



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัย

ความจำเพาะของไวรัสไข้เลือดออกที่มีผลกระทบต่อการเปลี่ยนแปลง
เยื่อผนังเส้นเลือดส่งผลต่อความรุนแรงของโรคไข้เลือดออก

โดย นายแพทย์ัญญฐเนศวร์ ลับเลิศลบ

มิถุนายน 2552

สัญญาเลขที่ MRG 5080350

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัย

ความจำเพาะของไวรัสไข้เลือดออกที่มีผลกระทบต่อการเปลี่ยนแปลง
เยื่อผนังเส้นเลือดส่งผลกระทบต่อความรุนแรงของโรคไข้เลือดออก

นายแพทย์หญิงฐนเนศวร์ ลับเลิศล

ภาควิชาสุขวิทยาเขตร้อน คณะเวชศาสตร์เขตร้อน

มหาวิทยาลัยมหิดล

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

Abstract

บทคัดย่อ

บทนำ	1
วัตถุประสงค์และขอบเขตการวิจัย	2
วิธีการดำเนินการวิจัย	6
ผลการวิจัย	11
ข้อวิจารณ์	21
สรุปและข้อเสนอแนะ	23
แผนการศึกษาวิจัยต่อเนื่องจากงานวิจัยครั้งนี้	24
บรรณานุกรม	25
Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.	27
ภาคผนวก	29

กิตติกรรมประกาศ

- โครงการวิจัยเรื่องนี้ได้รับการสนับสนุนทุนพัฒนาศักยภาพในการทำงานวิจัยของอาจารย์รุ่นใหม่ โดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
- งานวิจัยนี้ได้รับความอนุเคราะห์จากหลายหน่วยงานและหลายผู้ให้การสนับสนุนในการทำวิจัยได้แก่
 - ศาสตราจารย์คลินิกสุจิตรา นิมมานนิตย์ นักวิจัยที่ปรึกษาที่ให้คำแนะนำในการทำการศึกษาวิจัย อีกทั้งให้กำลังใจกับทีมผู้วิจัยจนงานวิจัยครั้งนี้เสร็จสิ้นสมบูรณ์ และยังแนะนำวิธีการ และแนวทางการสานต่องานวิจัยให้พัฒนาถึงการตรวจวินิจฉัยด้วยวิธีการทางห้องปฏิบัติการ การเฝ้าระวังและการดูแลผู้ป่วย จนถึงการพัฒนาวัคซีนสำหรับเชื้อไวรัสเดงกีทั้งสี่ซีโรทัยป์
 - ผศ.จรณิต แก้วกังวาล หัวหน้าภาควิชาสุขวิทยาเขตร้อน และ รศ.ประตাপ สิงหวิวานนท์ คณบดีคณะเวชศาสตร์เขตร้อนที่ให้ความอนุเคราะห์ในการพัฒนาห้องปฏิบัติการวิจัยประยุกต์ให้เหมาะสมกับงานวิจัยทางไวรัสวิทยา
 - เจ้าหน้าที่หน่วยบริหารจัดการ และ อาจารย์พัฒนมาส มณีกาญจน์ ภาควิชาสุขวิทยาเขตร้อน คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ได้ให้ความช่วยเหลือการทำวิจัยและการจัดทำเอกสารที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัยจนทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้อย่างดี

ทางทีมผู้วิจัยจึงขอขอบคุณในความอนุเคราะห์มา ณ โอกาสนี้

คณะผู้วิจัย

Abstract

Project Code : MRG5080350

Project Title : Serotype specific of Dengue viruses affected to the endothelial integrity trigger through the Protease enzyme over production by infected Dendritic cells

Investigator : Natthanej Luplertlop
Lecturer in Department of Tropical Hygiene
Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University

E-mail Address : tmnll@mahidol.ac.th

Project Period : 2 years

Dengue virus (DENV) is one of the most important high morbidity and mortality mosquito-borne diseases especially in tropical and subtropical countries., more than 2.5 billion people are at risk of dengue infection, and approximately 100 million cases of dengue fever annually. Up to 500,000 develop dengue hemorrhagic fever (DHF) or dengue shock syndrome (DSS), the life-threatening forms of the infection which are the consequence of increasing vascular permeability. Unfortunately, there is neither a vaccine for all four dengue serotypes nor specific antiviral drugs to treat the infection. This study aims to evaluate the relationship between matrix metalloproteinase enzymes(MMPs) and vascular leakage, the major cause severity in dengue infected patient. The expression of MMPs in all experiments identified by zymography and used specific inhibitor (SB-3CT) to confirm their expression. After that, we study the vascular integrity by immunofluorescence to the specific cytoskeletons. From this study demonstrated that all four dengue infected cells expressed the overproduction of MMP-2 trigger loss of vascular endothelial cell-cell interaction. This overproduction was associated with serotype specific and time dependent manner that MMP-2 response to DV virus type 2 infection is strikingly different between other serotypes and that DV-induced MMP-2 overproduction are highly at 6 hours post infection for all C6/36, LLC-MK2 and THP-1 cells. These experiments define the surrogate markers that provide an opportunity for DHF/DSS pathogenesis, as well as alternative molecular determinant on the treatment and vaccine development.

Keywords : Dengue, Matrix metalloproteinase, Vascular permeability, Dengue hemorrhagic fever, Endothelial cells

รหัสโครงการ : MRG5080350
ชื่อโครงการ : ความจำเพาะของไวรัสไข้เลือดออกมีผลกระทบต่อการเปลี่ยนแปลงของ
เยื่อผนังเส้นเลือดส่งผลกระทบต่อความรุนแรงของโรคไข้เลือดออก
ชื่อนักวิจัย : นายณัฐเนศวร์ ลับเลิศลบ
อาจารย์ประจำภาควิชาสุขวิทยาเขตร้อน
คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล
E-mail Address : tmnll@mahidol.ac.th
ระยะเวลาโครงการ : 2 ปี

เชื้อไวรัสเดงกีจัดเป็นไวรัสที่เป็นสาเหตุหลักที่ก่อให้เกิดความสูญเสียชีวิตลำดับต้นๆ ในกลุ่มโรคติดต่อที่มีุงเป็นพาหะโดยเฉพาะอย่างยิ่งในประเทศแถบเขตร้อน โดยพบว่ามีประชาชนมากกว่า 2.5 พันล้านคน ที่อยู่ในประเทศกลุ่มเสี่ยงต่อการติดเชื้อไวรัสเดงกี และประมาณ 100 ล้านคนทั่วโลกที่จะพบการเจ็บป่วยด้วยโรคไข้เดงกีในแต่ละปี โดยพบว่ามีประมาณ 500,000 คนที่จะพัฒนาเป็นไข้เลือดออกเดงกี ซึ่งจัดเป็นที่ชนิตรุนแรงถึงขั้นเสียชีวิตจากการรั่วของพลาสมาออกนอกเส้นเลือดซ้ำร้ายไปกว่านั้นโรคนี้อย่างไม่มีการรักษาที่จำเพาะ และยังไม่มียาที่สามารถป้องกันการติดเชื้อไวรัสเดงกีทั้งสี่ชนิดได้ การศึกษาวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อที่จะศึกษาหาความสัมพันธ์ของเอนไซม์ matrix metalloproteinase (MMPs) ต่อพยาธิกำเนิดของการรั่วของพลาสมาออกนอกเส้นเลือด ซึ่งเป็นพยาธิกำเนิดหลักของโรคไข้เลือดออกเดงกีชนิตรุนแรง โดยการศึกษาในครั้งนี้ จะศึกษาหาเอนไซม์ MMPs โดยใช้วิธี Zymography ร่วมกับการใช้สารยับยั้งที่สามารถยับยั้งการสร้าง MMPs ได้ คือ SB-3CT เพื่อเป็นการยืนยันการสร้าง MMPs นอกจากนั้นการศึกษานี้ยังศึกษาผลของ MMPs ต่อการยึดเกาะของเซลล์เยื่อผนังเส้นเลือดโดยใช้วิธี immunofluorescence เพื่อดูการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างพื้นฐานของการยึดเกาะระหว่างเซลล์เยื่อผนังเส้นเลือด ซึ่งจากการศึกษาครั้งนี้พบว่าการแสดงออกของ MMP-2 ในปริมาณที่สูงและส่งผลกระทบต่อการทำงานของเซลล์เยื่อผนังเส้นเลือด และยังพบว่าการแสดงออกของ MMP-2 นั้นมีความสัมพันธ์กับซีโรทัยป์ของไวรัสเดงกี และระยะเวลา โดยพบว่าจะมีการแสดงออกของ MMP-2 สูงสุดในเวลา 6 ชั่วโมงภายหลังการกระตุ้นด้วยไวรัสลงในเซลล์เป้าหมายและการแสดงออกของ MMP-2 สูงสุดในกลุ่มทดลองที่ใช้ไวรัสเดงกีซีโรทัยป์สองในทุกเซลล์เป้าหมายที่นำมาทำการทดลองคือ เซลล์ C6/36, LLC-MK2 และ THP-1

คำหลัก : Dengue, Matrix metalloproteinase, Vascular permeability, Dengue hemorrhagic fever, Endothelial cells

โรคไข้เลือดออก เกิดจากการติดเชื้อไวรัสเดงกี (Dengue viruses) มีทั้งหมด 4 สายพันธุ์ คือ DENV-1, DENV-2, DENV-3 และ DENV-4 เชื้อไวรัสเดงกีจัดอยู่ใน Family Flaviviridae, Genus Flavivirus สำหรับโครงสร้างโดยทั่วไปของเชื้อไวรัสพบว่ามีลักษณะกลม ประกอบด้วยโครงสร้างหลัก 3 ชนิดคือ capsid, membrane และ envelope โดยมีสายพันธุกรรมชนิด positive single strand RNA ยาวประมาณ 10.2-11.0 Kb อยู่ภายใน capsid⁽¹⁻³⁾ ไวรัสเดงกีจะสร้างสาย Polypeptide ยาวประมาณ 3,390 อนุพันธ์ของอะมิโนแอซิด เอนไซม์ของ Host cell จะย่อย Polypeptide ให้มีขนาดสายสั้นลงด้วยเอนไซม์ต่างๆ เช่น signalase, protease, aminopeptidase และ dibasic enzyme ทำให้ได้เป็นโปรตีนชนิดต่างๆ คือ 5'NCR, C, prM, M, E, NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a NS4b, NS5 และ 3'NCR⁽³⁾

โรคไข้เลือดออกมีความรุนแรงแตกต่างกันออกไป คือ Dengue fever (DF), Dengue haemorrhagic fever (DHF) และ Dengue shock syndrome (DSS) ซึ่งมียุงลายชนิด *Aedes aegypti* เป็นพาหะ ปัจจุบันโรคไข้เลือดออกนับเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญปัญหาหนึ่งในประเทศไทย ตามรายงานของกองระบาดวิทยา กระทรวงสาธารณสุขพบว่า อัตราการป่วยและอัตราการตายด้วยโรคนี้มีจำนวนเพิ่มขึ้นทุกปี ซึ่งพบว่าผู้ป่วยส่วนใหญ่เป็นเด็ก ต่อมาเชื้อไวรัสก่อโรคไข้เลือดออกมีการพัฒนาสายพันธุ์ทำให้สามารถก่อโรคในผู้ใหญ่และผู้สูงอายุได้ ตลอดจนสามารถก่อโรคที่มีความรุนแรงเพิ่มมากขึ้น ทำให้มีอัตราการป่วยและอัตราการตายเพิ่มสูงขึ้นอีกด้วย⁽⁴⁻⁵⁾ ดังนั้นการตรวจวินิจฉัยเบื้องต้นที่รวดเร็วจึงมีความสำคัญมากในการช่วยลดความรุนแรงของโรคและอัตราการตายที่เกิดจากโรคไข้เลือดออกจากเชื้อไวรัสเดงกี

สำหรับวิธีการตรวจหาเชื้อไวรัสเดงกีที่ก่อโรคไข้เลือดออกที่นิยมในปัจจุบันอาศัยหลักการทางคลินิกขั้นพื้นฐาน, การตรวจทางโลหิตวิทยาเพื่อดูการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของเลือด (Hematocrit), จำนวนเกร็ดเลือด และการตรวจ Tourniquet test เพื่อตรวจหาการเลือดออกใต้ผิวหนัง ซึ่งวิธีนี้มีความไวและความจำเพาะค่อนข้างต่ำเพราะว่าโรคติดเชื้อไวรัสและโรคติดเชื้ออื่นๆ สามารถให้ผลบวกได้คล้ายคลึงกับโรคไข้เลือดออก และยังต้องใช้แพทย์ที่มีความชำนาญในการดูแลและให้คำวินิจฉัยกับผู้ป่วย สำหรับการตรวจทางห้องปฏิบัติการสามารถทำได้หลายวิธี เริ่มต้นจากการเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัสใน Tissue Culture โดยที่นิยมนำมาใช้ในการศึกษาคือเซลล์จากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เช่น LLC-MK2, BHK, Vero เป็นต้น หรือใช้เซลล์จากลูกน้ำยุงเช่น C6/36 และ AP61 หรือสามารถตรวจสอบในยุงที่อยู่ genus *Toxorhynchites* spp. และ *Aedes* spp.^(2, 6) แต่มีข้อจำกัดเช่นกัน คือ ทั้งการตรวจสอบด้วย tissue culture และในยุงนั้นต้องใช้เวลาอย่างน้อย 1-2 สัปดาห์จึงจะทราบผล ในปัจจุบันมีการพัฒนาความรู้ทางด้านพันธุวิทยาโมเลกุลเพิ่มมากขึ้น จึงได้มีการนำความรู้

ทางด้านพันธุวิทยาโมเลกุลมาประยุกต์ใช้ในการตรวจหาเชื้อไข้เลือดออกหลายวิธีด้วยกัน เช่น Polymerase chain reaction (PCR), Nucleic acid hybridization และ Nucleic acid sequence-based amplification (NASBA)⁽⁷⁻⁹⁾ วิธีการเหล่านี้เป็นวิธีที่มีความไวและความจำเพาะสูง สามารถตรวจหาเชื้อไวรัสได้อย่างรวดเร็วภายในระยะเวลาอันสั้น แต่มีข้อเสียคือ เป็นวิธีที่มีค่าใช้จ่ายในการตรวจวินิจฉัยค่อนข้างสูง และต้องใช้เครื่องมือที่มีความจำเพาะซึ่งมีราคาแพง ปัจจุบันจึงอาศัยการตรวจทางภูมิคุ้มกันวิทยาเป็นหลัก ซึ่งมีหลายวิธีเช่น Plaque reduction neutralization test (PRNT), Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), และ Rapid immuno-chromatographic test ซึ่งวิธีการเหล่านี้เป็นการตรวจหาได้ทั้งแอนติเจน และ แอนติบอดีในตัวอย่างส่งตรวจของผู้ป่วย ซึ่งเป็นวิธีการที่มีความไวและความจำเพาะที่ดี⁽¹⁰⁻¹²⁾ แต่ข้อจำกัดของวิธีการทางภูมิคุ้มกันวิทยานั้นคือต้องใช้เวลาและต้องใช้ผู้เชี่ยวชาญวิเคราะห์ข้อมูลที่มีความชำนาญ และถ้าตัวอย่างส่งตรวจมีปริมาณไวรัสเดงกีไม่มากพอ (น้อยกว่า 250 pfu/ml) การตรวจหาด้วยวิธีการนี้อาจจะให้ผลลบได้⁽¹²⁾

ด้วยเหตุผลดังกล่าวข้างต้น ประกอบกับการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับพันธุวิทยาโมเลกุลของเชื้อไวรัสเดงกีนั้นมีมากขึ้น จึงมีการพัฒนาเทคนิคการตรวจวินิจฉัยทางพันธุวิทยาเพิ่มมากขึ้นเพื่อหาวิธีการตรวจสอบที่รวดเร็วและแม่นยำ นอกจากนี้เหตุผลหลักที่ใช้เลือดออกยังคงเป็นปัญหาสาธารณสุขอยู่ นั้น เป็นเพราะการพัฒนาการรักษาและวัคซีนที่สามารถป้องกันโรคไข้เลือดออกพัฒนาไปได้อย่างล่าช้าและยังไม่มีประสิทธิภาพสูงสุดนั้น เนื่องมาจากยังไม่มีรายงานทางวิทยาศาสตร์ที่อธิบายถึงสาเหตุของการเกิดโรคที่แน่ชัด ในปัจจุบันได้มีการศึกษาถึงเซลล์จำเพาะที่มีผลต่อการติดเชื้อไวรัสไข้เลือดออกอยู่ด้วยกันหลายชนิด คือ Dendritic cells, Langerhans cells; Kupffer cells; Monocyte; Alveolar macrophage; Hepatocyte และ Endothelial cells⁽¹³⁻¹⁶⁾ โดยมีกลุ่มนักวิจัยบางกลุ่มที่ได้ทำการศึกษาถึงการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์ที่มีการหลั่งจาก Target cells ของเชื้อไวรัสไข้เลือดออก แล้วส่งผลการเกิดการเรียงตัวที่เปลี่ยนแปลงไปของเยื่อผนังหลอดเลือด โดยเอนไซม์ดังกล่าวคือ Protease enzymes⁽¹⁷⁾ ซึ่งกลุ่มนักวิจัยได้กำลังพัฒนาเพื่อนำไปใช้เป็นพื้นฐานในการพัฒนาการรักษาและการพัฒนาวัคซีนที่เหมาะสมต่อไป⁽¹⁸⁻¹⁹⁾ แต่ยังไม่มียาหรือวัคซีนที่สามารถระบุได้ว่า ชนิดของไวรัสไข้เลือดออกนั้นมีความสัมพันธ์กับการหลั่ง Metalloproteinase enzyme ด้วยหรือไม่ อีกทั้งปริมาณของไวรัสเดงกีมีความสัมพันธ์กับปริมาณการหลั่งของ Metalloproteinase ด้วยหรือไม่ ดังนั้นทางผู้วิจัยจึงเล็งเห็นถึงความสำคัญของสิ่งที่ยังไม่มีผู้พิสูจน์ในเนื้อหาดังกล่าวข้างต้น จึงได้คิดศึกษาค้นคว้าวิจัย เพื่อนำพื้นฐานความรู้ดังกล่าวนี้ไปพัฒนา ยา พัฒนาตัวชี้วัดความรุนแรงของโรค รวมทั้งวัคซีน อย่างมีประสิทธิภาพต่อไป

วัตถุประสงค์และขอบเขตการวิจัย

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาถึงความจำเพาะของเชื้อไวรัสไข้เลือดออกที่มีผลต่อการกระตุ้นการหลั่ง protease enzyme และ Cytokine อื่นๆ
2. เพื่อศึกษาถึงการเปลี่ยนแปลงของเยื่อผนังหลอดเลือดที่มีผลมาจากเชื้อไวรัสไข้เลือดออกแต่ละชนิดเปรียบเทียบกับชนิดที่ในปัจจุบันนำมาทำเป็น vaccine candidate
3. เพื่อศึกษาถึงปริมาณเอนไซม์ที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของเยื่อผนังเส้นเลือด

วิธีการดำเนินการวิจัยและวิธีการประเมินผลการทดลอง

1. เพาะเลี้ยงไวรัส lab strains ของเชื้อไวรัสเดงกี (DV1-Hawaii, DV2-16681, DV3-H87 และ DV4-H241) ภายในห้องปฏิบัติการประยุกต์ ภาควิชาสุขวิทยาเขตร้อน
2. ตรวจสอบคุณสมบัติและปริมาณของไวรัสเดงกี เพื่อกำหนดปริมาณไวรัสเริ่มต้นในการตรวจสอบที่เท่ากัน โดยวิธีการตรวจสอบคุณสมบัติของไวรัสเดงกีที่ใช้ในการทดลองนี้ประกอบไปด้วย
 - 2.1 Animal tissue culture สำหรับวิธีการนี้ทำเพื่อดูคุณลักษณะจำเพาะของไวรัสเดงกีและตรวจสอบหาปริมาณไวรัสเดงกีแต่ละซีโรทัยป์
 - 2.2 Sandwich ELISA สำหรับวิธีการนี้ทำเพื่อตรวจสอบซีโรทัยป์ ของไวรัสเดงกี
 - 2.3 RT/Nested PCR สำหรับวิธีการนี้ทำเพื่อตรวจสอบซีโรทัยป์ ของไวรัสเดงกีและใช้เป็นตัวเปรียบเทียบสำหรับการทดลองนี้ เพราะเลือกใช้ไพรเมอร์ของ Lanciotti ที่ทั่วไปใช้เป็นมาตรฐานในการตรวจสอบหาไวรัสเดงกี
3. การเตรียมสาย DNA สำหรับการออกแบบไพรเมอร์และการเพิ่มจำนวนยีนเป้าหมายที่จำเพาะต่อไวรัสเดงกีทั้ง 4 ซีโรทัยป์ โดยไม่ให้มีการข้ามระหว่างซีโรทัยป์ (cross reaction)
4. ทำการตรวจสอบความจำเพาะของ Single-tube Multiplex-RT-PCR โดยแบ่งการตรวจสอบออกได้เป็น
 - 4.1 ตรวจสอบเปรียบเทียบเชื้อไวรัสเดงกีทั้ง 4 ซีโรทัยป์ ในตัวอย่างห้องปฏิบัติการ

- 4.2 ตรวจสอบเปรียบเทียบเชื้อไวรัสเดงกีทั้ง 4 ซีโรทัยป์ ในตัวอย่างส่งตรวจของผู้ป่วยในระยะ Dengue fever และ Dengue Hemorrhagic fever
- 4.3 ตรวจสอบเปรียบเทียบเชื้อไวรัสเดงกีทั้ง 4 ซีโรทัยป์ ในตัวอย่างห้องปฏิบัติการเปรียบเทียบกับเชื้อชนิดอื่น
 - 4.3.1 เชื้อไวรัสชนิดที่อยู่ใน Family เดียวกับไวรัสเดงกี คือ Japanese encephalitis และ Hepatitis C virus
 - 4.3.2 เชื้อไวรัสชนิดที่ไม่อยู่ใน Family เดียวกับไวรัสเดงกี คือ Rhinovirus
 - 4.3.3 เชื้อโรคชนิดอื่นที่ไม่ใช่ไวรัส คือ เชื้อ *Plasmodium falciparum*
5. การศึกษาวิจัยในการตรวจสอบคุณสมบัติความจำเพาะของไวรัสไข้เลือดออกที่มีผลกระทบต่อ การเปลี่ยนแปลงเยื่อผนังเส้นเลือดส่งผลกระทบต่อความรุนแรงของโรคไข้เลือดออกนั้นแบ่งการศึกษา ออกได้เป็น 5 ขั้นตอนใหญ่ๆ ดังนี้ :
 - 5.1 การเตรียม Dendritic cells

การเตรียม dendritic cells จะทำการเตรียมจาก whole blood cells เพื่อแยก monocyte แล้วกระตุ้นให้เป็น dendritic cells ด้วย cytokine 2 ชนิด คือ GM-CSF และ IL-4 แล้วทำการตรวจเพื่อยืนยัน purity ชนิดของ dendritic cells ด้วย DC-SIGN; CD1a antibody โดยใช้วิธี FACS หรือ IFA
 - 5.2 การเพิ่มจำนวนไวรัสทั้ง 4 serotypes และ Vaccine strain

ทำการเพิ่มจำนวนไวรัส ทั้ง 4 ชนิด (DV1-4; Lab strains) และ Vaccine strain โดยpropagated ใน C6/36 cells หลังจากนั้นทำการตรวจหาปริมาณไวรัสด้วยวิธี Double overlay plaque assay โดยปริมาณไวรัสที่ต้องการในแต่ละการทดลองอย่างต่ำ 5×10^6 PFU/ml แล้วทำการยืนยันชนิดของไวรัสด้วยวิธี RT-PCR
 - 5.3 การศึกษาเปรียบเทียบชนิดของ Cytokines (TNF α ; IL-8) และ Protease enzyme ในแต่ละกลุ่มการทดลอง

หลังจากได้ Dendritic cells และ Viruses แล้ว จะนำไวรัสไป infect dendritic cells ด้วย moi = 1 incubate ไว้ หลังจากนั้นทำการเก็บ supernatant ที่เวลาต่างๆกัน เพื่อดูปริมาณ Protease enzyme ที่สูงสุด เพื่อใช้เป็น time point สำหรับทุกชนิดของไวรัสเพื่อนำไปดูการเปลี่ยนแปลงของเยื่อผนังเส้นเลือดต่อไป
 - 5.4 การทดสอบยืนยันชนิดของ enzyme ที่มีการหลั่งจาก infected-Dendritic cells

หลังจากเก็บ supernatant ในแต่ละช่วงเวลาแล้ว จะทำการศึกษาหาชนิดของ protease enzymes ด้วยวิธี Zymography และดูปริมาณเอนไซม์แต่ละชนิดด้วยวิธี ELISA technique เปรียบเทียบกับ TNF α ; IL-8 ที่เปลี่ยนแปลงไป
 - 5.5 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเยื่อผนังหลอดเลือดภายหลังการ incubate ด้วย infected-DC-supernatants

เมื่อได้ infected-DC-supernatant ของไวรัสแต่ละชนิด จะนำมา incubate กับ primary Human Umbilical Vein Endothelial Cells (MVEC) 12 ชั่วโมง โดยการทดสอบนี้จะมีการนำ inhibitor ต่อ Protease enzyme; TNF α ; IL-8 มาศึกษาเปรียบเทียบกับ เพื่อยืนยันถึงการเปลี่ยนแปลงของเยื่อผนังหลอดเลือดที่มีและไม่มี inhibitors ว่ามีผลมาจาก enzymes จริง สำหรับการศึกษาดูการเปลี่ยนแปลงของ endothelial integrity นั้นจะศึกษาด้วยวิธี Immunofluorescences โดยใช้ antibody ที่จำเพาะต่อ endothelial cell junction คือ PECAM-1 และ VE-Cadherin แล้วเปรียบเทียบกับสิ่งที่ได้จากภาพของ SEM ว่ามีความสอดคล้องกันอย่างไร

6. ประเมินผลการทดลองด้วยโปรแกรม Microsoft Excel และ SPSS for Window version 12.0

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. เพื่อทราบกลไกการเกิดโรคและพยาธิสภาพที่เกิดขึ้นของไวรัสไข้เลือดออก ใน target cells เพื่อนำไปเป็นพื้นฐานของการพัฒนาความรู้ด้านพยาธิกำเนิดของโรคต่อไป
2. นำความรู้ที่ได้จากงานวิจัยไปพัฒนาวิธีการรักษาคนไข้ไข้เลือดออก เพื่อลดอุบัติการณ์ของโรค
3. นำความรู้ไปใช้ในการเฝ้าระวังคนไข้ในระยะต้นๆ เพื่อป้องกันหรือ ลดภาวะวิกฤติของคนไข้ที่เป็นไข้เลือดออก
4. นำความรู้ที่ได้ไปใช้ในการพัฒนาวัคซีนป้องกันไข้เลือดออกต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเพาะเลี้ยงไวรัสเดงกีในห้องปฏิบัติการ

เชื้อไวรัสเดงกีทั้ง 4 ซีโรทัยป์ คือ DV1-Hawaii, DV2-16681, DV3-H87 และ DV4-H241 ได้รับความอนุเคราะห์จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ทหาร (AFRIMS) กรุงเทพฯ สำหรับวิธีการเตรียมไวรัสจะทำการเพิ่มจำนวนไวรัสใน culture flask (Costar, USA) ขนาด 25 cm² ที่ค่าความสัมพัทธ์ของไวรัสต่อเซลล์ C6/36(multiplication of infection, moi) เท่ากับ 1 หลังจากกระตุ้นเซลล์ด้วยไวรัส 90 นาที จึงเติม 5 ml ของอาหารเลี้ยงเซลล์ (RPMI medium; Gibco, USA) ที่มี 10% fetal bovine serum(Gibco, USA) 1%non-essential amino acid (Gibco, USA) และ 1% penicillin-streptomycin (Gibco, USA) ลงใน culture flask แล้วจึงนำไป incubate เซลล์ที่ 28°C 5%CO₂ incubator หลังจากนั้น รอจนเกิด cytopathic effect ได้ประมาณ 50-70% จึงทำการ freeze ตัวอย่างที่ -70°C เพื่อนำไปตรวจสอบหาปริมาณไวรัสต่อไป

2. การตรวจสอบคุณสมบัติของเชื้อไวรัสเดงกี

2.1 ตรวจสอบด้วยวิธี Animal tissue culture

- 2.1.1 เตรียมเซลล์ที่จะใช้ในการตรวจสอบคุณสมบัติของไวรัสเดงกี ในการทดลองนี้ใช้เซลล์ LLC-MK2 โดยทำการใส่เซลล์ลงใน 6-well plate ปริมาณเท่ากับ 1x10⁵ cells/well รอจนเซลล์เต็ม plate ซึ่งจะมีปริมาณเซลล์เท่ากับ 5x10⁵ cells/well โดยใช้เวลาประมาณ 3 วัน
- 2.1.2 นำตัวอย่างไวรัสเดงกีทั้ง 4 ซีโรทัยป์ ที่เก็บไว้ที่ -70°C มาละลายที่ 37°C ทำ 10-fold dilution ตัวอย่างในอาหารเลี้ยงเซลล์ (MEM medium; Gibco, USA)
- 2.1.3 นำตัวอย่างที่ diluted แล้วมาหยดบนเซลล์ที่เตรียมไว้ 1 diluent : 1 well ทำการกระตุ้นโดยการเขย่า plate ทุกๆ 15 นาที จนครบ 90 นาที
- 2.1.4 เตรียม First overlay ซึ่งประกอบไปด้วย 2X-Medium (Hank's balance salt solution, RPMI FBS) และ 2% agarose
- 2.1.5 เก็บตัวอย่างที่เติม first overlay ใน 37°C 5%CO₂ incubator ประมาณ 1 สัปดาห์ หลังจากนั้นทำการเติม second overlay (2x-medium + 4% neutral red+ 2% agarose) เก็บตัวอย่างไว้ใน 37°C 5%CO₂ incubator เป็นเวลา 12-24 ชั่วโมง แล้วนำมานับจำนวน plaque formation และ วัดขนาดของ plaque ที่ตรวจพบ
- 2.1.6 ตรวจสอบคุณสมบัติของไวรัสเดงกีด้วยวิธี Immunofluorescence และ blotting assay ที่จำเพาะต่อไวรัสเดงกี(ไม่จำเพาะซีโรทัยป์) โดยเลือกใช้ primary

antibody ต่อ E-protein ของไวรัสเดงกี ในอัตราส่วน 1: 500 และใช้ secondary antibody คือ anti-goat ในอัตราส่วน 1: 5000 และตรวจสอบผลการทดลองโดยการดู Inverted fluorescence microscope และ chemiluminescence (BioRad, USA) ตามลำดับ

2.2 ตรวจสอบด้วยวิธี Sandwich ELISA

2.2.1 ทำการ sensitized ด้วย Goat-anti-human IgM และ IgG

2.2.2 เตรียม control sera จากหน่วยวินิจฉัยไข้เลือดออก คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล

2.2.3 เตรียม control positive dengue จากหน่วยวินิจฉัยไข้เลือดออก คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล

2.2.4 เตรียม substrate ที่ใช้ตรวจสอบคือ 0.18M Citrate Phosphate Buffer และ o-phenylenediamine

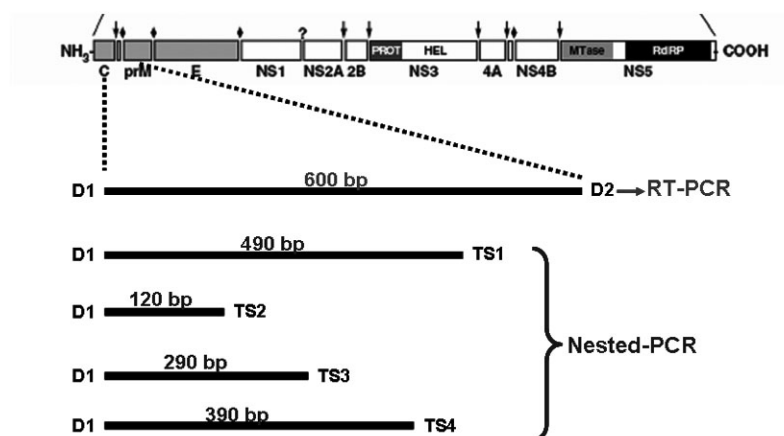
2.2.5 ตรวจสอบผลไวรัสเดงกีแต่ละซีโรทัยป์ ที่ 492 nm

2.3 ตรวจสอบด้วยวิธี RT/Nested PCR-Lanciotti primer set

2.3.1 ทำการ extract ตัวอย่างเพื่อเตรียม RNA ด้วย QIAamp viral RNA extraction kits (วิธีการตาม protocol ของ kits)

2.3.2 ทำการตรวจสอบปริมาณ RNA และ ความบริสุทธิ์ของ RNA จาก extracted samples ที่ 260 และ 280 nm

2.3.3 ตรวจสอบตัวอย่างไวรัสเดงกีด้วยวิธี RT-PCR โดยใช้ Qiagen-one step RT-PCR kits (วิธีการตาม protocol ของ kits) และใช้ไพรเมอร์ของ lanciotti set⁽¹⁶⁻¹⁹⁾



ภาพที่ 1 แสดงตำแหน่งของ Lanciotti primer set⁽¹⁶⁻¹⁹⁾

RT-PCR primer set :

Forward : 5' TCAATATGCTGAAACGCGCGAGAAACCG 3'

Reverse : 5' CAAAGCYCCTTCMGMYGACAT 3'

(M=A+C; Y=C+T)

Thermal cycler :

RT-condition : 42^oC ระยะเวลา 60 นาที

PCR-condition : จำนวน 35 รอบ

- Denature: 94^oC ระยะเวลา 30 วินาที
- Annealing: 55^oC ระยะเวลา 1 นาที
- Extension: 72^oC ระยะเวลา 2 นาที

Stable condition 4-8^oC ระยะเวลา 60 นาที

2.3.4 นำตัวอย่างที่ได้จาก RT-PCR มาทำการตรวจสอบหาซีโรทัยป์ ของไวรัสแดงกี ด้วยวิธี Nested-PCR โดยใช้ Qiagen-Taq PCR kits (วิธีการตาม protocol ของ kits)

Nested-PCR primer set :

Forward : 5' TCAATATGCTGAAACGCGCGAGAAACCG 3'

Reverse 1 : 5' CGTCTCAGTGATCCGGGGRC 3'

Reverse 2 : 5' CGCCACAAGGGCCATGAACAG 3'

Reverse 3 : 5' TAACATCATCATGAGACAGAGC 3'

Reverse 4 : 5' CTCTGTTGTCTTAAACAAGAGA 3'

(R= A+G)

Thermal cycler :

Nested PCR-condition : จำนวน 25 รอบ

- Denature: 94^oC ระยะเวลา 30 วินาที
- Annealing: 55^oC ระยะเวลา 1 นาที
- Extension: 72^oC ระยะเวลา 2 นาที

Stable condition 4-8^oC ระยะเวลา 60 นาที

2.3.5 นำมาตรวจสอบซีโรทัยป์ของ PCR-products ด้วย 1.5% agarose

- RT-PCR product size : 656 bp

- Nested Product size for Dengue-1 : 482 bp
- Nested Product size for Dengue-2 : 119 bp
- Nested Product size for Dengue-3 : 290 bp
- Nested Product size for Dengue-4 : 392 bp

3 ตรวจสอบการแสดงออกของเอนไซม์ Matrix metalloproteinases และผลกระทบที่มีต่อพยาธิกำเนิดของโรคไข้เลือดออก

3.1 การเตรียมตัวอย่างเพื่อการศึกษาการแสดงออกของ Matrix metalloproteinases ด้วยวิธี zymography

- 3.1.1 เตรียมเซลล์ที่จะใช้ในการทดลองคือ LLC-MK2 cells (ตัวแทนสำหรับ Mammalian cells), C6/36 cells (ตัวแทนสำหรับเซลล์ยุงพาหะไข้เลือดออก : Aedes albopictus cells) และ THP-1 cells และเตรียม Monocyte derived dendritic cells (ตัวแทนสำหรับเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันที่เป็นเซลล์เป้าหมายของไวรัสไข้เลือดออก) โดยใส่ลงใน 6-well plate ปริมาณประมาณ 1×10^5 cells
- 3.1.2 เตรียมไวรัสแต่ละซีโรทัยป์ที่ปริมาณ 1×10^5 PFU เพื่อให้ได้ค่า moi=1
- 3.1.3 ทำการ infect ไวรัสแต่ละซีโรทัยป์ลงในแต่ละเซลล์ ใช้เวลาในการ infect ประมาณ 90 นาที
- 3.1.4 ทำการเก็บตัวอย่างของ supernation ที่ระยะเวลา 6, 12, 24 ชั่วโมงภายหลังการ infected
- 3.1.5 นำ supernatant แต่ละเซลล์/ ซีโรทัยป์/ เวลา นำมาทำการตรวจสอบหาการแสดงออกของ เอนไซม์ Matrix metalloproteinases ด้วยวิธี zymography ตามวิธีการของ Luplertlop, et al. 2006 ⁽¹⁷⁾

3.2 เปรียบเทียบการแสดงออกของ เอนไซม์ Matrix metalloproteinases สำหรับเซลล์แต่ละชนิด และไวรัสแต่ละซีโรทัยป์ด้วยวิธี zymographyตามวิธีการของ Luplertlop, et al. 2006 ⁽¹⁷⁾

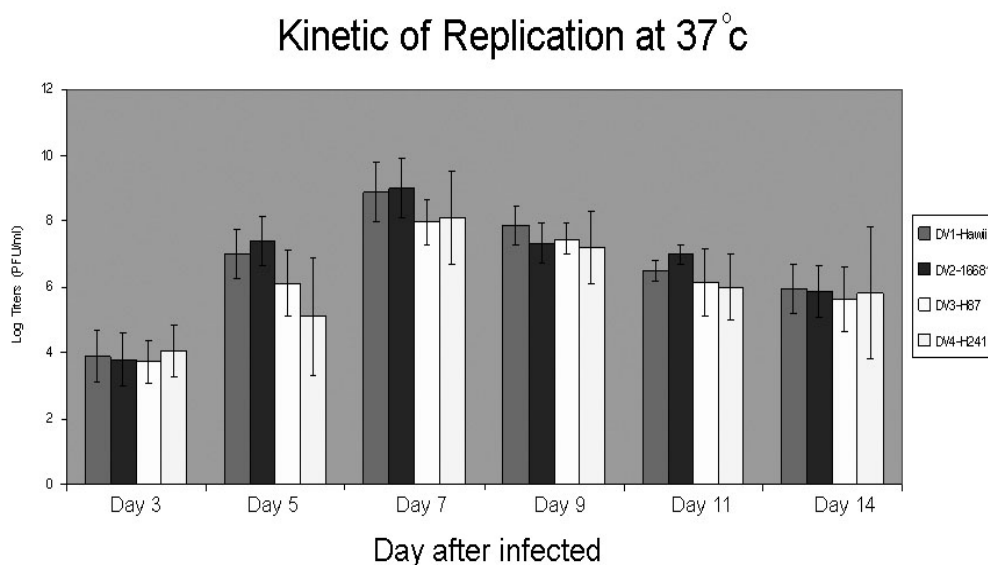
3.3 ตรวจสอบผลของ เอนไซม์ Matrix metalloproteinases ที่มีผลต่อ permeability ของ endothelial cells ที่มีผลจากการติดเชื้อไวรัสเดงกีซีโรทัยป์ 2

- 3.3.1 นำตัวอย่างไวรัสเดงกีซีโรทัยป์ 2 มาทำการ incubate กับ endothelial cells (MVEC) เป็นระยะเวลา 30 นาทีและนำ supernatant ที่ได้มาศึกษาหาปริมาณของ เอนไซม์ Matrix metalloproteinases ⁽¹⁷⁾

3.3.2 ทำการ fix cells ด้วย 4%para-Glutaraldehyde และเก็บตัวอย่างไว้ที่ 4°C เพื่อ
นำไปทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของ endothelial cells ด้วยวิธี Indirect
Immunofluorescence assay ⁽¹⁷⁾

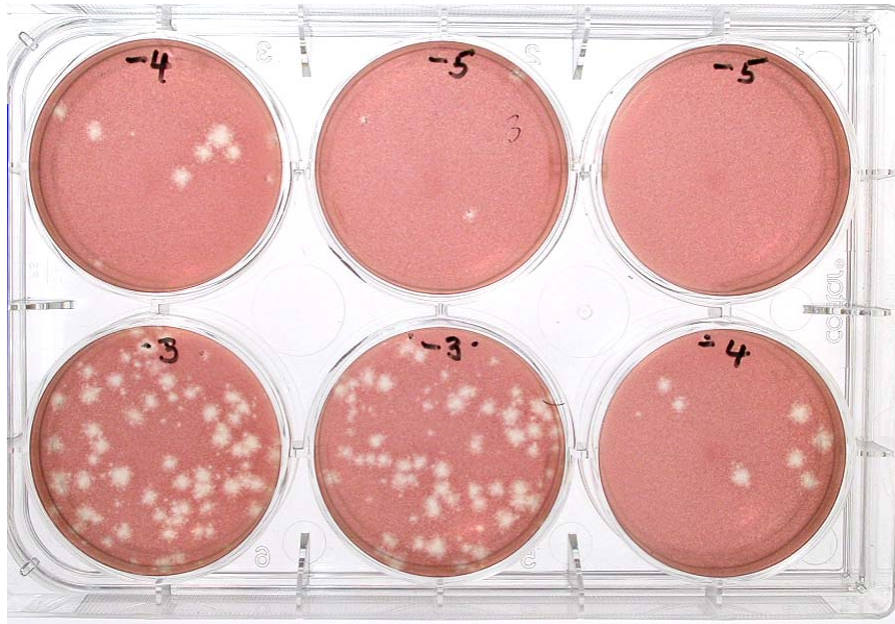
- การตรวจสอบหาปริมาณไวรัส ขนาดของ Plaque ที่เกิดจากไวรัสแดงก็แต่ละซีโรทัยป์ ใช้วิธีการ Plaque titration assay โดยทำผ่าน cell culture พบว่าไวรัสทั้ง 4 ซีโรทัยป์ จะมีปริมาณไวรัสมากที่สุดที่วันที่ 7 หลังการกระตุ้นใน LLC-MK2 cell culture (ภาพที่ 2)

■



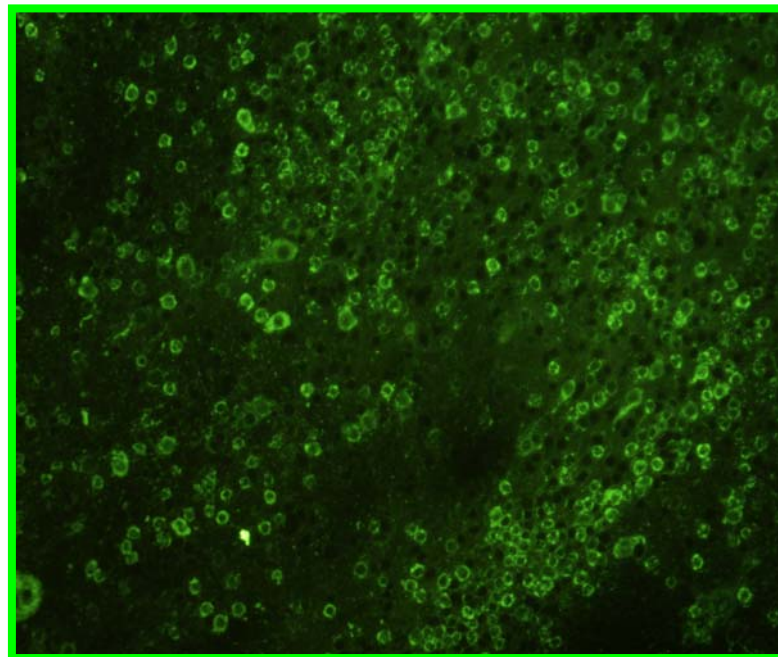
ภาพที่ 2 แสดงการเพิ่มจำนวนของไวรัสแดงก็ทั้ง 4 ซีโรทัยป์ ในเซลล์ LLC-MK2
ภายใต้อุณหภูมิที่ 37°C

- เมื่อตรวจสอบวัดขนาดของของ plaque ของไวรัสแต่ละซีโรทัยป์ พบว่ามีความใกล้เคียงกัน โดยมีขนาดใหญ่ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า ไวรัสที่นำมาใช้ในการทดลองครั้งนี้ยังคงคุณสมบัติในการติดเชื้อและยังคงมีความรุนแรงในการก่อพยาธิสภาพ โดยแต่ละซีโรทัยป์ มีความแตกต่างกันดังนี้ (ภาพที่ 3)
 - Dengue 1 – Hawaii 1.8 +/- 0.11 mm
 - Dengue 2 - 16681 2.1 +/- 0.2 mm
 - Dengue 3 – H87 1.65 +/- 0.09 mm
 - Dengue 4 – H241 1.71 +/- 0.15 mm

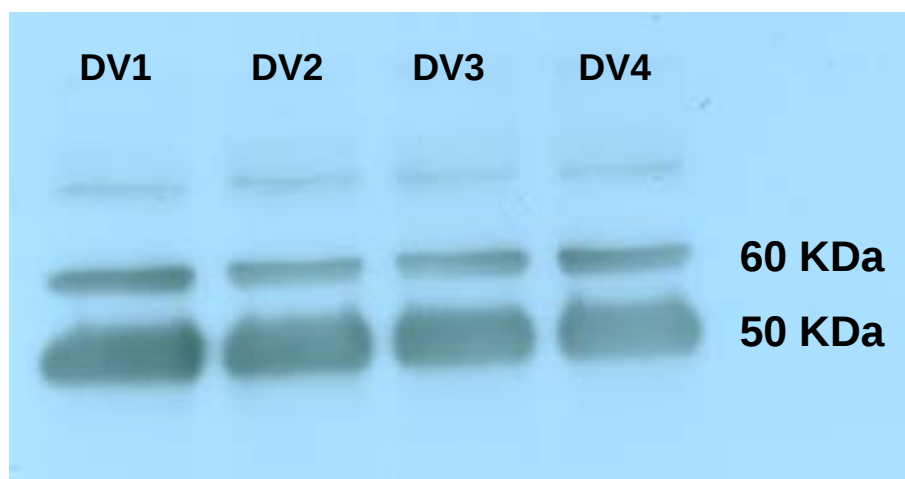


ภาพที่ 3 แสดงลักษณะของ Plaque เมื่อนำไวรัสไปเพาะเลี้ยงบน LLC-MK2 cells

- การตรวจสอบความจำเพาะของไวรัสแดงกี (ไม่กำหนดซีโรทัยป์) ด้วยวิธี Immunofluorescence และ Blotting assay ที่จำเพาะต่อไวรัสแดงกีพบว่าตัวอย่างเชื้อไวรัสที่ได้นำมาใช้ในห้องปฏิบัติการทั้งหมดแสดงผลบวกต่อไวรัสแดงกี (ดังภาพที่ 4 และ 5 ตามลำดับ)



ภาพที่ 4 แสดงผลการตรวจหาไวรัสแดงกีด้วยวิธี immunofluorescence ที่ให้ผลบวก



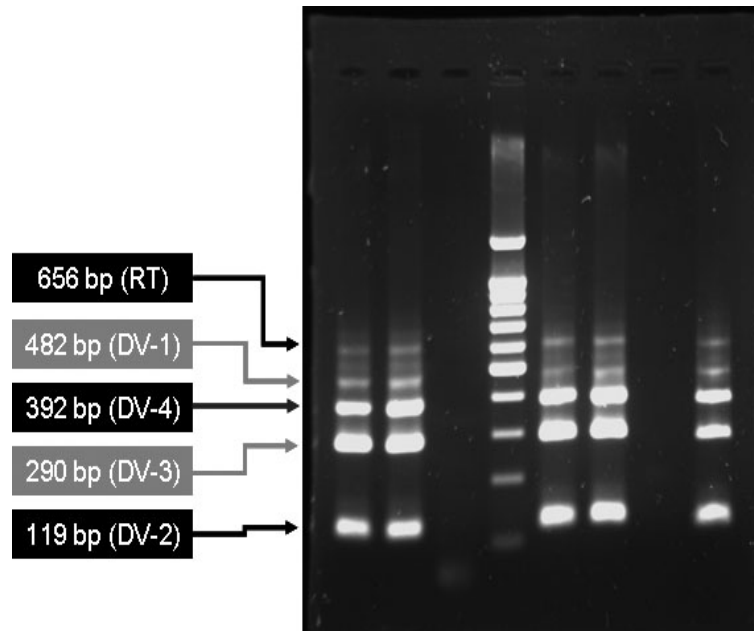
ภาพที่ 5 แสดงผลการตรวจหาไวรัสเดงกีด้วยวิธี Blotting assay ที่ให้ผลบวก

- เมื่อทำการตรวจสอบปริมาณตั้งต้นของไวรัสเดงกีทั้ง 4 มีปริมาณไวรัสที่จะนำมาใช้ในการทดลองครั้งนี้ พบว่าปริมาณไวรัสเดงกีเริ่มต้นมีความใกล้เคียงกัน (ดังตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 แสดงปริมาณไวรัสเดงกีแต่ละซีโรทัยป์ ที่ใช้ในการทดลอง

DENGUE VIRAL TITERS		
Dengue Stock	Date	Virus titer (PF U/ml)
DV1-Hawii	25 – Sep – 06	53×10^6
DV2-16681	25 – Sep – 06	5.3×10^6
DV3-H87	25 – Sep – 06	1.3×10^6
DV4-H241	25 – Sep – 06	1.0×10^6

- การตรวจสอบหาตำแหน่งและขนาดของ PCR products โดยใช้ Lanciotti primer set



ภาพที่ 6 แสดงตำแหน่งและขนาดของ RT-product มีขนาดเท่ากับ 656 bp และ Nested-PCR products ของไวรัสเดงกีทั้ง 4 ซีโรทัยป์ คือ Dengue 1 มีขนาดเท่ากับ 482 bp, Dengue 2 มีขนาดเท่ากับ 119 bp, Dengue 3 มีขนาดเท่ากับ 290 bp, และ Dengue 4 มีขนาดเท่ากับ 392 bp

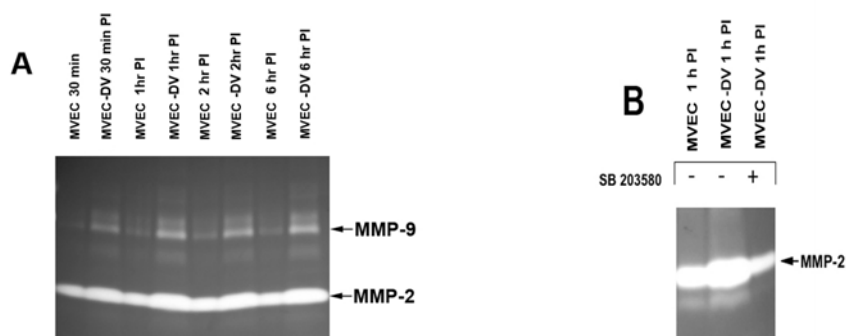
- การตรวจสอบหาปริมาณไวรัสเดงกีทั้ง 4 ซีโรทัยป์ ในห้องปฏิบัติการด้วยวิธี cell culture, ELISA และ RT/Nested PCR-Lanciotti primer set เพื่อยืนยันซีโรทัยป์ ของไวรัสทั้ง 4 ซีโรทัยป์ พบว่า ตัวอย่างที่นำมาในการตรวจสอบนั้นมีไวรัสเดงกีทั้ง 4 ซีโรทัยป์ โดยพบว่าการตรวจสอบตัวอย่างจากตัวอย่างทั้งหมด 30 ตัวอย่าง พบว่าแต่ละวิธีมีการให้ผลบวกเป็น 66.7%, 76.7% และ 90% ตามลำดับ แต่เมื่อพิจารณาถึงระยะเวลาของการตรวจวินิจฉัยพบว่ามีผลแตกต่างกันอย่างมาก โดยมีระยะเวลาต่าง ๆ กันคือ 14 วัน, 10 ชั่วโมง และ 1 วัน ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 แสดงจำนวนตัวอย่างที่ตรวจพบด้วยวิธีการตรวจสอบต่างๆ และจำนวนวันที่ใช้เพื่อการได้ผลการตรวจสอบ

RESULTS				
Dengue Diagnostic Tools	Durations	Samples	Positive	Percents
Cell culture (LLC-MK2 : Plaque assay)	14 days	30	20 (DV-1*5 ; DV-3*2;DV4*3)	66.7
ELISA (Sandwich ELISA)	1 days	30	23 (DV-1*5 and DV-3*2)	76.7
Lancioti PCR (RT/ Nested PCR)	10 hours	30	27 (DV-1*2 and DV-3)	90.0

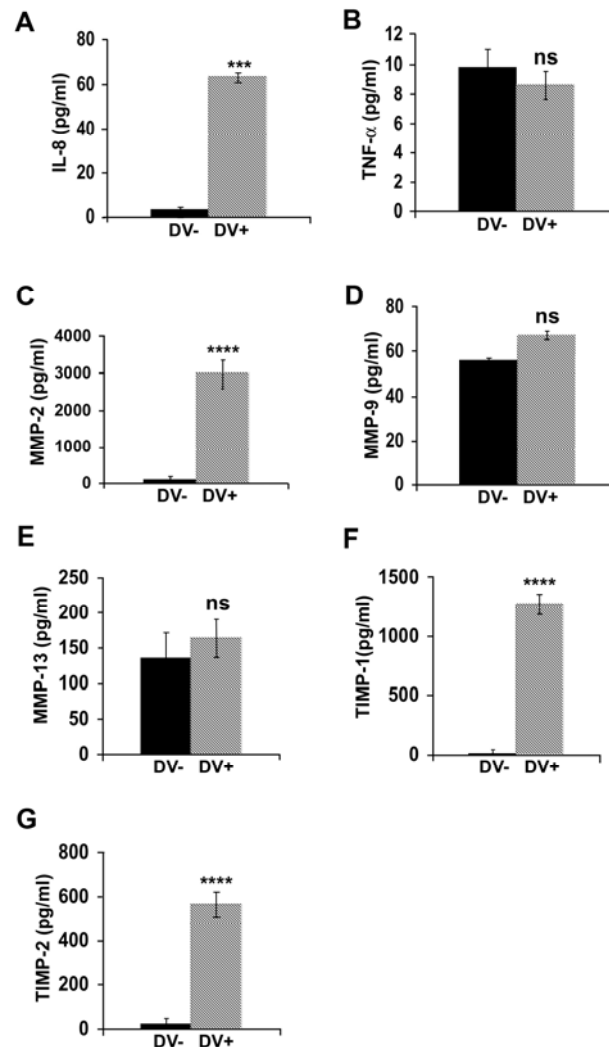
- การศึกษาผลของเอนไซม์ Matrix metalloproteinases และ IL-8 กับการส่งผลกระทบต่อการทำงานของเซลล์ใน primary human endothelial cells (MVEC)

ภายหลังการกระตุ้นไวรัสไข้เลือดออกชนิดที่สอง (DV2-16681) ในเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือด (MVEC) พบว่ามีการแสดงออกของ MMP-2 (72 kDa gelatinase) ซึ่งมีการเพิ่มปริมาณที่สอดคล้องกับระยะเวลาภายหลังการกระตุ้นด้วยไวรัสไข้เลือดออก (time-dependent manner) ผลดังรูป



ภาพที่ 7 การแสดงออกของ MMPs ภายหลังการกระตุ้นด้วยไวรัสไข้เลือดออกใน MVEC (A) Primary endothelial cells were infected with DV and the culture supernatants were analyzed for the presence of the active gelatinases MMP-9 and MMP-2 at the indicated time points by zymography. (B) Induction of MMP-2 by DV-infected MVEC was blocked by 10 μ M of SB203580, a specific p38 inhibitor. Similar results were obtained from 3 separate experiments.

- การตรวจเปรียบเทียบปริมาณการหลั่งของสารต่างๆ ที่มีบทบาทสำคัญร่วมกันกับ matrix metalloproteinases ภายหลังการกระตุ้นด้วยไวรัสเดงกีซีโรทัยปี 2 เพื่อใช้ในการยืนยันผลความสัมพันธ์ของ matrix metalloproteinases กับ cytokines อื่นๆที่ได้มีการศึกษามาก่อนแล้วว่ามีบทบาทสำคัญกับความรุนแรงของโรคไข้เลือดออก คือ IL-8 และ TNF- α ⁽¹⁷⁾

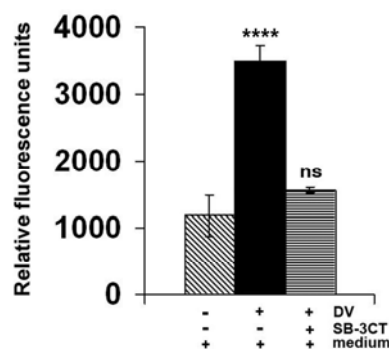


ภาพที่ 8 การตรวจสอบปริมาณของ MMP-2 และตัวควบคุมซึ่งได้มีการตรวจสอบความสัมพันธ์กับพยาธิกำเนิดของไวรัสไข้เลือดออกคือ IL-8. เมื่อทำการตรวจสอบ Supernatants จาก dengue-virus (DV)-infected MVEC (DV+) และ uninfected MVECs (DV-) โดยทำการเก็บที่ 1 ชั่วโมง ภายหลังการกระตุ้นด้วยไวรัสไข้เลือดออก และตรวจสอบด้วย Searchlight Proteome array technology พบว่า มีการแสดงออกของปริมาณสาร IL-8 (A), TNF- α (B), MMP-2 (C), MMP-9 (D) and MMP-13 (E) TIMP-1(F) and TIMP-2 (G)

จากผลการทดลองข้างต้นจะเห็นได้ว่าการเพิ่มปริมาณของ IL-8 , TNF- α , MMP-13, TIMP-1 และTIMP-2 สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Luplertlop ⁽¹⁷⁾ ที่พบว่า สารดังกล่าวจะเพิ่มสูงขึ้นอย่างชัดเจนภายหลังการกระตุ้นด้วยไวรัสเดงกี และเมื่อมาพิจารณาถึง MMP-2 และ MMP-9 จะพบว่าการเพิ่มปริมาณของ MMP-2 นั้นมีปริมาณที่สูงขึ้นภายหลังการกระตุ้นด้วยไวรัสเดงกีอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับ MMP-9 ซึ่ง Luplertlop, et al. พบว่าจะมีปริมาณเพิ่มสูงมากเมื่อมีการกระตุ้นด้วยไวรัสเดงกีซีโรทัยปี 2 ใน Dendritic cells ซึ่งเป็นเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน

- การศึกษาผลของไวรัสเดงกีกับการแสดงออกของ เอนไซม์ Matrix metalloproteinases โดยใช้ตัวยับยั้งการแสดงออกของ เอนไซม์ Matrix metalloproteinases -2 (MMP-2) ก่อนการ infected ด้วยไวรัสเดงกี

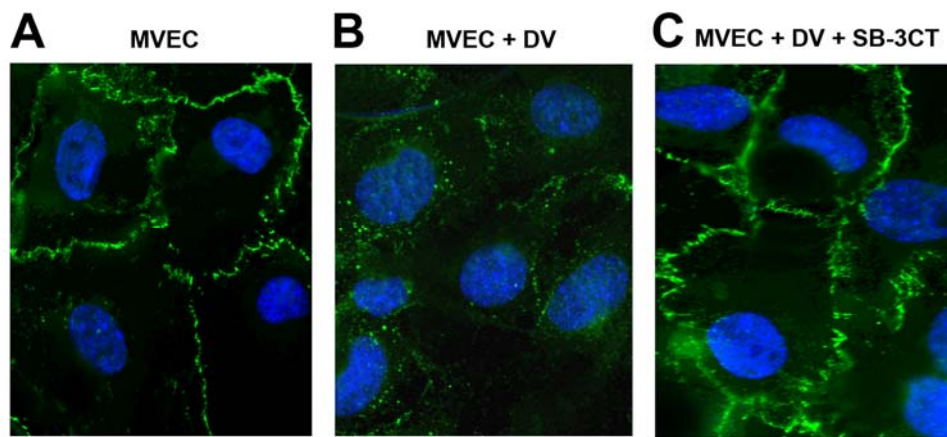
จากการตรวจสอบระดับของ MMP-2 ที่เพิ่มขึ้นภายหลังการกระตุ้นด้วย DV-infected endothelial cells,พบว่าภายหลังการกระตุ้นด้วยไวรัสแล้วประมาณ 2 h พบว่าเปลี่ยนแปลงไป 3-fold เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่กระตุ้นด้วยไวรัส และเมื่อศึกษา endothelium-permeabilizing activity ที่มีผลจาก MMPs เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ใส่สารยับยั้ง MMPs ด้วย SB-3CT พบว่ากลุ่มที่มีการกระตุ้นด้วยไวรัสมีการเพิ่มขึ้นของ endothelial permeability ตรงข้ามกับกลุ่มที่ใส่สาร SB-3CT ดังภาพ



ภาพที่ 9 แสดงการเพิ่มขึ้นของ endothelial cell permeability in a MMP-2-dependent manner เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่มีการกระตุ้นด้วยไวรัสไข้เลือดออก กลุ่มที่ไม่ได้กระตุ้นด้วยไวรัสไข้เลือดออกและกลุ่มที่มีการใส่ SB-3CT

- การศึกษาผลของไวรัสเดงกีกับการแสดงออกของ เอนไซม์ Matrix metalloproteinases กับการส่งผลกับการยึดเกาะของเซลล์เยื่อบุผนังเส้นเลือด (MVEC) เปรียบเทียบกับการใช้ตัวยับยั้งการแสดงออกของ เอนไซม์ Matrix metalloproteinases -2 (MMP-2)

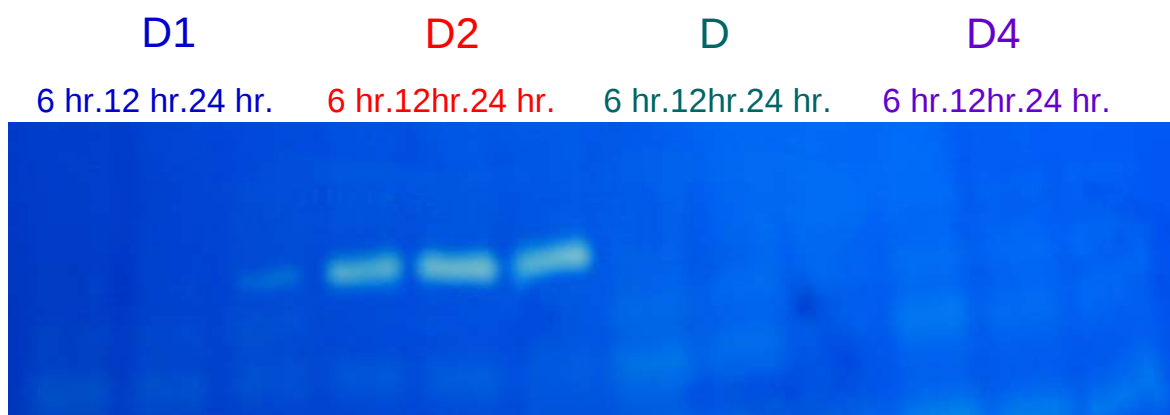
เซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือด ประกอบด้วย adhesion molecules หลายชนิด ซึ่งถ้ามีการเปลี่ยนแปลงของ endothelial cell junction อันส่งผลต่อการเพิ่มขึ้นของ endothelial cell permeability จึงจำเป็นต้องตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของการยึดติดระหว่าง endothelial cell junction ซึ่งในการตรวจสอบครั้งนี้จะทำการตรวจสอบ VE-cadherins ซึ่งจัดว่าเป็นตัวที่มีผลหลักของ cell-cell endothelial cell junction activities ซึ่งการตรวจสอบนี้จุดประสงค์เพื่อตรวจสอบ integrity ของ endothelial junctions ซึ่งจากการตรวจสอบในครั้งนี้พบว่าปริมาณของ VE-cadherin cell-cell adhesion มีการลดลงภายหลังการกระตุ้นด้วยไวรัสไข้เลือดออก (ภาพที่ 11A). แต่เมื่อมีการใส่สาร SB-3CT พบว่าการแสดงออกของ VE-cadherin cell-cell adhesion กลับเพิ่มขึ้นมาใกล้เคียงกับกลุ่มเซลล์ที่ไม่ได้มีการกระตุ้นด้วยไวรัสไข้เลือดออก ดังภาพที่ 11C



ภาพที่ 10 แสดงความสัมพันธ์ของ VE-cadherin ภายหลังการกระตุ้นด้วยไวรัสไข้เลือดออกและสาร SB-3CT

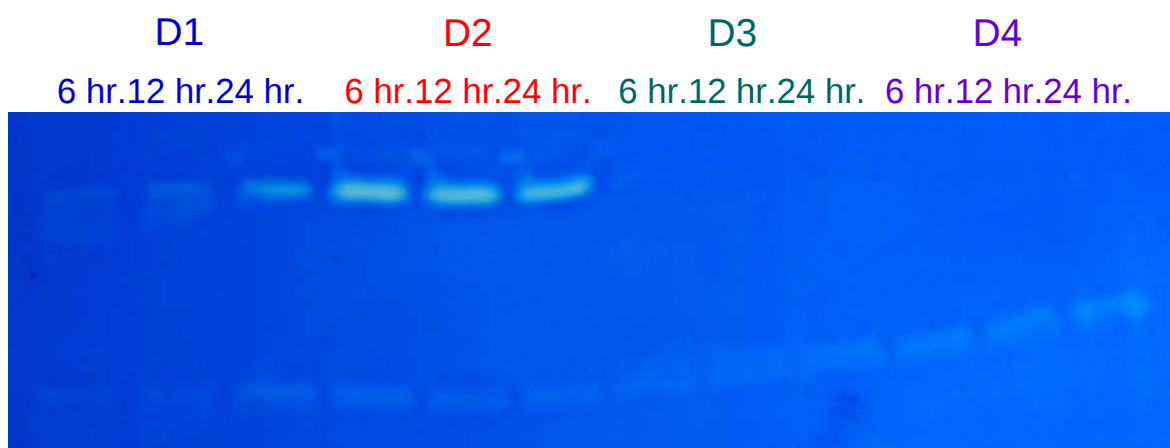
- การศึกษาเปรียบเทียบการแสดงออกของเอนไซม์ Matrix metalloproteinases ในเซลล์ที่จัดเป็นเซลล์เป้าหมายของไวรัสเดงกีคือ
 - a. LLC-MK2 เป็นตัวแทนสำหรับ mammalian cells
 - b. C6/36 cells เป็นตัวแทนสำหรับเซลล์ยุงพาหะของไวรัสเดงกี (Aedes albopictus)
 - c. THP-1 เป็นตัวแทนสำหรับเซลล์ระบบภูมิคุ้มกัน

LLC-MK2



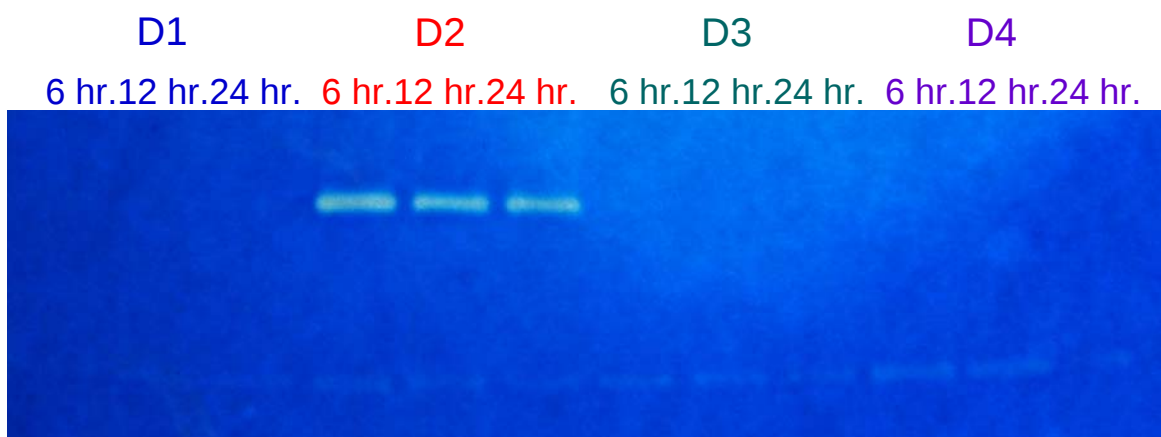
ภาพที่ 11 จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าไวรัสแดงกีซีโรทัยปัสสอง จะมีการแสดงออกของเอนไซม์ Matrix metalloproteinases ชนิดที่ 2 ในปริมาณสูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับไวรัสแดงกีซีโรทัยปัสทั้งสี่ชนิดที่ infected กับ LLC-MK2 cells

C6/36



ภาพที่ 12 จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าไวรัสแดงกีซีโรทัยปัสสอง จะมีการแสดงออกของเอนไซม์ Matrix metalloproteinases ชนิดที่ 2 ในปริมาณสูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับไวรัสแดงกีซีโรทัยปัสทั้งสี่ชนิดที่ infected กับ C6/36 cells

THP-1



ภาพที่ 13 จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าไวรัสเดงกีซีโรทัยปัสสอง จะมีการแสดงออกของเอนไซม์ Matrix metalloproteinases ชนิดที่ 2 ในปริมาณสูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับไวรัสเดงกีทั้งสี่ ซีโรทัยปัส ในการ infected กับ THP-1 cells ซึ่งผลการทดลองที่ได้นั้นแตกต่างกับ immune cells ที่ใช้ในการทดลองขอ Luplertlop, et al. ที่ได้ทำการศึกษากับ Dendritic cells ซึ่งจะมีการแสดงออกของ เอนไซม์ Matrix metalloproteinases ชนิดที่ 9 ปริมาณ สูงกว่าชนิดที่ 2 อย่างชัดเจน⁽¹⁷⁾

เชื้อไวรัสไข้เลือดออก ปัจจุบันมีการแพร่กระจายเพิ่มมากขึ้น ทั้งในประเทศภูมิภาคเอเชียและประเทศในแถบตะวันตก ส่งผลให้มีผู้เสียชีวิตจากโรคไข้เลือดออกเพิ่มจำนวนมากขึ้นเรื่อยๆ สาเหตุหลักที่ทำให้ปัญหาดังกล่าวเพิ่มมากขึ้น และยังไม่สามารถแก้ไขได้เนื่องจากการรักษาที่จำเพาะเจาะจงต่อการติดเชื้อไวรัสไข้เลือดออกนั้นยังไม่มี อีกทั้งยังไม่มีการพัฒนาวัคซีนที่มีประสิทธิภาพในการป้องกันการติดเชื้อไวรัสไข้เลือดออกที่สามารถป้องกันได้ทั้ง 4 ชนิดของไวรัสไข้เลือดออกนั้น ทั้งนี้เนื่องมาจากยังไม่มีรายงานทางวิทยาศาสตร์ที่กล่าวถึงกลไกการเกิดโรค หรือพยาธิกำเนิดของไวรัสไข้เลือดออกที่แน่ชัดว่าเกิดจากสาเหตุใด ส่วนมากจะเป็นการกล่าวถึงการเปลี่ยนแปลงของ cytokine หรือ chemokine ต่างๆ ที่มีความสัมพันธ์กับความรุนแรงของโรคโดยการศึกษาดังกล่าวจะเป็นไปในลักษณะของการนำระบาดวิทยาเข้ามาเป็นส่วนร่วมในการศึกษา

ด้วยเหตุดังกล่าวข้างต้น ทางกลุ่มผู้วิจัยจึงมีความสนใจในการศึกษาถึงการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นที่เยื่อบุผนังเส้นเลือดหลังจากมีการกระตุ้นด้วยเชื้อไวรัสไข้เลือดออกผ่านทาง dendritic cells ซึ่งเป็น primary target organ ของเชื้อไวรัสไข้เลือดออก โดยเน้นการศึกษาไปที่เอนไซม์ protease โดยการศึกษานี้เป็นการศึกษาต่อเนื่องจากการศึกษาของ Natthanej, et al , 2006 ซึ่งได้พิสูจน์ให้เห็นว่า Protease enzyme มีความสัมพันธ์ต่อการเปลี่ยนแปลงของเยื่อบุผนังหลอดเลือด โดยการศึกษาดังกล่าวนั้นเป็นการศึกษาไวรัสเพียง serotype เดียว คือ DV2-16681 ซึ่งจัดว่าเป็นชนิดที่รุนแรงชนิดหนึ่งของไวรัสไข้เลือดออก แต่การศึกษานี้จะเป็นการเปรียบเทียบทั้ง 4 serotypes และ Vaccine strain เพื่อเป็นการเปรียบเทียบให้เห็นถึงความรุนแรงที่ต่างกัน และเมื่อทราบถึงความรุนแรงของชนิดของไวรัสไข้เลือดออกแล้ว จะสามารถนำความรู้ดังกล่าวไปพัฒนาได้ทั้งตัวชีวิตในการเฝ้าระวังการรักษาค้นไข (Severity Markers) และนำไปเป็นพื้นฐานในการผลิตวัคซีนป้องกันไข้เลือดออกชนิด Recombinant หรือ Chimeric vaccine ต่อไป

จากผลการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ Matrix metalloproteinases ชนิดที่ 2 นั้นมีบทบาทสำคัญต่อพยาธิสภาพของโรคไข้เลือดออกและอาจจะนำไปเป็น surrogate markers สำหรับการดูแลและการเฝ้าระวังผู้ป่วยได้ เพื่อเป็นการลดอัตราการป่วยตายของโรคไข้เลือดออกลง โดยจะพบว่าเมื่อมีการนำไวรัสเดงกีทั้ง 4 ซีโรทัยป์มาทำการ infected กับเซลล์ซึ่งใช้เป็นเซลล์พื้นฐานสำหรับการศึกษาพยาธิกำเนิดของไวรัสเดงกี จะพบว่าเซลล์ทั้ง 4 ชนิด (C6/36, LLC-MK2, THP-1 และ Monocyte derived Dendritic cells) นั้นเมื่อมีการนำไวรัสเดงกี infected ลงไปจะมีการแสดงออกของปริมาณเอนไซม์ Matrix metalloproteinases ชนิดที่ 2 ที่สูงกว่าเอนไซม์ Matrix metalloproteinases ชนิดที่ 9 ยกเว้นใน Monocyte derived Dendritic cells จะมีการแสดงออกของเอนไซม์ Matrix metalloproteinases ชนิดที่ 9 มากกว่า ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ

Luplertlop, et al. ⁽¹⁷⁾ และเมื่อพิจารณาถึง Serotype specific จะพบว่า เชื้อไวรัสเดงกีซีโรทัยป์สองจะมีความสามารถในการกระตุ้นเอนไซม์ Matrix metalloproteinases ชนิดที่ 2 ได้มากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับระหว่างไวรัสเดงกีทั้งสี่ซีโรทัยป์ ซึ่งการแสดงออกของเอนไซม์ Matrix metalloproteinases ชนิดที่ 2 นั้นสอดคล้องกับชนิดของเชื้อไวรัสเดงกีที่มักจะส่งผลให้ผู้ป่วยเกิดความเจ็บป่วยชนิดรุนแรงคือ Dengue Hemorrhagic Fever และ Dengue Shock Syndrome ที่เกิดขึ้นแบบ Secondary infection แต่ความสัมพันธ์ดังกล่าว การศึกษาทดลองในครั้งนี้นี้ยังไม่ได้ทำการพิสูจน์ความสัมพันธ์ ซึ่งทีมผู้วิจัยจะทำการศึกษาหาความสัมพันธ์ดังกล่าวต่อไป

เมื่อพิจารณาถึงบทบาทสำคัญของเอนไซม์ Matrix metalloproteinases ชนิดที่ 2 กับการยืดเกาะของเซลล์เยื่อบุเส้นเลือด ก็พบว่าถ้ามีการแสดงออกของเอนไซม์ Matrix metalloproteinases ชนิดที่ 2 โดยไม่มีการใส่สารยับยั้งจะส่งผลให้การยืดเกาะระหว่างเซลล์ของเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือดลดลง อันจะส่งผลต่อการเพิ่ม vascular permeability ซึ่งตรงข้ามกับกลุ่มที่มีการใส่ inhibitor ต่อ เอนไซม์ Matrix metalloproteinases ชนิดที่ 2 คือ SB-3CT ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของการยืดเกาะของเซลล์เยื่อบุผนังเส้นเลือดแทบจะไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อมีการกระตุ้นด้วยไวรัสเดงกี

จากผลการทดลองดังกล่าวข้างต้น สามารถประเมินข้อดีและข้อเสียของงานวิจัยในครั้งนี้ได้ดังนี้คือ

ข้อดีของการวิจัยในครั้งนี้นี้คือ

- สามารถนำข้อมูลการทดลองครั้งนี้ไปเป็นพื้นฐานในการศึกษาพยาธิกำเนิดของไข้เลือดออก
- สามารถนำไปพัฒนาหาตัวชี้วัดและเครื่องมือที่เหมาะสมสำหรับการเฝ้าระวังผู้ป่วยไข้เลือดออก
- สามารถนำวิธีการตรวจหาเอนไซม์ Matrix metalloproteinases ด้วยวิธี zymography ไปใช้ในการเฝ้าระวังผู้ป่วยไข้เลือดออก

ข้อเสียของการวิจัยในครั้งนี้นี้

- ยังไม่มีการนำตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยที่ระดับความรุนแรงต่างๆ มาศึกษาหาปริมาณของเอนไซม์ Matrix metalloproteinases

สรุปและข้อเสนอแนะ

ด้วยผลการทดลองดังกล่าวข้างต้น พบว่าวิธีการศึกษาหาตัวชี้วัดความรุนแรงของโรคไขเลือดออกนั้นเป็นวิธีการหนึ่ง que เพิ่มประสิทธิภาพในการเฝ้าระวังผู้ป่วยไขเลือดออก และนำไปใช้เป็นพื้นฐานสำหรับการศึกษาพยากรณ์เกิดของโรคไขเลือดออก เพื่อการพัฒนาการรักษาทั้งในรูปแบบขอ ยาและวัคซีนที่มีประสิทธิภาพต่อไป

ปัญหาที่พบในการทำการวิจัย

- การเริ่มต้นการวิจัยในครั้งนี้ เป็นการเริ่มต้นทำในห้องปฏิบัติการที่ยังไม่เคยมีการทำการวิจัยเกี่ยวกับไวรัสมาก่อน จึงมีความจำเป็นต้องใช้เวลาในตอนเริ่มต้นการวิจัยค่อนข้างมาก (มากกว่าที่กำหนดไว้)
- ในช่วงแรกของการวิจัยมีปัญหา contamination เชื้อราในห้องปฏิบัติการ จึงต้องมีการหยุด การทำวิจัยในห้องปฏิบัติการเป็นระยะเวลานาน
- อุปกรณ์ในคณะเวชศาสตร์เขตร้อนบางชนิดยังไม่มี เช่น Inverted Fluorescence microscope ที่สามารถปรับค่า wave length ตามสีที่ใช้ในการตรวจสอบได้จึงต้องมีการใช้อุปกรณ์ดังกล่าว ที่คณะอื่น ซึ่งต้องมีการเรียงลำดับการใช้งาน จึงทำให้อ่อนช้าเสียเวลาในช่วงแรกของการวิจัย และมีค่าใช้จ่ายเพิ่มสูงขึ้นในการใช้บริการต่างหน่วยงาน ซึ่งไม่ได้มีการประเมินไว้ตั้งแต่ตอน เสนอขอทุนสนับสนุนการวิจัย
- เนื่องด้วยห้องปฏิบัติการวิจัยในครั้งนี้ ยังต้องมีการสั่งซื้อสารเคมี และเครื่องมือที่พร้อมสำหรับการ การวิจัยเกี่ยวกับไวรัส จึงต้องมีการสั่งสารเคมีเบื้องต้นเป็นจำนวนมาก กอปรกับราคาของ สารเคมีที่ซื้อในขณะที่ทำการวิจัย เมื่อเปรียบเทียบกับราคาที่เสนอไปในช่วงแรกของการขอทุน สนับสนุนการวิจัยมีราคาเพิ่มสูงขึ้นอย่างมาก จึงมีความจำเป็นที่ต้องกำหนดขอบเขตของการ ศึกษาวิจัยใหม่อีกครั้งโดยยึดหลักของหัวข้อวิจัยที่สอดคล้องกับหัวข้อเดิมมากที่สุด
- ทีมผู้วิจัยมีความตั้งใจที่จะทำการศึกษาต่อในตัวอย่างผู้ป่วยที่มีความรุนแรงแตกต่างกันไป แต่ เนื่องจากบทบาทความสำคัญของคณะกรรมการจริยธรรมการศึกษาวิจัยในมนุษย์ จึงทำให้มี ความล่าช้าและอาจจะไม่ทันสำหรับระยะเวลาการศึกษาวิจัย อีกทั้งการเปลี่ยนแปลงราคา สารเคมีต่างๆ อันเป็นผลสืบเนื่องจากปัญหาระบบเศรษฐกิจ ทำให้กรอบเงินสำหรับการ ศึกษาวิจัยในครั้งนี้จึงต้องจำกัดมากขึ้น

แผนการศึกษาวิจัยต่อเนื่องจากงานวิจัยครั้งนี้

จากผลการทดลองในครั้งนี้มีหลาย ๆ คำถามที่เกิดขึ้นในระหว่างการศึกษาวิจัยทำให้ทีมผู้วิจัยมีแผนการสำหรับการศึกษาวิจัยต่อเนื่อง เพื่อให้คำถามต่างๆที่เกิดขึ้นในการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ได้รับคำตอบและหวังผลในการพัฒนาพื้นฐานความรู้ ความเข้าใจในพยาธิกำเนิดของโรคไข้เลือดออกนั้น ทีมผู้วิจัยมีแผนการศึกษาวิจัยต่อเนื่องดังนี้ :

- ศึกษาวิจัยความสัมพันธ์ของเอนไซม์ Matrix metalloproteinases กับความรุนแรงของโรคไข้เลือดออกในซีรัมของผู้ป่วยในระดับความรุนแรงต่างๆ คือ Dengue fever, Dengue hemorrhagic fever และ Dengue shock syndrome เปรียบเทียบกับ Normal human serum
- ศึกษาความสัมพันธ์ของการแสดงออกของเอนไซม์ Matrix metalloproteinases ในการติดเชื้อไวรัสเดงกีชนิด Primary infection และ Secondary infection ที่มีความแตกต่างกันระหว่างไวรัสเดงกีในแต่ละซีโรทัยป์ เพื่อหาความเกี่ยวข้องของเอนไซม์ Matrix metalloproteinases กับชนิดการติดเชื้อต่างๆ
- ศึกษาความสัมพันธ์ของการแสดงออกของเอนไซม์ Matrix metalloproteinases ในการติดเชื้อไวรัสเดงกี เปรียบเทียบระหว่าง virulence strains, non-virulence strains และ vaccine strains เพื่อใช้ในการยืนยันว่า ชนิดและปริมาณของเอนไซม์ Matrix metalloproteinases นั้นมีความสำคัญกับความรุนแรงของโรคไข้เลือดออก
- ศึกษาพัฒนาสารเคมีที่มีความใกล้เคียงและสามารถยับยั้งการแสดงออกของเอนไซม์ Matrix metalloproteinases ทั้งจากพืชสมุนไพรไทยและสารเคมีสังเคราะห์ โดยสารดังกล่าวต้องไม่ส่งผลกระทบต่อเซลล์ปกติ เพื่อใช้ในการพัฒนาการรักษาโรคไข้เลือดออกต่อไป ทั้งที่เป็นแบบแพทย์แผนปัจจุบันและแพทย์ทางเลือก

1. Gubler DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever. Clin Microbiol Rev 1998; 11: 480-96.
2. World Health Organization. Dengue Haemorrhagic fever diagnosis, treatment, prevention and control. Geneva 1997, 84p
3. Monath TP. Flavivirus. In: Fields BN, ed. Virology. New York: Raven Press, 1990: 763-838.
4. Bureau of Epidemiology, Ministry of Public Health. Annual epidemiological surveillance report. Nonthaburi, Thailand, 2003. (<http://epid.moph.go.th/>).
5. Halstead SB. Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. Science 1998; 239: 476-81
6. Innis BL. Dengue and dengue hemorrhagic fever. In: Porterfield JS. eds. Exotic viral infections. London: Chapman and Hall, 1995;103-46.
7. Chan SY, Kautner I, Lam SK. Detection and serotyping of dengue viruses by PCR: a simple, rapid method for the isolation of viral RNA from infected mosquito larvae. Southeast Asian J Trop Med Pub Health 1994; 25: 258-61.
8. Lanciotti RS, Calisher CH, Gubler DJ, Chang GJ, Vorndam VA. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 1992; 30: 545-51.
9. Usawattanakul W, Jittmittraphap A, Tapchaisri P, et al. Detection of dengue viral RNA in patients' sera by nucleic acid sequence-based amplification (NASBA) and polymerase chain reaction (PCR). Dengue Bulletin 2002; 26: 131-9
10. Cardoso MJ, Hooi TP, Shaari NS. Development of a dot enzyme immunoassay for dengue 3: a sensitive method for the detection of anti-dengue antibodies. J Virol Methods 1998; 22: 81-8.
11. Innis BL, Nisalak A, Nimmannitya S, et al. An enzyme-linked immunosorbent assay to characterize dengue infections where dengue and Japanese encephalitis co-circulate. Am J Trop Med Hyg 1989; 40: 418-27.
12. Vaughn DW, Green S, Kalayanarooj S, et al. Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity. J Infect Disease 2000; 181: 2-9.

13. Marovich, M., G. Grouard-Vogel, M. Louder, M. Eller, W. Sun, S. J. Wu, R. Putvatana, G. Murphy, B. Tassaneetrithep, T. Burgess, et al. Human dendritic cells as targets of dengue virus infection. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.* 2001; 6: 219-224.
14. Burke, D. S., A. Nisalak, D. E. Johnson, R. M. Scott.. A prospective study of dengue infections in Bangkok. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1988; 38: 172-180.
15. Halstead, S. B. Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. *Science* 1988; 239: 476-481.
16. Kliks SC, Nimmanitya S, Nisalak A, Burke DS. Evidence that maternal dengue antibodies are important in the development of dengue hemorrhagic fever in infants. *Am J Trop Med Hyg* 1988; 38:411–419.
17. Luplerdlop N, Misse D, Bray D, Deleuze V, Gonzalez JP, Leardkamolkarn V, Yssel H, Veas F. 2006. Dengue-virus-infected dendritic cells trigger vascular leakage through metalloproteinase overproduction. *EMBO Rep.* 2006 ;7(11):1176-81.
18. Jessie K, Fong MY, Devi S, et al. Localization of dengue virus in naturally infected human tissues, by immunohistochemistry and in situ hybridization. *J Infect Dis.* 2004; 189:1411–1418.
19. Tassaneetrithep, B., T. H. Burgess, A. Granelli-Piperno, C. Trumpfheller, J. Finke, W. Sun, M. A. Eller, K. Pattanapanyasat, S. Sarasombath, D. L. Birx, et al. DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells. *J. Exp. Med.* 2003; 197: 823-829.

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ

Luplertlop N, Missé D. MMP cellular responses to dengue virus infection induced vascular leakage. Japanese Journal of Infectious Diseases 2008 Jul; 61(4): 298-301

2. การนำเสนอผลงานวิจัย

2.1 ถ่ายทอดความรู้เรื่องพยาธิกำเนิดของไวรัสไข้เลือดออก และความสัมพันธ์กับเอนไซม์ matrix metalloproteinases ให้กับทีมนักวิจัย G.E.M.I. IRD/CNRS

2.2 เสนอผลงานวิจัยในรูปแบบโปสเตอร์ที่ “The second international conference on Dengue and Dengue hemorrhagic fever-Global innovation to fight Dengue” 15th -17th October 2008, Phuket, THAILAND ในหัวเรื่องต่างๆ ดังต่อไปนี้

- The relationship between MMP expression and virulence of Dengue virus type-2 infected cells.
- MMPs cellular response to Dengue virus infection induced vascular leakage.
- Peritrophic membrane structure and Aedes aegypti mosquitoes after infected with Dengue virus type-2.

3. การเชื่อมโยงทางวิชาการกับนักวิชาการอื่นๆ ทั้งในและต่างประเทศ

3.1 การเชื่อมโยงงานวิจัยภายในประเทศ

- ศาสตราจารย์ศุภชิตา อุบล
ภาควิชาจุลชีววิทยาและอิมมูโนโลยี คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยมหิดล
- ศาสตราจารย์นายแพทย์ยง ภู่วรรณ
ภาควิชาภูมิเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- รองศาสตราจารย์นิจศิริ เรืองรังษี
คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- รองศาสตราจารย์จารุภา วิโยชน์
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

- ผู้ช่วยศาสตราจารย์พจมาลย์ สุรนิลพงศ์
สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร สาขาวิชาเทคโนโลยีผลิตพืช
มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์
- ดร.นิสากร แซ่วัน
สำนักวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

3.2 การเชื่อมโยงงานวิจัยในต่างประเทศ

ประเทศฝรั่งเศส

- Dr. Misse Dorothee
ศึกษาเกี่ยวกับความสัมพันธ์ของยุงพาหะกับไวรัสเดงกี
- Dr. Frederic Thomas
ศึกษาเกี่ยวกับ vertical and horizontal transmission ของไวรัสเดงกีกับยุงพาหะ
- Dr. Hans Yssel
ศึกษาเกี่ยวกับพยาธิกำเนิดและระบบ ภูมิคุ้มกันที่เกี่ยวข้องกับไวรัสไข้เลือดออก
- Dr. Chantal Ripoll
ศึกษาเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้างและรูปร่างของเซลล์เป้าหมายกับไวรัสเดงกี

ประเทศออสเตรเลีย

- Assoc.Prof. Erik. W. Thompson
ศึกษาเกี่ยวกับพัฒนาระบบ RNAi เพื่อใช้สำหรับการศึกษาวีรโรคไข้เลือดออก
- Dr. Nuttavud Pimpa
ศึกษาเกี่ยวกับแนวโน้มการเกิดโรคติดเชื้อไข้เลือดออกกับฐานการพัฒนาเศรษฐกิจ

ประเทศสาธารณรัฐเซด

- Prof. Hassan Farghali
ศึกษาเกี่ยวกับการพัฒนาวิธีการศึกษาพยาธิกำเนิดไวรัสเดงกีในเซลล์ดัดที่เพาะเลี้ยงแบบสามมิติ

Available online at www.ptat.thaigov.net

Overview of Dengue Viruses and Their Relations

Natthanej Luplertlop

Department of Tropical Hygiene, Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand

Abstract

Dengue virus (DENV) is one of the most important mosquito-borne diseases. It belongs to the genus *Flavivirus* of the family *Flaviviridae* and is a small enveloped, positive single-stranded RNA virus. Dengue virus comprise four distinct serotypes, DEN-1 through DEN-4, which are transmitted from infected to healthy humans through bites of female *Aedes aegypti* and *A. albopictus*. Dengue infection is a major cause of morbidity and mortality in tropical and subtropical countries. Over 2.5 billion people are at risk of dengue infection, and about 100 million cases of dengue fever occur annually. Up to 500,000 of these develop dengue hemorrhagic fever (DHF) or dengue shock syndrome (DSS), the life-threatening forms of infection. At present, no proven vaccine is available for all 4 dengue serotypes, nor specific antiviral drugs to treat infection. Studies of the viral structure, clinical presentation and classification, basic to advanced diagnostic tools, and primary treatments, are necessary for effective disease prevention and control. This review summarizes current basic knowledge of dengue virus infection, based on clinical and laboratory studies. This overview of dengue virus infection should be useful for developing disease control programs and further research.

Keywords: dengue, pathogenesis, diagnosis, treatment, vaccine, review

ความสำคัญของไข้เลือดออกเดงกี (Dengue Hemorrhagic Fever) และไวรัสเดงกี (Dengue Virus)

โรคไข้เลือดออกเดงกี จัดเป็นโรคที่มีผลกระทบต่อสุขภาพของประชาชนเพิ่มมากขึ้นทุกปีโดยเฉพาะประชากรผู้อาศัยอยู่ในประเทศในแถบเขตร้อน-ร้อนชื้น (พื้นที่ส่วนใหญ่ที่พบรายงานผู้ติดเชื้อไวรัสเดงกีจะอยู่ระหว่างเส้นรุ้งที่ 25 องศาเหนือถึง 25 องศาใต้) [1]

การติดเชื้อไวรัสเดงกีนั้น สามารถก่อให้เกิดอาการหรือความผิดปกติ ซึ่งสามารถจำแนกตามความรุนแรงออกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ [2] คือ

1. **Asymptomatic** กลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสแต่ไม่มีอาการ พบได้ประมาณ 90% ของผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสเดงกี

2. **Symptomatic** กลุ่มผู้ป่วยกลุ่มนี้จะมีอาการหรืออาการแสดงที่ทำให้สงสัยว่ามีการติดเชื้อของโรคไข้เลือดออกเดงกี ซึ่งจะพบได้ไม่เกิน 5% ของผู้ติดเชื้อไวรัสเดงกี โดยกลุ่มผู้ป่วยที่แสดงอาการหรือความรุนแรงของโรคนั้นสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่ม คือ

2.1 **Undifferentiated fever (UF)** ผู้ป่วยกลุ่มนี้จะมีลักษณะอาการเหมือนการติดเชื้อไวรัสทั่วๆ ไป ลักษณะคล้ายโรคหวัดแต่อาการคัดแน่นจมูกนำมูกไหลจะพบได้ไม่มากนัก แต่จะมีลักษณะอาการของไข้สูง ซึ่งจะพบได้ประมาณ 2-3 วัน ปวดเมื่อยตามร่างกาย ผู้ป่วยกลุ่มนี้อาการต่างๆ มักจะหายไปได้เอง

2.2 **Dengue fever (DF)** กลุ่มผู้ป่วยกลุ่มนี้จะมีอาการไข้สูง โดยลักษณะของไข้สูงอาจมีการลดต่ำลงแล้วกลับมาสูงขึ้นอีกครั้ง ร่วมกับอาการปวดศีรษะ ปวดกระบอกตา ปวดกล้ามเนื้อต่างๆ ตามร่างกาย บาง

Correspondence:

Natthanej Luplertlop,

E-mail: tmnll@mahidol.ac.th

ครั้งมีอาการปวดลึกถึงกระดูกและข้อ (บางครั้งจึงมีการเรียกโรคไข้เลือดออกเดงกีว่า Break bone fever) นอกจากนั้นอาจพบผื่นในลักษณะของ maculopapular ซึ่งผื่นผิวหนังชนิดนี้มักจะพบในผู้ใหญ่มากกว่าในเด็ก บางครั้งอาจพบจุดเลือดออกตามผิวหนัง เมื่อทำการทดสอบด้วยทูร์นิเก้ (Tourniquet test) จะให้ผลบวก

2.3 Dengue hemorrhagic fever (DHF) ผู้ป่วยกลุ่มนี้จะมีลักษณะอาการที่ชัดเจน คือ ไข้สูงลอยร่วมกับมีอาการเลือดออก ตับโต เมื่อตรวจทางห้องปฏิบัติการจะพบว่าปริมาณเกร็ดเลือดลดลงต่ำลง ถ้าเป็นรุนแรงจะพบลักษณะอาการที่บ่งชี้ว่ามีการรั่วของพลาสมาออกนอกเส้นเลือด โดยส่วนมากจะไปอยู่ในช่องปอดและช่องท้อง ถ้าตรวจทางห้องปฏิบัติการจะพบว่ามีการตีบอัดเม็ดเลือดเพิ่มขึ้น ซึ่งถ้าการรั่วนี้มีความรุนแรงมากบางครั้งจะส่งผลให้ผู้ป่วยเกิดภาวะช็อก เรียกกลุ่มผู้ป่วยนี้ว่า Dengue shock syndrome (DSS) ถ้าผู้ป่วยได้รับการรักษาไม่ทันจะเป็นอันตรายถึงตายได้ [2]

จากการศึกษาทางระบาดวิทยาพบว่า ประชากรอย่างน้อยประมาณ 1 ใน 100 คนของประชากรทั้งหมดมีประวัติของการติดเชื้อไวรัสไข้เลือดออก [2] มีรายงานการระบาดของเชื้อไวรัสเดงกีพบว่าประชากรหลายสิบล้านคนต่อปีทั่วโลกที่ป่วยด้วยโรค Dengue fever และยังมีประชากรมากกว่า 500,000 คนที่ป่วยรุนแรงถึงขั้นเสี่ยงต่อการเสียชีวิตด้วย Dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome (DHF/DSS) [2]

สำหรับประวัติความเป็นมาของเชื้อไวรัสไข้เลือดออกพบว่ามีรายงานครั้งแรกในปี พ.ศ. 2322 พบการระบาดของ DF ในประเทศภูมิภาคเอเชีย แอฟริกา และอเมริกาเหนือ โดยยังไม่มีรายงานผู้เสียชีวิตจากโรคไข้เลือดออกเดงกี จนกระทั่งหลังสงครามโลกครั้งที่ 2 พบการระบาดของ DHF เป็นครั้งแรกที่ประเทศฟิลิปปินส์ในปี พ.ศ. 2497 สำหรับการระบาดในประเทศไทยพบครั้งแรกในปี พ.ศ. 2501 จากนั้นจึงมีการระบาดไปยังประเทศต่างๆ ที่อยู่ใกล้เคียงของทวีปเอเชียและกระจายสู่ประเทศต่างๆ ทั่วโลก โดยพบอุบัติการณ์ของการระบาดเพิ่มขึ้นกว่า 500 เท่าภายในระยะเวลาย้อนหลังไป 50 ปี ทำให้มีการตรวจพบผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกเดงกีมากกว่า 100 ประเทศทั่วโลกภายหลังปี พ.ศ. 2532 [2] มีการศึกษาการระบาดของไวรัสเดงกีย้อนหลังไปทุกๆ สามปีเป็นเวลา 15 ปีโดยใช้หลักการทางคณิตศาสตร์เป็นแม่แบบเพื่อทำการเปรียบเทียบการแพร่กระจายของไข้เลือดออกเดงกีกับลักษณะและการแพร่กระจายของยุงพาหะ พบว่ามีความสัมพันธ์กับการระบาดของไวรัสเดงกี คือเชื้อไวรัสเดงกีจะแพร่กระจายสู่พื้นที่ใกล้เคียงด้วยอัตราการกระจายของโรคในแต่ละเดือนประมาณ 148 กิโลเมตร [1,2]

คุณลักษณะทางชีวภาพของเชื้อไวรัสเดงกี

เชื้อไวรัสเดงกี เป็นตัวก่อโรคชนิดที่ปรากฏขึ้นใหม่และมีภาวะระบาดซ้ำ (Emerging and re-emerging disease) จัดอยู่ใน Family Flaviviridae, Genus *Flavivirus* ซึ่งเป็นกลุ่มไวรัสกลุ่มใหญ่ที่เป็นสาเหตุการตายของทั้งคนและสัตว์ ไวรัสกลุ่ม Family Flaviviridae [3,4] นี้สามารถแบ่งย่อยออกได้ตามชนิดของพาหะเป็น 3 ชนิดใหญ่ๆ [3-5] คือ

1. กลุ่มไวรัสที่มียุงเป็นพาหะนำโรค (Mosquito-borne viruses) เช่น Dengue virus, West Nile virus, Yellow fever virus, Japanese encephalitis virus เป็นต้น

2. กลุ่มไวรัสที่มีเห็บเป็นพาหะนำโรค (Tick-borne viruses) เช่น Powassan virus, Kyasanur Forest disease virus

3. กลุ่มที่ไม่สามารถระบุพาหะนำโรคได้ (Viruses with no known arthropod vector) เช่น Dakar bat virus

เชื้อไวรัสเดงกีจัดอยู่ในกลุ่มไวรัสที่นำโดยยุง ซึ่งยุงที่เป็นพาหะของไวรัสเดงกี คือ *Aedes* spp. ที่พบว่าเป็นพาหะหลักคือ *Ae. aegypti*, *Ae. scutellaris* และ *Ae. albopictus* [1-3]

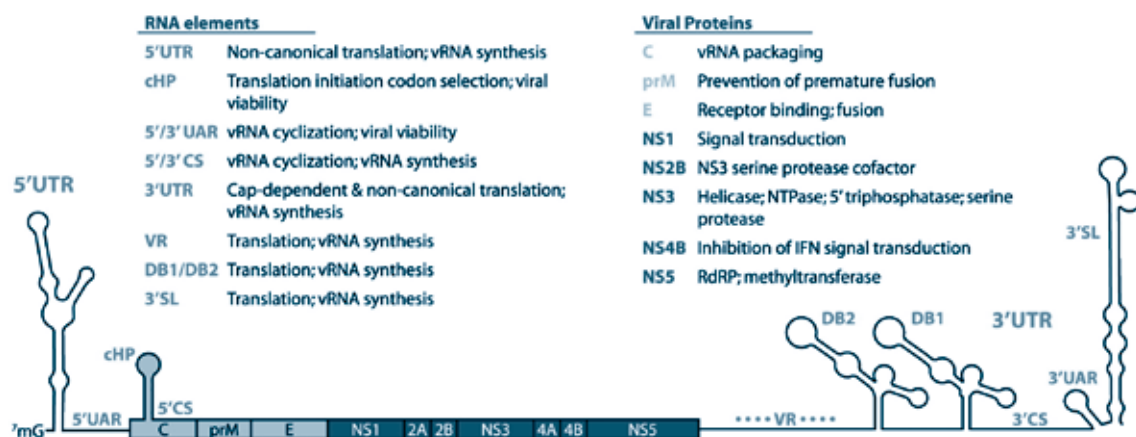
เชื้อไวรัสเดงกีมีสายพันธุกรรมเป็น RNA ชนิดสายเดี่ยวแบบสายตรงชนิดบวก (Linear, positive single-stranded RNA) ไวรัสเดงกีมีอนุภาครูปทรงกลม มีส่วนเปลือกหุ้ม (Envelope-protein) มีขนาดของอนุภาคไวรัสประมาณ 50 nm สามารถแบ่งชนิดของเชื้อไวรัสเดงกีเป็น 4 ชนิด คือ Dengue-1, 2, 3 และ 4 โดยโครงสร้างของไวรัสเดงกีทั้ง 4 ชนิดนี้คล้ายกัน ซึ่งจะประกอบไปด้วยสาย RNA ยาวประมาณ 10.7 Kb (Dengue-2 ยาวที่สุด ประมาณ 10.723 Kb และ Dengue-4 สั้นที่สุด ประมาณ 10.644 Kb) โครงสร้างของไวรัสไข้เลือดออกสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ส่วนหลักๆ [2-3] คือ

1. Structural proteins ประกอบไปด้วย Capsid (C), Pre-membrane/Membrane (PrM/M) และ Envelope (E) protein

2. Non-structural proteins (NS) ประกอบไปด้วย NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B และ NS5

3. Untranslated region (UTR) ประกอบไปด้วย 5' UTR และ 3' UTR

ไวรัสเดงกีมี open reading frame ของยีนส์ (genes) ที่กำหนดและควบคุมการสร้างโปรตีนต่างๆ ที่เป็นส่วนประกอบสำคัญของตัวไวรัส และเนื่องจากไวรัสนี้เป็น RNA virus ชนิดสายเดี่ยวแบบสายตรงชนิดบวกดังกล่าวข้างต้น สาย RNA นี้จึงทำหน้าที่เป็น mRNA ในการสร้างโปรตีนได้โดยตรง ดังนั้นเมื่อไวรัสเดงกีเข้าสู่เซลล์ RNA ของไวรัสจะกำหนดการสร้างโปรตีนที่สำคัญ เพื่อประกอบกันเป็นไวรัสตัวใหม่ ทำให้ไวรัสเดงกีเพิ่มจำนวนขึ้นในเซลล์นั้น โดยคุณสมบัติและหน้าที่ของส่วนประกอบในโครงสร้างของเชื้อไวรัสเดงกีทั้งในส่วน RNA และ โปรตีน สรุปได้ดังรูปที่ 1



รูปที่ 1 โครงสร้างและหน้าที่หลักของโปรตีนและ RNA ของไวรัสเดงกี (ได้รับอนุญาตจาก American Society for Microbiology) [5]

ตารางที่ 1 ความสัมพันธ์ระหว่าง Receptors กับเซลล์เป้าหมายของเชื้อไวรัสเดงกี

Receptors	Target cells	Reference
Heparan sulfate	Liver cells; VERO; BHK21; C636	14-16
Hsp70/ 90	Monocyte derived Macrophage; human; Neuroblastoma cells	17-18
GRP78/ BiP	Liver cells	19
37/ 67 kDa high affinity Laminin receptor	Liver cells	19-20
CD14	Monocyte derived Macrophage	21
DC-SIGN	Dendritic cells, Langerhans cells	22-24
L-SIGN	Liver cell; LN: Spleen	23-25

เซลล์เป้าหมายและการเข้าสู่เซลล์ของไวรัสเดงกี

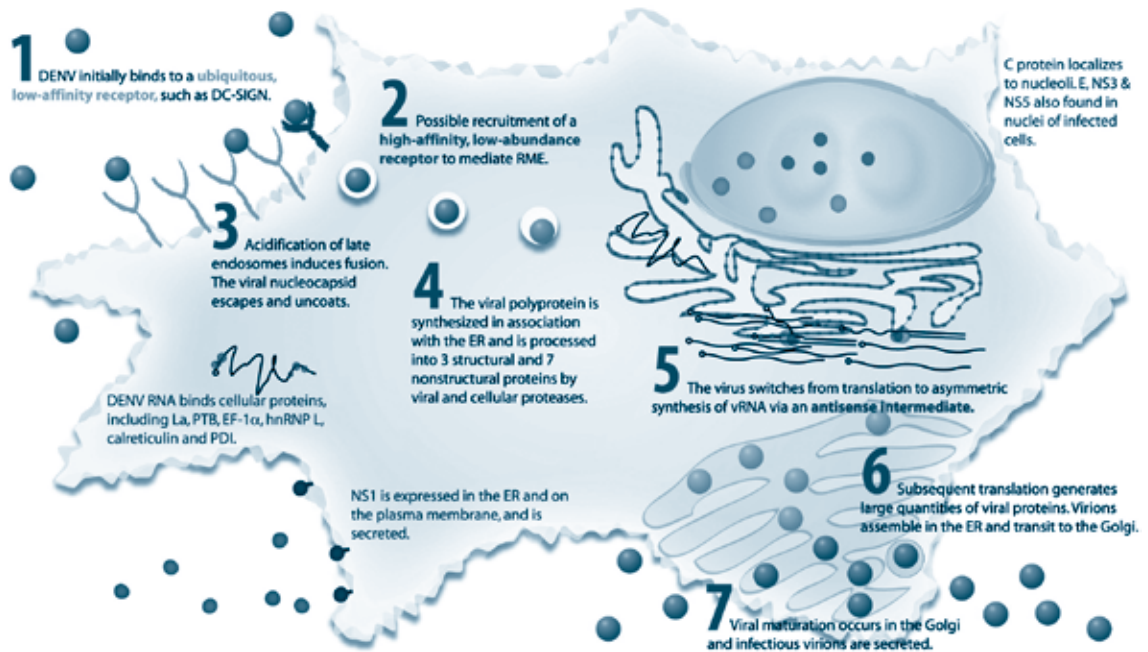
สำหรับการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสเดงกีนั้นเริ่มต้นเมื่อไวรัสเข้าสู่เซลล์เป้าหมาย (target cells) ซึ่งถ้าทำการศึกษาในห้องปฏิบัติการ (*in vitro*) เพื่อเปรียบเทียบความสัมพันธ์กับความเป็นจริงในผู้ป่วย ได้มีการศึกษาโดยใช้เซลล์หลายชนิดที่คิดว่าเป็นเซลล์เป้าหมายของไวรัสเดงกีโดยอาศัยพื้นฐานของอาการของผู้ป่วยเป็นหลักนั้น จะพบว่าเซลล์เป้าหมายของเชื้อไวรัสเดงกีนั้นมีหลายชนิด โดยแบ่งตามชนิดของเซลล์เพาะเลี้ยง คือ

1. เซลล์เพาะเลี้ยงปฐมภูมิ (Primary cell culture) ได้แก่ hepatocytes [6,7], neuron cells [7], dendritic cells [6,7], endothelial cells [7-10], monocyte/macrophage [7-10], B cell [8-11], และ T cells [8-11].

2. เซลล์เพาะเลี้ยงต่อเนื่อง (Cell lines) ได้แก่ Mosquito cells (C6/36, AP61) [13], Mammalian cells (LLC-MK2, Vero, BHK, PDK) [13], Mononuclear phagocyte lineage (Raji cells, THP-1 cells) [8-11]

3. เซลล์ที่ได้จากเนื้อเยื่อของผู้ป่วยที่เสียชีวิตโดยตรง (Autopsy study) [7,8]

วงจรชีวิตของไวรัสเดงกี เริ่มจากการที่ไวรัสเดงกีสามารถจับกับ receptors จำเพาะบนเซลล์เป้าหมาย แล้วกระตุ้นให้ไวรัสเข้าสู่เซลล์ด้วยขบวนการที่เรียกว่า Receptor-mediated endocytosis (RME) [25,26] โดยจะเกิดการสร้าง endosome ในเซลล์ซึ่งภายใน endosome มีสภาวะเป็นกรดทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ E protein (trimerization) เป็นผลให้ RNA ของไวรัสหลุดออกจาก envelop (uncoat) จากนั้น RNA ของไวรัสจะเริ่มสร้างโปรตีนต่างๆ (translation) ที่บริเวณ ER-derived membrane และจะหยุดสร้างโปรตีนเมื่อมีการสร้างสาย RNA ของไวรัส (replication) โปรตีนและสาย RNA ที่สร้างขึ้นจะประกอบตัวกัน (assembly) ที่ Endoplasmic reticulum (ER) แล้วเคลื่อนต่อไปที่ Golgi compartment เพื่อให้การประกอบตัวสมบูรณ์และไวรัสมีสภาพเป็นตัวเต็มวัย (mature form) แล้ว



รูปที่ 2 วงจรชีวิตของการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสเดงกี (ได้รับอนุญาตจาก American Society for Microbiology) [5]

เซลล์เป้าหมายนี้จะปล่อยไวรัสที่เกิดใหม่และมีความสมบูรณ์ออกจากเซลล์เดิมกระจายไปสู่เซลล์ใหม่เซลล์อื่นๆ ต่อไป (รูปที่ 2, ที่มาของรูปจากเอกสารอ้างอิงหมายเลข 5) [25-27]

พยาธิกำเนิดโรคไข้เลือดออกเดงกี

โรคไข้เลือดออกเดงกี เป็นโรคที่มีอุบัติการณ์การเสียชีวิตเพิ่มมากขึ้นทุกปี การติดเชื้อไวรัสต่างๆ ไปนั้น ระบบภูมิคุ้มกันภายในร่างกายมนุษย์จะสามารถยับยั้งหรือลดการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสเมื่อมีการติดเชื้อซ้ำในครั้งที่สอง แต่โรคไข้เลือดออกเดงกีจะแตกต่างจากเชื้อไวรัสอื่นๆ ตรงที่การติดเชื้อของไวรัสเดงกีในครั้งแรกผู้ป่วยอาจไม่แสดงอาการใดๆ หรืออาจมีอาการเหมือนการติดเชื้อไวรัสต่างๆ ไป ในขณะที่จะพบไข้เลือดออกเดงกีชนิดรุนแรง (DHF/DSS) เมื่อมีการติดเชื้อซ้ำ โดยจะพบได้ประมาณ 15-80 เท่า อันเป็นผลมาจากการที่ระบบภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัสชนิดนี้ไม่สามารถยับยั้ง (neutralize) เชื้อไวรัสได้ แต่กลับไปส่งเสริมให้มีการเข้าสู่เซลล์และเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสเดงกีภายในเซลล์เป้าหมาย เรียกลักษณะดังกล่าวนี้ว่า Antibody dependent enhancement (ADE) [28-31] คุณสมบัติ ADE นั้นจัดว่าเป็นส่วนสำคัญหนึ่งในการศึกษาถึงพยาธิกำเนิดของโรคไข้เลือดออกเดงกี

สำหรับการติดเชื้อไวรัสเดงกีนั้นไม่ได้ก่อให้เกิดโรคไข้เลือดออกเดงกีชนิดรุนแรงทุกครั้ง ทั้งนี้เนื่องมาจากปัจจัยที่มีผลต่อการก่อให้เกิดความรุนแรงของโรคไข้เลือดออกเดงกีนั้น สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ปัจจัยหลักคือ

1. ปัจจัยพลจากเชื้อไวรัส
สำหรับสาเหตุอันเนื่องมาจากเชื้อไวรัสเดงกีต่อความรุนแรงของโรคไข้เลือดออกเดงกีนั้นเกิดจาก
 - 1.1 จำนวนของไวรัส (Viral load effect) พบว่าปริมาณของไวรัสนั้นมีผลกระทบต่อเซลล์เป้าหมายโดยตรงสืบเนื่องมาจากปริมาณของไวรัสที่มาก ทำให้สามารถติดเชื้อต่อเซลล์เป้าหมายได้มาก จึงส่งผลให้มีการแสดงความผิดปกติออกมาได้ชัดเจนขึ้น [31-34]
 - 1.2 สายพันธุ์ของไวรัส (Viral strain) มีข้อมูลทางระบาดวิทยาพบว่า สายพันธุ์ของไวรัสที่ก่อโรคในภูมิภาคเอเชีย โดยเฉพาะภูมิภาคเอเชียอาคเนย์นั้นสามารถก่อให้เกิดความรุนแรงของโรคได้มากกว่าสายพันธุ์อเมริกา [35-38]
2. ปัจจัยพลจากผู้รับเชื้อ
สำหรับสาเหตุอันเนื่องมาจากผู้รับเชื้อต่อความรุนแรงของโรคไข้เลือดออกเดงกีนั้นเกิดจาก
 - 2.1 ปัจจัยส่วนบุคคล [39] ซึ่งได้แก่
 - 2.1.1 อายุ พบว่าความรุนแรงของโรคในเด็กนั้นจะรุนแรงกว่าในผู้ใหญ่
 - 2.1.2 เพศ พบว่าความรุนแรงมักจะเกิดในเพศหญิงมากกว่าเพศชาย
 - 2.1.3 ภาวะโภชนาการ พบว่าผู้ที่มีภาวะโภชนาการที่ดีมักเกิดความรุนแรงมากกว่าผู้ป่วยทุพโภชนาการ

2.1.4 เชื้อชาติ จะพบว่าผู้ป่วยที่เป็นผิวเหลืองจะมี ความรุนแรงมากกว่าผิวดำ

2.1.5 พันธุกรรม จะพบว่าผู้ที่มียีนส์ของ HLA class I จะมีความสัมพันธ์กับความรุนแรงของโรคไข้ เลือดออกเดงกี

2.2 บทบาทของภูมิคุ้มกัน [24,40-43] จากการศึกษา ความสัมพันธ์ของความรุนแรงของโรคไข้เลือดออกเดงกีกับ ระบบภูมิคุ้มกันนั้นสามารถแบ่งย่อยออกได้เป็น

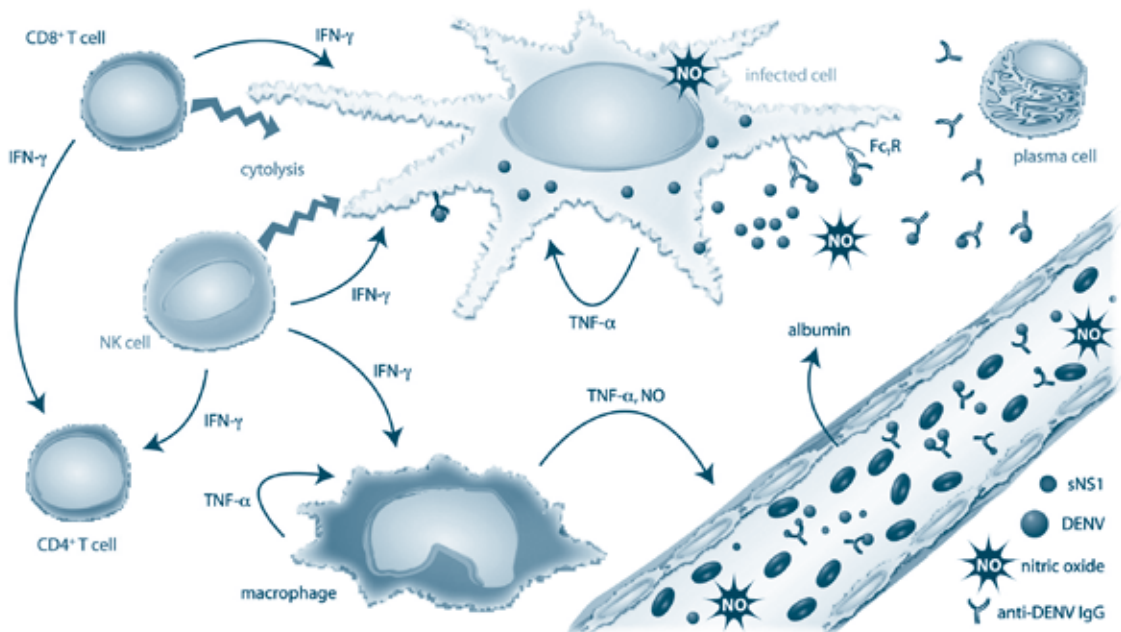
2.2.1 Antibody/ Humoral immunity ซึ่งสามารถ แบ่งเป็น 2 ชนิดย่อยๆ คือ

- 1) ชนิดที่สามารถลดหรือทำลายฤทธิ์ของ ไวรัสได้ (Neutralizing antibody) โดย เริ่มต้นจากการที่ไวรัสติดเซลล์เป้าหมาย แล้วมีการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันชนิด innate immune response ส่งผลให้มีการกระตุ้นการสร้างสาร cytokines และ chemokines ต่างๆ ไปยับยั้งการเพิ่ม จำนวนของไวรัส ในขณะเดียวกันสารดังกล่าวยังสามารถกระตุ้น T-cells ให้มีการ หลั่ง cytokines จำเพาะและกระตุ้น ระบบ complements ทำให้เกิดการ ทำลายฤทธิ์ของไวรัส ซึ่งส่วนมากมักจะ พบในการติดเชื้อครั้งแรก [44-46]
- 2) ชนิดที่ช่วยในการติดเชื้อและเพิ่มจำนวน ในเซลล์เป้าหมาย (Enhancing

antibody) ชนิดนี้เป็นชนิดที่พบและ อธิบายถึงพยาธิกำเนิดของโรคไข้เลือด ออกเดงกีชนิดติดเชื้อซ้ำและก่อให้เกิด ความรุนแรงของโรค โดยเชื้อไวรัสเดงกี จะอาศัย Fc-receptor ในการชักนำเข้า เซลล์และเพิ่มจำนวนในเซลล์เป้าหมาย ต่อไป [29-31]

2.2.2 Cellular immunity

สำหรับระบบภูมิคุ้มกันชนิดนี้จะเน้นในส่วนของความ สัมพันธ์ระหว่าง T-cell, B-cell และ Cytokines โดยมีการ ศึกษาความสัมพันธ์กับพยาธิกำเนิดของไข้เลือดออกเดงกีพบว่า ความสามารถของ T-cells ต่อการยับยั้งการติดเชื้อของไวรัส เดงกีในครั้งที่สองที่ต่างชนิดไปจากครั้งแรกนั้นเกิดขึ้นได้ไม่ สมบูรณ์ ส่งผลให้การกำจัดไวรัสออกจากร่างกายด้วยระบบ ภูมิคุ้มกันนั้นทำได้ลดลงอีก แต่กลับส่งผลให้เกิดการหลั่ง cytokines เพิ่มมากขึ้น เซลล์เป้าหมายแรกของเชื้อไวรัสเดงกี คือ Monocyte/Macrophage และ Dendritic cells พบว่าถ้า มีการติดเชื้อในครั้งที่สองนั้นจะมีการกระตุ้นให้มีการหลั่ง cytokine ชนิด $\text{TNF-}\alpha$ ร่วมกับอนุมูลอิสระ (Nitric oxide) ซึ่งมีผลกระทบโดยตรงกับเยื่อผนังเส้นเลือด โดยมีการศึกษา เปรียบเทียบระหว่างในห้องปฏิบัติการและในเลือดผู้ป่วยไข้เลือด ออกเดงกีชนิด DF เปรียบเทียบกับ DHF พบว่านอกเหนือจาก $\text{TNF-}\alpha$ แล้วยังมี cytokines อื่นๆ ที่มีผลทำให้เกิดความ รุนแรงของโรคไข้เลือดออกเดงกีได้อีก คือ IL-6, IL-8 และ IL-10 พบว่า cytokines ต่างๆ ที่ส่งผลให้เกิดความรุนแรงนั้น



รูปที่ 3 พยาธิสรีรวิทยาของไข้เลือดออกเดงกี (ได้รับอนุญาตจาก American Society for Microbiology) [5]

จะจัดอยู่ในกลุ่มของ Th-2 cytokines มากกว่า Th-1 cytokines (รูปที่ 3, ที่มาของรูปจากเอกสารอ้างอิงหมายเลข 5) [5,47-50] ซึ่ง cytokines ต่างๆ เหล่านี้จะส่งผลกระทบต่อเยื่อผนังเส้นเลือด โดยส่งผลต่อ extracellular matrix ต่างๆ เช่น Glycosaminoglycans และ proteoglycans เป็นต้น รวมถึง cell adhesion molecules ต่างๆ เช่น Laminin, ICAM-1, PECAM, β -actin เป็นต้น [24,49,51,52] ทำให้เกิดการรั่วของพลาสมาเพิ่มมากขึ้น สำหรับการศึกษาพยาธิสรีรวิทยาของโรคไข้เลือดออกเดงกี ยังคงต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมและพัฒนาความรู้อย่างต่อเนื่อง เพื่อหาความสัมพันธ์ของเชื้อไวรัสเดงกีและพยาธิกำเนิดที่จำเพาะเจาะจงและชัดเจนมากขึ้น ทั้งนี้เพื่อใช้เป็นแนวทางในการพัฒนารักษาและวัคซีนป้องกันไวรัสเดงกีที่มีประสิทธิภาพสูงสุดต่อไป

นอกจาก cytokines ดังกล่าวข้างต้น มีรายงานที่แสดงถึงความสัมพันธ์ของโรคไข้เลือดออกเดงกีชนิดรุนแรง (ในผู้ป่วย DHF/DSS) กับองค์ประกอบอื่นๆ อีก เช่น

- 1) พบว่ามีอัตราส่วนของ CD4:CD8 ลดลง (CD4:CD8 < 1) [53]
- 2) มีการกระตุ้น Human cytotoxic factor เพิ่มมากขึ้น [49,50]
- 3) มีการตรวจพบระดับของ MMP-9 เพิ่มมากขึ้น (จากการตรวจสอบทางห้องปฏิบัติการ) [51,52]
- 4) พบระดับของ cytokines บางชนิดลดลง เช่น IL-12 [49,50]
- 5) พบระดับของ cytokines บางชนิดเพิ่มขึ้น เช่น IL-18, IL-4, IL-13, IFN- γ , TGF- β เป็นต้น [49-52]

การตรวจวินิจฉัยในห้องปฏิบัติการ

จะเห็นว่าโรคไข้เลือดออกเดงกีนั้นมีความรุนแรงและมีการระบาดเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ แต่ยังไม่มียาที่ใช้ในการรักษาที่จำเพาะเจาะจง ดังนั้นการจะลดอุบัติการณ์ของการเสียชีวิตจากเชื้อไวรัสเดงกี จึงต้องอาศัยแพทย์ผู้มีความรู้ความสามารถในการวินิจฉัยจากอาการและอาการแสดงของผู้ป่วย ร่วมกับการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการที่แม่นยำและรวดเร็ว ซึ่งจะทำให้แพทย์ผู้ทำการรักษาทราบสาเหตุของโรคได้อย่างถูกต้อง ส่งผลต่อการรักษาที่รวดเร็ว ร่วมกับการเฝ้าระวังอาการ (treatment monitoring) รวมถึงการเฝ้าระวังโรค (surveillance) ที่มีประสิทธิภาพต่อไป

การตรวจวินิจฉัยไข้เลือดออกเดงกีในห้องปฏิบัติการนั้นสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ชนิดหลักๆ คือ

1. การตรวจหาเชื้อไวรัสเดงกี (Viral identification) แบ่งออกเป็น 2 ชนิด ดังนี้

1.1 การตรวจเพาะเลี้ยงแยกเชื้อไวรัส (Viral isolation) วิธีนี้ใช้ระยะเวลานานมากกว่า 1-2 สัปดาห์จึงจะทราบผล (แต่ใช้วิธีการตรวจสอบที่เลือกใช้) ซึ่งวิธีที่นิยมใช้ในปัจจุบัน คือ

- 1.1.1 Intracerebral inoculation โดยการนำ

ตัวอย่างตรวจที่ได้ฉีดเข้าสมองหนูแรกเกิดแล้วแยกไวรัสเพื่อตรวจสอบหรือดูพยาธิสภาพของหนูภายหลังการฉีดตัวอย่าง ว่ามีการเปลี่ยนแปลงของพัฒนาการของหนูแรกเกิด การเกิดภาวะอัมพาต (paralysis) หรือการตายของหนูแรกเกิดช้าเร็วต่างกันอย่างไรเมื่อเทียบกับกลุ่มตัวอย่างควบคุม (ใช้ระยะเวลาประมาณ 1-3 สัปดาห์) [55]

- 1.1.2 Mammalian and mosquito cell culture เป็นการนำตัวอย่างตรวจที่ได้ไปเพาะเลี้ยงในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด mammalian cell lines (เช่น LLC-MK2, Vero, BHK, PDK, HepG2 cells เป็นต้น) [13,55,56] หรือ mosquito cell line (C6/36, AP61 cells) [13] โดยจะศึกษาถึงการเปลี่ยนแปลงของ cytoplasm ของเซลล์เมื่อเกิดพยาธิสภาพ ที่เรียกว่า Cytopathic effect (CPE) พบว่าลักษณะของ CPE ในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด mammalian cells มักจะเป็นในลักษณะ lysis หรือ cell swelling แต่สำหรับในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด mosquito cell line มักจะไม่ค่อยพบ CPE แต่ถ้าพบในบางตัวอย่างมักจะเป็นลักษณะ syncytium นอกจากการตรวจหา CPE แล้ววิธีการนี้ยังหวังผลในการเพิ่มปริมาณไวรัสจากตัวอย่างตรวจ เพื่อนำไปศึกษาเรื่องอื่นๆ ต่อไป (ใช้ระยะเวลาประมาณ 1-3 สัปดาห์)

- 1.1.3 Mosquito inoculation วิธีนี้เป็นการนำตัวอย่างตรวจเข้าสู่ยุง โดยมีวัตถุประสงค์หลักคือเพิ่มปริมาณของไวรัสที่ได้จากตัวอย่างตรวจเพื่อนำไปทำการศึกษาเรื่องอื่นๆ ต่อไป อีกทั้งสามารถตรวจสอบพยาธิสภาพที่เกิดภายในตัวยุงหลังจากนำตัวอย่างตรวจเข้าสู่ตัวยุง โดยยุงที่นิยมนำมาใช้คือ ยุงลาย (*Aedes* spp) หรือ ยุงยัก (*Toxorhynchites* spp) (ใช้ระยะเวลาประมาณ 1-2 สัปดาห์) [56]

1.2 การตรวจสอบหา RNA ของไวรัส

เป็นวิธีที่นิยมมากขึ้นในปัจจุบัน ทั้งนี้เพราะสามารถตรวจสอบได้อย่างรวดเร็วและมีความแม่นยำสูง สำหรับการเลือกตำแหน่งจำเพาะในไวรัสเดงกีเพื่อตรวจสอบด้วยวิธีการหา RNA ของไวรัสสามารถทำได้ทุกตำแหน่งในโครงสร้างของไวรัส แต่ที่นิยมและมีการศึกษากันอย่างกว้างขวางในปัจจุบันคือ untranslated region (5', 3' UTR) [57], Capsid protein (C) [58], envelope protein (E) [59], nonstructural protein-1 (NS1) [60], nonstructural protein-5 (NS5) [61] โดยวิธีที่นิยมใช้มากในปัจจุบันคือ

1.2.1 Nucleic acid hybridization โดยการนำตัวอย่างที่ได้ไป hybridized ด้วย biotinylated probe หรือ ^{32}P -labeled probe แล้วทำการตรวจสอบหาไวรัสจากตัวอย่าง นิยมใช้ตรวจสอบตัวอย่างที่เป็นเนื้อเยื่อมากกว่าตัวอย่างที่เป็นสารน้ำ [62]

1.2.2 Polymerase chain reaction ที่นิยมใช้กับการตรวจวินิจฉัยไข้เลือดออกเดงก็คือ Reverse transcriptase PCR (RT-PCR) เพื่อตรวจสอบว่าตัวอย่างตรวจมีการติดเชื้อไวรัสเดงก็หรือไม่ (Viral identification) และมีการใช้ร่วมกับ Nested-PCR เพื่อระบุชนิดของเชื้อไวรัสเดงก็ (Viral serotyping) วิธีการนี้จะต้องออกแบบ primers ซึ่งจำเพาะเจาะจงกับยีนส์ (gene) ที่สนใจศึกษา (กรณีที่ต้องการตรวจสอบจำเพาะเจาะจงแต่ละโปรตีนในโครงสร้างของไวรัสเดงก็) [63,64] หรืออาจใช้ universal primer สำหรับตรวจสอบชนิดของเชื้อไวรัสเดงก็ [64] โดยพบว่าวิธีนี้สามารถได้ผลการตรวจสอบไม่เกิน 2-6 ชั่วโมง ข้อจำกัดของวิธี PCR คือ สารที่ใช้ตรวจสอบและเครื่องมือยังมีราคาสูง นอกจากนี้ยังมีการพัฒนาวิธีตรวจสอบที่มีความจำเพาะสูงสามารถตรวจสอบได้ในตัวอย่างที่มีปริมาณไวรัสน้อยมากๆ ได้ ภายใต้หลักการของ PCR คือ Single tube multiplex RT-PCR ทั้งนี้เพื่อเพิ่มความแม่นยำ ลดปริมาณค่าใช้จ่ายและระยะเวลาของการตรวจสอบ วิธีดังกล่าวอยู่ในช่วงพัฒนาและนิยมใช้ในการศึกษาวิจัยมากกว่าการวินิจฉัยโรคไข้เลือดออกเดงก็ [65]

1.2.3 Real-time PCR วิธีนี้มีการพัฒนาเพื่อใช้ในการตรวจวินิจฉัยเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ ทั้งนี้เนื่องมาจากความรวดเร็วและความจำเพาะต่อไวรัสสูง และสามารถได้ผลการตรวจสอบที่รวดเร็วภายในระยะเวลาไม่เกิน 1 ชั่วโมง แต่วิธีนี้เหมาะสำหรับงานวิจัยมากกว่างานวินิจฉัย ทั้งนี้เนื่องมาจากราคาของการตรวจสอบวิธีนี้ยังคงสูงอยู่ [66-68]

2. การตรวจหา Antibody ของผู้ป่วย

สามารถทราบผลได้แตกต่างกันไปแล้วแต่ชนิดของวิธีการตรวจสอบ คือ ตั้งแต่ภายใน 24 ชั่วโมงจนถึงหลายสัปดาห์ วิธีที่นิยมใช้อยู่ในปัจจุบัน คือ

2.1 Rapid test เป็นการตรวจหา IgM และ IgG ต่อไวรัสเดงก็ในตัวอย่างตรวจ โดยหลักการของวิธีนี้จะเป็นการเคลือบ antigen ต่อโปรตีนในไวรัสเดงก็บนแผ่นตรวจสอบเมื่อต้องการตรวจสอบตัวอย่างตรวจ ทำได้โดยการนำตัวอย่างตรวจ

มาหยดลงบนแผ่นตรวจสอบ รอตามระยะเวลาที่กำหนด จะปรากฏแถบสีให้เห็น ซึ่งใช้เวลาเฉลี่ยไม่เกิน 15 นาที ซึ่งโปรตีนที่ใช้ในปัจจุบันคือ nonstructural protein-1 (NS1) สำหรับวิธีนี้สามารถตรวจสอบได้รวดเร็ว แต่มีความผิดพลาดค่อนข้างสูงเนื่องจากการเกิด cross reaction ระหว่างกลุ่มตัวอย่างตรวจได้ ในปัจจุบันมีการพัฒนาทำให้การตรวจสอบวิธีนี้มี ความจำเพาะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ (ใช้ระยะเวลาประมาณ 15-30 นาที) [69]

2.2 Plaque assay and plaque neutralization assay เป็นวิธีที่ใช้ตรวจสอบหาชนิดของไวรัสเดงก็ที่ได้จากตัวอย่าง โดยอาศัยหลักการของ mammalian cell culture ร่วมกับ Antigen-antibody complex (ใช้ระยะเวลาประมาณ 2-3 สัปดาห์) [70,71]

2.3 Hemagglutination inhibition assay เป็นการตรวจสอบโดยใช้หลักการของการเกาะกลุ่มกันระหว่างเชื้อไวรัสเดงก็กับเซลล์เม็ดเลือดแดงของสัตว์บางชนิด เช่น ห่าน (*Anser cinereus*) การตรวจสอบวิธีนี้จะพิจารณาจากการเปลี่ยนแปลงของ antibody titer ซึ่งจะต้องมีการตรวจสอบ 2 ครั้งคือ acute phase และ convalescent phase ห่างกันประมาณ 7 วัน โดยพิจารณาจากค่า convalescent antibody titer ให้ผลบวกเมื่อมีค่าสูงขึ้นมากกว่า 4 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับ acute phase และเมื่อพิจารณาค่าจำเพาะในระยะ convalescent antibody titer ถ้าน้อยกว่า 1:1,280 มักจะเป็นการติดเชื้อครั้งแรก (Primary infection) แต่ถ้ามีค่ามากกว่า 1:2,560 มักจะเป็นการติดเชื้อซ้ำ (Secondary infection) [72,73]

2.4 Plaque reduction neutralization assay (PRNT) เป็นการดัดแปลง cell culture ร่วมกับ Challenge virus resistant assay โดยการเจือจางตัวอย่างมาผสมกับไวรัสและดูการแสดงผลต่อการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสจาก antibody จำเพาะภายหลังการติดเชื้อไวรัสเดงก็ [70,71]

2.5 Enzyme immunosorbent assay (EIA, ELISA) ถือเป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสไข้เลือดออก โดยใช้หลักการของการตรวจสอบสัดส่วนของ immunoglobulin isotype (IgM หรือ IgG) ที่ทำปฏิกิริยาต่อ Dengue หรือ Japanese encephalitis (JE) antigen [74,75] โดยหลักการของการอ่านผลการตรวจสอบจะพิจารณาจาก

2.5.1 Ratio ของ anti-dengue IgM ต่อ anti-JE IgM เพื่อตรวจสอบว่าเป็นการติดเชื้อ Dengue virus หรือ JE virus [74,75]

- ถ้าค่าที่ได้มากกว่า 1 ถือว่าเป็นการติดเชื้อ Dengue virus
- ถ้าค่าที่ได้น้อยกว่า 1 ถือว่าเป็นการติดเชื้อ JE virus

2.5.2 แยกการติดเชื้อครั้งแรก (Primary infection) หรือเป็นการติดเชื้อซ้ำ (Secondary infection) จะพิจารณาจาก ratio ระหว่าง IgM กับ IgG [74,75]

ตารางที่ 2 วิธีการตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรัสเดงกี ความไวและเวลาที่ใช้ในการตรวจสอบ

Test	Minimum virion	Time	Reference
Viral culture/ isolation	>104 PFU	>10 days	6-13
RT/Nested-PCR	10-250 PFU	9-15 hours	63-65
Real time PCR	<10 PFU	1-2 hours	66-68
Antibody detection	>103 PFU	>1 weeks	56, 72, 74, -75

- ratio IgM : IgG มากกว่า 1.8 ถือว่าเป็นการติดเชื้อครั้งแรก (Primary infection)
- ratio IgM : IgG น้อยกว่า 1.8 ถือว่าเป็นการติดเชื้อซ้ำ (Secondary infection)

การตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสเดงกีนั้นยังมีการพัฒนาอย่างต่อเนื่อง เพื่อหาวิธีการตรวจสอบที่รวดเร็ว สะดวก และมีความแม่นยำสูง ทั้งนี้เพราะวิธีการตรวจสอบของแต่ละวิธีย่อมมีข้อจำกัดแตกต่างกันออกไป [76] ดังในตารางที่ 2

แนวทางการรักษาผู้ป่วยไข้เลือดออกเดงกี

ปัจจุบันยังไม่มียาด้านไวรัสเดงกี ดังนั้นการรักษาส่วนใหญ่จะเป็นการรักษาแบบตามอาการและประคับประคอง โดยเน้นที่การชดเชยการรั่วของพลาสมา ร่วมกับการรักษาอาการแทรกซ้อนอื่นๆ ของผู้ป่วยแต่ละราย ทั้งนี้ปัจจัยสำคัญของการรักษาผู้ป่วยไข้เลือดออกเดงกี คือการเฝ้าระวังคนไข้อย่างใกล้ชิดตลอดระยะเวลาวิกฤต ซึ่งมีระยะเวลาประมาณ 24-48 ชั่วโมงภายหลังไข้ลดหรือมีการรั่วของพลาสมา โดยมีหลักการสำคัญๆ ของการดูแลรักษาผู้ป่วยไข้เลือดออกเดงกี [77,78] คือ

- วินิจฉัยอย่างรวดเร็วและถูกต้องให้ได้ว่าผู้ป่วยเป็นไข้เลือดออกเดงกีก่อนเข้าระยะวิกฤต
- ให้สารน้ำชดเชยเท่าที่จำเป็นเมื่อมีการรั่วของพลาสมา
- เฝ้าระวังภาวะเลือดออกภายในหรือการให้สารน้ำมากเกินไป
- หลีกเลี่ยงการใช้ยาที่ไม่จำเป็นทุกชนิด
- หลีกเลี่ยงการรักษาที่เป็น invasive procedure

สาเหตุสำคัญของการเสียชีวิตของผู้ป่วยไข้เลือดออกเดงกี [77]

- ภาวะน้ำเกิน (Fluid overload)
- อาการช็อกนาน (Prolonged shock)
- มีเลือดออกมาก (Massive bleeding)
- อาการแทรกซ้อนด้วยการติดเชื้อชนิดอื่นร่วมกับการติดเชื้อไวรัสเดงกี

วัคซีนป้องกันไวรัสไข้เลือดออกเดงกี

การพัฒนาวัคซีนป้องกันไวรัสเดงกีนั้นเริ่มมีการพัฒนาดังแต่ปี พ.ศ. 2487 โดย Sabin และ Schlesinger [79] เริ่มต้น

จากไวรัสเดงกีชนิดที่ 1 “Hawaiian strain” โดยวิธีการเตรียมในสมองหนู เมื่อนำวัคซีนที่ได้มาทำการทดสอบในคนจำนวนน้อย พบว่าได้ผลดี มีอาการข้างเคียงเพียงเล็กน้อยแต่สามารถปลูกสร้างภูมิคุ้มกันต่อต้านเชื้อไวรัสที่ฉีดเข้าไปได้ ต่อมาได้หยุดดำเนินการเนื่องจากตรวจพบมีอาการอัมพาตของลิ้นภายหลังได้รับวัคซีน [79,80]

ต่อมาในปี พ.ศ. 2515 ทีมนักวิจัยมหาวิทยาลัยมหิดลได้พัฒนา วัคซีนโดยใช้ purified virus ที่ clone ใน animal tissue culture พบว่าไวรัสเดงกีซีโรทัยป์ที่ 1, 2 และ 4 สามารถเจริญเติบโตได้ดีใน primary dog kidney (PDK) cells แต่สำหรับไวรัสเดงกีซีโรทัยป์ 3 ต้องใช้ primary green monkey kidney (PGMK) cells หลังจากนั้นได้ทำให้ไวรัสเดงกีอ่อนกำลังในการก่อพยาธิสภาพ พบว่าไวรัสเดงกีมีความจำเพาะแตกต่างกันในการทำให้อ่อนกำลังลงในแต่ละซีโรทัยป์คือ DEN-1, 2, 3 และ 4 จะสามารถทำให้อ่อนกำลังลงได้ใน passage ที่ 43, 53, 50, และ 60 ตามลำดับ เรียกวัคซีนดังกล่าวว่า Live attenuate vaccine ในช่วงแรกนั้นวัคซีนชนิดนี้จะยังไม่สามารถควบคุมไวรัสเดงกีได้ครบทั้ง 4 ซีโรทัยป์ในการฉีดเพียงครั้งเดียว ซึ่งทีมนักวิจัยจากมหาวิทยาลัยมหิดลได้พัฒนาวัคซีนเรื่อยมาจนได้วัคซีนรวมที่สามารถครอบคลุมไวรัสได้ครบทั้ง 4 ชนิด (Live attenuate tetravalent vaccine) ในปี 2535 [81,82]

หลังจากนั้นได้มีกลุ่มนักวิจัยและพัฒนาวัคซีนป้องกันไวรัสเดงกีพยายามที่จะพัฒนาวัคซีนป้องกันไวรัสเดงกีเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ มีการนำเทคนิคทางอนุพันธุวิทยาเข้ามามีส่วนร่วมในการพัฒนาวัคซีนเพิ่มมากขึ้นได้แก่ :

1. Recombinant vaccine

วัคซีนชนิดนี้จะมีการใช้อณูพันธุวิศวกรรม (Molecular cloning) และชีวสารสนเทศ (Bioinformatics) เข้ามาร่วมในการสร้างอนุภาคไวรัสที่มีคุณลักษณะของการเป็นวัคซีนที่ดีในการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ซึ่งสามารถใช้ไวรัสเพียงชนิดเดียว หรือชนิดเดียวกันแต่ต่างซีโรทัยป์ หรือไวรัสคนละชนิดอยู่ในยีนโอมเดียวกันเรียกว่า Chimeric vaccine

วัคซีนชนิดนี้ที่อยู่ในช่วงการพัฒนาในปัจจุบันจะเป็นการนำ Live attenuated vaccine หรือ Live attenuated virus มาเป็นแกนกลางแล้วเติมส่วนของไวรัสเดงกีทั้ง 4 ซีโรทัยป์ที่

ทำให้หมดฤทธิ์ในการก่อโรคเข้าไปโดยใช้เทคโนโลยีทางพันธุวิศวกรรม หวังผลว่าวัคซีนนี้จะสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อไวรัสเดงกีได้ทั้ง 4 ซีโรทัยป์ สำหรับวัคซีนชนิดนี้เริ่มต้นศึกษาในไวรัสเดงกีซีโรทัยป์ 4 โดยการ deletion นิวคลีโอไทด์ออกไป 30 ตัว ที่ตำแหน่ง untranslated region เพื่อนำมาเป็นแกนหลักของโครงสร้างวัคซีนแล้วนำส่วน capsid, envelope และ pre-membrane จากไวรัสเดงกีซีโรทัยป์ 1-3 เข้ามาประกอบเป็นโครงสร้างวัคซีน เรียกวัคซีนชนิดนี้ว่า Chimera vaccine [83] นอกจากนั้นยังมีอีกกลุ่มนักวิจัยที่ทำการพัฒนาโดยใช้วัคซีนป้องกันไวรัสไข้เหลือง (Yellow fever) ชื่อ 17D yellow fever เป็นแกนหลักแล้วนำส่วน envelope proteins ของไวรัสเดงกีทั้งสี่โรทัยป์เข้ามาประกอบเป็นโครงสร้างวัคซีน เรียกวัคซีนชนิดนี้ว่า ChimeriVax-Den1-4 tetravalent vaccine [84]

2. Subunit vaccine

วัคซีนชนิดนี้จะทำการสร้างโปรตีนของไวรัสเดงกีด้วยเทคโนโลยีทางพันธุวิศวกรรม โดยเลือกส่วนของโปรตีนบางส่วนจากโครงสร้างของไวรัสที่สนใจและสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันได้ ที่นิยมในปัจจุบันคือ ส่วน E-protein และ NS1 [80,81,85] วัคซีนรูปแบบนี้ยังอยู่ในช่วงพัฒนาในห้องปฏิบัติการ

3. DNA vaccine

วัคซีนชนิดนี้จะมีการสร้าง plasmid ที่มียีนของไวรัสเดงกีที่คาดว่ามีส่วนต่อการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันได้ดี ซึ่งชนิดนี้จะมีผลดีกว่า Subunit vaccine สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันทั้งแบบเซลล์ (Cellular immune response) และแบบสารน้ำ (Humoral immune response) ได้ดีกว่า Subunit vaccine [85] วัคซีนรูปแบบนี้ยังอยู่ในช่วงพัฒนาในห้องปฏิบัติการ

บทสรุป

เชื้อไวรัสเดงกี จัดเป็นเชื้อไวรัสเกิดใหม่ ที่มีความสำคัญทางสาธารณสุขอย่างมาก ทั้งนี้เนื่องจากการระบาดของไวรัสเดงกีมีการแพร่กระจายไปทั่วโลก มีจำนวนผู้ป่วยเพิ่มขึ้นและเสียชีวิตจากไวรัสเดงกีมากขึ้นเรื่อยๆ แต่ยังไม่มีการรักษาที่จำเพาะเจาะจง เนื่องจากพยาธิกำเนิดที่จำเพาะของโรคไข้เลือดออกเดงกีก็ยังไม่ชัดเจนทางวิทยาศาสตร์ที่แน่ชัด พบว่าปัจจัยที่ส่งผลต่อความรุนแรงของโรคไข้เลือดออกเดงกีเกิดได้ทั้งจากตัวไวรัสเดงกีและระบบภูมิคุ้มกันของผู้ป่วย ดังนั้นการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสเดงกีที่รวดเร็วและมีประสิทธิภาพสูงจึงเป็นปัจจัยหนึ่งที่สามารถช่วยลดอัตราการเสียชีวิตของผู้ป่วยได้ ซึ่งวิธีการตรวจวินิจฉัยอาจทำได้โดยการตรวจหาเชื้อไวรัสเดงกี หรือ antibody ต่อเชื้อไวรัส ซึ่งการตรวจวินิจฉัยที่ถูกต้อง แม่นยำ รวดเร็ว จะนำไปสู่การรักษาที่เหมาะสม รวดเร็ว ส่งผลให้อัตราการเสียชีวิตของผู้ป่วยด้วยโรคไข้เลือดออกเดงกีลดลงได้ สำหรับวัคซีนป้องกันไวรัสเดงกีนั้นยังอยู่ระหว่างการพัฒนาและทดสอบความสามารถในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน การยับยั้งการเจริญเติบโตของไวรัสเดงกีทั้ง 4 ซีโรทัยป์ รวมถึงความปลอดภัยและผลข้างเคียงต่อผู้รับวัคซีน ในปัจจุบันยังไม่มี

วัคซีนที่ได้ประกาศอย่างเป็นทางการที่สามารถป้องกันไวรัสเดงกีทั้ง 4 ซีโรทัยป์

เอกสารอ้างอิง

1. Thomas SJ, Strickman D, Vaughn DW. Dengue epidemiology: virus epidemiology, ecology, and emergence. *Adv Virus Res.* 2003;61: 235-89.
2. Gubler DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin Microbiol Rev.* 1998;11:480-96.
3. Lindenbach BD, Rice CM. Molecular biology of flaviviruses. *Adv Virus Res.* 2003;59:23-61.
4. Harris E, Holden KL, Edgil D, Polacek C, Clyde K. Molecular biology of flaviviruses. *Novartis Found Symp.* 2006;277:23-39.
5. Clyde K, Kyle JL, Harris E. Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis. *J Virol.* 2006;80:11418-31.
6. Kuno G, Chang GJ, Tsuchiya KR, Karabatsos N, Cropp CB. Phylogeny of the genus *Flavivirus*. *J Virol.* 1998;72:73-83.
7. Courageot MP, Catteau A, Desprès P. Mechanisms of dengue virus-induced cell death. *Adv Virus Res.* 2003;60:157-86.
8. Kou Z, Quinn M, Chen H, Rodrigo WW, Rose RC, Schlesinger JJ, *et al.* Monocytes, but not T or B cells, are the principal target cells for dengue virus (DV) infection among human peripheral blood mononuclear cells. *J Med Virol.* 2008;80:134-46.
9. King AD, Nisalak A, Kalayanrooj S, Myint KS, Pattanapanyasat K, Nimmannitya S, *et al.* B cells are the principal circulating mononuclear cells infected by dengue virus. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1999;30:718-28.
10. Navarro-Sanchez E, Despres P, Cedillo-Barron L. Innate immune responses to dengue virus. *Arch Med Res.* 2005;36:425-35.
11. Scott RM, Nisalak A, Cheamudon U, Seridhoranakul S, Nimmannitya S. Isolation of dengue viruses from peripheral blood leukocytes of patients with hemorrhagic fever. *J Infect Dis.* 1980;141:1-6.
12. Wu SJ, Grouard-Vogel G, Sun W, Mascola JR, Brachtel E, Putvatana R, *et al.* Human skin

- Langerhans cells are targets of dengue virus infection. *Nat Med.* 2000;6:816-20.
13. Hase T, Summers PL, Eckels KH. Flavivirus entry into cultured mosquito cells and human peripheral blood monocytes. *Arch Virol.* 1989;104:129-43.
14. Germe R, Crance JM, Garin D, Guimet J, Lortat-Jacob H, Ruigrok RW, *et al.* Heparan sulfate-mediated binding of infectious dengue virus type 2 and yellow fever virus. *Virology.* 2002;292:162-8.
15. Hilgard P, Stockert R. Heparan sulfate proteoglycans initiate dengue virus infection of hepatocytes. *Hepatology.* 2000;32:1069-77.
16. Avirutnan P, Zhang L, Punyadee N, Manuyakorn A, Puttikhunt C, Kasinrerak W, *et al.* Secreted NS1 of dengue virus attaches to the surface of cells via interactions with heparan sulfate and chondroitin sulfate E. *PLoS Pathog.* 2007;3:e183.
17. Lin YL, Lei HY, Lin YS, Yeh TM, Chen SH, Liu HS. Heparin inhibits dengue-2 virus infection of five human liver cell lines. *Antivir Res.* 2002;56:93-6.
18. Cabrera-Hernandez A, Thepparit C, Suksanpaisan L, Smith DR. Dengue virus entry into liver (HepG2) cells is independent of hsp90 and hsp70. *J Med Virol.* 2007;79:386-92.
19. Jindadamrongwech S, Thepparit C, Smith DR. Identification of GRP 78 (BiP) as a liver cell expressed receptor element for dengue virus serotype 2. *Arch Virol.* 2004;149:915-27.
20. Thepparit C, Smith DR. Serotype-specific entry of dengue virus into liver cells: identification of the 37-kilodalton/67-kilodalton high-affinity laminin receptor as a dengue virus serotype 1 receptor. *J Virol.* 2004;78:12647-56.
21. Chen YC, Wang SY, King CC. Bacterial lipopolysaccharide inhibits dengue virus infection of primary human monocytes/macrophages by blockade of virus entry via a CD14-dependent mechanism. *J Virol.* 1999;73:2650-7.
22. Lozach PY, Burleigh L, Staropoli I, Navarro-Sanchez E, Harriague J, Virelizier JL, *et al.* Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing non-integrin (DC-SIGN)-mediated enhancement of dengue virus infection is independent of DC-SIGN internalization signals. *J Biol Chem.* 2005;280:23698-708.
23. Navarro-Sanchez E, Altmeyer R, Amara A, Schwartz O, Fieschi F, Virelizier JL, *et al.* Dendritic-cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin is essential for the productive infection of human dendritic cells by mosquito-cell-derived dengue viruses. *EMBO Rep.* 2003;4:723-8.
24. Tassaneetrithep B, Burgess TH, Granelli-Piperno A, Trumpfherer C, Finke J, Sun W, *et al.* DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells. *J Exp Med.* 2003;197:823-9.
25. Mosso C, Galván-Mendoza IJ, Ludert JE, Del Angel RM. Endocytic pathway followed by dengue virus to infect the mosquito cell line C6/36 HT. *Virology.* 2008;378:193-9.
26. Acosta EG, Castilla V, Damonte EB. Functional entry of dengue virus into *Aedes albopictus* mosquito cells is dependent on clathrin-mediated endocytosis. *J Gen Virol.* 2008;89(Pt 2):474-84.
27. Chaturvedi UC, Nagar R, Mathur A. Effect of dengue virus infection on Fc-receptor functions of mouse macrophages. *J Gen Virol.* 1983;64(Pt 11):2399-407.
28. Kurane I. Dengue hemorrhagic fever with special emphasis on immunopathogenesis. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2007;30:329-40.
29. Chareonsirisuthigul T, Kalayanarooj S, Ubol S. Dengue virus (DENV) antibody-dependent enhancement of infection upregulates the production of anti-inflammatory cytokines, but suppresses anti-DENV free radical and pro-inflammatory cytokine production, in THP-1 cells. *Gen Virol.* 2007;88(Pt 2):365-75.
30. Kawaguchi I, Sasaki A, Boots M. Why are dengue virus serotypes so distantly related? Enhancement and limiting serotype similarity between dengue virus strains. *Proc Biol Sci.*

- 2003;270:2241-7.
31. Morens DM. Antibody-dependent enhancement of infection and the pathogenesis of viral disease. *Clin Infect Dis*. 1994;19:500-12.
 32. Wang WK, Chao DY, Kao CL, Wu HC, Liu YC, Li CM, *et al*. High levels of plasma dengue viral load during defervescence in patients with dengue hemorrhagic fever: implications for pathogenesis. *Virology*. 2003;305:330-8.
 33. Rosen L. Dengue in Greece in 1927 and 1928 and the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever: new data and a different conclusion. *Am J Trop Med Hyg*. 1986;35:642-53.
 34. Vaughn DW, Green S, Kalayanarooj S, Innis BL, Nimmannitya S, Suntayakorn S, *et al*. Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity. *J Infect Dis*. 2000;181:2-9.
 35. Pryor MJ, Carr JM, Hocking H, Davidson AD, Li P, Wright PJ. Replication of dengue virus type 2 in human monocyte-derived macrophages: comparisons of isolates and recombinant viruses with substitutions at amino acid 390 in the envelope glycoprotein. *Am J Trop Med Hyg*. 2001;65:427-34.
 36. Rico-Hesse R, Harrison LM, Salas RA, Tovar D, Nisalak A. Origins of dengue type 2 viruses associated with increased pathogenicity in the Americas. *Virology*. 1997;230:244-51.
 37. Diaz FJ, Black WC, Farfan-Ale JA, Lorono-Pino MA, Olson KE, Beaty BJ. Dengue virus circulation and evolution in Mexico: a phylogenetic perspective. *Arch Med Res*. 2006;37:760-73.
 38. Cologna R, Rico-Hesse R. American genotype structures decrease dengue virus output from human monocytes and dendritic cells. *J Virol*. 2003;77:3929-38.
 39. Kyle JL, Harris E. Global spread and persistence of dengue. *Annu Rev Microbiol*. 2008;62:71-92.
 40. Noisakran S, Perng GC. Alternate hypothesis on the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever (DHF)/dengue shock syndrome (DSS) in dengue virus infection. *Exp Biol Med* (Maywood). 2008;233:401-8.
 41. Gould EA, Solomon T. Pathogenic flaviviruses. *Lancet*. 2008;371:500-9.
 42. Qi RF, Zhang L, Chi CW. Biological characteristics of dengue virus and potential targets for drug design. *Acta Biochim Biophys Sin* (Shanghai). 2008;40:91-101.
 43. Leong AS, Wong KT, Leong TY, Tan PH, Wannakrairot P. The pathology of dengue hemorrhagic fever. *Semin Diagn Pathol*. 2007;24:227-36.
 44. Green S, Rothman A. Immunopathological mechanisms in dengue and dengue hemorrhagic fever. *Curr Opin Infect Dis*. 2006;19:429-36.
 45. Roehrig JT. Antigenic structure of flavivirus proteins. *Adv Virus Res*. 2003;59:141-75.
 46. Wu SF, Liao CL, Lin YL, Yeh CT, Chen LK, Huang YF, *et al*. Evaluation of protective efficacy and immune mechanisms of using a non-structural protein NS1 in DNA vaccine against dengue 2 virus in mice. *Vaccine*. 2003;21:3919-29.
 47. Basu A, Chaturvedi UC. Vascular endothelium: the battlefield of dengue viruses. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2008;53:287-99.
 48. Pang T, Cardoso MJ, Guzman MG. Of cascades and perfect storms: the immunopathogenesis of dengue haemorrhagic fever-dengue shock syndrome (DHF/DSS). *Immunol Cell Biol*. 2007;85:43-5.
 49. Chaturvedi UC, Agarwal R, Elbishbishi EA, Mustafa AS. Cytokine cascade in dengue hemorrhagic fever: implications for pathogenesis. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2000;28:183-8.
 50. Lei HY, Yeh TM, Liu HS, Lin YS, Chen SH, Liu CC. Immunopathogenesis of dengue virus infection. *J Biomed Sci*. 2001;8:377-88.
 51. Luplertlop N, Missé D, Bray D, Deleuze V, Gonzalez JP, Leardkamolkarn V, *et al*. Dengue-virus-infected dendritic cells trigger vascular leakage through metalloproteinase overproduction. *EMBO Rep*. 2006;7:1176-81.
 52. Luplertlop N, Misse D. MMP cellular responses to dengue virus infection-induced vascular leakage. *Jpn J Infect Dis*. 2008;61:298-301.

53. Liu CC, Huang KJ, Lin YS, Yeh TM, Liu HS, Lei HY. Transient CD4/CD8 ratio inversion and aberrant immune activation during dengue virus infection. *J Med Virol.* 2002;68:241-52.
54. Mabalirajan U, Kadiravan T, Sharma SK, Banga A, Ghosh B. Th(2) immune response in patients with dengue during defervescence: preliminary evidence. *Am J Trop Med Hyg.* 2005;72:783-5.
55. Placheril JG. Dengue fever: diagnosis, prevention & control. *Nurs J India.* 2004;95:281-4.
56. De Paula SO, Fonseca BA. Dengue: a review of the laboratory tests a clinician must know to achieve a correct diagnosis. *Braz J Infect Dis.* 2004;8:390-8.
57. Yu L, Nomaguchi M, Padmanabhan R, Markoff L. Specific requirements for elements of the 5' and 3' terminal regions in flavivirus RNA synthesis and viral replication. *Virology.* 2008;374:170-85.
58. Sadon N, Delers A, Jarman RG, Klungthong C, Nisalak A, Gibbons RV, *et al.* A new quantitative RT-PCR method for sensitive detection of dengue virus in serum samples. *J Virol Methods.* 2008;153:1-6.
59. Li Z, Khaliq M, Zhou Z, Post CB, Kuhn RJ, Cushman M. Design, synthesis, and biological evaluation of antiviral agents targeting flavivirus envelope proteins. *J Med Chem.* 2008;51:4660-71.
60. Lapphra K, Sangcharaswichai A, Chokeyhaibulkit K, Tiengrim S, Piriakarnsakul W, Chakorn T, *et al.* Evaluation of an NS1 antigen detection for diagnosis of acute dengue infection in patients with acute febrile illness. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2008;60:387-91.
61. Perera R, Kuhn RJ. Structural proteomics of dengue virus. *Curr Opin Microbiol.* 2008;11:369-77.
62. Jessie K, Fong MY, Devi S, Lam SK, Wong KT. Localization of dengue virus in naturally infected human tissues, by immunohistochemistry and *in situ* hybridization. *J Infect Dis.* 2004;189:1411-8.
63. Lanciotti RS, Calisher CH, Gubler DJ, Chang GJ, Vorndam AV. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 1992;30:545-51.
64. Lewis JG, Chang GJ, Lanciotti RS, Trent DW. Direct sequencing of large flavivirus PCR products for analysis of genome variation and molecular epidemiological investigations. *J Virol Methods.* 1992;38:11-23.
65. Saxena P, Dash PK, Santhosh SR, Shrivastava A, Parida M, Rao PL. Development and evaluation of one step single tube multiplex RT-PCR for rapid detection and typing of dengue viruses. *Virol J.* 2008;5:20-5.
66. Dos Santos HW, Poloni TR, Souza KP, Muller VD, Tremeschin F, Nali LC, *et al.* A simple one-step real-time RT-PCR for diagnosis of dengue virus infection. *J Med Virol.* 2008;80:1426-33.
67. Yong YK, Thayan R, Chong HT, Tan CT, Sekaran SD. Rapid detection and serotyping of dengue virus by multiplex RT-PCR and real-time SYBR green RT-PCR. *Singapore Med J.* 2007;48:662-8.
68. Gomes AL, Silva AM, Cordeiro MT, Guimarães GF, Marques ET Jr, Abath FG. Single-tube nested PCR using immobilized internal primers for the identification of dengue virus serotypes. *J Virol Methods.* 2007;145:76-9.
69. Kumarasamy V, Chua SK, Hassan Z, Wahab AH, Chem YK, Mohamad M, *et al.* Evaluating the sensitivity of a commercial dengue NS1 antigen-capture ELISA for early diagnosis of acute dengue virus infection. *Singapore Med J.* 2007;48:669-73.
70. Putnak JR, de la Barrera R, Burgess T, Pardo J, Dessy F, Gheysen D, *et al.* Comparative evaluation of three assays for measurement of dengue virus neutralizing antibodies. *Am J Trop Med Hyg.* 2008;79:115-22.
71. Roehrig JT, Hombach J, Barrett AD. Guidelines for plaque-reduction neutralization testing of human antibodies to dengue viruses. *Viral Immunol.* 2008;21:123-32.
72. Hapugoda MD, Batra G, Abeyewickreme W, Swaminathan S, Khanna N. Single antigen

- detects both immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies elicited by all four dengue virus serotypes. *Clin Vaccine Immunol.* 2007;14:1505-14
73. Anantapreecha S, A-Nuegoonpipat A, Prakrong S, Chanama S, Sa-Ngasang A, Sawanpanyalert P, Kurane I. Dengue virus cross-reactive hemagglutination inhibition antibody responses in patients with primary dengue virus infection. *Jpn J Infect Dis.* 2007;60:267-70.
 74. Berlioz-Arthaud A, Gurusamy A. Comparison of PanBio dengue IgM ELISA assay with pentax dengue IgM particle agglutination assay to evaluate factors affecting false positive results. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2008;39:55-61.
 75. De Souza VA, Tateno AF, Oliveira RR, Domingues RB, Araújo ES, Kuster GW, *et al.* Sensitivity and specificity of three ELISA-based assays for discriminating primary from secondary acute dengue virus infection. *J Clin Virol.* 2007;39:230-3.
 76. Kao CL, King CC, Chao DY, Wu HL, Chang GJ. Laboratory diagnosis of dengue virus infection: current and future perspectives in clinical diagnosis and public health. *J Microbiol Immunol Infect.* 2005;38:5-16.
 77. Kalayanaroop S, Nimmannitya S. DHF case management. WHO Collaborating Centre for Case Management of Dengue/DHF/DSS. Bangkok: Bangkok Medical Publisher;2004.
 78. Kalayanaroop S, Chansiriwongs V, Nimmannitya S. Dengue patients at the Children's Hospital, Bangkok: a 5-year review. *Dengue Bulletin.* 2002;26:33-43.
 79. Edelman R. Dengue vaccines approach the finish line. *Clin Infect Dis.* 2007;45 Suppl 1: S56-60.
 80. Innis BL, Eckels KH. Progress in development of a live-attenuated, tetravalent dengue virus vaccine by the United States Army Medical Research and Materiel Command. *Am J Trop Med Hyg.* 2003;69(6 Suppl):1-4.
 81. Hatch S, Mathew A, Rothman A. Dengue vaccine: opportunities and challenges. *IDrugs.* 2008;11:42-5.
 82. Hombach J. Vaccines against dengue: a review of current candidate vaccines at advanced development stages. *Rev Panam Salud Publica.* 2007;21:254-60.
 83. Durbin AP, Karron RA, Sun W, Vaughn DW, Reynolds MJ, Perreault JR, *et al.* Attenuation and immunogenicity in humans of a live dengue virus type-4 vaccine candidate with a 30 nucleotide deletion in its 3'-untranslated region. *Am J Trop Med Hyg.* 2001;65:405-13.
 84. Lai CJ, Monath TP. Chimeric flaviviruses: novel vaccines against dengue fever, tick-borne encephalitis, and Japanese encephalitis. *Adv Virus Res.* 2003;61:469-509.
 85. Ray D, Shi PY. Recent advances in flavivirus antiviral drug discovery and vaccine development. *Recent Patents Anti-Infect Drug Disc.* 2006;1:45-55.