon occurs only in secondary-DHF patients, we then hypothesized that enhancing antibody(ADE) may be the mediator that suppressed nitric oxide production in secondary DHF patients. Thus the impact of ADE on nitric oxide production was detected in DV-infected monocytic cells. The significant reduction of nitric oxide production was found, 4.43 ± 2.62 and 8.36 ± 2.83 $\mu\text{M/ml}$, in the presence and absence of antibody, respectively. In contrast, the level of viral synthesis was higher in the presence of ADE, $3.77 \pm 1.81 \times 10^5$ versus $3.64 \pm 2.56 \times 10^4$ copies/ml. This result implied that ADE downregulated nitric oxide production which in turn increased viral replication. To determine the mechanism of antiviral radical downregulation, the effect of ADE on an activation of iNOS gene transcription factor, STAT-1, was determined. Lysates of infected cells were electrophoresed. An activated form of STAT-1 was detected using specific antibody. Result demonstrated that activation of STAT-1 was blocked in the present of enhancing antibody. The information obtained from this study demonstrated one of the virulent mechanisms exerted by enhancing antibody during DV infection.

Travel Scholarships

Airfares: From: Bangkok

To: Singapore

Yes

Accommodation: 4 nights

Yes

A POST-PDVI/SINGAPORE DENGUE MEETING IN BANGKOK
THAILAND - A HUB OF DENGUE HAEMORRHAGIC FEVER RESEARCH
3 OCTOBER 2005
SIAM CITY HOTEL, BANGKOK

Register 8:00-8:30

Opening Ceremony 8:30-8:45

Invited speakers:

1 Dr. Anavaj Sakuntabhai and Dr. Laurance Baril 9:00-9:30

A variant located in the promoter of the CD209 (DC-SIGN) gene is associated with the severity of dengue disease

2 Dr. Juthathip Mongkolsapaya 9:30-10:00

T cell responses in Dengue Virus infection; are cross reactive T cells sub-optimal?

3 Dr. Nopporn Sittisombut 10:00-10:30

Reverse genetics in dengue vaccine development

Break 10:30-10:45

4 Dr. Sukthida Ubol 10:45-11:15

Nitricoxide and dengue virus: from an in vitro experiments to dengue patients

5 Dr. Duncan Smith 11:15-11:45

Interaction of the dengue virus with liver cells

6 Dr. Prapat Suriyaphol 11:45-12:15

Bioinformatics in Dengue Research

Lunch 12:15-13:30

8 Dr. Ampaiwan Chuansumrit 13:30-14:00

Management of bleeding control in patients with dengue hemorrhagic fever

9 Dr. Gavin Screaton 14:00-14:30

Cytokines profiles in Dengue Haemorrhagic Fever

Break 14:30-14:45

10 Dr. Philippe Despres 14:45-15:15

A single nucleotide polymorphism within the interferon-inducible Oas1b has an impact on the incidence of West Nile virus infection

11 Dr. Michael Jacobs 15:15-15:45

Dengue infection and innate immune defences

Recess

Panel Discussion: "Experiences in international collaborations, present and future"
Prida, Anavaj, Gavin, Somsak as moderator
16:00-17:30

กับความเข้มข้นของ β -actin band แล้วนำมา plot กราฟ จะได้ผลดังแสดงในรูปที่ 12 กล่าวคือ nitric oxide ซึ่งสร้างมาจาก 50 μ M และ 75 μ M SNAP กดการสร้าง RNA ของ DF isolate อย่างมีนัยสำคัญ

การกดการสร้าง RNA ของ DHF isolate แสดงในรูปที่ 13 และ 14 กล่าวคือที่ 50 μ M SNAP ไม่พบการกดการสร้าง RNA โดยการสร้าง RNA เริ่มตรวจพบได้ตั้งแต่ 8 ชั่วโมงหลังการได้รับเชื้อและปริมาณการสร้างอยู่ในระดับเดียวกับเซลล์ติดเชื้อที่ไม่ได้รับ nitric oxide และเมื่อ treat เซลล์นี้ด้วย 75 μ M SNAP จะพบการสร้าง RNA ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ โดยเริ่มตรวจพบการสร้าง RNA ในชั่วโมงที่ 12 และปริมาณการสร้าง RNA ต่ำกว่า infected cells ที่ไม่ได้รับ nitric oxide อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งเห็นได้ชัดเจนเมื่อนำมา plot เป็น กราฟในรูปที่ 14 50 μ M SNAP ไม่กดการสร้าง RNA ในขณะที่ 75 μ M กดการสร้าง RNA เมื่อเทียบกับปริมาณการแสดงออกของ β -actin gene ซึ่งเป็น internal control ข้อมูลที่แสดงในรูปที่ 14-14 สอดคล้องกับการศึกษาในรูปที่ 8

สรุปผลการทดลองคือ nitric oxide กดการเพิ่มจำนวนของไวรัสไข้เลือดออกโดยขั้นตอนหนึ่งของการ suppress คือการ inhibit transcription

สรุปผลการศึกษาในรอบ 1 ปี

ผลการศึกษาที่กล่าวมาข้างต้นสรุปได้ดังนี้

1. Exogenous nitric oxide donor (SNAP) ที่ใช้ในการศึกษาสามารถสร้าง nitric oxide radical ได้ในปริมาณที่สูงโดยความเข้มข้นที่ใช้ในการศึกษานี้ไม่มีผลต่อการทำงานของเซลล์และการตายของเซลล์
2. Nitric oxide radical มีบทบาทในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสไข้เลือดออก
3. ขั้นตอนใน viral replication ซึ่งถูกยับยั้งโดย nitric oxide พบว่าอยู่ในช่วงของการสร้าง RNA จากการศึกษาเบื้องต้น แต่อาจจะพบการกดในขั้นตอนอื่นๆ อีก ซึ่งยังไม่ได้ดำเนินการศึกษา
4. จากข้อมูลเบื้องต้น nitric oxide อาจจะมีบทบาทในการยับยั้ง DF และ DHF isolates ไม่แตกต่างกันกล่าวคือ DF isolate อาจจะ susceptible ต่อ nitric oxide มากกว่า DHF isolate แต่อย่างไรก็ดีต้องรอผลการศึกษาจาก isolate จำนวนมากกว่านี้

งานที่จะดำเนินการต่อไปในปีที่ 2 และ 3

1. ศึกษากลไกของการยับยั้งในระดับ โมเลกุล ซึ่งได้ส่งนักศึกษาปริญญาเอกหนึ่งคนได้ทำการศึกษาขั้นตอนนี้ที่ห้อง Lab ของ Dr. Padhaman ที่ Georgetown University, USA
2. ทำการศึกษาในผู้ป่วยเพื่อดูความสัมพันธ์ระหว่างระดับ nitric oxide, การแสดงออก iNOS gene, viral load และอาการของผู้ป่วย