

**REPLICATION AND CYTOKINE PROFILE IN HUMAN  
MONONUCLEAR CELLS INFECTED WITH VIRULENT AND  
ATTENUATED CLONES OF DENGUE 2 VIRUS**

**JUNDEE RABABLERT**

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILMENT  
OF THE REQUIREMENTS FOR  
THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY  
(MEDICAL MICROBIOLOGY)  
FACULTY OF GRADUATE STUDIES  
MAHIDOL UNIVERSITY  
2005**

**ISBN 974-04-6506-4  
COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY**

การเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัส และการหลั่งไซโตไคน์ ในเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดียวของคนที่ติดเชื้อไวรัสที่เกิดจากโคลนของเชื้อไวรัสเดงกีทัยป์ 2 เปรียบเทียบระหว่างเชื้อจากโคลนที่ก่อโรค และโคลนที่อ่อนฤทธิ์ (REPLICATION AND CYTOKINE PROFILE IN HUMAN MONONUCLEAR CELLS INFECTED WITH VIRULENT AND ATTENUATED CLONES OF DEN-2 VIRUS)

จันทร์ดี ระเบียบเลิศ 4337601 SIMM/D

ปร.ด. (จุลชีววิทยาการแพทย์)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: จันทพงษ์ ะสี, M.D., สุขธิดา อุบล, Ph.D., วิจิตร เลิศกมลกาญจน์, Ph.D., โกวิท พัฒนปัญญาสัตย์, Ph.D., สุทธิ ยกสำน, M.D., Ph.D.,

**บทคัดย่อ**

การติดเชื้อไวรัสเดงกี เป็นสาเหตุของโรคไข้เดงกี และไข้เลือดออกเดงกี เชื้อเดงกีแบ่งตามลักษณะแอนติเจนเป็น 4 ซีโรทัยป์ คือ D1, D2, D3 และ D4 พบการทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดี กับเชื้อไวรัสต่างทัยป์ แต่ภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้นไม่สามารถป้องกันการติดเชื้อเดงกีต่างทัยป์ ไข้เลือดออกเดงกีและกลุ่มอาการช็อกมีอาการรุนแรงทำให้เสียชีวิตได้ ปัจจัยที่ทำให้เกิดอาการรุนแรง ได้แก่ ลำดับของการติดเชื้อต่างซีโรทัยป์ และความรุนแรงของเชื้อ พยาธิกำเนิดเป็นผลเกี่ยวข้องกับแอนติบอดีที่ส่งเสริมการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสใน monocytes/ macrophages การที่ dengue-specific lymphocyte ถูกกระตุ้น ผลจากการที่เซลล์หลั่งสารไซโตไคน์ และการกระตุ้นของสารคอมพลีเมนต์ การศึกษานี้ต้องการดูความแตกต่างในการหลั่งสารไซโตไคน์จากเซลล์เม็ดเลือดขาวของคนที่เคยและไม่เคยติดเชื้อเดงกีมาก่อน เมื่อติดเชื้อไวรัสเดงกีที่ได้จากโคลนที่ก่อโรค (D2/IC 30 PA) เปรียบเทียบกับเชื้อเดงกีจากโคลนอ่อนฤทธิ์ (D2/IC VV45R) พบว่า เชื้อไวรัสจากโคลนทั้งสองเพิ่มจำนวนได้ในเซลล์ monocytes ที่เพาะเลี้ยงไว้อายุตั้งแต่ 1 ถึง 7 วัน ปริมาณไวรัสสูงสุดในวันที่สอง การติดเชื้อไวรัสจากโคลนก่อโรคและอ่อนฤทธิ์มีผลให้เซลล์เม็ดเลือดขาวตายเองแบบ apoptosis แต่การติดเชื้อก่อโรคทำให้เกิด apoptosis สูงกว่าชัดเจน ทั้งในเซลล์ที่ได้จากผู้ที่เคยและไม่เคยติดเชื้อเดงกี ผลการศึกษาโดยวิธี cDNA macroarray เพื่อดูการเปลี่ยนแปลงการหลั่งไซโตไคน์ และคีโมไคน์ จำนวน 268 ยีน หลังติดเชื้อจากโคลนทั้งสอง พบว่าในวันที่ 1 และ 3 เซลล์จากผู้ไม่เคยติดเชื้อมีการเปลี่ยนแปลงของยีนหลังติดเชื้อก่อโรค 25 กับ 24 ยีน หลังติดเชื้ออ่อนฤทธิ์เปลี่ยนแปลง 13 กับ 18 ยีน ถ้าเป็นเซลล์จากผู้เคยติดเชื้อ พบการเปลี่ยนแปลงมากกว่า คือ 33 กับ 38 ยีน หลังติดเชื้อก่อโรค และ 25 กับ 29 ยีน หลังติดเชื้ออ่อนฤทธิ์ ยีนที่ออกฤทธิ์สร้างสารเพิ่มขึ้น คือ IL- $\beta$ , IL-6, IL-8, ENA-78, M-CSF1, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , MIP-2 $\alpha$ , EMAP II, PDGF  $\alpha$ , VEGF ยีนที่ออกฤทธิ์ลดลงคือ IL-4, IL-4R, IL-1R II, MIF, RANTES, IGF-1, IGF BP-1 และ GM-CSF-2 ผลของ macroarray ยืนยันได้โดยวิธี RT-PCR และ ELISA ต่อไซโตไคน์จำเพาะ ผลการศึกษานี้ บ่งว่า การศึกษาการหลั่งไซโตไคน์ และคีโมไคน์ในเชื้อที่เตรียมเป็นวัคซีน จะช่วยให้ศึกษาการอ่อนฤทธิ์ของเชื้อได้ดีขึ้น

120 หน้า ISBN 974-04-6506-4

**REPLICATION AND CYTOKINE PROFILE IN HUMAN MONONUCLEAR CELLS INFECTED WITH VIRULENT AND ATTENUATED CLONES OF DEN-2 VIRUS**

JUNDEE RABABLERT 4337601 SIMM/D

Ph.D. (MEDICAL MICROBIOLOGY)

THESIS ADVISORS: CHANTAPONG WASI, M.D., SUKATHIDA UBOL, Ph.D., VIJITTRA LERDKAMOLKARN, Ph.D., KOVIT PATTANAPANYASAT, Ph.D., SUTEE YOKSAN, M.D., Ph.D.

**ABSTRACT**

Dengue fever (DF)/dengue hemorrhagic fever (DHF) is caused by infection with dengue viruses. There are four closely related virus serotypes i.e, D1, D2, D3, and D4. Extensive cross-reactivity among the different dengue serotypes is shown, but does not provide long life cross-protective immunity. DHF and dengue shock syndrome (DSS) are severe manifestations and life threatening dengue infections. The sequencing of infecting serotypes and strain differences in virulence appear to influence the occurrence of DHF. The immunopathologic processes associated with DHF/DSS include antibody-mediated enhancement of monocytes/macrophages; activation of dengue-specific lymphocytes; immune clearance of infected monocytes/macrophages, also with release of cytokines and activation of complement. The specific aim of this study is to study the differentiate pattern of cytokines which are immunological mediators released from human mononuclear cells infected with either virulent clone, D2/IC 30PA, or attenuated clone, D2/IC VV45R. Both virulent and attenuated clones can replicate in primary human monocytes obtained from dengue naive and immune donors at various stage of cell differentiation. The replication kinetics were similar in both virulent and attenuated clones, the peaks of virus replication was on day 2 post-infection. Both virulent and attenuated clones induced apoptosis in infected PBMC cultures. The virulent clone exerted stronger capacity to induce apoptotic death than the attenuated clone did. The patterns of cytokine and chemokine gene expression in dengue naive and immune PBMC after infected with both clones were determined by using cDNA macroarray analysis. In dengue naive PBMC, the virulent and attenuated clones induced alteration in expression of 25 and 24 versus 13 and 18 genes out of 268 genes on days 1 and 3. In dengue immune PBMC, the virulent and attenuated clones induced alteration in expression of 33 and 38 versus 25 and 29 genes on days 1 and 3. Upregulation for IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, ENA-78, M-CSF1, MIP-1 $\alpha$ , MIP- $\beta$ , MIP-2 $\alpha$ , EMAP II, PDGF $\alpha$  and VEGF and downregulation of IL-4, IL-4R, IL-1RII, MIF, RANTES, IGF-1, IGFBP-1 and GM-CSF-2 were shown. To confirm the results obtained from macroarray analysis, four genes (IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-4R, and IL-8) and two proteins (IL-4 and IL-8) were selected for RT-PCR based gene-expression and protein analysis. Our approaches pointed out the alteration of cytokine and chemokine gene expression after being infected with infectious dengue clone-derived viruses

KEY WORDS: CYTOKINE/ GENE EXPRESSION/ APOPTOSIS/ cDNA ARRAY  
120P. ISBN 974-04-6506-4