15 JAN 2009

THE EFFECT OF NITRIC OXIDE ON DENGUE VIRUS SEROTYPE II REPLICATION, *IN VITRO*

WEERAWAN CHARNSILPA

With compliments
of
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE (MICROBIOLOGY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2002

ISBN 974-04-2251-9

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

TH
W398e
2002
c.2

Copyright by Mahidol University

4036444 SCMI/M : MAJOR : MICROBIOLOGY ; M.Sc. (MICROBIOLOGY)
KEY WORDS : DENGUE VIRUS/ NITRIC OXIDE
WEERAWAN CHARNSILPA : THE EFFECT OF NITRIC OXIDE ON DENGUE VIURS SEROTYPE II REPLICATION, *IN VITRO*. THESIS ADVISORS: SUKATHIDA UBOL, Ph.D., MATHUROSE PONGLIKITMONGKOL, Ph.D. 104 p. ISBN 974-04-2251-9

Immune cells such as macrophage are known as target cells for dengue virus replication. This type of immune cell rapidly and strongly synthesizes an antimicrobial agent called nitric oxide (NO). NO has been shown to contain an inhibitory effect against many RNA and DNA viruses. Whether NO synthesized by macrophages exert an inhibitory effect on dengue virus is unknown. Therefore, the impact of NO on dengue virus replication was investigated.

In the present study, dengue-2-infected neuroblastoma cells were treated with S-nitroso-L-acethylpenicillamine (SNAP), an exogenous nitric oxide donor and the kinetics of viral replication was examined by using plaque assay. Treatment with SNAP at the concentration of 50, 75, and 100 μM which did not interfere with cell viability and mitochondrial function could delay dengue 2 virus replication and suppress the level of infectious particles production. The characteristics of delay and suppression are dependent on NO concentration, viral titer, and viral strain. A study in DF isolates infected culture reveal that SNAP at the concentration of 50 μM and 75 μ M could delay viral replication by three and nine hours respectively. The mechanisms of delay replication were identified at the level of RNA synthesis using RT-PCR and time course of viral proteins synthesis by immunochemiluminasence using a specific monoclonal antibody. We found that NO generated from SNAP at a concentration of 50 μM suppressed and delayed dengue virus RNA by 2 hours while the expression of E and NS1 were delayed by 2 and 4 hours respectively

In conclusion, we have demonstrated that in this *in vitro* study, NO has an effect on dengue virus replication and exerts its activity through suppression of viral gene transcription and viral protein synthesis.

Copyright by Mahidol University

4036444 SCMI/M : สาขาวิชา : จุลชีววิทยา ; วท.ม. (จุลชีววิทยา)

วีรวรรณ ชาญศิลป์: การศึกษาอิทธิพลของไนตริกออกไซด์ต่อการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสเด็งกี่ 2 ในหลอดทดลอง (THE EFFECT OF NITRIC OXIDE ON DENGUE VIRUS SEROTYPE II REPLICATION *IN VITRO*). คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : ศุขธิดา อุบล, Ph.D., มธุรส พงษ์ลิขิตมงคล, Ph.D. 104 หน้า. ISBN974-04-2251-9

เป็นที่ทราบกันโดยทั่วไปว่า macrophage เป็นเซลล์ที่เชื้อไวรัสเด็งกี่ ใช้เป็นแหล่งเพิ่มจำนวน เมื่อมีการติดเชื้อด้วยจุลชีพใดๆ macrophage จะสามารถผลิตและหลั่งสารที่มีผลในการต่อต้านจุลชีพชนิดหนึ่งคือ ไนตริกออกไซด์ (NO) ถึงแม้ว่าจะมีรายงานที่ระบุถึงความสามารถของไนตริกออกไซด์ ในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสหลายชนิด ทั้งที่เป็น RNA และ DNA แต่ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดว่า NO มีผลอย่างไรต่อการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสเด็งกี่ ดังนั้นเพื่อให้เข้าใจบทบาทของ NO ต่อเชื้อไวรัสเด็งกี่ เราจึงทำการศึกษาอิทธิพลของ NO ต่อการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสเด็งกี่ในหลอดทดลอง

ในการศึกษานี้ เซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงที่ติดเชื้อไวรัสเด็งกี่ ได้รับ NO จาก S-nitroso-L-acethylpenicillamine (SNAP) ซึ่งเป็นสารที่ให้ NO ถูกตรวจสอบการเพิ่มจำนวนของไวรัสเด็งกี่ด้วยวิธี plaque assay พบว่า SNAP ที่ความเข้มข้น 50, 75 และ 100 μM ซึ่งไม่ก่อให้เกิดอันตรายต่อเซลล์สามารถทำให้การเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสเด็งกี่ล่าช้า และกดปริมาณการผลิตไวรัสจากเซลล์ที่ติดเชื้อ ลักษณะการล่าช้าและการกดปริมาณการผลิตไวรัสเด็งกี่ของ NO ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของ NO สัดส่วนเริ่มต้นระหว่างไวรัสต่อเซลล์ในการเหนี่ยวนำให้เกิดการติดเชื้อ รวมทั้งเชื้อไวรัสที่ก่อให้เกิดความรุนแรงของโรคต่างกัน เมื่อศึกษาในเซลล์ติดเชื้อไวรัสเด็งกี่ซึ่งแยกได้จากผู้ป่วยที่มีอาการไม่รุนแรง พบว่าที่ความเข้มข้นของ SNAP 50 และ 75 μM NO ทำให้การเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสเด็งกี่ล่าช้าไป 3 และ 9 ชั่วโมงตามลำดับ กลไกการที่ทำให้เกิดการล่าช้านี้ ได้ถูกตรวจสอบในระดับการสร้าง RNA ด้วยวิธี RT-PCR และดูจากช่วงเวลาในการสร้างโปรตีนด้วยวิธี immunochemiluminasence โดยใช้ specific monoclonal antibody พบว่า ที่ความเข้มข้นของ SNAP 50 μM NO ทำให้การแสดงออกของยีนลดลงและล่าช้าไป 2 ชั่วโมง ในขณะที่การแสดงออกของโปรตีนชนิด E และ NS1 ล่าช้าไป 2 และ 4 ชั่วโมง ตามลำดับ

จากผลการศึกษาในหลอดทดลองดังกล่าวสรุปได้ว่า NO มีผลต่อการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสเด็งกี่ โดยกดการแสดงออกของยีน และมีผลต่อการสังเคราะห์โปรตีนของเชื้อไวรัส

Copyright by Mahidol University