THESIS TITLE Production of Tumor Necrosis Factor by Dengue Virus-infected Human Monocytes

AUTHOR Miss Supaporn Damrongdachakul

M.Sc. in Microbiology

EXAMINING COMMITTEE :

Assoc. Prof. Dr.Niwat	Maneekarn	Chairman
Dr.Nopporn	Sittisombut	Member
Assist. Prof. Dr.Kriangsak	Praputpittaya	Member

ABSTRACT

Monocytes appear to play an important role in dengue virus infection of human. They have been identified as the cells that support dengue virus replication. Dengue virus-infected monocytes may be involved in the host response to dengue virus infection. The purpose of this study was to determine the effect of dengue virus infection on the production of tumor necrosis factor (TNF) by human monocytes. Peripheral blood monocytes were separated from peripheral blood of healthy Thai adults by centrifugation in Histopaque density gradient and subsequent

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

adhesion to and elution from gelatin/plasma-coated flasks. Monocytes were infected with dengue virus type 2 at a multiplicity of infection of 5 in the presence or absence of an optimal enhancing dilution of the monoclonal 4G2 antibody. In each experiment, monocytes were also stimulated with LPS at an optimal concentration of 1 ug/ml to produce TNF. After human monocytes were infected with dengue virus for 24 hours, the level of TNF in the culture supernatant and the number of dengue virus-infected cells were determined. Determination of TNF level was done by the WEHI 164-13-3 cytotoxicity assay whereas dengue virus infection of human monocytes was detected by immunoperoxidase anti-peroxidase staining. It was found that biologically active TNF could not be detected in the culture supernatant of dengue virus-infected monocytes under the conditions which allowed at least 20% of the monocytes to be infected with dengue virus. In addition, an increase in the concentrations of monocytes, a switching of dengue virus type 2 from 16681 strain to the prototype New Guinea C strain, or a variation of incubation time did not result in TNF production. Under the same conditions, monocyte at 5×10^2 - 5×10^3 cells/ culture could be stimulated with LPS to produce TNF at the level which was detectable by the WEHI 164-13-3 cytotoxicity assay.

In conclusion, this study suggest that dengue virus infection is unlikely to represent a strong stimulus for TNF production from human monocytes. Further studies are needed to vigorously examine the role of TNF in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever as it may be produced from other cells involved in the host response to dengue virus infection.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อวิทยานิพนธ์ การสร้างทูเมอร์นิโครซิสแฟคเตอร์ โดยเซลล์เม็ดเลือดขาวของคนชนิดโมโนซัยท์ ที่ติดเชื้อไวรัสเดงกี่

ผู้เขียน นางสาวสุภาพร ดำรงค์เดชากูล

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ :

รศ.ดร.นิวัตน์	มณีกาญจน์	ประธานกรรมการ
นพ.นพพร	สิทธิสมบัติ	กรรมการ
ผศ.ดร.เกรียงศักดิ์	ประพุทธ์พิทยา	กรรมการ

บทคัดย่อ

เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนซัยท์ เป็นเซลล์ที่มีบทบาทสำคัญในการติดเชื้อไวรัสเดงกี่ในคน โดยพบว่าเป็นเซลล์ที่ช่วยสนับสนุนการเพิ่มจำนวนของไวรัสเดงกี่ ดังนั้นเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนซัยท์ที่ถูกติดเชื้อไวรัสเดงกี่อาจจะเกี่ยวข้องในการตอบสนองของร่างกายต่อการติดเชื้อไวรัสเดงกี่ในคน การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อจะดูผลของการติดเชื้อไวรัสเดงกี่ต่อการสร้างทูเมอร์นิโครซิสแฟคเตอร์โดยเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนซัยท์ โดยได้ทำการแยกเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนซัยท์จากเลือดของคนไทยที่มีสุขภาพสมบูรณ์แข็งแรง โดยวิธีการปั่นแยกด้วย Histopaque ซึ่งแยกเซลล์โดยอาศัยความถ่วงจำเพาะที่แตกต่างกันของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดต่าง ๆ แล้วนำไปแยกต่อด้วยการให้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนซัยท์เกาะกับภาชนะที่ถูกเคลือบด้วยเจลาตินและพลาสมา แล้วจึงนำไปทำให้หลุดออกมาจากภาชนะนั้นอีกทีหนึ่ง เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนซัยท์ที่ได้จะนำไปทำให้ติดเชื้อด้วยไวรัสเดงกี่ทัยป์ 2 ที่อัตราส่วนระหว่างไวรัสเดงกี่ต่อเซลล์เท่ากับ 5 ในสภาวะที่มีหรือไม่มีโมโนโคลนอลแอนติบอดี 4G2 ในระดับความเจือจางที่เหมาะสมต่อการเพิ่มการติดเชื้อไวรัส ในการทดลองแต่ละครั้งเซลล์โมโนซัยท์จะถูกกระตุ้นด้วย LPS (1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมในการกระตุ้นให้มีการสร้างทูเมอร์นิโครซิสแฟคเตอร์ หลังจากให้เซลล์โมโนซัยท์ถูกติดเชื้อด้วยไวรัสเดงกี่นาน 24 ชั่วโมง จึงทำการวัดระดับ TNF ในอาหารเหลวที่ใช้เพาะเลี้ยงเซลล์โมโนซัยท์นั้นโดยวิธี WEHI 164-13-3 cytotoxicity assay และตรวจหาจำนวนเซลล์โมโนซัยท์ที่ถูกติดเชื้อไวรัสเดงกี่โดยวิธี immunoperoxidase anti-peroxidase staining ผลการศึกษาพบว่าไม่สามารถตรวจพบ biologically active TNF ในอาหารเหลวที่ใช้เพาะเลี้ยงของเซลล์โมโนซัยท์ที่ถูกติดเชื้อไวรัสเดงกี่ ภายใต้สภาวะที่มีการติดเชื้อไวรัสเดงกี่อย่างน้อย 20% ของเซลล์โมโนซัยท์ทั้งหมด นอกจากนั้นถึงแม้ว่าจะเพิ่มจำนวนเซลล์โมโนซัยท์, หรือเปลี่ยนชนิดไวรัสเดงกี่ทัยป์ 2 จากสายพันธุ์ 16681 เป็นสายพันธุ์ New Guinea C ซึ่งเป็นสายพันธ์ต้นตระกูล หรือ เปลี่ยนแปลงระยะเวลาในการให้เซลล์โมโนซัยท์ถูกติดเชื้อด้วยไวรัสเดงกี่ในระยะเวลาต่าง ๆ กัน ก็ยังตรวจไม่พบการสร้างทูเมอร์นิโครซิสแฟคเตอร์ในขณะที่ภายใต้สภาวะเดียวกันนี้เซลล์โมโนซัยท์ปริมาณ $5x10^2$-$5x10^3$ cells/culture สามารถถูกกระตุ้นด้วย LPS ให้มีการสร้างทูเมอร์นิโครซิสแฟคเตอร์ในระดับซึ่งสามารถตรวจพบได้โดยวิธี WEHI 164-13-3 cytotoxicity assay

กล่าวโดยสรุปแล้วการศึกษาในครั้งนี้พบว่า การติดเชื้อไวรัสเดงกี่ อาจเป็นตัวกระตุ้นที่ไม่ดีพอที่จะกระตุ้นเซลล์โมโนซัยท์ให้สร้างทูเมอร์นิโครซิสแฟคเตอร์ได้ แนวทางการศึกษาต่อไปเพื่อให้ทราบบทบาทของทูเมอร์นิโครซิสแฟคเตอร์ ว่ามีส่วนเกี่ยวข้องกับกลไกการทำให้เกิดพยาธิสภาพในโรคไข้เลือดออก อาจตรวจหาว่ามีเซลล์อื่นที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองของร่างกายต่อการติดเชื้อไวรัสเดงกี่ที่อาจจะสามารถสร้างทูเมอร์นิโครซิสแฟคเตอร์นี้ได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved