

**THE STUDY OF FLAVIVIRUS INDUCED REACTIVE OXYGEN SPECIES (ROS)
IN MICROGLIA CELLS****LATTAPON SUWANPRINYA 5536064 SCPM/M****M.Sc. (PHARMACOLOGY)****THESIS ADVISORY COMMITTEE: NOPPAWAN PHUMALA MORALES, Ph.D.,
RONALD ENRIQUE MORALES VARGAS, Ph.D., TAMAKI OKABAYASHI,
Ph.D., PIMTIP SANVARINDA, M.D., Ph.D.****ABSTRACT**

Increased cases of dengue encephalitis have been reported worldwide. In order to evaluate whether dengue virus (DENV) has capacity in the induction of neuroinflammatory process, the pathway involving reactive oxygen species (ROS) production was investigated. Flavivirus, including Japanese encephalitis virus (JEV), Culex flavivirus (CxFV), dengue serotype 2 and 4 (DENV-2 and DENV-4), induced reactive oxygen species (ROS) was demonstrated in a rat microglia cell line, HAPI cells. The cells were challenged with flavivirus with a multiplicity of infections (MOI) 0.01 and 0.1 for two hours of adsorption period. Intracellular ROS production and cell viability were determined at 6, 24, 48 and 72 hours post-infection. As demonstrated by increased fluorescence intensity of 2',7'-dichlorodihydrofluorescein (DCHF), all viruses induced ROS production as early as at 6 hours and prolonged over 72 hours, in corresponding with decreased cell viability. DENV-4 was the most potent virus in the induction of ROS production. Furthermore, expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS), caspase-3 and activation of caspase-3 were determined at 24 hours post-infection. JEV, CxFV and DENV-2 with MOI 0.1 induced iNOS expression approximately 1.4 fold of mock control. JEV and CxFV activated caspase-3 approximately 1.2 fold of mock control. These effects were comparable with the activity of lipopolysaccharide (LPS) 1 mg/ml. Interestingly, DENV-4 significantly suppressed iNOS expression and caspase-3 activation. These results may, at least in part, be explained by the levels of ROS that determine the downstream of several signalling pathways. In conclusion, DENV as well as CxFV have the capacity as JEV in microglia activation and ROS production, which results in the alteration of microglia functions and survival.

**KEY WORDS: DENGUE / FLAVIVIRUS / JAPANESE ENCEPHALITIS /
MICROGLIA CELLS (HAPI) / REACTIVE OXYGEN SPECIES
(ROS)**

63 pages

การศึกษาการสร้างรีแอกทีฟออกซิเจนสปีชีส์เหนี่ยวนำโดยฟลาวิไวรัสในไมโครเกลียเซลล์

THE STUDY OF FLAVIVIRUS INDUCED REACTIVE OXYGEN SPECIES (ROS) PRODUCTION IN MICROGLIA CELLS

ลัทพล สุวรรณปริญญา 5536064 SCPM/M

วท.ม. (เภสัชวิทยา)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ : นพวรรณ ภูมาลา มอราเลส, Ph.D., โรนัลด์ เอนริเก้ มอราเลส วาร์กัส, Ph.D., ทามาโก โอคาบายาชิ, Ph.D., พิมทิพย์ สังวรินทะ, Ph.D.,

บทคัดย่อ

มีรายงานการเกิดภาวะสมองอักเสบจากการติดเชื้อไวรัสแดงที่เพิ่มขึ้นทั่วโลก ซึ่งกระบวนการเกิดการอักเสบของระบบประสาทที่เกี่ยวข้องกับการเกิดรีแอกทีฟออกซิเจนสปีชีส์ (ROS) นั้นน่าจะเป็นกระบวนการหนึ่งที่สามารถอธิบายภาวะนี้ ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินความสามารถในการเหนี่ยวนำการเกิดรีแอกทีฟออกซิเจนสปีชีส์และกระบวนการเกิดการอักเสบของระบบประสาทของไวรัสแดงที่ (DENV) ในไมโครเกลียเซลล์ไลน์ของหนู (High Aggressive Proliferating Immortalized (HAPI) cell) โดยทำการศึกษาเทียบในฟลาวิไวรัสได้แก่ ไวรัสไข้สมองอักเสบแจแปนีส (JEV) คิวเล็กซ์ฟลาวิไวรัส (CxFV) ไวรัสแดงที่ชิโรโทปี 2 และ 4 (DENV-2 และ 4) ไมโครเกลียเซลล์ของหนูถูกกระตุ้นโดยฟลาวิไวรัสที่ความเข้มข้นของไวรัสที่ MOI 0.01 และ 0.1 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง การตรวจวัดรีแอกทีฟออกซิเจนสปีชีส์ที่ถูกสร้างขึ้นภายในเซลล์สามารถวัดได้โดยใช้การตรวจวัดค่าการเพิ่มขึ้นของความเข้มฟลูออเรสเซนส์ของ 2',7'-dichlorodihydrofluorescein (DCHF) และการมีชีวิตอยู่รอดของเซลล์ที่ 6, 24, 48 และ 72 ชั่วโมงหลังถูกกระตุ้นด้วยไวรัส การศึกษาพบว่าไวรัสทุกชนิดเหนี่ยวนำให้เกิดรีแอกทีฟออกซิเจนสปีชีส์ได้ตั้งแต่ 6 ชั่วโมง ถึง 72 ชั่วโมง และมีผลให้การอยู่รอดของเซลล์ลดลง จากการศึกษาพบว่าไวรัสแดงที่-4 เป็นไวรัสที่มีศักยภาพสูงสุดในการเหนี่ยวนำให้เกิดรีแอกทีฟออกซิเจนสปีชีส์ นอกจากนี้ที่เวลา 24 ชั่วโมงยังตรวจวัดการแสดงออกของเอนไซม์ inducible nitric oxide synthase (iNOS) และ เอนไซม์ caspase-3 รวมทั้งเอนไซม์ caspase-3 ในรูปที่ถูกกระตุ้น จากการศึกษาพบว่า JEV, CxFV และ DENV-2 ที่ความเข้มข้นของไวรัสที่ MOI 0.1 กระตุ้นให้เกิดการแสดงออกของ iNOS ประมาณ 1.4 เท่าของกลุ่มควบคุม นอกจากนี้ยังพบว่า JEV และ CxFV กระตุ้น caspase-3 ประมาณ 1.2 เท่าของกลุ่มควบคุม ผลที่เกิดขึ้นเหล่านี้เทียบได้กับความสามารถในการกระตุ้นของไลโปโพลีแซคคาไรด์ (LPS) ที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเป็นที่น่าสนใจอย่างยิ่งที่ DENV-4 นั้นสามารถยับยั้งการแสดงออกของ iNOS และยับยั้งการกระตุ้นของ caspase-3 อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งความแตกต่างของผลจากไวรัสนี้อาจจะอธิบายจากความแตกต่างของระดับรีแอกทีฟออกซิเจนสปีชีส์ที่สร้างขึ้นในเซลล์ซึ่งมีผลกับกระบวนการส่งสัญญาณในเซลล์ความสำคัญต่อการส่งสัญญาณในเซลล์หลายกระบวนการ การศึกษาสรุปได้ว่า DENV และ CxFV มีความสามารถในการกระตุ้นไมโครเกลียและการสร้างรีแอกทีฟออกซิเจนสปีชีส์ได้เช่นเดียวกับไวรัสที่ก่อให้เกิดภาวะสมองอักเสบ JEV ซึ่งส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงหน้าที่และการอยู่รอดของเซลล์ไมโครเกลีย