



สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (สกอ.)
Commission on Higher Education (CHE)



สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)
Thailand Research Fund (TRF)

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การแสดงออกของ Cytokines จาก Th1 และ Th2 ในตัวอย่างโรคติดต่อมาโดยยุง
ที่พบบ่อยในประเทศไทย

(Th1 and Th2 cytokine expression in common mosquito borne infected samples in Thailand)

โดย... ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์นัฐเนศวร์ ลิ้มเลิศลพ และคณะ

วันที่เสร็จโครงการ : 31 ตุลาคม 2555

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การแสดงออกของ Cytokines จาก Th1 และ Th2 ในตัวอย่างโรคติดต่อมาโดยยุง
ที่พบบ่อยในประเทศไทย

(Th1 and Th2 cytokine expression in common mosquito borne infected samples in Thailand)

คณะผู้วิจัย

สังกัด

1. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์นัฐเนศวร์ ลับเลิศบ

ภาควิชาจุลชีววิทยาและอิมมูโนโลยี
คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล

2. รองศาสตราจารย์ แพทย์หญิงพรรณเพ็ญ วิริยเวชกุล

ภาควิชาพยาธิวิทยาเขตร้อน
คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล

3. แพทย์หญิง สารนาถ ล้อพูลศรี

ภาควิชาสูติวิทยาเขตร้อน
คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล

4. ผู้ช่วยศาสตราจารย์จรณีต แก้วกังวาล

ภาควิชาสูติวิทยาเขตร้อน
คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล

5. อาจารย์พัฒนมาศ มณีกาญจน์

ภาควิชาสูติวิทยาเขตร้อน
คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษาและสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

Abstract

Project Code : MRG5080350

Project Title : Th1 and Th2 cytokine expression in common mosquito borne infected samples in Thailand

Investigator : Natthanej Luplertlop

Lecturer in Department of Microbiology and Immunology

Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University

E-mail Address : natthanej.lup@mahidol.ac.th

Project Period : 30 Months

Dengue and malaria infection are two common vector borne diseases which annually affect million of people in many countries. Both of diseases show variety of clinical presentation from mild to severe signs and symptoms of Dengue fever (DF) to Dengue hemorrhagic fever (DHF) in Dengue infection, and low and high parasitemia in malaria infection. This study intends to find biomarker(s) for early detection through the immune response of Th1 and Th2 cytokine expressions between Dengue virus type 2 (DENV-2) infection and *Plasmodium falciparum* (*P.falciparum*) malaria infection composed of mild and severe form comparing to normal human sera (NHS). A high through-put of the magnetic bead-based Bio-Plex assay which applied to detect the expression of Th1 and Th2 cytokines by using small volume sera samples which run in only once. Results showed the significant difference higher of Th1 and Th2 cytokine expressions: interleukin (IL)-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), interferon (IFN)- γ , and tumor necrosis factor (TNF)- α , in DENV-2 and *P.falciparum* malaria infection than NHS at p-value < 0.05. For DENV-2 infection showed a slightly expression of Th1 and Th2 cytokines were higher in DHF than DF, except IL-13. For *P.falciparum* malaria infection, high parasitemia was significant difference higher expressions of IL-4, IL-10, GM-CSF, and TNF- α at p-value < 0.05. Both DENV-2 and *P.falciparum* malaria infection remarkable presented IL-10 expression, highest among other cytokines expression and higher in severe form. Therefore, it is worth noting that IL-10 plays an important role in severity of infection and pathogenesis.

Keywords : Dengue, Malaria, T helper, Cytokines, BioPlex

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : MRG5080350

ชื่อโครงการ : การแสดงออกของ Cytokines จาก Th1 และ Th2 ในตัวอย่างโรคติดต่อ
โดยยุงที่พบบ่อยในประเทศไทย

ชื่อนักวิจัย : นายณัฐเนศวร์ ลับเลิศลบ
อาจารย์ประจำภาควิชาจุลชีววิทยาและอิมมูโนโลยี
คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล

E-mail Address : natthanej.lup@mahidol.ac.th

ระยะเวลาโครงการ : 30 เดือน

เชื้อไวรัสเดงกีและเชื้อมาลาเรีย จัดเป็นสองกลุ่มโรคที่อยู่ในกลุ่มโรคติดต่อโดยแมลงที่พบได้บ่อย และยังเป็นกลุ่มโรคที่ส่งผลกระทบต่อประชากรหลายล้านคนในหลายประเทศ ทั้งนี้พบว่า โรคทั้งสองจะมีการแสดงออกทางคลินิกที่มีความรุนแรงตั้งแต่รุนแรงน้อยจนถึงรุนแรงมาก กล่าวคือในกลุ่มติดเชื้อไวรัสเดงกีจะสามารถแสดงออกถึงความรุนแรงได้ตั้งแต่ Dengue fever (DF) จนถึง Dengue hemorrhagic fever (DHF) และสำหรับเชื้อมาลาเรียนั้น ความรุนแรงของโรคจะขึ้นกับปริมาณเชื้อในกระแสเลือด (parasitemia) โดยสามารถแสดงออกได้ตั้งแต่ low parasitemia จนถึงระดับ high parasitemia

สำหรับการศึกษานี้มุ่งเน้นที่จะหาตัวแทนของการแสดงออกของ biomarkers ที่แสดงออกในระยะเริ่มต้นของโรค และมีความเป็นไปได้ที่จะใช้ในการวิเคราะห์ความรุนแรงของโรค เพื่อนำไปสู่การรักษาและการเฝ้าระวังโรคในผู้ป่วยได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดย biomarkers ที่ดำเนินการศึกษานี้จะเป็นกลุ่ม cytokines ที่แสดงออกมาจาก T-helper cells (Th)1 และ Th2 เปรียบเทียบในกลุ่มผู้ติดเชื้อไวรัสเดงกีที่มีความรุนแรงแตกต่างกัน กับกลุ่มผู้ติดเชื้อมาลาเรียที่มีปริมาณ parasitemia ที่แตกต่างกัน โดยกลุ่มควบคุมจะใช้กลุ่มคนปกติ (normal human sera (NHS)) สำหรับการตรวจวัดระดับ cytokines จะใช้วิธีการของ magnetic bead-based Bio-Plex assay ซึ่งเป็นวิธีการที่สามารถตรวจการแสดงออกของ cytokines ได้ครั้งละหลายชนิดโดยอาศัยปริมาณซีรัมเพียงเล็กน้อย (20 ไมโครลิตร)

การศึกษานี้ศึกษาการแสดงออกของ 8 cytokines ประกอบด้วย interleukin (IL)-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), interferon (IFN)- γ , and tumor necrosis factor (TNF)- α พบว่ากลุ่มผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสเดงกี ซีโรทัยป์ 2 และผู้ติดเชื้อมาลาเรียชนิด *P.falciparum* มีการแสดงออกของ cytokines ทั้ง 8 ในปริมาณที่สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (p-value < 0.05) โดยผู้ที่ติดเชื้อไวรัสเดงกีชนิด DHF จะมีการแสดงออกของ cytokines สูงกว่ากลุ่ม DF ทั้ง 7 cytokines ยกเว้น IL-13 สำหรับกลุ่มผู้ติดเชื้อมาลาเรียชนิด *P.falciparum* จะพบในกลุ่ม high parasitemia จะมีการแสดงออกของ IL-4, IL-10, GM-CSF, and TNF- α ที่สูงกว่ากลุ่ม low parasitemia อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p-value < 0.05) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มผู้ติดเชื้อไวรัสเดงกีกับผู้ติดเชื้อมาลาเรียทั้งสองกลุ่ม ความรุนแรง จะพบว่ามีการแสดงออกของ IL-10 สูงอย่างชัดเจนในกลุ่มของ severe form (DHF และ High parasitemia) ดังนั้นจะเห็นได้ว่า IL-10 นั้นมีความสำคัญในการนำไปศึกษาต่อเพื่อพัฒนาเครื่องมือตรวจวัด biomarkers เพื่อตรวจพยากรณ์ความรุนแรงของโรคและนำไปสู่การศึกษาในแนวลึกเกี่ยวกับพยาธิกำเนิดของโรคต่อไป

คำหลัก : Dengue, Malaria, T helper, Cytokines, BioPlex

กิตติกรรมประกาศ

- โครงการวิจัยเรื่องนี้ได้รับการสนับสนุนทุนพัฒนาศักยภาพในการทำงานวิจัยของอาจารย์รุ่นใหม่ โดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
- โครงการนี้ดำเนินการสำเร็จได้อย่างดี เนื่องจากได้รับคำแนะนำที่มีประโยชน์สำหรับงานวิจัยจาก ศาสตราจารย์ นายแพทย์ยง ภู่วรวรรณ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- สำหรับหน่วยงานต่างๆ ที่ให้ความสนับสนุนงานวิจัยนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ประกอบด้วย
 - ห้องปฏิบัติการประยุกต์ ภาควิชาสุขวิทยาเขตร้อน คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล
 - ศูนย์วินิจฉัยโรคเขตร้อน คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล
 - ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
 - สำนักวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

ทางทีมผู้วิจัยจึงขอขอบคุณในความอนุเคราะห์มา ณ โอกาสนี้

คณะผู้วิจัย

Executive Summary

โครงการการแสดงผลของ Cytokines จาก Th1 และ Th2 ในตัวอย่างโรคติดต่อที่พบบ่อยในประเทศไทย

สัญญาเลขที่ MRG5380006

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหา

โรคติดต่อที่นำโดยยุง จัดเป็นโรคที่พบบ่อยในประเทศเขตร้อนและแถบเส้นศูนย์สูตร มีการแพร่กระจายเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ ทั้งในประเทศภูมิภาคเอเชีย และประเทศตะวันตก ส่งผลให้มีผู้เจ็บป่วยและเสียชีวิตเพิ่มจำนวนมากขึ้นเรื่อยๆ สาเหตุหนึ่งมาจากการที่โลกมีภาวะโลกร้อนเพิ่มมากขึ้น ส่งผลให้วงจรชีวิตของยุงมีรอบของการเจริญเติบโตเร็วขึ้น และมีระยะเวลาในการกินเลือดในแต่ละวันเพิ่มมากขึ้น จึงจัดเป็นปัจจัยหนึ่งของการเพิ่มปริมาณของยุงและยังส่งผลต่อการระบาดของโรคติดต่อที่นำโดยยุงเพิ่มขึ้น นอกจากผลกระทบจากการเพิ่มปริมาณของยุงแล้ว พยาธิกำเนิดของโรคติดต่อที่นำโดยยุงก็มีส่วนต่อการเพิ่มอัตราการติดเชื้อ และป่วยตายเพิ่มขึ้นเช่นกัน ในประเทศไทย โรคติดต่อที่นำโดยยุงที่พบบ่อยคือไข้เลือดออก และไข้มาลาเรีย

- กรณีไข้เลือดออก ในปัจจุบันยังไม่มีข้อสรุปที่แน่ชัดสำหรับพยาธิกำเนิดของโรค จึงส่งผลให้การพัฒนารักษาและวัคซีนป้องกันเป็นไปได้ช้าๆ
- กรณีโรคมาลาเรีย เป็นที่ทราบกันว่าจังหวัดตามแนวชายแดนของประเทศไทยยังคงมีอัตราการติดเชื้อสูง และยังพบอัตราการดื้อยาเพิ่มมากขึ้นส่งผลกระทบในด้านระบาดวิทยาและความรุนแรงของโรค

จากการศึกษาของทีมผู้วิจัยที่ทำการศึกษเกี่ยวกับ Matrix metalloproteinases enzymes (MMPs) ในโรคไข้เลือดออก พบว่ามีผลต่อความรุนแรงของโรคโดยเฉพาะเกี่ยวข้องกับการเพิ่ม permeability ของเส้นเลือด ซึ่งส่วนหนึ่งของการศึกษาวิจัยพบว่าการเพิ่มจำนวนของ TNF α ที่สอดคล้องกับการแสดงออกของ MMPs จากผลการทดลองดังกล่าวทีมผู้วิจัยจึงเห็นว่าความสัมพันธ์ของการแสดงออกของ cytokines น่าจะมีผลกระทบต่อ permeability ของเส้นเลือดและมีความสัมพันธ์กับ cytokines ในกลุ่มของ Th1 และ Th2 ซึ่งเป็นเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันหลักที่ส่งผลกระทบต่อการสร้าง TNF α เช่นกัน ซึ่งเมื่อพิจารณาถึงความรุนแรงของโรคติดต่อที่นำโดยยุง ในกรณีของไข้มาลาเรียจะพบว่าเมื่อผู้ป่วยอยู่ในขั้นวิกฤตมักจะเสียชีวิตด้วยภาวะของ vascular leakage เช่น pulmonary edema brain edema และ hepatic failure และ/หรือ renal failure ซึ่งสอดคล้องกับสาเหตุการตายของไข้เลือดออกเช่นกัน ด้วยเหตุนี้ทีมผู้วิจัยจึงสนใจที่จะทำการศึกษการแสดงผลของ cytokines จากกลุ่มของ Th1 และ Th2 เปรียบเทียบระหว่างไข้เลือดออก และมาลาเรีย เปรียบเทียบกับกลุ่มผู้มีสุขภาพแข็งแรง (กลุ่มควบคุม) เพื่อหาความสัมพันธ์ของ cytokines ต่างๆ และการแสดงออกของ cytokines ว่ากลุ่ม cytokine ชนิดใดที่ส่งผลต่อความรุนแรงในแต่ละโรค

2. วัตถุประสงค์

- เพื่อศึกษาตัวชี้วัดทางระบบภูมิคุ้มกันเพื่อบ่งบอกระดับความรุนแรงของโรค
- เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของตัวชี้วัดทางระบบภูมิคุ้มกันในกลุ่มโรคที่นำโดยยุงที่พบบ่อยในประเทศไทย โดยเฉพาะในกลุ่มไวรัส(ไวรัสเดงกี)และโปรโตซัว(มาลาเรีย)
- เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของตัวชี้วัดกับพยาธิกำเนิดของโรคที่นำโดยยุงที่พบบ่อยในประเทศไทย

3. ระเบียบวิธีวิจัย

Study design : Experimental study

สถานที่วิจัย :

- หน่วยปฏิบัติการประยุกต์ ภาควิชาสุขวิทยาเขตร้อน คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล
- ศูนย์วินิจฉัยโรคเขตร้อน คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล

➤ การศึกษาวิจัยในครั้งนี้จะแบ่งการศึกษาออกเป็น 7 ขั้นตอนใหญ่ๆ ดังนี้ :

1. การเตรียมไวรัสเดงกี และตรวจสอบคุณลักษณะของไวรัสเดงกี
ทำการเพาะเลี้ยงไวรัสเดงกีทั้งสี่ซีโรทัยป์ (Lab strain) โดยเพาะเลี้ยงในเซลล์ยูง (C6/36) แล้วทำการตรวจสอบคุณลักษณะของไวรัสเดงกีเพื่อดู titration, virulence ด้วยวิธี Double overlay plaque assay โดยปริมาณไวรัสที่ต้องการในแต่ละการทดลองอย่างต่ำ 5×10^6 PFU/ml และยืนยันชนิดของไวรัสเดงกีด้วยวิธี Lanciotti RT/Nested PCR
2. ทำการศึกษาการแสดงออกของเซลล์ระบบภูมิคุ้มกันภายหลังการติดเชื้อด้วยไวรัสเดงกี
 - เตรียมเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน (THP-1 cells)⁽³¹⁻³²⁾ เพื่อตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสเดงกี และดูการแสดงออกของ cytokines
 - นำไวรัสเดงกี ซีโรทัยป์ 2 infect เข้าสู่ THP-1 โดยใช้ multiplication of infection เท่ากับ 1 และทำการเก็บ supernatant ในช่วงเวลาที่ 6, 12, 24 ชั่วโมงภายหลังการกระตุ้นด้วยไวรัส
3. นำsupernatants ที่ได้จากข้อ (b) มาทำการตรวจสอบหา Matrix metalloproteinase enzyme (MMP-2 และ MMP-9) ด้วยวิธี Gelatinolytic zymography และตรวจสอบหาระดับของTh₁ และ Th₂ ด้วยวิธี Magnetic bead-based multiplex assays (BioRad[®]) เพื่อการศึกษาเปรียบเทียบชนิดและความแตกต่างของ Cytokines ของ Th1 และ Th2 (โดยจะทำการศึกษาระดับของ IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12, IL-13, GM-CSF, IFN_γ และ TNF_α) เปรียบเทียบกับ Proteinase enzyme (MMP-2 และ MMP-9) ในซีโรทัยป์2
4. เก็บตัวอย่างซีรัมของผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกชนิด Dengue fever (DF) และ Dengue hemorrhagic fever (DHF) กลุ่มละ 10 คนจากการวินิจฉัยของแพทย์ (Clinical base diagnosis) เพื่อการศึกษาเปรียบเทียบชนิดและความแตกต่างของ Cytokines ของ Th1 และ Th2 (โดยจะทำการศึกษาระดับของ IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12, IL-13, GM-CSF, IFN_γ และ TNF_α) เปรียบเทียบผลกับกลุ่ม THP-1 ด้วยวิธี Magnetic bead-based multiplex assays (BioRad[®])

5. เก็บตัวอย่างซีรัมจากกลุ่มผู้มีสุขภาพแข็งแรง (Normal human sera) จำนวน 10 คน เพื่อการศึกษาเปรียบเทียบชนิดและความแตกต่างของ Cytokines ของ Th₁ และ Th₂ (โดยจะทำการศึกษาระดับของ IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12, IL-13, GM-CSF, IFN_γ และ TNF_α) ด้วยวิธี Magnetic bead-based multiplex assays (BioRad[®]) โดยมีข้อกำหนดสำหรับอาสาสมัครเข้าร่วมโครงการวิจัยมีดังนี้

● **Inclusion criteria**

- สุขภาพแข็งแรง
- อายุ 15 ปีขึ้นไป
- ปฏิเสธโรคประจำตัวติดต่อเรื้อรัง หรือโรคทางระบบภูมิคุ้มกันและระบบโลหิต
- ปฏิเสธการใช้ยาหรือผลิตภัณฑ์ที่มีผลต่อความผิดปกติของระบบภูมิคุ้มกัน ก่อนเข้าร่วมโครงการอย่างน้อย
- ผู้เข้าร่วมโครงการมีความยินดีเข้าร่วมโครงการด้วยความเต็มใจ ภายใต้การตัดสินใจของผู้ป่วยเอง

● **Exclusion criteria**

- ปฏิเสธการเข้าร่วมโครงการวิจัย

6. เก็บตัวอย่างซีรัมจากกลุ่มผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคมาลาเรียด้วยวิธี Thick and Thin blood film diagnosis จำนวนกลุ่มละ 10 คน

• Plasmodium falciparum (High parasite counted : $\geq 50/1000$ RBC)

• Plasmodium falciparum (Low parasite counted : $< 50/1000$ RBC)

ทำการศึกษาเปรียบเทียบชนิดและความแตกต่างของ Cytokines ของ Th₁ และ Th₂ (โดยจะทำการศึกษาระดับของ IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12, IL-13, GM-CSF, IFN_γ และ TNF_α) ด้วยวิธี Magnetic bead-based multiplex assays (BioRad[®])

7. นำข้อมูลการแสดงผลของ ความแตกต่างของ Cytokines ของ Th₁ และ Th₂ (โดยจะทำการศึกษาระดับของ IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12, IL-13, GM-CSF, IFN_γ และ TNF_α) ด้วยวิธี Magnetic bead-based multiplex assays (BioRad[®]) มาวิเคราะห์เปรียบเทียบปริมาณการแสดงผล โดยการหาความแตกต่างในแต่ละกลุ่มด้วยวิธี ANOVA และ/หรือ non-Parametric ชนิด K-independent variables และทำการศึกษาหาความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มด้วยวิธี Correlation

4. แผนการดำเนินงานวิจัยตลอดโครงการในแต่ละช่วง 6 เดือน

กิจกรรม	การทำวิจัยรอบ			
	6 เดือน	12 เดือน	18-21 เดือน	ขยายทุน (25-30 เดือน)
	2553	2554	2554-2555	2555
เพิ่มปริมาณ และตรวจสอบDengue virus	↔			
การศึกษาในห้องปฏิบัติการ (THP-1)	↔			
การดำเนินการขอจริยธรรมการวิจัย ในมนุษย์		↔		
เก็บตัวอย่างซีรัมผู้ป่วยไวรัสเดงกี ใช้ มาลาเรียและอาสาสัมคร			↔	
การศึกษาการแสดงออกของ cytokines ด้วย Magnetic bead- based multiplex assays (BioRad®)		THP-1 + DV2		Sera samples
วิเคราะห์ข้อมูลและประเมินผลการ ทดลอง				↔
ตีพิมพ์วารสารต่างประเทศ				↔

5. ผลงาน/ หัวข้อเรื่องที่คาดว่าจะตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติในแต่ละปี

- ปีที่ 1 :
 - ไม่มีการตีพิมพ์
- ปีที่ 2 :
 - ไม่มีการตีพิมพ์
- ปีที่ 2 : ช่วงขยายทุน (กรกฎาคม 2555 – พฤศจิกายน 2555)
 - Protein expression in the salivary glands of dengue-infected Aedes aegypti mosquitoes and blood feeding success. *Southeast Asian J TropMed Public Health*. **Accepted**.
(IF 0.604)
 - Potential Anti-oxidative Activity of Crude Rice Oil Extracted from Cadmium-contaminated Rice as Determined Using an In Vitro Primary Human Fibroblast Cell Model. *Journal of Agricultural Science*. **Accepted**.
(IF 2.041)
 - T helper (TH)1 and Th2 cytokine expressions in common mosquito-borne diseases in Thailand: Dengue and Malaria by Magnetic bead-based BioPlex assay. *Southeast Asian J TropMed Public Health*. **In Press**.
(IF 0.604)

ปัจจุบันโรคติดต่อมาโดยยุงนับเป็นปัญหาที่สำคัญมากทางสาธารณสุขในประเทศไทยและยังส่งผลไปยังประเทศต่างๆมากมาย โดยเฉพาะประเทศแถบเขตร้อน ตามรายงานทางระบาดวิทยาพบว่า อัตราการป่วยและอัตราการตายโดยโรคติดต่อมาโดยยุง เช่น ไข้เลือดออก และมาลาเรีย พบว่านี้มีจำนวนเพิ่มมากขึ้นทุกปี⁽¹⁻³⁾ ตลอดจนสามารถก่อโรคที่มีความรุนแรงเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ ทำให้มีอัตราการป่วยและอัตราการตายเพิ่มสูงขึ้น ทั้งนี้เนื่องมาจากมีปัจจัยที่สำคัญอยู่ 3 ปัจจัยคือ การพัฒนาความเป็นเมืองเพิ่มมากขึ้น⁽⁴⁻⁵⁾ ภาวะโรคเรื้อรังที่ส่งผลต่อพฤติกรรมและการเจริญของยุงพาหะ⁽⁶⁻⁸⁾ อีกทั้งพยายังกำเนิดของการก่อความรุนแรงของโรคยังคงคลุมเครืออยู่ ส่งผลให้การพัฒนาการดูแลรักษา และการป้องกันจึงเป็นไปได้อย่างล่าช้า และยังส่งผลกระทบต่อการศึกษาการเกิดภาวะดื้อยาได้ในกรณีโรคที่มียารักษาจำเพาะเช่นมาลาเรีย

เมื่อกล่าวถึงพยายังกำเนิดของโรค มีการศึกษาถึงความสัมพันธ์ของการแสดงออกของ cytokines กับการส่งผลกระทบต่อความรุนแรงของโรคได้แก่

- การเพิ่มการแสดงออกของ Matrix metalloproteinase enzyme⁽⁹⁻¹⁰⁾ , Nitric oxide⁽¹¹⁻¹²⁾ , TNF- α ⁽¹³⁻¹⁵⁾ , IL-8⁽¹⁶⁾ , Complement⁽¹⁷⁻¹⁸⁾ , และกลุ่มcytokines ที่หลั่งจากDendritic cells⁽¹⁹⁻²⁰⁾ ที่ได้รับการกระตุ้นด้วยไวรัสเดงกี ซึ่งการแสดงออกของ cytokines ต่างๆนั้น สอดคล้องกับการกระตุ้นการเพิ่ม vascular permeability ในกลุ่มผู้ป่วยไข้เลือดออก⁽²¹⁾ ส่งผลกระทบต่อความรุนแรงของโรค ไข้เลือดออกเพิ่มมากขึ้น

- การเพิ่มการแสดงออกของ IL-10⁽²²⁾ , IFN- γ ⁽²³⁾ และ IL-6⁽²³⁾ ,TNF- α ⁽²⁴⁻²⁶⁾ และกลุ่ม cytokines จาก CD₄ T cells⁽²⁷⁻²⁸⁾ พบว่ากลุ่ม cytokines ต่างๆ ส่งผลกระทบต่อความรุนแรงของโรค มาลาเรีย โดยพบว่าถ้ามีการแสดงออกของcytokines ต่างๆข้างต้นจะส่งผลทำให้ผู้ป่วยเป็น severe malaria และ/หรือ cerebral malaria เพิ่มมากขึ้น

จากผลการศึกษาดังกล่าวข้างต้นเกี่ยวกับความสัมพันธ์ของการแสดงออกของ cytokines โดยเฉพาะกลุ่ม cytokines จาก Th และ Th₂ ว่ามีผลต่อความรุนแรงของโรคติดต่อมาโดยยุงทั้งไวรัสเดงกี ไวรัสซิกุนกูยา และเชื้อมาลาเรีย ดังนั้นทีมผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะศึกษาการแสดงออกของ Th₁/ Th₂cytokines และหาความสัมพันธ์ของ cytokines ดังกล่าวเพื่อเป็นแนวทางในการหาตัวชี้วัดที่มีความสัมพันธ์ต่อความรุนแรงของโรคติดต่อมาโดยยุง และกำหนดตัวชี้วัดทางระบบภูมิคุ้มกันที่ใช้เป็นมาตรฐานในการศึกษาพยายังกำเนิดของโรคที่มีพยายาสภาพใกล้เคียงกับกลุ่มผู้ป่วยโรค ไข้เลือดออก และมาลาเรีย และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการพัฒนาการศึกษาพยายังกำเนิดที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน และเครื่องมือคัดกรองความรุนแรงของโรค ส่งผลถึงประสิทธิภาพในการรักษาผู้ป่วย และครอบคลุมถึงงานด้านระบาดวิทยาโดยหวังผลในการลดอัตราการป่วยตายจากโรค ไข้เลือดออก และโรคมาลาเรียต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาตัวชี้วัดทางระบบภูมิคุ้มกันเพื่อบ่งบอกระดับความรุนแรงของโรค
(To determine the indicators of immune system for disease severity classification)
2. เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของตัวชี้วัดทางระบบภูมิคุ้มกันในกลุ่มโรคนำโดยยุงที่พบบ่อยในประเทศไทย โดยเฉพาะในกลุ่มไวรัส(ไวรัสเดงกี)และโปรโตซัว(มาลาเรีย)
(To compare the difference of immune indicators in common mosquito borne diseases in Thailand particularly in virus group (Dengue) and blood protozoa (Malaria))
3. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของตัวชี้วัดกับพยาธิกำเนิดของโรคนำโดยยุงที่พบบ่อยในประเทศไทย
(To evaluate the correlation of the effective indicators and immunopathology of common mosquito borne diseases in Thailand)

วิธีการดำเนินการวิจัยและวิธีการประเมินผลการทดลอง

Study design : Experimental study

สถานที่วิจัย :

- หน่วยปฏิบัติการประยุกต์ ภาควิชาสุขวิทยาเขตร้อน คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล
- ศูนย์วินิจฉัยโรคเขตร้อน คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล

การศึกษาวิจัยในครั้งนี้จะแบ่งการศึกษาออกเป็น 7 ขั้นตอนใหญ่ๆ ดังนี้ :

1. การเตรียมไวรัสเดงกี และตรวจสอบคุณลักษณะของไวรัสเดงกี
ทำการเพาะเลี้ยงไวรัสเดงกีทั้งสี่โรทัยปี (Lab strain) โดยเพาะเลี้ยงในเซลล์ยุง (C6/36) แล้วทำการตรวจสอบคุณลักษณะของไวรัสเดงกีเพื่อดู titration, virulence ด้วยวิธี Double overlay plaque assay โดยปริมาณไวรัสที่ต้องการในแต่ละการทดลองอย่างต่ำ 5×10^6 PFU/ml และยืนยันชนิดของไวรัสเดงกีด้วยวิธี Lanciotti RT/Nested PCR

2. ทำการศึกษาการแสดงออกของเซลล์ระบบภูมิคุ้มกันภายหลังการติดเชื้อด้วยไวรัสเดงกี
 - เตรียมเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน(THP-1 cells)⁽³¹⁻³²⁾ เพื่อตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสเดงกีและดูการแสดงออกของ cytokines
 - นำไวรัสเดงกี ซีโรทัยป์ 2 infect เข้าสู่ THP-1 โดยใช้ multiplication of infection เท่ากับ 1 และทำการเก็บ supernatant ในช่วงเวลาที่ 6, 12, 24 ชั่วโมงภายหลังการกระตุ้นด้วยไวรัส
3. นำsupernatants ที่ได้จากข้อ (b) มาทำการตรวจสอบหา Matrix metalloproteinase enzyme (MMP-2 และ MMP-9) ด้วยวิธี Gelatinolytic zymography และตรวจสอบหาระดับของTh₁ และ Th₂ ด้วยวิธี Magnetic bead-based multiplex assays (BioRad[®]) เพื่อการศึกษาเปรียบเทียบชนิดและความแตกต่างของ Cytokines ของ Th1 และ Th2 (โดยจะทำการศึกษาระดับของ IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12, IL-13, GM-CSF, IFN_γ และ TNF_α) เปรียบเทียบกับ Proteinase enzyme (MMP-2 และ MMP-9) ในซีโรทัยป์2
4. เก็บตัวอย่างซีรัมของผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกชนิด Dengue fever (DF) และ Dengue hemorrhagic fever (DHF) กลุ่มละ 10 คนจากการวินิจฉัยของแพทย์ (Clinical base diagnosis) เพื่อการศึกษาเปรียบเทียบชนิดและความแตกต่างของ Cytokines ของ Th1 และ Th2 (โดยจะทำการศึกษาระดับของ IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12, IL-13, GM-CSF, IFN_γ และ TNF_α) เปรียบเทียบผลกับกลุ่ม THP-1 ด้วยวิธี Magnetic bead-based multiplex assays (BioRad[®])
5. เก็บตัวอย่างซีรัมจากกลุ่มผู้มีสุขภาพแข็งแรง (Normal human sera) จำนวน 10 คน เพื่อการศึกษาเปรียบเทียบชนิดและความแตกต่างของ Cytokines ของ Th₁ และ Th₂ (โดยจะทำการศึกษาระดับของ IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12, IL-13, GM-CSF, IFN_γ และ TNF_α) ด้วยวิธี Magnetic bead-based multiplex assays (BioRad[®]) โดยมีข้อกำหนดสำหรับอาสาสมัครเข้าร่วมโครงการวิจัยมีดังนี้

- **Inclusion criteria**

- สุขภาพแข็งแรง
- อายุ 15 ปีขึ้นไป
- ปฏิเสธโรคประจำตัวติดต่อเรื้อรัง หรือโรคทางระบบภูมิคุ้มกันและระบบโลหิต
- ปฏิเสธการใช้ยาหรือผลิตภัณฑ์ที่มีผลต่อความผิดปกติของระบบภูมิคุ้มกันก่อนเข้าร่วมโครงการอย่างน้อย

- ผู้เข้าร่วมโครงการมีความยินดีเข้าร่วมโครงการด้วยความเต็มใจ ภายใต้งานตัดสินใจของผู้ป่วยเอง

- **Exclusion criteria**

- ปฏิเสธการเข้าร่วมโครงการวิจัย

6. เก็บตัวอย่างซีรัมจากกลุ่มผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคมาลาเรียด้วยวิธี Thick and Thin blood film diagnosis จำนวนกลุ่มละ 10 คน

- Plasmodium falciparum (High parasite counted : $\geq 50/1000$ RBC)

- Plasmodium falciparum (Low parasite counted : $< 50/1000$ RBC)

ทำการศึกษาระดับของ IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12, IL-13, GM-CSF, IFN _{γ} และ TNF _{α} (โดยจะทำการศึกษาระดับของ IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12, IL-13, GM-CSF, IFN _{γ} และ TNF _{α}) ด้วยวิธี Magnetic bead-based multiplex assays (BioRad)

7. นำข้อมูลการแสดงผลของ ความแตกต่างของ Cytokines ของ Th₁ และ Th₂ (โดยจะทำการศึกษาระดับของ IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12, IL-13, GM-CSF, IFN _{γ} และ TNF _{α}) ด้วยวิธี Magnetic bead-based multiplex assays (BioRad) มาวิเคราะห์เปรียบเทียบปริมาณการแสดงผล โดยการหาความแตกต่างในแต่ละกลุ่มด้วยวิธี ANOVA และ/หรือ non-Parametric ชนิด K-independent variables และทำการศึกษาหาความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มด้วยวิธี Correlation

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- ทำให้ทราบลักษณะ รูปแบบการเปลี่ยนแปลงของ cytokines ภายหลังจากการถูกกระตุ้นด้วยจุลชีพ โดยเฉพาะกลุ่มจุลชีพติดต่อนำโดยยุง
- นำความรู้ที่ได้ไปพัฒนาการศึกษาเปรียบเทียบพยาธิกำเนิดของโรคติดต่อนำโดยยุง และทราบถึงตัวบ่งชี้ความรุนแรงของโรคเพื่อนำไปเป็นตัวควบคุมในการศึกษาทดลองทางพยาธิกำเนิด
- นำความรู้ที่ได้ไปศึกษาเปรียบเทียบและหาความสัมพันธ์ระหว่างโฮสต์ จุลชีพและการตอบสนอง รวมถึงความจำเพาะของยุงพาหะต่อโรคติดต่อนำโดยยุง
- นำความรู้ที่ได้ไปใช้พัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อโรคติดต่อนำโดยยุงโดยใช้พื้นฐานความรู้ทางระบบภูมิคุ้มกันและ cytokines ในการศึกษาครั้งนี้ เพื่อใช้ในการพยากรณ์โรคและเฝ้าระวังในการรักษาผู้ป่วย

1. การเพาะเลี้ยงไวรัสเดงกีในห้องปฏิบัติการ

เชื้อไวรัสเดงกีทั้ง 4 ซีโรทัยป์ คือ DV1-Hawaii, DV2-16681, DV3-H87 และ DV4-H241 ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วินิจฉัยโรคไข้เลือดออก คณะเวชศาสตร์เขตร้อน(TDC) สำหรับวิธีการเตรียมไวรัสจะทำโดยการเพิ่มจำนวนไวรัสใน culture flask (Costar, USA) ขนาด 75 m^2 ที่ค่าความสัมพันธ์ของไวรัสต่อเซลล์ 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 $28^{\circ}C$ 5%CO₂ incubator หลังจากนั้น รอจนเกิด cytopathic effect ได้ประมาณ 50-70% จึงทำการ freeze ตัวอย่างที่ $-70^{\circ}C$ เพื่อนำไปตรวจสอบหาปริมาณไวรัสต่อไป

2. การตรวจสอบคุณสมบัติของเชื้อไวรัสเดงกี

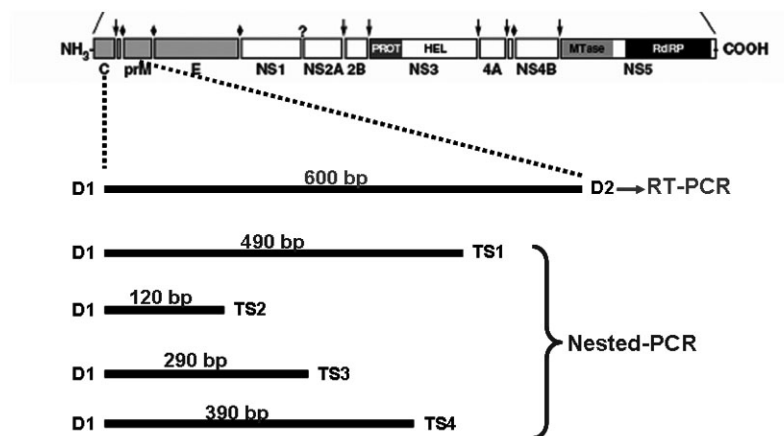
a. ตรวจสอบด้วยวิธี Animal tissue culture

- เตรียมเซลล์ที่จะใช้ในการตรวจสอบคุณสมบัติของไวรัสเดงกี ในการทดลองนี้ใช้เซลล์ LLC-MK2 โดยทำการใส่เซลล์ลงใน 6-well plate ปริมาณเท่ากับ 1×10^5 cells/well รอจนเซลล์เต็ม plate ซึ่งจะมีปริมาณเซลล์เท่ากับ 5×10^5 cells/well โดยใช้เวลาประมาณ 3 วัน
- นำตัวอย่างไวรัสเดงกีทั้ง 4 ซีโรทัยป์ ที่เก็บไว้ที่ $-70^{\circ}C$ มาละลายที่ $37^{\circ}C$ ทำ 10-fold dilution ตัวอย่างในอาหารเลี้ยงเซลล์ (MEM medium; Gibco, USA)
- นำตัวอย่างที่ diluted แล้วมาหยดบนเซลล์ที่เตรียมไว้ 1 diluent : 1 well ทำการกระตุ้นโดยการเขย่า plate ทุกๆ 15 นาที จนครบ 90 นาที
- เตรียม First overlay ซึ่งประกอบไปด้วย 2X-Medium (Hank's balance salt solution, RPMI FBS) และ 2% agarose
- เก็บตัวอย่างที่เต็ม first overlay ใน $37^{\circ}C$ 5%CO₂ incubator ประมาณ 1 สัปดาห์ หลังจากนั้นทำการเติม second overlay (2x-medium + 4% neutral red+ 2% agarose) เก็บตัวอย่างไว้ใน $37^{\circ}C$ 5%CO₂ incubator เป็นเวลา 12-24 ชั่วโมง แล้วนำมานับจำนวน plaque formation และ วัดขนาดของ plaque ที่ตรวจพบ

- ตรวจสอบคุณสมบัติของไวรัสแดงกีด้วยวิธี Immunofluorescence และ blotting assay ที่จำเพาะต่อไวรัสแดงกี(ไม่จำเพาะซีโรทัยป์) โดยเลือกใช้ primary antibody ต่อ E-protein ของไวรัสแดงกี ในอัตราส่วน 1: 500 และใช้ secondary antibody คือ anti-goat ในอัตราส่วน 1: 5000 และตรวจสอบผลการทดลองโดยการดู Inverted fluorescence microscope และ chemiluminescence (BioRad, USA) ตามลำดับ

b. ตรวจสอบด้วยวิธี RT/Nested PCR-Lanciotti primer set

- ทำการ extract ตัวอย่างเพื่อเตรียม RNA ด้วย QIAamp viral RNA extraction kits (วิธีการตาม protocol ของ kits)
- ทำการตรวจสอบปริมาณ RNA และ ความบริสุทธิ์ของ RNA จาก extracted samples ที่ 260 และ 280 nm
- ตรวจสอบตัวอย่างไวรัสแดงกีด้วยวิธี RT-PCR โดยใช้ Qiagen-one step RT-PCR kits (วิธีการตาม protocol ของ kits) และใช้ไพรเมอร์ของ lanciotti set ⁽¹⁶⁻¹⁹⁾



ภาพที่ 1 แสดงตำแหน่งของ Lanciotti primer set ⁽⁸⁾

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

- นำตัวอย่างที่ได้จาก RT-PCR มาทำการตรวจสอบหาซีโรทัยป์ ของไวรัสเดงกีด้วยวิธี 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

- 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 เพื่อใช้เป็นตัวควบคุมในการตรวจหาระดับ cytokines ด้วยวิธี Magnetic bead-based multiplex assays (BioRad®)
 - a. การเตรียมตัวอย่างเพื่อทำการศึกษาการแสดงออกของ Matrix metalloproteinases ด้วยวิธี zymography
 - เตรียมเซลล์ที่จะใช้ในการทดลองคือ THP-1 cells โดยใส่ลงใน 6-well plate ปริมาณประมาณ 1×10^5 cells
 - เตรียมไวรัสแต่ละซีโรทัยป์ที่ปริมาณ 1×10^5 PFU เพื่อให้ได้ค่า moi=1
 - ทำการ infect ไวรัสแต่ละซีโรทัยป์ลงในแต่ละเซลล์ ใช้เวลาในการ infect ประมาณ 90 นาที
 - ทำการเก็บตัวอย่างของ supernation ที่ระยะเวลา 6, 12, 24 ชั่วโมง ภายหลังการ infected
 - นำ supernatant แต่ละเซลล์/ ซีโรทัยป์/ เวลา นำมาทำการตรวจสอบหาการแสดงออกของ เอนไซม์ Matrix metalloproteinases ด้วยวิธี zymography ตามวิธีการของ Luplertlop, et al. 2006⁽⁹⁻¹⁰⁾
 - b. เปรียบเทียบการแสดงออกของ เอนไซม์ Matrix metalloproteinases สำหรับ ด้วยวิธี zymographyตามวิธีการของ Luplertlop, et al. 2006⁽⁹⁻¹⁰⁾
4. เก็บตัวอย่างซีรัมของผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกชนิด Dengue fever (DF) และ Dengue hemorrhagic fever (DHF) กลุ่มละ 10 คนจากการวินิจฉัยของแพทย์ (Clinical base diagnosis) พร้อมทั้งตรวจยืนยันการติดเชื้อไข้เลือดออก ตามวิธีการวิจัยที่ 1-2
5. จัดแบ่งซีรัมผู้ป่วยไข้เลือดออกใส่ใน ependorf tubes อย่างละ 50 ไมโครลิตร เพื่อศึกษาเปรียบเทียบชนิดและความแตกต่างของ Cytokines ของ Th1 และ Th2 (โดยจะทำการศึกษาระดับของ IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12, IL-13, GM-CSF, IFN_γ และ TNF_α) เปรียบเทียบผลกับกลุ่ม THP-1 ด้วยวิธี Magnetic bead-based multiplex assays (BioRad®)
6. เก็บตัวอย่างซีรัมจากกลุ่มผู้มีสุขภาพแข็งแรง (Normal human sera) จำนวน 10 คน แบ่งซีรัมใส่ ependorf tubes อย่างละ 50 ไมโครลิตร เพื่อการศึกษาเปรียบเทียบชนิดและความแตกต่างของ Cytokines ของ Th₁ และ Th₂ (โดยจะทำการศึกษาระดับของ IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12, IL-13, GM-CSF, IFN_γ และ TNF_α) ด้วยวิธี Magnetic bead-based multiplex assays (BioRad®)

8. เก็บตัวอย่างซีรัมจากกลุ่มผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคมาลาเรียด้วยวิธี Thick and Thin blood film diagnosis จำนวนกลุ่มละ 10 คน

- Plasmodium falciparum (High parasite counted : $\geq 50/1000$ RBC)

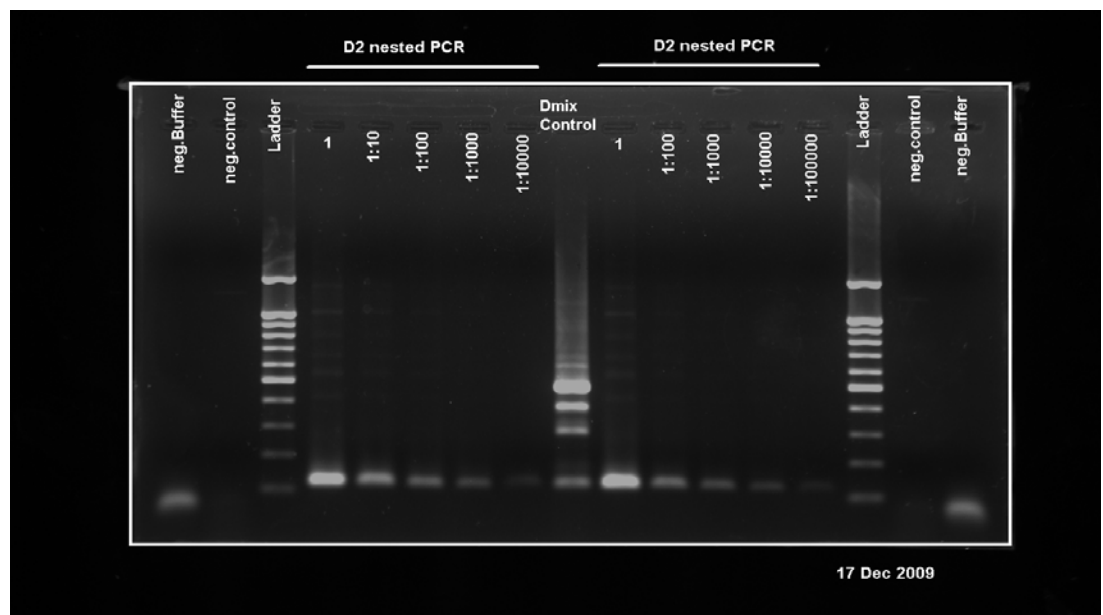
- Plasmodium falciparum (Low parasite counted : $< 50/1000$ RBC)

จัดแบ่งซีรัมผู้ป่วยใส่ ependorf tubes อย่างละ 50 ไมโครลิตร ทำการศึกษาเปรียบเทียบชนิดและความแตกต่างของ Cytokines ของ Th_1 และ Th_2 (โดยจะทำการศึกษาระดับของ IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12, IL-13, GM-CSF, IFN_γ และ TNF_α) ด้วยวิธี Magnetic bead-based multiplex assays (BioRad[®])

นำซีรัมของผู้ป่วยไข้เลือดออก ชนิด DF และ DHF , ซีรัมผู้ป่วยมาลาเรีย ชนิด high และ low parasitemia รวมถึงอาสาสมัครปกติ อย่างละ 10 ตัวอย่าง ปริมาณ 20 ไมโครลิตร ตรวจหา Cytokines ของ Th_1 และ Th_2 (โดยจะทำการศึกษาระดับของ IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12, IL-13, GM-CSF, IFN_γ และ TNF_α) ด้วยวิธี Magnetic bead-based multiplex assays (BioRad[®]) ตามขั้นตอนของบริษัทที่นำมาสนับสนุนการศึกษานี้

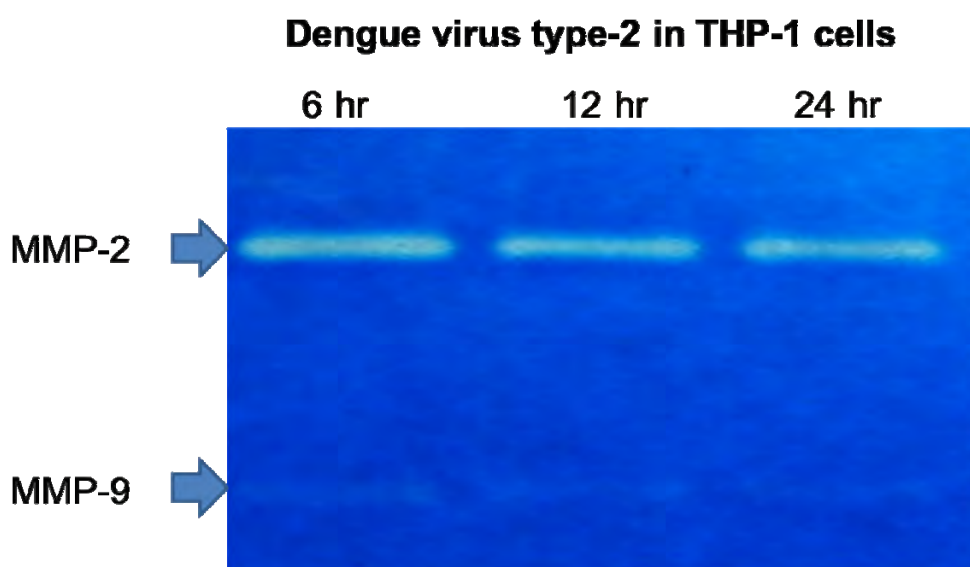
9. นำข้อมูลการแสดงผลของ ความแตกต่างของ Cytokines ของ Th_1 และ Th_2 (โดยจะทำการศึกษาระดับของ IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12, IL-13, GM-CSF, IFN_γ และ TNF_α) ด้วยวิธี Magnetic bead-based multiplex assays (BioRad[®]) มาวิเคราะห์เปรียบเทียบปริมาณการแสดงผล โดยการหาความแตกต่างในแต่ละกลุ่มด้วยวิธี ANOVA และ/หรือ non-Parametric ชนิด K-independent variables และทำการศึกษาหาความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มด้วยวิธี Correlation

- การตรวจสอบหาปริมาณไวรัสเดงกี ซีโรทัยปัสสอง โดยใช้วิธีการตรวจสอบหาตำแหน่งและขนาดของ PCR products ของ Lanciotti primer set โดยพบว่าขนาดของ PCR product ของไวรัสเดงกีซีโรทัยปัสสอง จะมีขนาดที่ 119 bp. ดังภาพ 2



ภาพที่ 2 แสดงตำแหน่งและขนาดของ Nested-PCR products ของไวรัสเดงกีซีโรทัยปัสสอง มีขนาด เท่ากับ 119 bp,

- การตรวจหาการแสดงออกของ matrix metalloproteinases enzymes (MMPs) จาก THP-1 cells ภายหลังการกระตุ้นด้วยไวรัสเดงกี ซีโรทัยปัสสอง ที่ moi=1 พบว่ามีการแสดงออกของปริมาณ MMP-2 ในปริมาณที่สูงกว่า MMP-9 โดยพบว่าการแสดงออกสูงสุดในช่วงเวลา 6 ชั่วโมงหลังกระตุ้นด้วยไวรัสเดงกี ซีโรทัยปัสสอง ดังภาพ 3



ภาพที่ 3 แสดงการแสดงออกของ matrix metalloproteinases enzymes ชนิดที่ 2 และ ชนิดที่ 9 จาก supernatants ที่ได้จากตัวอย่างของ THP-1+ Dengue virus 2

- เมื่อดำเนินการตรวจวัดระดับของ IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12, IL-13, GM-CSF, IFN_γ และ TNF_α ด้วยวิธี Magnetic bead-based multiplex assays (BioRad) เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มของ THP-1 และกลุ่ม THP-1 ที่กระตุ้นด้วยไวรัสเดงกีซีโรทัยปัสสอง (ดำเนินการทดลองแบบ independent ทั้งหมด 5 ครั้ง) พบว่า กลุ่มที่มีการติดเชื้อไวรัสเดงกี ซีโรทัยปัสสองนั้นจะมีการแสดงออกของปริมาณ ของ IL-2, IL-5, IL-10, IL-12, IL-13, GM-CSF, IFN_γ และ TNF_α สูงกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับการกระตุ้นด้วยไวรัสเดงกีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ยกเว้น IL-4 มีความแตกต่างเพียงเล็กน้อย อย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ

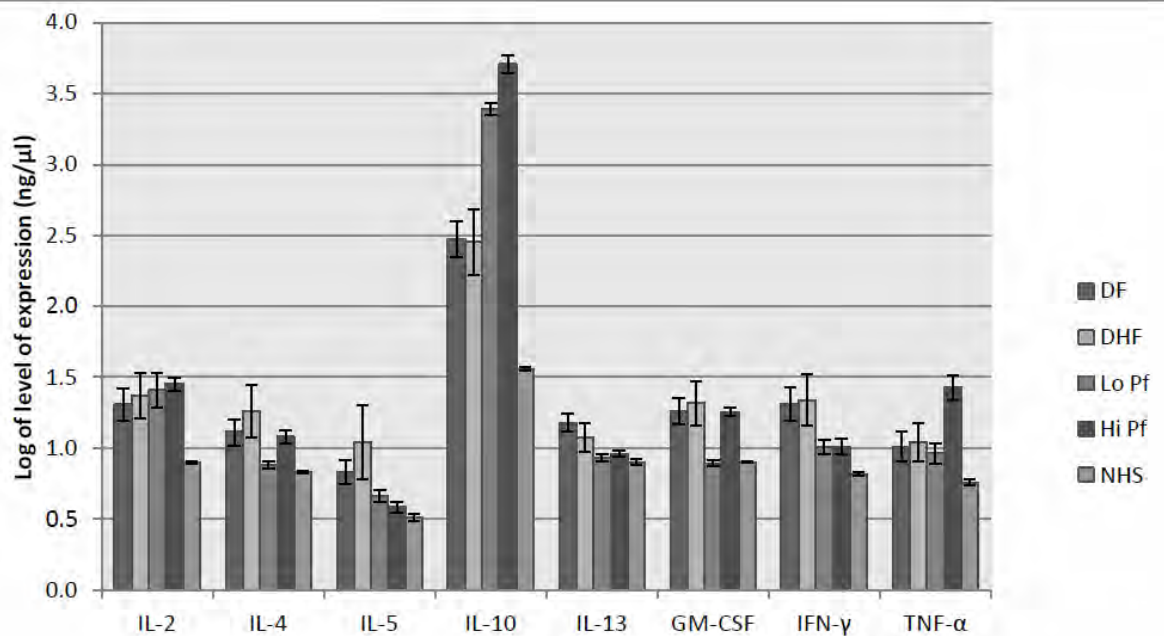
- นำกลุ่มซีรัมตัวอย่างทั้ง 5 กลุ่มคือกลุ่มอาสาสมัคร กลุ่มผู้ป่วยไข้เลือดออก และกลุ่มผู้ป่วยมาลาเรีย มาตรวจหาเปรียบเทียบความแตกต่างของ Cytokines ของ Th1 และ Th2 (โดยจะทำการศึกษาระดับของ IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12, IL-13, GM-CSF, IFN_γ และ TNF_α) ด้วยวิธี Magnetic bead-based multiplex assays (BioRad[®]) พบว่าทั้งกลุ่มผู้ติดเชื้อไข้เลือดออกและกลุ่มผู้ติดเชื้อมาลาเรียมีการแสดงออกของ cytokines ที่สูงกว่ากลุ่มอาสาสมัครอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังตารางที่.....

ตารางที่ 1 แสดงการเปรียบเทียบการแสดงออกของ Th1 และ Th2 cytokines

Cytokines	Expression level (median, min, max in ng/μl)			P-value
	Dengue (n=20)	Malaria (n=20)	NHS (n=10)	
IL-2	14.5 (8.5, 169.5)	29.0 (6.0, 59.1)	7.9 (7.5, 8.8)	<0.001
IL-4	10.0 (6.0, 173.0)	9.4 (6.0, 19.7)	6.7 (6.5, 7.5)	0.001
IL-5	6.8 (2.5, 249.0)	4.1 (3, 6.4)	3.4 (2.5, 4.0)	0.006
IL-10	395.9 (31.0, 1,882.0)	3,169.7 (1,600.0, 8,172.0)	37.0 (32.5, 39)	<0.001
IL-13	11.0 (7.0, 64.5)	8.9 (7.4, 11.7)	8.0 (6.8, 9.8)	0.007
GM-CSF	14.5 (7.5, 226.5)	12.0 (6.5, 21.0)	8.0 (7.5, 8.7)	0.005
IFN-γ	15.8 (6.0, 273.3)	10.7 (6.0, 19.0)	6.8 (5.8, 7.4)	<0.001
TNF-α	7.0 (5.0, 54.8)	16.5 (6.5, 44.7)	5.9 (5.0, 7.0)	0.001

- การตรวจเปรียบเทียบการแสดงออกของ Cytokines ของ Th1 และ Th2 (โดยจะทำการศึกษาระดับของ IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12, IL-13, GM-CSF, IFN_γ และ TNF_α) ด้วยวิธี Magnetic bead-based multiplex assays (BioRad[®]) ในกลุ่มผู้ติดเชื้อไข้เลือดออก ชนิด DF และ DHF กลุ่มผู้ติดเชื้อมาลาเรีย ชนิด high และ low parasitemia เปรียบเทียบกับกลุ่มอาสาสมัคร พบว่า : (ดังภาพที่4)

- O เมื่อนำซีรัมของผู้ป่วยไข้เลือดออกชนิด Dengue fever (DF) และ Dengue hemorrhagic fever (DHF) กลุ่มละ 10 คนจากการวินิจฉัยของแพทย์ (Clinical base diagnosis) พร้อมทั้งตรวจยืนยันการติดเชื้อไข้เลือดออกด้วยวิธี PCR แล้ว จึงนำซีรัมตัวอย่างมาตรวจหาความแตกต่างของ Cytokines ของ Th1 และ Th2 (โดยจะทำการศึกษาระดับของ IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12, IL-13, GM-CSF, IFN_γ และ TNF_α) ด้วยวิธี Magnetic bead-based multiplex assays (BioRad[®]) พบว่า กลุ่ม DHF มีการแสดงออกของ cytokines ทั้ง 7 ชนิดสูงกว่ากลุ่ม DF อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ยกเว้น IL-13 ที่มีความแตกต่างโดยพบว่า DHF มีการแสดงออกในปริมาณที่เพิ่มขึ้นกว่า DF แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)
- O สำหรับกลุ่มผู้ติดเชื้อมาลาเรียชนิด P.falciparum จะพบว่ากลุ่ม high parasitemia จะมีการแสดงออกของ IL-4, IL-10, GM-CSF, and TNF- α ที่สูงกว่ากลุ่ม low parasitemia อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\text{-value} < 0.05$)
- O เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มผู้ติดเชื้อไวรัสเดงกีกับผู้ติดเชื้อมาลาเรียทั้งสองกลุ่ม ความรุนแรง จะพบว่าการแสดงออกของ IL-10 สูงอย่างชัดเจนในกลุ่มของ severe form (DHF และ High parasitemia)



ภาพที่ 4 แสดงการแสดงออกของ ระดับ IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12, IL-13, GM-CSF, IFN_γ และ TNF_α ด้วยวิธี Magnetic bead-based multiplex assays (BioRad[®]) เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มผู้ติดเชื้อไวรัสเดงกีซีโรทัยปสอง ผู้ติดเชื้อมาลาเรีย และกลุ่มอาสาสมัคร

โรคติดต่อที่นำโดยยุง จัดเป็นโรคที่พบบ่อยในประเทศเขตร้อนและแถบเส้นศูนย์สูตร มีการแพร่กระจายเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ ทั้งในประเทศภูมิภาคเอเชีย และประเทศตะวันตก ส่งผลให้มีผู้เจ็บป่วยและเสียชีวิตเพิ่มจำนวนมากขึ้นเรื่อยๆ สาเหตุหนึ่งมาจากการที่โลกมีภาวะโลกร้อนเพิ่มมากขึ้น ส่งผลให้วงจรชีวิตของยุงมีรอบของการเจริญเติบโตเร็วขึ้น และมีระยะเวลาในการกินเลือดในแต่ละวันเพิ่มมากขึ้น จึงจัดเป็นปัจจัยหนึ่งของการเพิ่มปริมาณของยุงและยังส่งผลต่อการระบาดของโรคติดต่อที่นำโดยยุงเพิ่มขึ้น

นอกจากผลกระทบจากการเพิ่มปริมาณยุงแล้ว พยาธิกำเนิดของโรคติดต่อที่นำโดยยุงก็มีผลต่อการเพิ่มอัตราการติดเชื้อ และป่วยตายเพิ่มขึ้นเช่นกัน ในประเทศไทย โรคติดต่อที่นำโดยยุงที่พบบ่อยคือไข้เลือดออก และไข้มาลาเรีย

- กรณีไข้เลือดออก ในปัจจุบันยังไม่มีข้อสรุปที่แน่ชัดสำหรับพยาธิกำเนิดของโรค จึงส่งผลให้การพัฒนารักษาและวัคซีนป้องกันเป็นไปได้อย่างช้าๆ
- กรณีโรคมาลาเรีย เป็นที่ทราบกันว่าจังหวัดตามแนวชายแดนของประเทศไทยยังคงมีอัตราการติดเชื้อสูง และยังพบอัตราการดื้อยาเพิ่มมากขึ้นส่งผลกระทบในด้านระบาดวิทยาและความรุนแรงของโรค

จากการศึกษาของทีมผู้วิจัยที่ทำการศึกษเกี่ยวกับ Matrix metalloproteinases enzymes (MMPs) ในโรคไข้เลือดออก พบว่ามีผลต่อความรุนแรงของโรคโดยเฉพาะเกี่ยวข้องกับการเพิ่ม permeability ของเส้นเลือด ซึ่งส่วนหนึ่งของการศึกษาวิจัยพบว่ามี的增加จำนวนของ TNF α ที่สอดคล้องกับการแสดงออกของ MMPs จากผลการทดลองดังกล่าวทีมผู้วิจัยจึงเห็นว่าความสัมพันธ์ของการแสดงออกของ cytokines น่าจะมีผลกระทบต่อ permeability ของเส้นเลือดและมีความสัมพันธ์กับ cytokines ในกลุ่มของ Th1 และ Th2 ซึ่งเป็นเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันหลักที่ส่งผลกระตุ้นให้มีการสร้าง TNF α เช่นกัน ซึ่งเมื่อพิจารณาถึงความรุนแรงของโรคติดต่อที่นำโดยยุง ในกรณีของไข้มาลาเรียนั้น พบว่าเมื่อผู้ป่วยอยู่ในขั้นวิกฤตมักจะเสียชีวิตด้วยภาวะของ vascular leakage เช่น pulmonary edema brain edema และ hepatic failure และ/หรือ renal failure ซึ่งสอดคล้องกับสาเหตุการตายของไข้เลือดออกเช่นกัน ด้วยเหตุนี้ทีมผู้วิจัยจึงสนใจที่จะทำการศึกษการแสดงออกของ cytokines จากกลุ่มของ Th1 และ Th2 เปรียบเทียบระหว่างไข้เลือดออก และมาลาเรีย เปรียบเทียบกับกลุ่มอาสาสมัครผู้มีสุขภาพแข็งแรง(กลุ่มควบคุม) เพื่อหาความสัมพันธ์ของ cytokines ต่างๆ ว่ากลุ่ม cytokine ชนิดใดที่ส่งผลต่อความรุนแรงในแต่ละโรค โดยใช้ไวรัสแดงก็เป็นแม่แบบในการศึกษาทั้งในห้องปฏิบัติการ และซีรัมของผู้ป่วย

จากผลการศึกษาวิจัยในครั้งนี้พบว่า การแสดงออกของ 8 cytokines ซึ่งเป็นกลุ่ม cytokines ที่มีความเกี่ยวข้องกับ Th1 และ Th2 อันประกอบด้วย interleukin (IL)-2, IL-4, IL-5,

IL-10, IL-13, Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), interferon (IFN)- γ , and tumor necrosis factor (TNF)- α พบว่ากลุ่มผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสเดงกี ซีโรทัยปี 2 และผู้ติดเชื้อมาลาเรียชนิด *P.falciparum* มีการแสดงออกของ cytokines ทั้ง 8 ในปริมาณที่สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (p-value < 0.05) โดยผู้ที่ติดเชื้อไวรัสเดงกีชนิด DHF จะมีการแสดงออกของ cytokines สูงกว่ากลุ่ม DF ทั้ง 7 cytokines ยกเว้น IL-13 สำหรับกลุ่มผู้ติดเชื้อมาลาเรียชนิด *P.falciparum* จะพบว่ากลุ่ม high parasitemia จะมีการแสดงออกของ IL-4, IL-10, GM-CSF, and TNF- α ที่สูงกว่ากลุ่ม low parasitemia อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p-value < 0.05) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มผู้ติดเชื้อไวรัสเดงกีกับผู้ติดเชื้อมาลาเรียทั้งสองกลุ่มความรุนแรง จะพบว่าการแสดงออกของ IL-10 สูงอย่างชัดเจนในกลุ่มของ severe form (DHF และ High parasitemia)

ดังนั้นจะเห็นได้ว่า IL-10 นั้นมีความสำคัญในการนำไปศึกษาต่อเพื่อพัฒนาเครื่องมือตรวจวัด biomarkers เพื่อตรวจพยากรณ์ความรุนแรงของโรคและนำไปสู่การศึกษาในแนวลึกเกี่ยวกับพยาธิกำเนิดของโรคต่อไป

จากผลการทดลองดังกล่าวข้างต้น สามารถประเมินข้อดีและข้อเสียของงานวิจัยในครั้งนี้ได้ดังนี้คือ

- ข้อดีของการวิจัยในครั้งนี้คือ
 - สามารถนำข้อมูลการทดลองครั้งนี้ไปเป็นพื้นฐานเบื้องต้นในการศึกษาพยาธิกำเนิดของไข้เลือดออกและไข้มาลาเรียในแนวลึกต่อไป
 - สามารถนำเป็นข้อมูลเบื้องต้นเพื่อไปพัฒนาตัวชี้วัดและเครื่องมือที่เหมาะสมสำหรับการเฝ้าระวังผู้ป่วยไข้เลือดออกและไข้มาลาเรียต่อไป อันจะส่งผลต่อการเฝ้าระวัง และการพยากรณ์โรคที่มีประสิทธิภาพ ส่งผลให้อัตราการเสียชีวิตของผู้ป่วยลดน้อยลง
- ข้อเสียของการวิจัยในครั้งนี้
 - การศึกษาวิจัยนี้ใช้เพียงกลุ่ม cytokines จาก Th1 และ Th2 ซึ่งอาจเป็นเพียงกลุ่ม cytokines ที่ส่งผลต่อพยาธิกำเนิดได้ แต่อาจจะมีการตอบสนองที่ช้ากว่ากลุ่ม cytokines หรือ chemokines จาก innate immune cells เช่น NK cells หรือ NKT cells รวมถึงกลุ่ม Antigen presenting cells ที่ตอบสนองต่อการติดเชื้อจุลชีพที่เร็วกว่า
 - การศึกษานี้ใช้กลุ่มประชากรตัวอย่างที่น้อยเกินไป จึงเห็นว่าควรต้องเพิ่มปริมาณประชากรตัวอย่างในการศึกษาเพิ่มเติม

จากผลการทดลองดังกล่าวข้างต้นพบว่าวิธีการศึกษาหาตัวชี้วัดความรุนแรงของโรคติดต่อ นำโดยยุงด้วยวิธี Magnetic bead-based multiplex assays (BioRad®) จัดเป็นวิธีการหนึ่งที่ใช้ปริมาณตัวอย่างสิ่งส่งตรวจน้อย (<20 ไมโครลิตร) และสามารถตรวจหา cytokines ได้ตั้งแต่ 1-30 ชนิด (ซึ่งการทดลองนี้ใช้เพียง 8 ชนิด) ในระยะเวลาไม่เกิน 2 ชั่วโมง ดังนั้นข้อมูลที่ได้จากการศึกษานี้จึงสามารถนำไปเป็นพื้นฐานสำหรับการศึกษาวิจัยในแนวลึกด้าน molecular immunology รวมถึงการศึกษความสัมพันธ์ของ cytokines และ cell signaling หรือสารอื่น ๆ ที่มีความสัมพันธ์และเกี่ยวข้องกับพยาธิกำเนิด และความรุนแรงของโรคอื่น ๆ ต่อไป ทั้งนี้เพื่อเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการเฝ้าระวังผู้ป่วย การพยากรณ์โรค อีกทั้งยังสามารถนำไปใช้เป็นพื้นฐานสำหรับการศึกษาพยาธิกำเนิดของโรค เช่น โรคติดต่อ โรคไม่ติดต่อ โรคที่มีพาหะนำโรค หรือโรคที่ไม่มีพาหะนำโรคอื่น ๆ ต่อไป ซึ่งการศึกษาต่าง ๆ จะนำไปสู่การพัฒนาการดูแลรักษาผู้ป่วย ทั้งในรูปแบบการพัฒนาเครื่องมือตรวจวัดความรุนแรงของโรคเพื่อใช้ในการพยากรณ์โรค ส่งผลต่อการเฝ้าระวังโรคที่มีประสิทธิภาพต่อไป

ปัญหาที่พบในการทำการวิจัย

- การศึกษาวิจัยนี้ ต้องมีการขออนุมัติจากคณะกรรมการจริยธรรมการศึกษาวิจัยในมนุษย์ ของคณะเวชศาสตร์เขตร้อนก่อนเริ่มต้นดำเนินการวิจัย ซึ่งใช้เวลานานมากในการตรวจ แก้ไข ซึ่งระยะเวลาที่ผ่านการอนุมัติ เป็นระยะเวลาที่ความชุกของโรคลดน้อยลง ทำให้ ต้องใช้เวลาในการเก็บตัวอย่างสิ่งส่งตรวจนานขึ้นกว่าแผนงานที่ได้วางไว้
- ปัญหาการประสพภัยพิบัติธรรมชาติ (อุทกภัย 2554) ส่งผลทำให้การดำเนินการวิจัยดังนี้
 - ไม่สามารถดำเนินการวิจัยได้อย่างต่อเนื่อง และเป็นช่วงระยะเวลาที่มีการระบาดของ โรคไข้เลือดออก และมาลาเรีย แต่ไม่สามารถดำเนินการเก็บตัวอย่างสิ่งส่ง ตรวจได้ จึงต้องเลื่อนกำหนดการเก็บตัวอย่างสิ่งส่งตรวจ เป็นช่วงเดือน มกราคม – มีนาคม 2555 ซึ่งเป็นช่วงที่การระบาดของโรคดังกล่าวมีปริมาณน้อย
 - ปัญหาไฟฟ้าดับโดยไม่มีผู้ดูแลเนื่องจากประสบอุทกภัย ส่งผลให้ไวรัสที่เก็บไว้ ละลาย ทำให้ต้องเริ่มดำเนินการเพิ่มปริมาณไวรัสใหม่ ผู้วิจัยจึงเลือกใช้ เติงกี ไวรัสซีโรทัยปัสอง เป็นตัวแทน เนื่องจากสามารถเพิ่มปริมาณได้เร็วและยังคงมี ปริมาณไวรัสพอสำหรับการวิจัย
 - การตรวจวิเคราะห์ Cytokines ของ Th_1 และ Th_2 (โดยจะทำการศึกษาระดับของ IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12, IL-13, GM-CSF, IFN_γ และ TNF_α) ด้วยวิธี Magnetic bead-based multiplex assays (BioRad) นั้น เนื่องด้วยเครื่องมือ ดังกล่าวยังไม่ได้ดำเนินการซื้อไว้ในครอบครองของคณะเวชศาสตร์เขตร้อน จึง ต้องดำเนินการวิจัยภายใต้ความอนุเคราะห์ของบริษัทผู้จำหน่าย ซึ่งทางบริษัท ติดปัญหาอุทกภัยทำให้ไม่สามารถมาบริการได้ตามเวลา อีกทั้งสารเคมีก็ต้องใช้ เวลาในการสั่งซื้อนานและค้างอยู่ที่หน่วยงานรัฐบาลที่ตรวจรับนานกว่าจะ สามารถเบิกมาใช้ได้
 - ด้วยปัญหาอุทกภัยดังกล่าวค่อนข้างรุนแรงและยืดเยื้อ ทีมผู้วิจัยจึงนํานางานวิจัยที่ สามารถทำได้ในช่วงเวลาดังกล่าวเพราะผู้วิจัยได้เก็บตัวอย่างไว้บ้างแล้ว และ เป็นโครงการที่ยังไม่มีทุนวิจัยสนับสนุน มาทำการศึกษาวินิจฉัยแทน โดยใช้เงิน สนับสนุนจากทุนที่ได้รับในครั้งนี้นี้ดำเนินการจนสามารถปิดโครงการอื่นๆได้ 3 โครงการในช่วงเวลาการรอกการดำเนินการโครงการวิจัยหลัก โดยโครงการทั้ง 3 โครงการมีดังนี้
 - การศึกษาผลของสารสกัดจากข้าวที่ปนเปื้อนแคดเมียมต่อการยับยั้ง อนุมูลอิสระ (นำเสนองานประชุมวิชาการการประชุมพฤษศาสตร์แห่งประเทศไทย และดำเนินการส่งตีพิมพ์วารสารต่างประเทศ)

- การศึกษาผลของกาวยาใหม่ต่อการชะลอความชรา (ดำเนินการส่งตีพิมพ์วารสารต่างประเทศ)
- บทบาทของโปรตีนจากน้ำลายยุ่งลาย (เป็นโครงการต่อเนื่องจากที่ได้ดำเนินการศึกษาวิจัยและจดสิทธิบัตรร่วมกับประเทศฝรั่งเศส และดำเนินการส่งตีพิมพ์วารสารต่างประเทศ)
- ภาวะโรคผิวหนังที่เกิดในช่วงอุทกภัยในประเทศไทย ปี 2554
(นำเสนองานประชุมวิชาการสมาคมแพทย์ผิวหนังแห่งประเทศไทย)

➤ เนื่องด้วยหัวหน้าโครงการได้ดำเนินการย้ายภาควิชา จากภาควิชาสุขวิทยาเขตร้อนไป ภาควิชาจุลชีววิทยาและอิมมิวโนโลยี ทำให้ต้องมีการจัดตั้งห้องปฏิบัติการวิจัยในครั้งใหม่และยังต้องมีการสั่งซื้อสารเคมี รวมถึงเครื่องมือที่พร้อมสำหรับการวิจัยครั้งนี้ใหม่ จึงต้องมีการส่งสารเคมีเบื้องต้นเป็นจำนวนมาก กอปรกับราคาของสารเคมีที่ซื้อในขณะทำการวิจัยเมื่อเปรียบเทียบกับราคาที่เสนอไปในช่วงแรกของการขออนุสนับสนุการวิจัยมีราคาเพิ่มสูงขึ้นอย่างมาก จึงมีความจำเป็นที่ต้องกำหนดขอบเขตของการศึกษาวิจัยใหม่อีกครั้งโดยยึดหลักของหัวข้อวิจัยที่สอดคล้องกับหัวข้อเดิมมากที่สุด ทำให้ผู้วิจัยต้องขอลดการวิจัยในบางส่วนออกไป

*** ด้วยเหตุผลดังกล่าวข้างต้น ทำให้ผู้วิจัยต้องขอขยายระยะเวลาการดำเนินโครงการวิจัย จากช่วงระยะเวลาการดำเนินการวิจัยที่ได้ทำสัญญากับทุน ตั้งแต่วันที่ 15 กรกฎาคม 2555 ถึงวันที่ 14 กรกฎาคม 2555 ไปเป็นสิ้นสุดโครงการวันที่ 14 ธันวาคม 2555

แผนการศึกษาวิจัยต่อเนื่องจากงานวิจัยครั้งนี้

จากผลการทดลองในครั้งนี้มีหลายคำถามที่เกิดขึ้นในระหว่างการศึกษาวิจัยทำให้ทีมผู้วิจัยมีแผนการสำหรับการศึกษาวิจัยต่อเนื่อง เพื่อให้คำถามต่างๆที่เกิดขึ้นในการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ได้รับคำตอบและหวังผลในการพัฒนาพื้นฐานความรู้ ความเข้าใจในพยาธิกำเนิดของโรคไขข้ออักเสบนั้น ทีมผู้วิจัยมีแผนการศึกษาวิจัยต่อเนื่องดังนี้ :

- ศึกษาหา cytokines ของ T cells อื่นๆที่มีความเกี่ยวข้องกับ cytokines ที่ใช้ทดลองนี้ เพื่อหาความแตกต่างของการแสดงออกที่ชัดเจนขึ้น
- ศึกษาเปรียบเทียบการแสดงออกของ cytokines และสารอื่นๆ ในกลุ่มของ Innate immune cells เช่น PMN, NK และ NKT cells ที่มีความเกี่ยวข้องกับความรุนแรงของโรค โดยจะมุ่งเน้นที่ไขข้ออักเสบเป็นแม่แบบ
- จากกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาวิจัยนี้เป็นกลุ่มตัวอย่างที่เป็นโรคติดต่อมาโดยยุง ทีมผู้วิจัยจึงเล็งเห็นว่า น่าจะดำเนินการศึกษาหาความสัมพันธ์ระหว่างน้ำลายยุงพาหะกับการกระตุ้น cytokines จากคน
- ทดลองใช้ Magnetic bead-based multiplex assays (BioRad[®]) กับสารอื่นๆที่ได้จากยุงพาหะ เปรียบเทียบในแต่ละกลุ่มยุงพาหะที่เป็น principle vector และ accidental vector เพื่อดูความแตกต่างและหาความจำเพาะของโปรตีนหรือสารอื่นๆที่มีความสัมพันธ์ระหว่างความจำเพาะของยุงพาหะกับจุลชีพ
- ศึกษาและพัฒนาเครื่องมือตรวจวัดการแสดงออกของ cytokines ที่สามารถใช้ได้ในงานวิจัยในภาคสนาม ที่มีประสิทธิภาพที่ดี แต่ราคาไม่สูงมากนัก เพื่อให้สามารถใช้ได้จริงในโรงพยาบาลในต่างจังหวัด สถานีอนามัย เป็นต้น

เอกสารอ้างอิง

1. Smart K, Safitri I. Evidence behind the WHO guidelines: hospital care for children: what treatments are effective for the management of shock in severe dengue? *J Trop Pediatr*. 2009 Jun;55(3):145-8
2. Aly AS, Vaughan AM, Kappe SH. Malaria Parasite Development in the Mosquito and Infection of the Mammalian Host. *Annu Rev Microbiol*. 2009 May 1.
3. Stoddard ST, Morrison AC, Vazquez-Prokopec GM, Paz Soldan V, Kochel TJ, Kitron U, Elder JP, Scott TW. The role of human movement in the transmission of vector-borne pathogens. *PLoS Negl Trop Dis*. 2009 Jul 21;3(7):e481
4. Mathai S, Bishburg E, Slim J, Nalmas S. Severe Malaria in Immigrant Population: A Retrospective Review. *J Immigr Minor Health*. 2009 May 3.
5. Reiter P. Climate change and mosquito-borne disease: knowing the horse before hitching the cart. *Rev Sci Tech*. 2008 Aug;27(2):383-98.
6. Griffiths P. Viruses in the era of global warming. *Rev Med Virol*. 2008 Mar-Apr;18(2):69-71.
7. Diaz JH. Global climate changes, natural disasters, and travel health risks. *J Travel Med*. 2006 Nov-Dec;13(6):361-72
8. Lanciotti RS. Molecular amplification assays for the detection of flaviviruses. *Adv Virus Res*. 2003;61:67-99
9. Luplertlop N, Missé D, Bray D, Deleuze V, Gonzalez JP, Leardkamolkarn V, Yssel H, Veas F. Dengue-virus-infected dendritic cells trigger vascular leakage through metalloproteinase overproduction. *EMBO Rep*. 2006 Nov;7(11):1176-81.
10. Luplertlop N, Missé D. MMP cellular responses to dengue virus infection-induced vascular leakage. *Jpn J Infect Dis*. 2008 Jul;61(4):298-301.

11. Yen YT, Chen HC, Lin YD, Shieh CC, Wu-Hsieh BA. Enhancement by tumor necrosis factor alpha of dengue virus-induced endothelial cell production of reactive nitrogen and oxygen species is key to hemorrhage development. *J Virol*. 2008 Dec;82(24):12312-24.
12. Chaturvedi UC, Nagar R. Nitric oxide in dengue and dengue haemorrhagic fever: necessity or nuisance? *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2009 Jun;56(1):9-24.
13. Chaturvedi UC. Shift to Th2 cytokine response in dengue haemorrhagic fever. *Indian J Med Res*. 2009 Jan;129(1):1-3.
14. Chen J, Ng MM, Chu JJ. Molecular profiling of T-helper immune genes during dengue virus infection. *Virol J*. 2008 Dec 31;5:165.
15. Dejnirattisai W, Duangchinda T, Lin CL, Vasanawathana S, Jones M, Jacobs M, Malasit P, Xu XN, Screaton G, Mongkolsapaya J. A complex interplay among virus, dendritic cells, T cells, and cytokines in dengue virus infections. *J Immunol*. 2008 Nov 1;181(9):5865-74.
16. Talavera D, Castillo AM, Dominguez MC, Gutierrez AE, Meza I. IL8 release, tight junction and cytoskeleton dynamic reorganization conducive to permeability increase are induced by dengue virus infection of microvascular endothelial monolayers. *J Gen Virol*. 2004 Jul;85(Pt 7):1801-13.
17. Avirutnan P, Mehlhop E, Diamond MS. Complement and its role in protection and pathogenesis of flavivirus infections. *Vaccine*. 2008 Dec 30;26 Suppl 8:1100-7
18. Dejnirattisai W, Duangchinda T, Lin CL, Vasanawathana S, Jones M, Jacobs M, Malasit P, Xu XN, Screaton G, Mongkolsapaya J. A complex interplay among virus, dendritic cells, T cells, and cytokines in dengue virus infections. *J Immunol*. 2008 Nov 1;181(9):5865-74.
19. Alen MM, Kaptein SJ, De Burghgraeve T, Balzarini J, Neyts J, Schols D. Antiviral activity of carbohydrate-binding agents and the role of DC-SIGN in dengue virus infection. *Virology*. 2009 Apr 25;387(1):67-75
20. Mathew A, Rothman AL. Understanding the contribution of cellular immunity to dengue disease pathogenesis. *Immunol Rev*. 2008 Oct;225:300-13.
21. Basu A, Chaturvedi UC. Vascular endothelium: the battlefield of dengue viruses. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2008 Aug;53(3):287-99.

22. Robinson LJ, D'Ombrian MC, Stanisic DI, Taraika J, Bernard N, Richards JS, Beeson JG, Tavul L, Michon P, Mueller I, Schofield L. Cellular tumor necrosis factor, gamma interferon, and interleukin-6 responses as correlates of immunity and risk of clinical *Plasmodium falciparum* malaria in children from Papua New Guinea. *Infect Immun*. 2009 Jul;77(7):3033-43.
23. Zhu J, Wu X, Goel S, Gowda NM, Kumar S, Krishnegowda G, Mishra G, Weinberg R, Li G, Gaestel M, Muta T, Gowda DC. MAPK-activated protein kinase 2 differentially regulates *plasmodium falciparum* glycosylphosphatidylinositol-induced production of tumor necrosis factor- α and interleukin-12 in macrophages. *J Biol Chem*. 2009 Jun 5;284(23):15750-61.
24. Clark IA. Along a TNF-paved road from dead parasites in red cells to cerebral malaria, and beyond. *Parasitology*. 2009 May 19:1-12.
25. Shibui A, Hozumi N, Shiraishi C, Sato Y, Iida H, Sugano S, Watanabe J. CD4(+) T cell response in early erythrocytic stage malaria: *Plasmodium berghei* infection in BALB/c and C57BL/6 mice. *Parasitol Res*. 2009 Jul;105(1):281-6.
26. Huaman MC, Mullen GE, Long CA, Mahanty S. *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 vaccine elicits multifunctional CD4 cytokine-producing and memory T cells. *Vaccine*. 2009 Jul 8. [Epub ahead of print]
27. Ubol S, Chareonsirisuthigul T, Kasisith J, Klungthong C. Clinical isolates of dengue virus with distinctive susceptibility to nitric oxide radical induce differential gene responses in THP-1 cells. *Virology*. 2008 Jul 5;376(2):290-6.
28. Chareonsirisuthigul T, Kalayanaroj 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. *J Gen Virol*. 2007 Feb;88(Pt 2):365-75.

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

1. จัดสิทธิบัตรร่วมกับประเทศฝรั่งเศส

- Antimicrobial peptides of the cecropin family and therapeutic uses thereof. **PCT/IB2011/050465**. Date de publication : 11/08/2011. Inventeur: Missé D (IRD), **Luplertlop N** (Mahidol university, Thailand), Hans Y (INSERM), Thomas F (CNRS), Renaud F (CNRS).

2. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ

- Protein expression in the salivary glands of Dengue-Infected Aedes aegypti mosquitoes and blood-feeding success. Accepted from *Southeast Asian J Trop Med Public Health*.
- Potential Anti-oxidative Activity of Crude Rice Oil Extracted from Cadmium-contaminated Rice as Determined Using an *In Vitro* Primary Human Fibroblast Cell Model. Accepted from *Journal of Agricultural Science*.
- T helper (Th)1 and Th2 cytokine expressions in common mosquito-borne diseases in Thailand: Dengue and Malaria by magnetic bead-based, BioPlex assay. *In Press*

3. การเสนอผลงานวิจัย

- การประชุมพฤกษศาสตร์แห่งประเทศไทย ครั้งที่ 5 ในวันที่ 30 มีนาคม 2554 ถึง 1 เมษายน 2554 ในรูปแบบ Oral presentation เรื่อง Comparison of Cadmium Concentrations in Soil, Rice Grain, and Crude Rice Oil from Mae Sot District, Tak Province for an Alternative Use of Cadmium-Contaminated Rice
- การประชุมวิชาการสมาคมแพทย์ผิวหนังแห่งประเทศไทย วันที่ 29 กุมภาพันธ์ ถึง 2 มีนาคม 2555 ในรูปแบบ Oral presentation เรื่อง 2011: Bangkok flood disaster and skin problems

4. การเชื่อมโยงทางวิชาการกับนักวิชาการอื่นๆทั้งในและต่างประเทศ

● การเชื่อมโยงงานวิจัยภายในประเทศ

- ศ.ศุภจิตา อุบล ภาควิชาจุลชีววิทยาและอิมมิวโนลยี
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
- ศ.นพ.ยง ภู่วรวรรณ ภาควิชาภูมิคุ้มกันวิทยา คณะ
แพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- ดร.นิสากร แสงวัน สำนักวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง
มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง
- ผศ.พจมาลย์ สุรนิลพงศ์ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร สาขาวิชา
เทคโนโลยีผลิตพืช มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์

● การเชื่อมโยงงานวิจัยในต่างประเทศ

- Dr.Misse Dorothee ประเทศฝรั่งเศส
ศึกษาเกี่ยวกับความสัมพันธ์ของยุงพาหะกับไวรัสเดงกี
- Dr.Frederic Thomas ประเทศฝรั่งเศส
ศึกษาเกี่ยวกับvertical and horizontal transmission ของ
ไวรัสเดงกีกับยุงพาหะ
- Dr.Hans Yssel ประเทศฝรั่งเศส
ศึกษาเกี่ยวกับพยาธิกำเนิดและระบบภูมิคุ้มกันที่เกี่ยวข้องกับ
ไวรัสไข้เลือดออก
- Dr.Chantal Ripoll ประเทศฝรั่งเศส
ศึกษาเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้างและรูปร่างของ
เซลล์เป้าหมายกับไวรัสเดงกี
- Prof. Hassan Farghali ประเทศสาธารณรัฐเซเชลล์
ศึกษาเกี่ยวกับการพัฒนาวิธีการศึกษาพยาธิกำเนิดไวรัสเดงกี
ในเซลล์ตับที่เพาะเลี้ยงแบบสามมิติ
- Assoc.Prof.Erik.W.Thompson ประเทศออสเตรเลีย
ศึกษาเกี่ยวกับพัฒนาระบบ RNAi เพื่อใช้สำหรับการศึกษาวิจัย
โรคไข้เลือดออก
- Prof.Abul K.Abbas ประเทศสหรัฐอเมริกา
ศึกษาเกี่ยวกับระบบภูมิคุ้มกันต่อจุลชีพ
- Dr.Gregory J.Bancroft ประเทศสหราชอาณาจักร
ศึกษาเกี่ยวกับ NK and NKT cells ต่อ Viral infection

โครงการวิจัยการแสดงออกของ Cytokines จาก Th1 และ Th2 ในตัวอย่างโรคติดต่อที่พบบ่อยในประเทศไทย

(Th1 and Th2 cytokine expression in common mosquito borne infected samples in Thailand)

- เนื่องด้วยช่วงเวลาดำเนินการศึกษาวิจัย มีปัญหาประสบอุทกภัย ทำให้ต้องขยายเวลาทุน โดยในระยเวลาดังกล่าวที่ผู้วิจัยได้ดำเนินการอันเป็นผลจากงานวิจัยของผู้วิจัยดังนี้ :
 - ผู้วิจัยได้ดำเนินการขอจดสิทธิบัตรร่วมกับประเทศฝรั่งเศสในหัวเรื่อง Antimicrobial peptides of the cecropin family and therapeutic uses thereof. PCT/IB2011/050465. Date de publication : 11/08/2011. Inventeur: Missé D (IRD), Luplertlop N (Mahidol university, Thailand), Hans Y (INSERM), Thomas F (CNRS), Renaud F (CNRS).
 - เอกสารที่แนบมาในภาคผนวก
- วิจัยตามโครงการที่นำเสนอจนเสร็จ และดำเนินการวิจัยอื่นๆในช่วงประสบอุทกภัย ขณะนี้ที่ผู้วิจัยได้ดำเนินการส่งเอกสารเพื่อดำเนินการตีพิมพ์ในวารสารต่างประเทศ ภายใต้ทุนสนับสนุนการวิจัยของสกอ.และสกว.สัญญาเลขที่ MRG5380006 รวมทั้งสิ้น 3 เรื่องคือ
 - Protein expression in the salivary glands of dengue-infected Aedes aegypti mosquitoes and blood feeding success. Southeast Asian J TropMed Public Health. (IF 0.604)
 - Potential Anti-oxidative Activity of Crude Rice Oil Extracted from Cadmium-contaminated Rice as Determined Using an In Vitro Primary Human Fibroblast Cell Model. Journal of Agricultural Science. (IF 2.041)
 - T helper (TH)1 and Th2 cytokine expressions in common mosquito-borne diseases in Thailand: Dengue and Malaria by Magnetic bead-based BioPlex assay. Southeast Asian J TropMed Public Health. (IF 0.604)
- ทั้งนี้ได้รับการตอบรับแล้ว 2 เรื่อง (เรื่องที่ 1 และ 2) และอยู่ในช่วงดำเนินการของวารสารอีก 1 เรื่อง (เรื่องที่ 3) ทั้งนี้ผู้วิจัย ขอแนบเอกสารที่เกี่ยวข้องดังนี้ :
 - เอกสารตอบรับจากวารสารสำหรับเรื่องที่ 1 และ 2
 - Manuscript ของเรื่องที่ 1
 - สำหรับManuscript ของเรื่องที่ 2 และ 3 จะดำเนินการส่งถึงผู้รับผิดชอบอีกครั้งเมื่อได้รับReprint จากวารสารดังกล่าว

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(10) Numéro de publication internationale
WO 2011/095939 A1

(43) Date de la publication internationale
11 août 2011 (11.08.2011)

PCT

(51) Classification internationale des brevets :
C07K 14/435 (2006.01) A61P 31/12 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01) A61P 33/02 (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/IB2011/050465

(22) Date de dépôt international :
3 février 2011 (03.02.2011)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
10/00434 3 février 2010 (03.02.2010) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) :
INSTITUT DE RECHERCHE POUR LE
DEVELOPPEMENT (IRD) [FR/FR]; Immeuble Le
Sextant, 44, Bd de Dunkerque - CS 90009, F-13572
Marseille cedex 02 (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : MISSE
BRUMAS, Marthe Dorothée [FR/FR]; 6 Impasse du
Val de Teyran, F-34820 Teyran (FR). LUPLERTLOP,
Natthanej [TH/TH]; 58/5 Bang Ka-Sor Nonthaburi,
Thaïlande, 11000 (TH). YSSEL, Hans [NL/FR]; 4 ancien
chemin St Jean de l'Arbousier, F-34160 Sussargues (FR).
THOMAS, Frédéric [FR/FR]; Résidence Jardin de
Lavalette, 104 rue Ali Ben Chekhal, F-34090 Montpellier
(FR). RENAUD, François [FR/FR]; 202, Rue Philippe
Castan, F-34090 Montpellier (FR).

(74) Mandataires : PEAUCELLE, Chantal et al.; 3, Avenue
Bugeaud, F-Paris 75116 (FR).

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre
de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM,
AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ,
CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP,
KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD,
ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI,
NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD,
SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR,
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre
de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG,
ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), européen (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU,
LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK,
SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Déclarations en vertu de la règle 4.17 :

— relative à la qualité d'inventeur (règle 4.17.iv))

Publiée :

— avec rapport de recherche internationale (Art. 21(3))

— avec la partie de la description réservée au listage des
séquences (règle 5.2.a))

(54) Titre : ANTIMICROBIAL PEPTIDES OF THE CECROPIN FAMILY AND THERAPEUTIC USES THEREOF

(54) Titre : PEPTIDES ANTIMICROBIENS DE LA FAMILLE DES CECROPINES ET LEURS UTILISATIONS
THERAPEUTIQUES

(57) Abstract : The present invention relates to an antimicrobial peptide characterised in that said peptide includes the sequence SEQ ID No. 1 or the sequence SEQ ID No. 2, the sequence SEQ ID No. 2 representing a fragment of the sequence SEQ ID No. 1, for use as a drug. Advantageously according to the invention, the peptide having sequence SEQ ID No. 1 is used specifically for treating bacterial, viral and/or parasitic infections, and the peptide having sequence SEQ ID No. 2 is used for treating bacterial and/or viral infections.

(57) Abrégé : La présente invention a pour objet un peptide antimicrobien caractérisé en ce qu'il présente la séquence SEQ ID N°1 ou la séquence SEQ ID N°2, la séquence SEQ ID N°2 représentant un fragment de la séquence SEQ ID N°1, pour utilisation comme médicament. De façon avantageuse selon l'invention, le peptide de séquence SEQ ID N°1 est plus particulièrement utilisé pour le traitement d'infections bactériennes, virales et/ou parasitaires et le peptide de séquence SEQ ID N°2 pour le traitement d'infections bactériennes et/ou virales.



WO 2011/095939 A1

PEPTIDES ANTIMICROBIENS DE LA FAMILLE DES CECROPINES ET LEURS UTILISATIONS
THERAPEUTIQUES

La présente invention concerne des peptides antimicrobiens pour leur utilisation comme médicament à des fins de lutte antibactérienne, antivirale et/ou antiparasitaire.

5

Les peptides antimicrobiens désignent un vaste ensemble de peptides (plus de 500 peptides ont été identifiés à ce jour) comportant en moyenne de 20 à 50 acides aminés, qui partagent un caractère cationique et des propriétés amphiphiles. Leur diversité structurale est grande, à l'origine de trois grandes familles de peptides antimicrobiens cationiques. Les cécropines furent les premiers peptides microbiens cationiques entièrement caractérisés, à partir des nymphes du papillon *Hyalophora cecropia*, au début des années 80 par H. Boman (J. Intern. Med. 2003 ; 254 :197-215).

10

Les peptides antimicrobiens cationiques sont considérés comme l'un des éléments clés du système immunitaire inné, système qui assure la première ligne de défense des organismes multicellulaires.

15

L'utilisation de peptides antimicrobiens d'insecte, qui sont des substances naturelles produites par les insectes, ainsi que l'utilisation de leurs dérivés sont actuellement en cours de développement clinique, essentiellement sous forme topique (diminution de la flore microbienne locale afin de prévenir la survenue des infections : « Andrès et Dimarcq, *Med Mal Infect* 2007 ; 37 :194-199 »).

20

Tant en santé humaine qu'animale, face à l'émergence de nouveaux pathogènes et surtout de microorganismes multirésistants, le besoin de découvrir des molécules qui permettent de lutter contre les infections aussi bien bactériennes, virales que parasitaires, est grandissant, et les industriels de la pharmacie s'intéressent de plus en plus à des molécules qui ont un large spectre d'activité.

25

Ainsi, la présente invention a notamment pour but de fournir des molécules qui présentent un large spectre d'activité.

30

Plus particulièrement, un des buts de l'invention est de fournir des molécules qui permettent de lutter à la fois contre les infections bactériennes, virales et parasitaires, ou au moins contre deux desdites infections.

Il a été découvert de manière surprenante par les Inventeurs, que des peptides antimicrobiens naturels d'insectes, à savoir des peptides antimicrobiens d'*Aedes Aegypti* permettaient de remplir le but recherché par la présente invention.

35

Parmi les peptides antimicrobiens d'*Aedes Aegypti* objets de la présente invention, le peptide de séquence SEQ ID N°1 tel que défini ci-dessous a déjà été décrit dans la littérature comme appartenant à la famille des cécropines et comme étant un peptide antibactérien putatif (voir base
5 de données « *aaegypti.vectorbase.org* » et « *UniProtKB/TrEMBL* »). Cependant aucune fonction n'a été démontrée à ce jour concernant ce peptide.

Concernant les peptides de la famille des cécropines, certains d'entre eux ont été décrits dans la littérature comme présentant une activité pour le traitement de la leishmaniose. Ainsi, les
10 documents « WO03008442 », « Biochem J. 1998 Feb 15, 330 (Pt 1) : 453-60 », « Biochem J. 2003 Oct 1, 375 (Pt 1) : 221-30 », « Protein Pept Lett. 2004 Apr, 11(2) : 115-24 », « Antimicrob Agents Chemother. 2004 Feb, 48 (2) : 641-3 » et « Antimicrob Agents Chemother. 2001 Sep, 45(9) : 2441-9 » décrivent tous l'utilisation de peptides hybrides cécropine-mellitine pour le traitement de la leishmaniose.

15

Le peptide de séquence SEQ ID N°1 est le peptide immature qui comporte le peptide signal. Le clivage du peptide signal permet d'obtenir le peptide sécrété ou peptide mature.

Les Inventeurs ont pu déterminer que le peptide signal correspondait au peptide de séquence SEQ
20 ID N°3 tel que défini ci-dessous et ils ont ainsi pu déterminer que le peptide mature ou sécrété correspondait au peptide de séquence SEQ ID N°2 tel que défini ci-dessous.

De façon habituelle dans l'état de l'art, les tests d'efficacité des peptides sont réalisés sur les peptides sécrétés, c'est-à-dire sur les peptides dépourvus de leur peptide signal. Ainsi, les tests
25 d'activités effectués dans la présente demande de brevet ont été effectués sur le peptide de séquence SEQ ID N°2.

Cependant, une originalité du travail des Inventeurs a été de tester également l'efficacité d'un peptide antimicrobien naturel d'insecte avec son peptide signal, ce qui n'avait jamais été réalisé
30 auparavant.

Ainsi, il a été découvert de façon surprenante par les Inventeurs que le peptide de séquence SEQ ID N°1 était particulièrement intéressant sur le plan de son activité puisqu'il présente à la fois des activités aussi bien antibactériennes, antiparasitaires et antivirales.

35 Il a ainsi pu être déterminé que le peptide immature (de séquence SEQ ID N°1) ne se comportait pas de la même façon que le peptide mature (de séquence SEQ ID N°2). En effet, le peptide de séquence SEQ ID N°1 présente une activité virale plus prononcée que celle du peptide de

séquence SEQ ID N°2 tandis que le peptide de séquence SEQ ID N°2 présente une activité antibactérienne plus prononcée que celle du peptide de séquence SEQ ID N°1. De plus, le peptide de séquence SEQ ID N°2 présente des activités antibactériennes et antivirales mais ne présente pas d'activité antiparasitaire, contrairement au peptide SEQ ID N°1 qui présente à la fois des activités antibactériennes, antivirales et antiparasitaires.

Le peptide signal de séquence SEQ ID N°3 se révèle donc intéressant quant à sa fonctionnalité puisqu'il constitue la seule différence entre le peptide de séquence SEQ ID N°2 et celui de séquence SEQ ID N°1.

Ainsi la présente invention concerne aussi bien les peptides antimicrobiens d'*Aedes Aegypti* avec ou sans peptide signal, que le peptide signal en lui-même.

La séquence SEQ ID N°1 est la suivante :

MNMNFTKLFAIVLLAALVLLGQTEAGGLKKLGKKLEGAGKRVFKASEKALPVVVGIIKAIGK

La séquence SEQ ID NO 2 est :

GGLKKLGKKLEGAGKRVFKASEKALPVVVGIIKAIGK

La séquence SEQ ID NO°3 est :

MNMNFTKLFAIVLLAALVLLGQTEA

La présente invention a plus particulièrement pour objet un peptide antimicrobien caractérisé en ce qu'il présente la séquence SEQ ID N°1 ou la séquence SEQ ID N°2, la séquence SEQ ID N°2 représentant un fragment de la séquence SEQ ID N°1, pour utilisation comme médicament.

Selon l'invention, ledit médicament comprend une quantité thérapeutiquement efficace d'au moins un peptide tel que défini ci-dessus, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

De façon avantageuse selon l'invention, le médicament est préparé pour une administration par voie injectable ou pour une administration sous forme topique.

Plus particulièrement, le peptide tel que défini ci-dessus, de séquence SEQ ID N°1 ou SEQ ID N°2, est utilisé pour le traitement d'infections bactériennes et/ou virales.

Selon un mode de réalisation avantageux de l'invention, le peptide tel que défini ci-dessus, de séquence SEQ ID N°1 ou SEQ ID N°2, est plus particulièrement utilisé pour le traitement

d'infections bactériennes, et notamment celles dues à des bactéries à *Gram positif* et/ou à *Gram négatif*.

Selon un autre mode de réalisation avantageux de l'invention, le peptide tel que défini ci-dessus, de séquence SEQ ID N°1 ou SEQ ID N°2, est plus particulièrement utilisé pour le traitement d'infections virales, et notamment celles dues au virus de la Dengue et/ou au virus du Chikungunya.

De manière avantageuse selon l'invention, le peptide tel que défini ci-dessus, de séquence SEQ ID N°1 ou SEQ ID N°2, est utilisé pour le traitement d'infections bactériennes et virales.

Selon un autre mode de réalisation avantageux, l'invention concerne plus particulièrement le peptide antimicrobien de séquence SEQ ID N°1, pour le traitement d'infections parasitaires, et notamment celles dues au parasite *Leishmania braziliensis* et/ou au parasite *Leishmania infantum*.

De manière avantageuse selon l'invention, le peptide de séquence SEQ ID N°1 est utilisé pour le traitement d'infections bactériennes, virales et parasitaires.

La présente invention concerne encore une composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle comporte une quantité thérapeutiquement efficace d'un peptide antimicrobien présentant la séquence SEQ ID N°1 ou SEQ ID N°2 telles que définies ci-dessus, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

De manière avantageuse selon l'invention, la composition pharmaceutique est destinée à une administration par voie injectable ou sous forme topique.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention sont donnés dans la description qui suit avec référence aux figures 1 à 7.

La figure 1 représente le test antimicrobien avec la bactérie Gram négatif *E. coli* et les peptides « MK61 » (peptide de séquence SEQ ID N°1) et « GK36 » (peptide de séquence SEQ ID N°2). La figure 2 représente le test antimicrobien avec la bactérie Gram positif *Micrococcus Luteus* et les peptides MK61 et GK36.

L'axe des ordonnées de chacune des figures 1 et 2 représente le pourcentage de croissance bactérienne et l'axe des abscisses la concentration en peptides (μM). Le symbole -○- représente le peptide MK61 et le symbole -□- le peptide GK36.

La figure 3 est un histogramme qui représente l'inhibition de l'infection des cellules dendritiques par le virus de la dengue sérotype 2 « DENV-2 » à l'aide des peptides MK61 et GK36.

L'axe des ordonnées représente le pourcentage d'infection des cellules dendritiques par le virus « DENV-2 » et l'axe des abscisses la concentration en peptides (μM).

La colonne la plus à gauche représente le témoin positif lorsque 100% des cellules sont infectées par DENV-2. Les deux colonnes suivantes représentent respectivement les résultats obtenus pour le peptide MK61 à une concentration de 2,5 $\mu\text{g/ml}$ et à une concentration de 12 $\mu\text{g/ml}$. La colonne la plus à droite représente le résultat obtenu pour le peptide GK36 à une concentration de 2,5 $\mu\text{g/ml}$.

Les figures 4A, 4B, 4C et 4D représentent l'inhibition de l'infection des cellules C6/36 de moustiques *Aedes albopictus* par le virus de la dengue (respectivement les virus de sérotype 1, 2, 3 et 4 : « DENV-1 », « DENV-2 », « DENV-3 » et « DENV-4 ») à l'aide des peptides MK61 et GK36. Les peptides MK61 et GK36 sont préparés chacun à des concentrations de 5 $\mu\text{g/ml}$ et 10 $\mu\text{g/ml}$ et sont testés au bout de 12 heures et de 24 heures d'incubation des cellules avec le virus.

La figure 5 est un histogramme qui représente l'inhibition de l'infection des cellules HEK-293T par le virus Chikungunya 147-2 à l'aide des peptides MK61 et GK36.

L'axe des ordonnées représente le pourcentage d'infection des cellules HEK-293T par le virus Chikungunya 147-2 et l'axe des abscisses la concentration en peptides (μM).

Les peptides GK36 et MK61 sont préparés chacun à des concentrations de 10 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$ et 80 $\mu\text{g/ml}$.

Les figures 6 et 7 représentent le test antiparasitaire avec le peptide MK61 et respectivement le parasite *Leishmania braziliensis* et *Leishmania infantum*.

L'axe des ordonnées de chacune des figures 6 et 7 représente le pourcentage de croissance parasitaire et l'axe des abscisses la concentration en peptides (μM). Le symbole -○- représente le peptide MK61.

L'exemple ci-après illustre l'invention, il ne la limite en aucune façon.

EXEMPLE 1 : TESTS ANTIBACTERIENS, ANTIVIRAUX ET ANTIPARASITAIRES DES PEPTIDES DE SEQUENCE « SEQ ID N°1 » ET « SEQ ID N°2 ».

5 **A. SYNTHÈSE DES PEPTIDES**

Les peptides de séquence SEQ ID N°1 (dénommé « MK61 » ou « MK » dans ce qui suit) et de séquence SEQ ID N°2 (dénommé « GK36 » ou « GK » dans ce qui suit) ont été préparés par la société Proteogenix SA (France).

10 Ils sont synthétisés par voie chimique, purifiés par chromatographie liquide haute performance (HPLC) et contrôlés par spectrométrie de masse. Le degré de pureté de chaque peptide est supérieur à 95% et les poids moléculaires des peptides GK36 et MK61 sont respectivement de 3676,57 g/mol et de 6380,93 g/mol.

15 **B. TESTS ANTIBACTERIENS**

Les bactéries *Escherichia coli* (Gram négatif) et *Micrococcus luteus* (Gram positif) sont cultivées dans un milieu de culture LB (Luria-Bertani) avec et sans les peptides GK36 et MK61 à tester. La croissance bactérienne est contrôlée après une nuit d'incubation à 37°C en mesurant le
20 changement de la valeur de l'absorbance à 600 nanomètres (A600) à l'aide d'un spectrophotomètre pour microplaques. Les peptides MK61 et GK36 sont incubés pendant 24 heures avec les bactéries Gram négatif et Gram positif. La concentration minimale inhibitrice (CMI) des peptides synthétiques GK36 et MK61 représente la concentration la plus faible de peptides qui est suffisante pour inhiber complètement la croissance bactérienne.

25

Les résultats obtenus sont illustrés à la figure 1 pour la bactérie *Escherichia coli* (Gram négatif) et à la figure 2 pour la bactérie *Micrococcus luteus* (Gram positif).

Conclusion :

30 Les peptides GK36 et MK61 ont une activité marquée contre la bactérie Gram négatif *E. coli* avec des CMI respectivement de 0,6 µM et 5 µM (cf. figure 1).

Les peptides GK36 et MK61 ont également une bonne activité contre la bactérie Gram positif *Micrococcus Luteus* avec des CMI de 10 µM (cf. figure 2).

35

Les peptides GK36 et MK61 présentent donc une activité antibactérienne satisfaisante.

C. TESTS ANTIVIRAUX

1) VIRUS DE LA DENGUE (dengue sérotype 2)

5 (a) Inhibition de l'infection des cellules dendritiques par le virus de la dengue

Les cellules dendritiques sont les principales cibles du virus de la dengue (« Navarro-Sanchez et al., EMBO Rep. 2003 Jul., 4 (7) : 723-8 » et « Tassaneetrithep et al., J Exp Med., 2003, Apr. 7, 197(7) : 823-9 »).

10 Les cellules dendritiques sont incubées pendant 3 heures à 37°C en présence du virus de la dengue (elles sont infectées à un « MOI » (« Multiplicity of infection ») de 0,4) avec et sans les peptides MK61 et GK36 à tester qui sont préparés à des concentrations de 2,5 µg/ml et 12 µg/ml pour MK61 et 2,5 µg/ml pour GK36. Le surnageant est ensuite retiré et les cellules sont mises en présence ou non de peptide pendant 48 h.

15

Des analyses de PCR en temps réel sont ensuite effectuées. La viabilité cellulaire est évaluée par cytométrie en flux et aucune toxicité cellulaire n'est observée.

Les résultats obtenus sont illustrés à la figure 3.

20

Conclusion :

Avec le peptide MK61 à 12 µg/ml on passe de 100% d'infection à 40% d'infection. Ainsi le peptide MK61 à 12 µg/ml entraîne une inhibition de 60% de l'infection des cellules dendritiques. On note une inhibition dose dépendante pour le peptide MK61.

25 Le peptide GK36 à 2,5 µg/ml entraîne une inhibition de 35% de l'infection.

Les peptides GK36 et MK61 présentent donc une activité antivirale satisfaisante.

(b) Inhibition de l'infection des cellules C6/36 par le virus de la dengue

30 Les cellules C6/36 de moustiques d'*Aedes albopictus* sont incubées pendant 1 heure à 4°C avec les différents virus de la dengue ((sérotype 1) « DENV-1 » ou (sérotype 2) « DENV-2 » ou (sérotype 3) « DENV-3 » ou (sérotype 4) « DENV-4 ») (avec des « PFU » (« Plaque Forming Units » ou « Unités formant des phages de lyse ») de 1). Les cellules sont ensuite lavées trois fois et incubées pendant 12 heures ou 24 h à 28°C en présence ou non des peptides GK36 et MK61 à
35 tester qui sont préparés chacun à des concentrations de 5 µg/ml ou de 10 µg/ml.

Des analyses de RT-PCR sont ensuite effectuées sur les culots cellulaires afin de détecter la présence du virus de la dengue.

Les résultats obtenus sont représentés à la figure 4 (A, B, C ou D).

5 La lettre P signifie que le contrôle est positif, c'est-à-dire que les cellules sont infectées.

La lettre C signifie que le contrôle est négatif, c'est-à-dire que les cellules récupérées au bout de 24 heures ne sont pas infectées.

La lettre M désigne le marqueur de poids moléculaire.

Les résultats montrent une forte réduction de la production de virus en présence des peptides
10 GK36 et MK61 et ceci de manière dose dépendante (on observe une meilleure inhibition de l'infection à 10 µg/ml qu'à 5 µg/ml). On constate également qu'on a un meilleur effet inhibiteur des peptides à 24 h d'exposition par rapport au temps de 12 h. Au vu de l'intensité des bandes, on constate que le peptide MK est légèrement plus efficace que le peptide GK.

15 La visibilité par RT-PCR du gène 18SrRNA (gène de ménage) sur les culots cellulaires montre que toutes les conditions présentent la même quantité d'ARN.

Conclusion :

Les peptides GK36 et MK61 inhibent l'infection des cellules C6/36 de moustiques *d'Aedes albopictus* par le virus de la dengue (virus dengue-1, virus dengue-2, virus dengue-3 et virus
20 dengue-4).

Cet effet est dose dépendant et est plus prononcé au bout de 24 h. On note également que le peptide MK61 est encore plus efficace que le peptide GK36.

2) VIRUS DU CHIKUNGUNYA

25

Les cellules, qui proviennent de la lignée cellulaire humaine HEK-293T (Human Embryonic Kidney 293), sont incubées pendant 2 heures à 37°C en présence de virus CHIKV-147-2 GFP (elles sont infectées à une « MOI » de 1) avec et sans les peptides GK36 et MK61 à tester qui sont préparés chacun à des concentrations de 10 µg/ml, 50 µg/ml et 80 µg/ml. Le surnageant est ensuite retiré et
30 les cellules sont mises en présence ou non de peptides pendant 48 heures. Le pourcentage de cellules infectées correspond au pourcentage de cellules GFP (« Green Fluorescent Protein ») visualisé en cytométrie en flux (10000 cellules ont été comptées par condition).

Les résultats obtenus sont représentés à la figure 5.

35 Conclusion :

Le peptide MK61 inhibe très efficacement l'infection des cellules HEK-293T et de manière dose dépendante, comme on a pu l'observer pour le virus de la dengue.

Le peptide GK36 inhibe également l'infection des cellules HEK-293T et de manière dose dépendante.

Les résultats obtenus aussi bien sur le virus du chikungunya que sur le virus de la dengue montrent donc que les peptides de séquence SEQ ID N°1 et SEQ ID N°2 sont des inhibiteurs puissants de l'infection virale.

D. TESTS ANTIPARASITAIRES

Détermination de l'activité leishmaniose

Des promastigotes de *Leishmania infantum* (souche MHOM/MA/67/ITMAP-263) et de *Leishmania braziliensis* (souche MHOM/BR/75M2904) exprimant le gène luciférase ont été utilisés pour tester les activités anti-leishmanioses du peptide antimicrobien MK61 de la manière précédemment décrite (Serenio et al., Antimicrob Agents Chemother. 2001 Apr;45(4):1168-73). En bref, des formes promastigotes ont été inoculées à raison de 10^5 dans 100 µl de milieu, dans des plaques de 96 puits, puis le peptide a été ajouté 4 h après et les plaques ont été à nouveau incubées pendant 72 h.

L'activité luciférase a ensuite été évaluée afin de déterminer le pourcentage de croissance des parasites. Les résultats sont exprimés en indice « RLU » « Relative Light Unit ».

Indice RLU = (RLU dans les puits traités / RLU dans les puits contrôlés) x 100.

Les résultats obtenus sont illustrés dans les figures 6 et 7 qui représentent l'incubation des promastigotes exprimant le gène de la luciférase pendant 72h à 37°C avec le peptide MK61.

Conclusion :

Le peptide MK61 présente la capacité de tuer les leishmanies. Plus particulièrement ce peptide présente une activité antiparasitaire sur les deux souches de leishmanies (*Leishmania infantum* et *Leishmania braziliensis*) avec des concentrations minimales inhibitrices de 20 à 40 µM.

REVENDEICATIONS

1. Peptide antimicrobien caractérisé en ce qu'il présente la séquence SEQ ID N°1 ou la séquence SEQ ID N°2, la séquence SEQ ID N° 2 représentant un fragment de la séquence SEQ ID N°1,
5 pour utilisation comme médicament.
2. Peptide selon la revendication 1, pour le traitement d'infections bactériennes et/ou virales.
3. Peptide selon la revendication 1 ou 2, pour le traitement d'infections bactériennes.
10
4. Peptide selon la revendication 3 pour le traitement d'infections dues à des bactéries à *Gram positif* et/ou à *Gram négatif*.
5. Peptide selon la revendication 1 ou 2, pour le traitement d'infections virales.
15
6. Peptide selon la revendication 5, pour le traitement d'infections dues au virus de la Dengue et/ou au virus du Chikungunya.
7. Peptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, pour le traitement d'infections
20 bactériennes et virales.
8. Peptide antimicrobien caractérisé en ce qu'il présente la séquence SEQ ID N°1, pour le traitement d'infections parasitaires.
- 25 9. Peptide selon la revendication 8, pour le traitement d'infections dues au parasite *Leishmania braziliensis* et/ou au parasite *Leishmania infantum*.
10. Peptide selon la revendication 8 ou 9, pour le traitement d'infections bactériennes, virales et parasitaires.
30
11. Composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle comporte une quantité thérapeutiquement efficace d'un peptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.
- 35 12. Composition selon la revendication 11, pour une administration par voie injectable.
13. Composition selon la revendication 11, pour une administration sous forme topique.

Figure 1

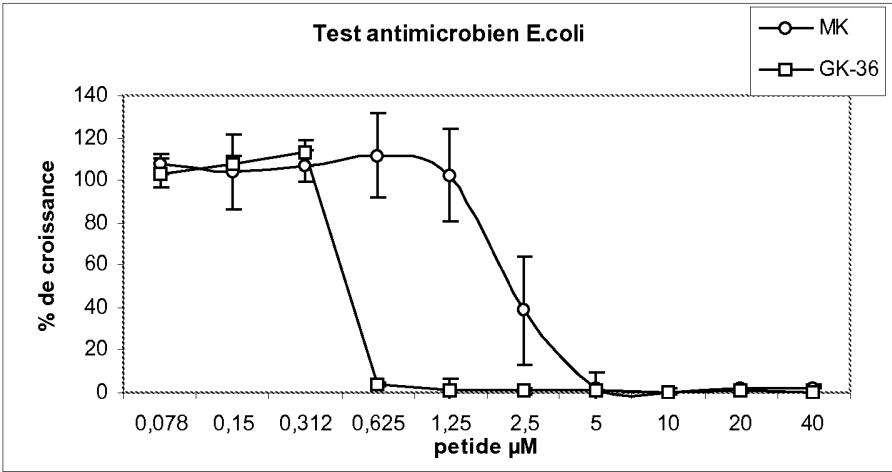


Figure 2

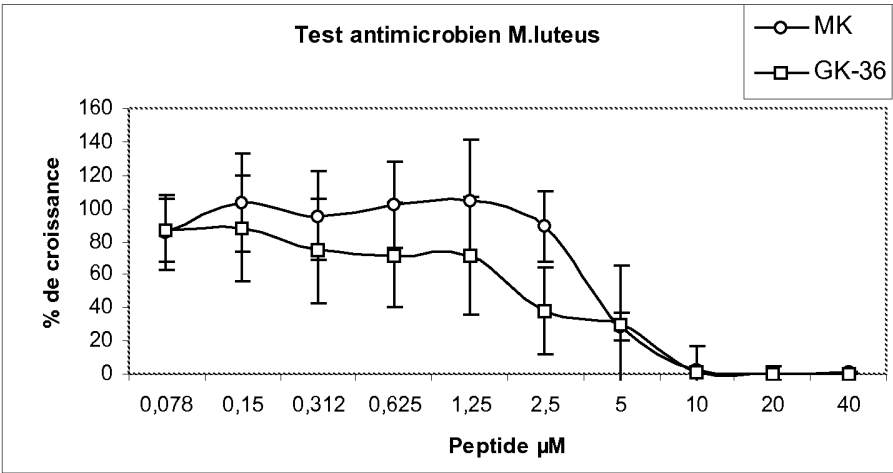


Figure 3

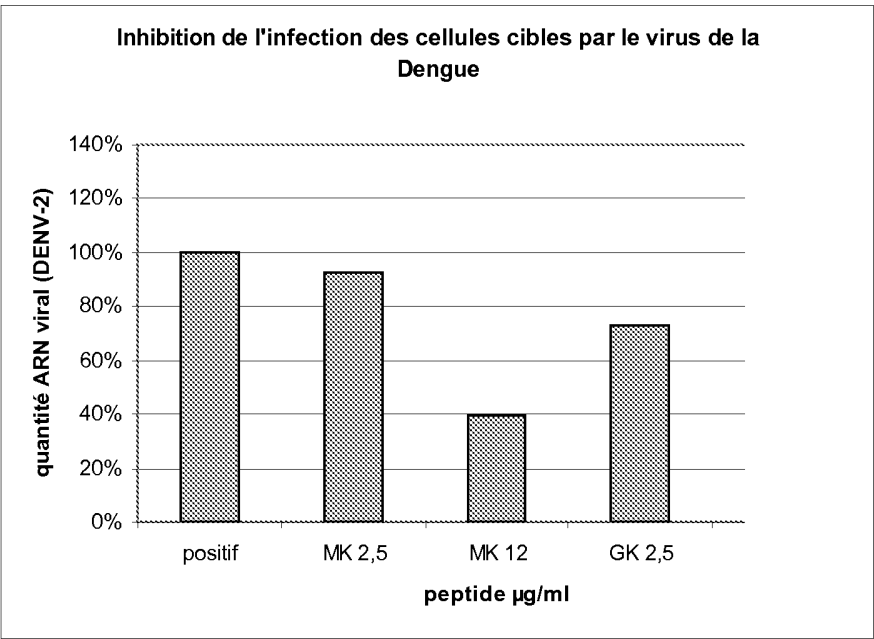


Figure 4

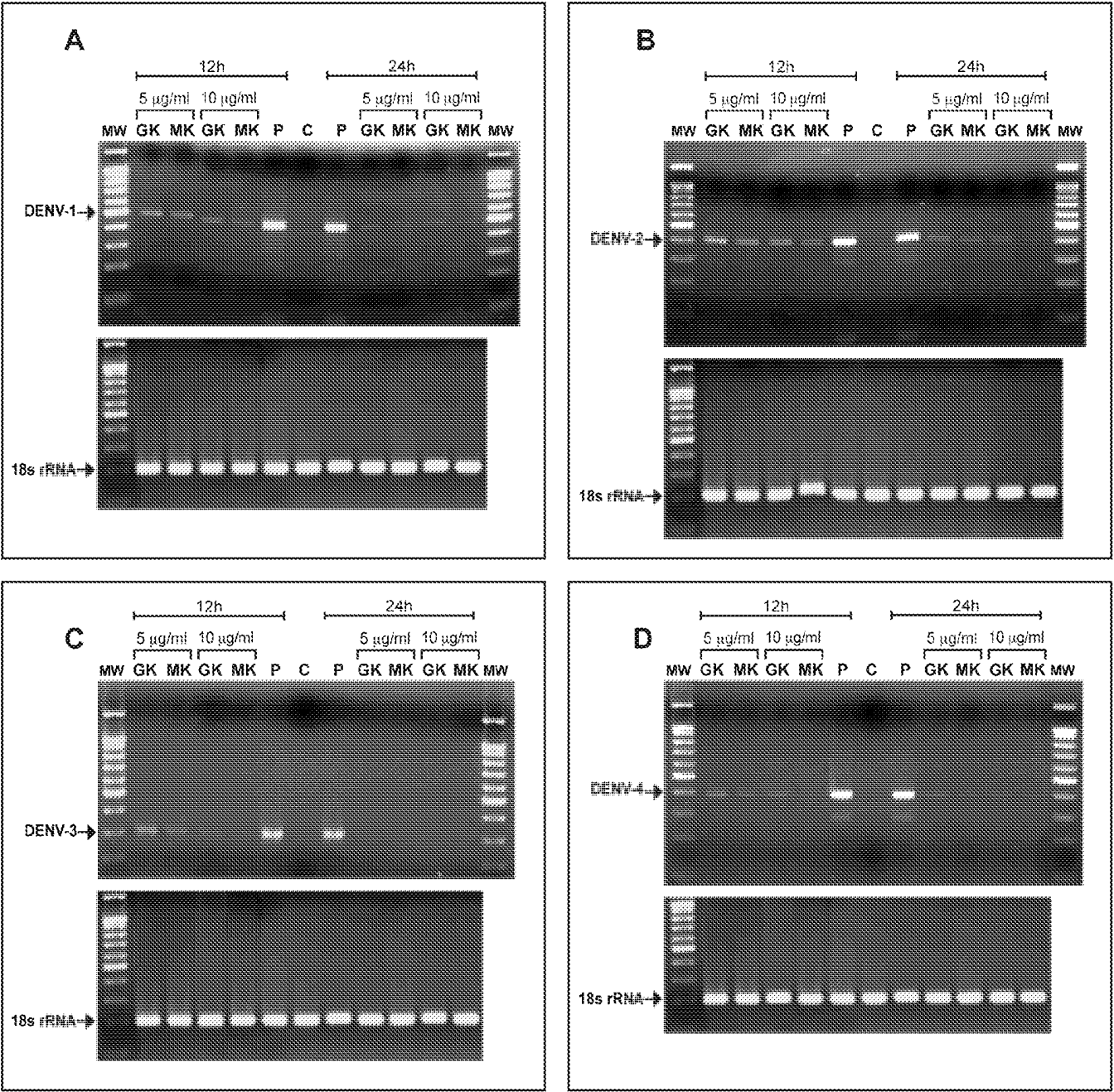


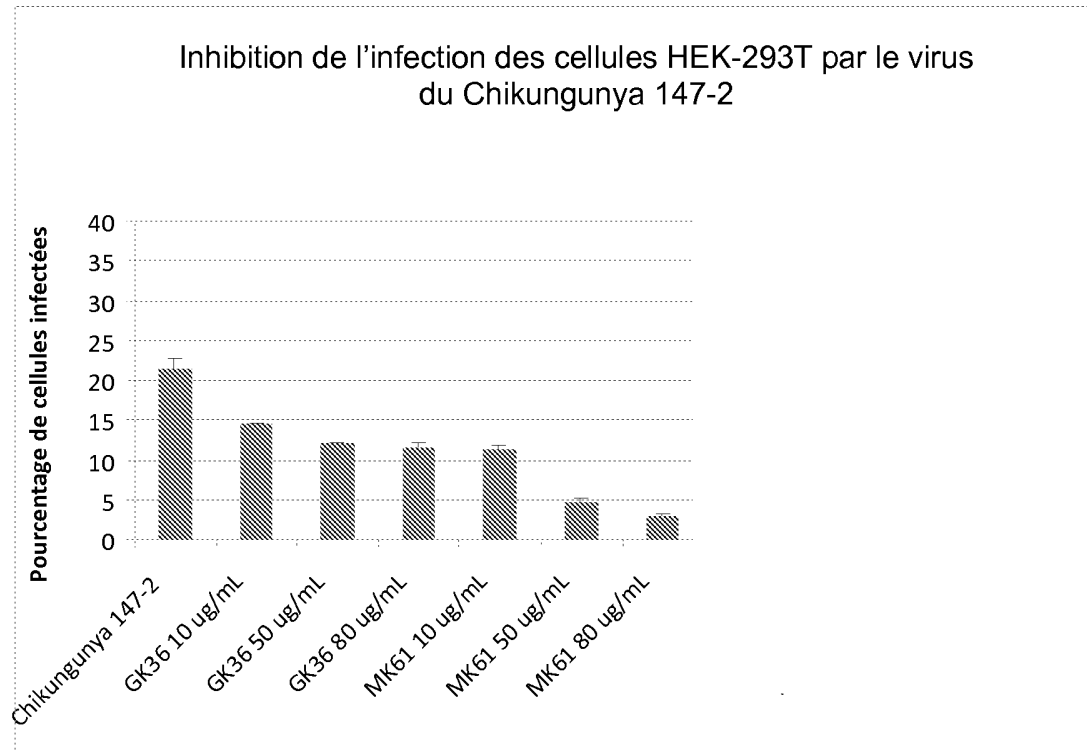
Figure 5

Figure 6

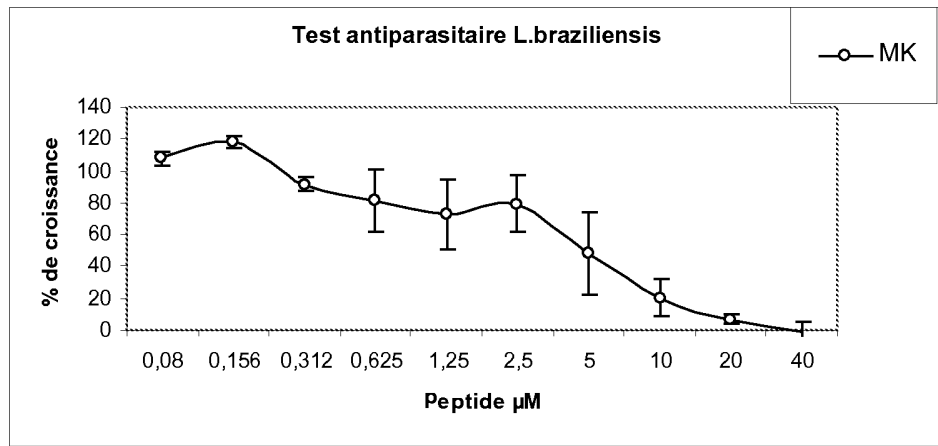
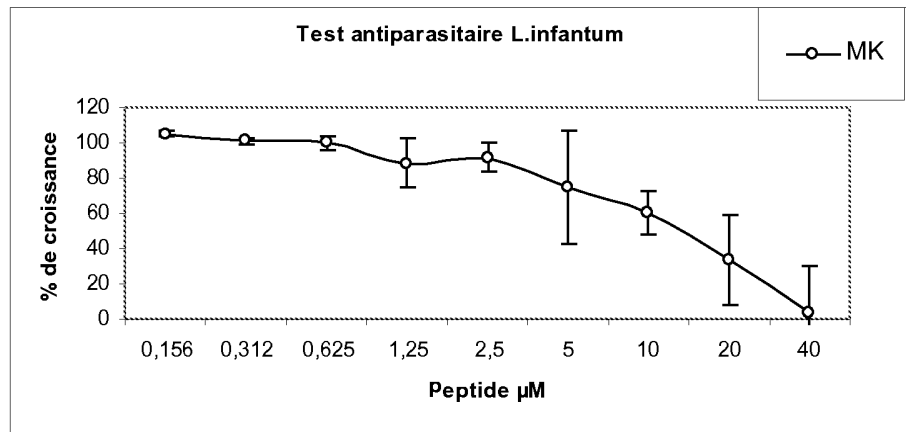


Figure 7



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IB2011/050465

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C07K14/435 A61P31/04 A61P31/12 A61P33/02
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K A61K A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DATABASE UniProt [Online] 25 July 2006 (2006-07-25), Nene V. et al.: "Genome sequence of Aedes aegypti", XP002598498, retrieved from EBI Database accession no. Q17NR1 abstract ----- -/-	1-13



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

4 April 2011

Date of mailing of the international search report

15/04/2011

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Merckling-Ruiz, V

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IB2011/050465

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	LOWENBERGER C ET AL: "Antimicrobial Activity Spectrum, cDNA Cloning, and mRNA Expression of a Newly Isolated Member of the Cecropin Family from Mosquito Vector <i>Aedes aegypti</i>", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY FOR BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY, INC, US LNKD- DOI:10.1074/JBC.274.29.20092, vol. 274, no. 29, 16 July 1999 (1999-07-16), pages 20092-20097, XP002165176, ISSN: 0021-9258 voir abrégé, Tableau 1 et Fig.4, pages 20094-20095 -----	1-13
A	SUN D. ET AL.: "peptide sequence of an antibiotic cecropin from the vector mosquito, <i>Aedes albopictus</i>", BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMM., vol. 249, 1998, pages 410-415, XP002598499, voir abrégé et Tableau 2 -----	1-13
A	WO 03/008442 A1 (CONSEJO SUPERIOR INVESTIGACION [ES]; UNIV BARCELONA [ES]; ANDREU MARTI) 30 January 2003 (2003-01-30) voir abrgé, page 27 et Rev.1 -----	1-13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/IB2011/050465

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
W0 03008442	A1	30-01-2003	ES
2195734	A1	01-12-2003	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/IB2011/050465

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE INV. C07K14/435 A61P31/04 A61P31/12 A61P33/02 ADD.		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) C07K A61K A61P		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	DATABASE UniProt [Online] 25 juillet 2006 (2006-07-25), Nene V. et al.: "Genome sequence of Aedes aegypti", XP002598498, extrait de EBI Database accession no. Q17NR1 abrégé ----- -/-	1-13
☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents ☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe		
* Catégories spéciales de documents cités: "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier "&" document qui fait partie de la même famille de brevets		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée 4 avril 2011		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale 15/04/2011
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé Merckling-Ruiz, V

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	LOWENBERGER C ET AL: "Antimicrobial Activity Spectrum, cDNA Cloning, and mRNA Expression of a Newly Isolated Member of the Cecropin Family from Mosquito Vector <i>Aedes aegypti</i>", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY FOR BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY, INC, US LNKD- DOI:10.1074/JBC.274.29.20092, vol. 274, no. 29, 16 juillet 1999 (1999-07-16), pages 20092-20097, XP002165176, ISSN: 0021-9258 voir abrégé, Tableau 1 et Fig.4, pages 20094-20095 -----	1-13
A	SUN D. ET AL.: "peptide sequence of an antibiotic cecropin from the vector mosquito, <i>Aedes albopictus</i>", BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMM., vol. 249, 1998, pages 410-415, XP002598499, voir abrégé et Tableau 2 -----	1-13
A	WO 03/008442 A1 (CONSEJO SUPERIOR INVESTIGACION [ES]; UNIV BARCELONA [ES]; ANDREU MARTI) 30 janvier 2003 (2003-01-30) voir abrgé, page 27 et Rev.1 -----	1-13

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

PCT/IB2011/050465

Formulaire PCT/ISA/210 (annexe familles de brevets) (avril 2005)

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/IB2011/050465

Cadre N° I Séquence(s) de nucléotides ou d'acides aminés (suite du point 1.b de la première feuille)

1. En ce qui concerne la ou les séquences de nucléotides ou d'acides aminés divulguées dans la demande internationale, le cas échéant, la recherche internationale a été effectuée sur la base des éléments suivants:
 - a. (support)

☒

 sur papier
 - ☒

 sous forme électronique
 - b. (moment)

☒

 dans la demande internationale telle que déposée
 - ☒

 avec la demande internationale, sous forme électronique
 - ☐

 ultérieurement à la présente administration aux fins de la recherche
2.

☐

 De plus, lorsque plus d'une version ou d'une copie d'un listage des séquences ou d'un ou plusieurs tableaux y relatifs a été déposée, la déclarations requises selon lesquelles les informations fournies ultérieurement ou au titre de copies supplémentaires sont identiques à celles initialement fournies et ne vont pas au-delà de la divulgation faite dans la demande internationale telle que déposée initialement, selon le cas, ont été remises.
3. Commentaire complémentaires:

Result of Review

Title: Potential Anti-oxidative Activity of Crude Rice Oil Extracted from Cadmium-contaminated Rice as Determined Using an In Vitro Primary Human Fibroblast Cell Model

Author(s): Thitinan Kitisin, Pahol Kosiyachinda & Natthanej Luplertlop

Decision of Paper Selection

- ☐ Accept submission, no revisions required
- ☒ Accept submission, revisions required; please revise the paper according to comments
- ☐ Revise and resubmit for review
- ☐ Decline submission

What should you do? (For accepted papers)

- ✓ Revise the paper according to the comments (if applicable)
- ✓ All authors must agree on the publication, please inform us the agreement by E-mail.
- ✓ You have to pay a publication fee of 300.00USD for the paper.
 - ✧ Please find payment information at: www.ccsenet.org/payment
 - ✧ Please notify the editor when payment has been made

Proposed Schedule for Publication

- ✓ Vol. 5, No. 1, January 2013, if you meet above requirements within 2 weeks.
- ✓ e-Version First: the online version may be published soon when the final draft completed
- ✓ You may also ask to publish the paper later, if you need more time for revision or payment.

Additional Information

- ✓ You will receive two copies (per paper) of printed journal, *free of charge*
- ✓ If you want to buy more printed journals, please contact with the Editor
- ✓ You may download e-journal in PDF from: [www.ccsenet.org/jas/free of charge](http://www.ccsenet.org/jas/free%20of%20charge)
- ✓ Any questions please contact with the Editor at: jas@ccsenet.org

Comments from Internal Editor

Evaluation	Grade Please fill a grade of 5, 4, 3, 2, 1(high to low)
Overall evaluation on the paper	4
Contribution to existing knowledge	4
Organization and Readability	4
Soundness of methodology	4
Evidence supports conclusion	4
Adequacy of literature review	4
Comments and Suggestions Re-edit the paper according to <i>Paper Submission Guide</i>: www.ccsenet.org/submission Add DOI persistent links to those references that have DOIs, please see <i>Paper Submission Guide</i>	

Comments from External Reviewers

Evaluation	Grade Please fill a grade of 5, 4, 3, 2, 1(high to low)
Overall evaluation on the paper	4
Contribution to existing knowledge	3
Organization and Readability	4
Soundness of methodology	4
Evidence supports conclusion	4
Adequacy of literature review	4
❖ Strengths The manuscript is very important and useful in this research field	
❖ Weaknesses	
❖ Suggestions to Author/s	

PROTEIN EXPRESSION IN THE SALIVARY GLANDS OF DENGUE-INFECTED *Aedes Aegypti* MOSQUITOES AND BLOOD-FEEDING SUCCESS

Ladawan Wasinpiyamongkol¹, Sirilaksana Patramool², Supatra Thongrungrat³,
Pannamas Maneekan¹, Suntaree Sangmukdanan¹, Dorothée Missé²
and Natthanej Luplertlop⁴

¹Department of Tropical Hygiene, ³Department of Medical Entomology, ⁴Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University, Bangkok, Thailand; ²Laboratoire MIVEGEC, UMR CNRS 5230/IRD 224/UM1, Montpellier, France

Abstract. Mosquito salivary glands (SG) play an essential role in food digestion and pathogen transmission. The function of the salivary components during infection is poorly understood. In this study, female *Aedes aegypti* mosquitoes were infected with dengue virus serotype 2 (DENV-2) via an artificial membrane feeding apparatus. The mosquito SGs were examined for DENV-2 infection for 14 days post-infection (dpi). The amount of dengue virus increased throughout the 14 dpi. Three different meals were provided for the *Ae. aegypti* mosquitoes. SG protein expression was compared among sugar-fed (SF), blood-fed (BF), and dengue-infected blood-fed (DF) mosquitoes using SDS-PAGE coupled with densitometric analysis. The SG of SF mosquitoes had fewer protein bands than those of BF and DF mosquitoes. The major SG proteins seen among BF and DF mosquitoes had molecular weights of 12-15, 25-30, 35-40, 45-50, 55-60 kDa and 61-67 kDa. We compared the SG protein band expression profiles in BF and DF mosquitoes. Two bands (35-40 and 61-67 kDa) were expressed more by DF mosquitoes and 3 different bands (25-30, 45-50, and 55-60 kDa) were expressed more by BF mosquitoes. These SG proteins may have some role in facilitating blood-feeding and dengue infection. We speculate these specific SG proteins in dengue-infected mosquitoes may increase the chance of blood-feeding and virus transmission by infected mosquitoes. These results may be useful for designing additional tools to investigate the interaction between *Ae. aegypti* SG and the dengue virus.

Keywords: *Aedes*, blood feeding, dengue, mosquito, protein, salivary gland

Correspondence: Natthanej Luplertlop, Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University, 420/6 Ratchawithi Road, Ratchathewi, Bangkok 10400, Thailand.

Tel: 66 (0) 2354 9100-19; Fax: 66 (0) 2644 4436
E-mail: natthanej.luplertlop@mahidol.ac.th

INTRODUCTION

Dengue fever is an important mosquito-borne disease. The World Health Organization has estimated the incidence of dengue fever is 50-100 million cases annually (WHO, 2007). The dengue virus

is transmitted to humans by the bite of an infected female *Aedes* mosquito with *Aedes aegypti* being the principle vector for dengue virus (Gubler, 1998). There are no currently available commercial dengue vaccines or antiviral agents effective against dengue virus. Understanding mosquito-pathogen interactions is essential to determining how the pathogen develops in the vector prior to transmission. This may provide information to help develop a vaccine or method to control the spread of the disease.

The mosquito salivary gland (SG) plays an essential role in food ingestion and dengue virus transmission. Mosquito saliva contains various anti-hemostatic agents, which enable the mosquito to feed quickly and efficiently, avoiding the defensive response of the host (Beerntsen *et al*, 2000). These molecules are secreted in the distal lateral and median lobes of the SG (Ribeiro *et al*, 1984; James and Rossignol, 1991; James, 1994). Male mosquitoes are incapable of blood-feeding due to a lack of these specialized regions, consequentially they only feed on nectar. Determination of SG proteins among *Ae. aegypti* (Valenzulela *et al*, 2002; Ribeiro *et al*, 2007; Almeras *et al*, 2010), *Ae. albopictus* (Arca *et al*, 2007), *Anopheles gambiae* (Francischetti *et al*, 2002; Arca *et al*, 2005) and *Culex pipiens quinquefasciatus* (Ribeiro *et al*, 2004) mosquitoes has been conducted. In a study of SG proteins from female *Ae. aegypti* (Wasinpiyamongkol *et al*, 2010) and *Anopheles barbirostris* complex (Jariyapan *et al*, 2010) mosquitoes, the majority of SG proteins were found to be involved in blood feeding. These anti-hemostatic molecules include anti-platelet factors (apyrases), the anticoagulant factor Xa (Ribeiro *et al*, 1984; Champagne *et al*, 1995; Smartt *et al*, 1995; Stark and James,

1998), vasodilators (sialokinins) (Ribeiro, 1992; Champagne and Ribeiro, 1994), D7 proteins (James *et al*, 1991) and α -amylase (Grossman and James, 1993). The saliva of mosquitoes has also been demonstrated to enhance pathogen transmission (Edwards *et al*, 1998; Schneider and Higgs, 2008).

Previous studies of *Leishmania major* have shown mice injected with the SG extract of sand flies and *L. major* had a greater parasite burden than mice injected with parasite alone (Titus and Ribeiro, 1988). Mice experimentally infected with West Nile virus through mosquito bite had higher viremia levels than those infected without a mosquito bite (Styer *et al*, 2011). The features of mosquito saliva that might facilitate pathogen transmission include vasodilation, inhibition of platelet activation and suppression of inflammation (Champagne *et al*, 1994, 1995). The sequestration of inflammatory mediators, such as biogenic amines and leukotrienes, is an important function of the abundant D7 protein in *Ae. aegypti* saliva (Calvo *et al*, 2006, 2009). Therefore, saliva not only facilitates blood-feeding, but also plays a vital role in viral infection and transmission. Although, the roles of various mosquito SG components in preventing vertebrate hemostasis have been relatively well-documented, the roles of such compounds in modulating dengue virus infection and promoting transmission have not been clearly described. The aims of this study were to evaluate the expression of mosquito SG proteins in relationship to dengue-infected blood-feeding and the effect of SG proteins in dengue virus infected female mosquitoes on feeding behavior and virus transmission in order to better understand the complex role of SG protein on blood meals and pathogen transmission.

MATERIALS AND METHODS

Mosquitoes and dengue virus

Lab raised *Aedes aegypti* mosquitoes were maintained on 10% sugar solution at 28°C, 70-80% relative humidity on 12:12 hour light:dark photoperiods at the Department of Medical Entomology, Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University. Dengue virus serotype 2 strain 16681(DENV-2-16681) was used for the study, obtained from the TROPMED Dengue Diagnostic Center (TDC), Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University, Thailand. The concentration of virus used in this study was approximately 1.7×10^7 PFU/ml.

Mosquito infection

Five to 7 day-old adult female mosquitoes were orally infected with dengue virus via an artificial membrane feeding apparatus (Ward *et al*, 1978). Mosquitoes were divided into three treatment groups: 1) those fed on 10% sugar solution (SF); 2) those fed on defibrinated human blood (BF); 3) those fed on defibrinated human blood with dengue virus (DF). Engorged mosquitoes were collected from each group 1 day post-infection (dpi), 3 dpi, 5 dpi, 9 dpi and 14 dpi.

Salivary gland dissection and preparation

Mosquito SG tissue samples were dissected in a drop of cold sterile PBS (pH 7.4); the tissue was washed three times with sterile PBS. The SG samples were then homogenized with a pellet pestle and centrifuged at 14,000 rpm for 45 minutes at 4°C and then the supernatant was collected. The concentrations of SG proteins and RNA supernatant were then determined using a Nanodrop ND-1000, version 3.3.1 (Thermo Scientific, Hamton, NH). The SG supernatant was stored at -80°C until used.

Dengue viral detection

RNA was extracted from mosquito SG at each time-point using a QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, Valencia, CA) following the manufacturer's instructions. The presence of dengue viral RNA was determined using reverse transcriptase-PCR (RT-PCR) as described by Lanciotti *et al* (1992). RT-PCR was carried out on 0.5 µg of SG RNA using a Onestep RT-PCR kit (Invitrogen, Carlsbad, CA) following the manufacturer's protocol. The following primers were used: DENV-2_F: 5'-CAATATGCTGAAAC-GCGCGAGAAACCG-3', DENV-2_R: 5'-CCACAAGGGCCATGAACAG-3', and ribosomal protein S7, rpS7_F: 5' TCAGT-GTACAAGAAGCTGACCGGA-3', and rpS7_R: 5'-AACGATGCAGCACAAA-GATG-3', was used as an internal control. The RT-PCR products were detected by gel electrophoresis with ethidium bromide staining. The gel was digitized using the Gene Genius Gel documentation system with Gene Snap software (Syngene Laboratories, Cambridge, UK) for ultraviolet visualization.

Characterization of SG protein profiles

The SG proteins were separated using SDS-PAGE with a discontinuous system as described by Laemmli (1970) with some modifications. Determination of SG proteins in BF and DF mosquitoes was conducted in triplicate. Twenty micrograms of SG protein per lane was mixed in a 1:1 ratio (v/v) with 2% sodium dodecyl sulfate (SDS) gel loading buffer [50 mM Tris-HCl (pH 6.8), 100 mM DTT, 2% (w/v) SDS, 10% β-mercaptoethanol, 0.1% (w/v) bromophenol blue and 10% (v/v) glycerol]. The mixture was heated to 100°C for 3 minutes in a hot well and then loaded into wells with 12% acrylamide gel (40 µl/well). The electrophoresis was conducted at 110 V,

Table 1
Aedes aegypti mosquito salivary gland proteins.

Proteins	Molecular weight	References
Apyrase (Aed a 1)	62-68 kDa	Ribeiro <i>et al</i> , 1984; Smartt <i>et al</i> , 1995; Champagne <i>et al</i> , 1995; Peng <i>et al</i> , 2001
Anticoagulant-factor Xa	54 kDa	Stark and James, 1998
Salivary serpin putative anticoagulant	47-50 kDa	Orlandi-Pradines <i>et al</i> , 2007; Almeras <i>et al</i> , 2010
Aed a X1, Aed a X2	37-44 kDa	Peng <i>et al</i> , 1998, 1999
Female-specific protein, D7 (Aed a 2)	36-39 kDa	James <i>et al</i> , 1991; Peng <i>et al</i> , 1998; Almeras <i>et al</i> , 2010
Aed a 3, Putative 30 kDa allergen-like protein	23-30 kDa	Xu <i>et al</i> , 1998; Simons and Peng, 2001; Ribeiro <i>et al</i> , 2007; Orlandi-Pradines <i>et al</i> , 2007; Almeras <i>et al</i> , 2010
Adenosine deaminase	53-59 kDa	Ribeiro <i>et al</i> , 2001; Almeras <i>et al</i> , 2010
Angiopoietins-like protein	23-30 kDa	Hackett <i>et al</i> , 2000; Valenzuela <i>et al</i> , 2002
Antigen-5 protein family	23-30 kDa	Schreiber <i>et al</i> , 1997
Vasodilator sialokinins	1.4 kDa	Beerntsen <i>et al</i> , 1999; Ribeiro, 1992

300 mA for 45 minutes. After electrophoresis, the SG proteins were detected with 0.2% Coomassie® brilliant blue stain. The molecular weights of the SG proteins were determined by comparing the relative electrophoretic mobility of an unknown component with standard protein markers (Bio-Rad, Hercules, CA). Digital images of protein bands were captured at 600 dpi using a color scanner (SPEC). A linear relationship was obtained by plotting the relative mobility of the protein markers against the logarithmic values for their molecular weight. The density of band expression was determined using Gene-tools version 4.0 (Syngene Laboratories, Cambridge, UK).

Statistical analysis

SPSS version 13.0 (SPSS, Chicago, IL) was used to compare the expressions of the DENV bands at each time-point and to compare the SG protein bands between BF and DF mosquitoes. Differences between BF and DF mosquito SG protein bands were analyzed using a standard *t*-test to determine statistical significance. Statistical significance was set at $p \leq 0.01$.

RESULTS

DENV-2 replication among the female *Ae. aegypti* salivary glands (SG)

The DENV-2 replication in the mosquito SG increased slowly during the

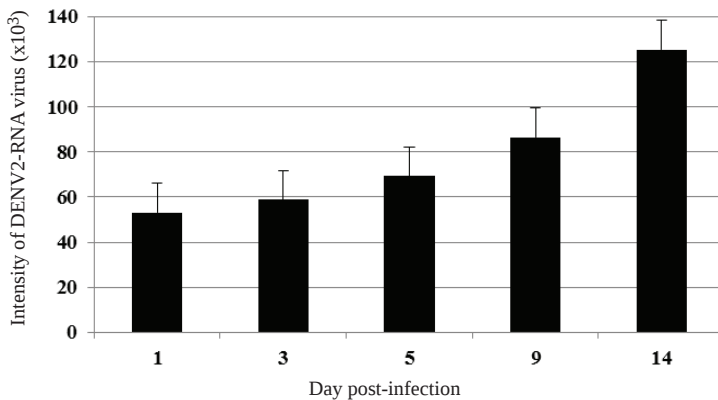


Fig 1—Number of DENV-2 viruses in salivary glands of *Ae. aegypti* by day post-infection.

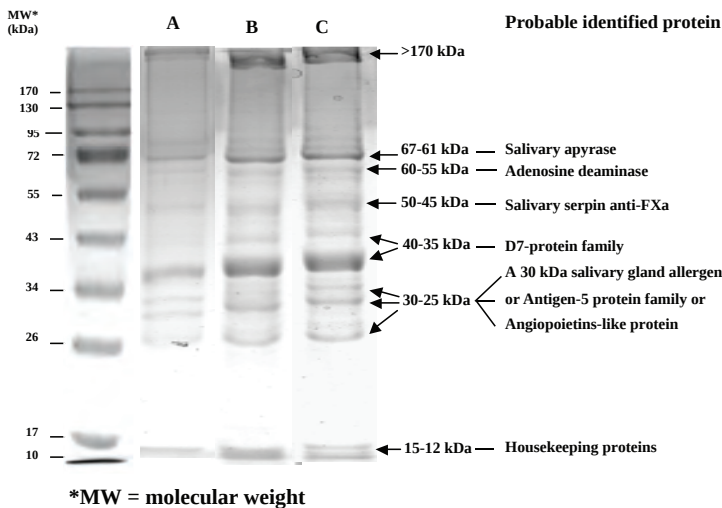


Fig 2—Electrophoresis of salivary gland proteins among A) sugar-fed, B) blood-fed, and C) DENV-2 infected blood-fed female *Ae. aegypti* mosquitoes 14 days post-infection.

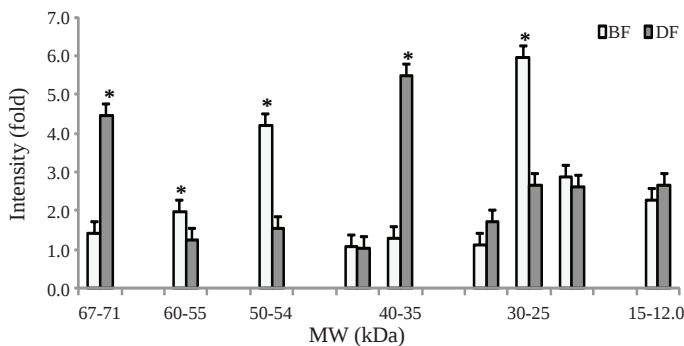


Fig 3—Intensity of female *Ae. aegypti* salivary gland proteins 14 days post-infection

first 3 dpi, then increased rapidly until it reached a peak 14 dpi (Fig 1).

Salivary gland protein profiles

We observed considerable variation in protein profiles by meal type; the bands ranged in molecular weight from 12 kDa to >170 kDa (Fig 2). At 14 dpi 9 SG protein bands were observed with molecular weights of 12-15, 25-30, 35-40, 45-50, 55-60, and 61-67 kDa. Most of the bands were found in the BF and DF groups, with fewer protein bands seen in the SF group (Fig 2).

The densities of band expression of 5 of the 9 SG protein bands (25-30, 35-40, 45-50, 55-60 kDa and 61-67 kDa) were significantly different between DF and BF mosquitoes (Fig 3), *ie*, two protein bands (35-40 and 61-67 kDa) were expressed in a significantly higher amount ($p \leq 0.01$) among DF mosquitoes, while three protein bands (25-30 kDa, 45-50 kDa and 55-60 kDa) were expressed in a significantly higher amount ($p \leq 0.01$) among BF mosquitoes. The other 4 SG protein bands (12-15, 25-30, and 35-40 kDa) exhibited similar expressions in both DF and BF mosquitoes ($p > 0.01$).

Some proteins were expressed to a greater extent among DF mosquitoes and some were expressed to a greater extent among BF mosquitoes and some by both groups (Fig 3).

DISCUSSION

Once a mosquito is infected with an arbovirus, it is capable of transmitting that virus for the rest of its life. The concentration of dengue virus in the SG gradually increased throughout the study. These findings suggest *Ae. aegypti* is a remarkably competent vector (Armstrong and Rico-Hesse, 2003; Salazar *et al*, 2007). A previous study using fluorescence staining demonstrated DENV-2 reached a maximum concentration by 14 dpi (Watt *et al*, 1987). The time from when the mosquito becomes infected with dengue virus until transmission is 7-14 dpi, called the extrinsic incubation period (EPI) (Salazar *et al*, 2007). Thus, the first 14 dpi are a good time to investigate changes in mosquito SG proteins during infection (Salazar *et al*, 2007; Zhang *et al*, 2010). The present study supports previous reports that *Aedes* mosquito SG are susceptible to dengue infection and transmission (Salazar *et al*, 2007). Understanding SG infection with dengue virus and how replication facilitates dissemination can aid in a greater understanding of vector-virus interactions on dengue transmission.

Salivary gland proteins by meal type

A previous study showed mosquito SG are comprised of fewer than 20 protein bands, as demonstrated by a SDS PAGE (Racioppi and Spielman, 1987). In the present study, SF mosquitoes had fewer protein bands than BF and DF mosquitoes. The major SG proteins seen in BF and DF mosquitoes had molecular weights in the ranges of 12-15, 25-30, 35-40, 45-50, 55-60

and 61-67 kDa (Fig 2). Two bands (35-40 and 61-67 kDa) were expressed more by DF mosquitoes and three bands (25-30, 45-50, and 55-60 kDa) were expressed more by BF mosquitoes (Fig 3). Comparing the effects of the blood meal on SG protein expression revealed the protein band density among SF mosquitoes was different than that in BF mosquitoes. Our observations are similar to a previous study comparing differences in SG protein expression between sugar- and blood-fed female *Ae. aegypti* mosquitoes (Wasinpiyamongkol *et al*, 2010) who found those SG proteins up-regulated in SF mosquitoes tended to be housekeeping proteins, those related to energy metabolism (Das *et al*, 2010); whereas, the SG proteins up-regulated in BF mosquitoes were proteins that facilitated the blood-feeding process. Our study found the SG of BF and DF mosquitoes expressed different levels of some proteins after blood feeding than SF mosquitoes.

Several authors have studied the proteins from the SG of *Ae. aegypti*; Valenzuela *et al* (2002) identified 10 amino-terminal sequences obtained by Edman degradation with 1D SDS-PAGE from SG proteins. Ribeiro *et al* (2007) succeeded in identifying 24 SG proteins using 2D gel electrophoresis. The majority of SG proteins related to blood feeding in *Ae. aegypti* have been classified according to their known or predicted cellular location, biological function or allergenicity using proteomic approaches (Valenzuela *et al*, 2002; Ribeiro *et al*, 2007; Orlandi-Pradines *et al*, 2007; Almeras *et al*, 2010; Wasinpiyamongkol *et al*, 2010). These include the D7 family, salivary serpin anticoagulant, salivary apyrase, angiopoietin, antigen-5 protein, adenosine deaminase and certain salivary allergens (Table 1). However, there has been little work on

the role of SG proteins in *Ae. aegypti* mosquitoes infected with dengue virus.

In our study expression of some SG proteins in DF and BF mosquitoes was different. This suggests dengue infection induces expression of specific proteins and normal blood-feeding induces expression of different proteins. A previous study suggested this difference in protein expression may be an extensive process and there may be post-translational modifications of protein among infected mosquitoes (Choumet *et al*, 2007). Many studies support the hypothesis the presence of pathogens in mosquito SG not only induces modifications in saliva composition but also induces modifications in insect behavior (Rossignal *et al*, 1984; Garcia *et al*, 1994; Mourya *et al*, 2003; Luz *et al*, 2011).

The behavior of insect vectors may be affected by infection with viruses, parasites (Grimstad *et al*, 1980; Rowland and Lindsay, 1986) or symbionts (Evans *et al*, 2009; Moreira *et al*, 2009). There is evidence the dengue virus can alter the behavior of *Ae. aegypti* mosquitoes. For example, dengue-infected mosquitoes spend a longer time feeding than non-infected mosquitoes (Platt *et al*, 1997). *Ae. aegypti* female mosquitoes experimentally-infected with dengue virus have increased locomotor activity, which can increase their chances of finding a suitable host and their biting rate (Lima-Camara *et al*, 2011). Previous studies found viral infection may only affect behavior if certain organs are infected (Platt *et al*, 1997). Pathogens must travel from the insect's midgut epithelial cells into the lymph, and then to other organs to ultimately reach the SG. *Ae. aegypti* SG may play a major role in dengue virus transmission and express a variety of bioactive components in saliva that facilitate blood-feeding by inhibiting

hemostatic activity. We hypothesized SG proteins expressed among infected female mosquitoes may affect blood-feeding behavior and enhance virus transmission. We investigated some of these SG proteins by looking at how they influence mosquito feeding and probing behavior. Our observations were performed 14 dpi, a time corresponding to a late stage in SG infection when the dengue virus should be at a high concentration (Fig 1).

To identify SG proteins with significantly-altered expression in DF mosquitoes, we made predictions based on previously identified SG proteins isolated with a SDS-PAGE that yielded amino-terminal sequencing with Edman's degradation (Valenzuela *et al*, 2002). Our predictions were based on previously described proteins identified by proteomic approaches (Valenzuela *et al*, 2002; Orlandi-Pradines *et al*, 2007; Ribeiro *et al*, 2007; Almeras *et al*, 2010).

Five SG protein bands were selected based on their predicted involvement in the anti-hemostatic process, being major *Ae. aegypti* SG secretory proteins. Of the three SG-protein bands with less expression among DF than BF mosquitoes, the first SG protein band (25-30 kDa) was believed to be a salivary allergen (Simons and Peng, 2001), a member of the aegyptin family (Ribeiro *et al*, 2007), part of the antigen-5 family (Schreiber *et al*, 1997), or an angiopoietin (Hackett *et al*, 2000; Valenzuela *et al*, 2002). The function of these SG proteins is unclear, thus we cannot anticipate the consequences of altering their expression during dengue infection and the blood-feeding process. The second band (45-50 kDa) is similar to salivary serpin putatively associated with the salivary factor Xa-directed anticlotting of *Ae. aegypti* (Stark and James, 1998). The last band (55-60 kDa) may be

the previously described salivary adenosine deaminase (ADA) (Ribeiro *et al*, 2001). Adenosine deaminase hydrolyzes adenosine to make inosine and ammonia; removal of adenosine may inhibit platelet aggregation and mast cell degranulation. Inosine interferes with host coagulation at the bite site to inhibit the production of inflammatory cytokines. These processes may facilitate blood feeding (Hasko *et al*, 2000; Ribeiro *et al*, 2001; Valenzuela *et al*, 2002). The SG protein bands expressed in smaller amounts among DF mosquitoes (25-30, 45-50 and 55-60 kDa) may be four proteins. These include the 30 kDa salivary protein allergen, the antigen-5 family, the salivary factor Xa-directed anticlotting and adenosine deaminase (Table 1). The present study suggests the expressed SG proteins are likely to play a role, either directly or indirectly, in the feeding process. These proteins have been found to be significantly regulated by blood feeding by *Ae. aegypti* mosquitoes (Das *et al*, 2010; Wasinpiyamongkol *et al*, 2010). It is possible that the expression of these SG proteins is related to blood feeding.

Two SG protein bands were highly expressed among DF mosquitoes. A 35-40 kDa band had a strong similarity to the D7 protein family (James *et al*, 1991). D7-protein, a major SG secretory protein identified in *Ae. aegypti* mosquitoes, exists in two forms. The long form (~30-35 kDa) is found exclusively in mosquitoes (James *et al*, 1991). The D7 protein is expressed predominantly in the SG of adult female mosquitoes, especially in the distal-lateral and median lobes (Suwan *et al*, 2002). The D7 protein has been shown to bind to biogenic amines, which may antagonize vasoconstriction, platelet aggregation and pain during feeding (Calvo *et al*, 2006). This protein may act as an anti-hemostatic factor (Arca *et al*,

2007). Its sequestration by D7 proteins could antagonize these host defense functions, thus promoting blood acquisition and pathogen transmission (Calvo *et al*, 2006). Another 61-67 kDa band could be a salivary apyrase (Champagne *et al*, 1995). Salivary apyrases in *Ae. aegypti* mosquitoes are members of a protein family that includes 5' nucleotidases (Champagne *et al*, 1995), which are expressed specifically in the distal-lateral and median lobes of SG mosquitoes (Ribeiro *et al*, 1984; Smartt *et al*, 1995). Salivary apyrase is known to facilitate blood-feeding by inhibiting platelet aggregation (Champagne *et al*, 1995). The level of apyrase activity is correlated with the length of probing time during feeding, suggesting the enzyme facilitates the speed of locating blood (Ribeiro, 1987). Salivary apyrase is known to have anti-inflammatory and vasodilatory activity while the D7 family proteins show anti-platelet activity (James *et al*, 1991; Champagne *et al*, 1995). Higher levels of these proteins may result in an increase in mosquito blood-feeding capacity. A previous study revealed that aberrant feeding behavior manifested after increased probing resulting in reduced feeding. Reduced feeding was reported for *Ae. triseriatus* mosquitoes orally-infected with Lacrosse virus (Grimstad *et al*, 1980) and in *Ae. aegypti* mosquitoes parenterally-infected with Semliki Forest virus (Mims *et al*, 1966). The dengue virus may stimulate over-expression of certain SG proteins among *Aedes* mosquitoes, modifying their behavior to enhance virus transmission. Our study provides a better understanding of the relationship between SG proteins expressed in dengue infected mosquitoes and changes in blood-feeding behavior. We speculate the specific SG proteins found in dengue-infected female mosquitoes may increase

blood-feeding and virus transmission by infected mosquitoes.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank Mr. Tim Jackson, Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University, for his critical review of this manuscript. This research was supported by a Trop. Med. Grant, Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University, The Thailand Research Fund grant #MRG5380006 and the Vejdsut Foundation under the patronage of HRH Princess Galyanivadhana Kromluangnaradhiwas-
rajanagarindra, Bangkok, Thailand.

REFERENCES

- Almeras L, Fontaine A, Belghazi M, *et al.* Salivary gland protein repertoire from *Aedes aegypti* mosquitoes. *Vector-Borne Zoonot Dis* 2010; 10: 4.
- Aramstrong PM, Hesse RR. Efficiency of dengue serotype 2 virus strains to infect and disseminate in *Aedes aegypti*. *Am J Trop Med Hyg* 2003; 68: 539-44.
- Arca B, Lombardo F, Francischetti IM, *et al.* An insight into the sialome of the adult female mosquito *Aedes albopictus*. *Insect Biochem Mol Biol* 2007; 37:107-27.
- Arca B, Lombardo F, Valenzuela JG, *et al.* An updated catalogue of salivary gland transcripts in the adult female mosquito, *Anopheles gambiae*. *J Exp Biol* 2005; 208:3971-86.
- Beerntsen BT, Champagne DE, Coleman JL, *et al.* Characterization of the Sialokinin I gene encoding the salivary vasodilator of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Mol Biol* 1999; 8: 459-67.
- Beerntsen BT, James AA, Christensen BM. Genetics of mosquito vector competence. *Micro Mol Biol Rev* 2000; 64: 115-37.
- Calvo E, Mans BJ, Andersen JF, Ribeiro JM. Function and evolution of a mosquito salivary protein family. *J Biol Chem* 2006; 281: 1935-42.
- Calvo E, Mans BJ, Ribeiro JM, Andersen JF. Multifunctionality and mechanism of ligand binding in a mosquito anti-inflammatory protein. *Proc Natl Acad Sci, USA* 2009; 106: 3728-33.
- Champagne DE, Ribeiro JM. Sialokinin I and II: vasodilatory tachykinins from the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. *Proc Natl Acad Sci, USA* 1994; 91: 138-42.
- Champagne DE, Smartt CT, Ribeiro JM, James AA. The salivary gland-specific apyrase of the mosquito *Aedes aegypti* is a member of the 5'-nucleotidase family. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 694-8.
- Choumet V, Carmi-Leroy A, Laurent C, *et al.* The salivary glands and saliva of *Anopheles gambiae* as an essential step in the *Plasmodium* life cycle: a global proteomic study. *Proteomics* 2007; 7: 3384-94.
- Das S, Radtke A, Choi Y, Mendes AM, Valenzuela JG, Dimopoulos G. BMC transcriptomic and functional analysis of the *Anopheles gambiae* salivary gland in relation to blood feeding. *Genomics* 2010; 11: 566.
- Edwards JF, Higgs S, Beaty BJ. Mosquito feeding-induced enhancement of Cache Valley virus (*Bunyaviridae*) infection in mice. *J Med Entomol* 1998; 35: 261-5.
- Evans O, Caragata EP, McMeniman CJ, *et al.* Increased locomotor activity and metabolism of *Aedes aegypti* infected with a life-shortening strain of *Wolbachia pipientis*. *J Exp Biol* 2009; 212: 1436-41.
- Francischetti IM, Valenzuela JG, Pham VM, *et al.* Toward a catalog for the transcripts and proteins (sialome) from the salivary gland of the malaria vector *Anopheles gambiae*. *J Exp Biol* 2002; 205:2429-51.
- Garcia ES, Mello CB, Azambuja P, Ribeiro JM. *Rhodnius prolixus*: salivary antihemostatic components decrease with *Trypanosoma rangeli* infection. *Exp Parasitol* 1994; 78: 287-93.
- Grimstad PR, Ross QE, Craig GB. *Aedes trise-*

- riatus* (Diptera:Culicidae) and La Crosse virus. II. Modification of mosquito feeding behavior by virus infection. *J Med Entomol* 1980; 17: 1-7.
- Grossman GL, James AA. The salivary glands of the vector mosquito, *Aedes aegypti*, express a novel member of the amylase gene family. *Insect Mol Biol* 1993; 1: 223-32.
- Gubler DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin Microbial Biol Res* 1998; 11: 480-96.
- Hackett SF, Ozaki H, Strauss RW, *et al.* Angiopoietin 2 expression in the retina: upregulation during physiologic and pathologic neovascularization. *J Cell Physiol* 2000; 184: 275-84.
- Hasko G, Kuhel DG, Ne'meth ZH, *et al.* Inosine inhibits inflammatory cytokine production by a posttranscriptional mechanism and protects against endotoxin-induced shock. *J Immunol* 2000; 164: 1013-9.
- James AA. Molecular and biochemical analyses of the salivary glands of vector mosquitoes. *Bull Inst Pasteur* 1994; 92: 133-50.
- James AA, Blackmer K, Marinotti O, Ghosn CR, Racioppi JV. Isolation and characterization of the gene expressing the major salivary gland protein of the female mosquito *Aedes aegypti*. *Mol Biochem Parasitol* 1991; 44: 245-53.
- James AA, Rossignol PA. Mosquito salivary glands: parasitological and molecular aspects. *Parasitol Today* 1991; 7: 267-71.
- Jariyapan N, Baimai V, Poovorawan Y, *et al.* Analysis of female salivary gland proteins of *An. barbirostris* complex in Thailand. *Parasitol Res* 2010; 107: 509-16.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-5.
- 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(3): 545-51.
- Lima-Camara TN, Bruno RV, Luz PM, *et al.* Dengue infection increases the locomotor activity of *Aedes aegypti* females. *PLoS ONE* 2011; 6: e17690.
- Luz PM, Lima-Camara TN, Bruno RV, *et al.* Potential impact of a presumed increase in the biting activity of dengue-virus-infected *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) females on virus transmission dynamics. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2011; 106: 755-8.
- Mims CA, Day MF, Marshall ID. Cytopathic effects of Semliki Forest viruses in the mosquito *Aedes aegypti*. *Am J Trop Med Hyg* 1966; 15: 775-84.
- Moreira LA, Iturbe-Ormaetxe I, Jeffery JA, *et al.* A *Wolbachia* symbiont in *Aedes aegypti* limits infection with dengue, Chikungunya, and *Plasmodium*. *Cell* 2009; 139: 1268-78.
- Mourya DT, Rohankhedkar MS, Yadav P, Dighe V, Deobagkar DN. Enhanced esterase activity in salivary gland and midgut of *Aedes aegypti* mosquito infected with dengue-2 virus. *Indian J Exp Biol* 2003; 41: 91-3.
- Orlandi-Pradines E, Almeras L, Denis de Sennerville L, *et al.* Antibody response against saliva antigens of *Anopheles gambiae* and *Aedes aegypti* in travellers in tropical Africa. *Microbes Infect* 2007; 9: 1454-62.
- Platt KB, Linthicum KJ, Myint KS, Innis BL, Lerdthusnee K, Vaughn DW. Impact of dengue virus infection on feeding behavior of *Aedes aegypti*. *Am J Trop Med Hyg* 1997; 57: 119-25.
- Peng Z, Lam H, Xu W, *et al.* Characterization and clinical relevance of two recombinant mosquito *Aedes aegypti* salivary allergens, rAed a 1 and rAed a 2. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 101: S32.
- Peng Z, Yang J, Wang H, Simons FE. Production and characterization of monoclonal antibodies to two new mosquito *Aedes aegypti* salivary proteins. *Insect Biochem Mol Biol* 1999; 29: 909-14.
- Peng Z, Xu W, James AA, *et al.* Expression, purification, characterization, and clinical relevance of rAed a 1-a 68 kDa recombinant mosquito *Aedes aegypti* salivary allergen. *Int Immunol* 2001; 13: 1445-52.

- Racioppi JV, Spielman A. Secretory proteins from the salivary glands of adult *Aedes aegypti* mosquitoes. *Insect Biochem* 1987; 17: 503.
- Ribeiro JM, Sarkis JJ, Rossignol PA, Spielman A. Salivary apyrase of *Aedes aegypti*: characterization and secretory fate. *Comp Biochem Physiol* 1984; 79B: 81-6.
- Ribeiro JM. Characterization of a vasodilator from the salivary glands of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. *J Exp Biol* 1992; 165: 61-71.
- Ribeiro JM, Arca B, Lombardo F, et al. An annotated catalogue of salivary gland transcripts in the adult female mosquito, *Aedes aegypti*. *BMC Genomics* 2007; 8: 6.
- Ribeiro JM, Charlab R, Pham VM, et al. An insight into the salivary transcriptome and proteome of the adult female mosquito *Culex pipiens quinquefasciatus*. *Insect Biochem Mol Biol* 2004; 34: 543-63.
- Ribeiro JM, Charlab R, Valenzuela JG. The salivary adenosine deaminase activity of the mosquitoes *Culex quinquefasciatus* and *Aedes aegypti*. *J Exp Biol* 2001; 204: 2001-10.
- Ribeiro JM. Role of arthropod saliva in blood feeding. *Ann Rev Entomol* 1987; 32: 463-78.
- Ribeiro JM, Rossignol PA, Spielman A. Role of mosquito saliva in blood vessel location. *J Ext Biol* 1984; 108: 1-7.
- Rossignol PA, Ribeiro JM, Spielman A. Increased intradermal probing time in sporozoite-infected mosquitoes. *Am J Trop Med Hyg* 1984; 33(1): 17-20.
- Rowland MW, Lindsay SW. The circadian flight activity of *Aedes aegypti* parasitized with the filarial nematode *Brugia pahangi*. *Physiol Entomol* 1986; 11: 325-34.
- Salazar MI, Richardson JH, Sánchez-Vargas I, et al. Dengue virus type 2: replication and tropisms in orally infected *Aedes aegypti* mosquitoes. *Micro Biol* 2007; 30: 9.
- Schneider BS, Higgs S. The enhancement of arbovirus transmission and disease by mosquito saliva is associated with modulation of the host immune response. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2008; 102: 400-8.
- Schreiber MC, Karlo JC, Kovalick GE. A novel cDNA from *Drosophila* encoding a protein with similarity to mammalian cysteine-rich secretory proteins, wasp venom antigen-5, and plant group 1 pathogenesis-related proteins. *Gene* 1997; 191: 135-41.
- Simons FE, Peng Z. Mosquito allergy: recombinant mosquito salivary antigens for new diagnostic tests. *Int Arch Allergy Immunol* 2001; 124: 403-5.
- Smartt CT, Kim AP, Grossman GL, James AA. The apyrase gene of the vector mosquito, *Aedes aegypti*, is expressed specifically in the adult female salivary glands. *Exp Parasitol* 1995; 81: 239-48.
- Stark KR, James AA. Isolation and characterization of the gene encoding a novel factor Xa-directed anticoagulant from the yellow fever mosquito. *Aedes aegypti*. *J Biol Chem* 1998; 273: 20802-9.
- Styer LM, Lim P-Y, Louie KL, Albright RG, Kramer LD, Bernard KA. Mosquito saliva causes enhancement of West Nile virus infection in mice. *J Virol* 2011; 85: 1517-27.
- Suwan N, Wilkinson MC, Crampton JM, Bates PA. Expression of D7 and D7-related proteins in the salivary glands of the human malaria mosquito *Anopheles stephensi*. *Insect Mol Biol* 2002; 11: 223-32.
- Titus RG, Ribeiro JM. Salivary gland lysates from the sandfly *Lutzomyia longipalpis* enhance *Leishmania* infectivity. *Science* 1988; 239: 1306-8.
- Valenzuela JG, Pham VM, Garfield MK, Francischetti IM, Ribeiro JM. Toward a description of the sialome of the adult female mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Mol Biol* 2002; 32: 1101-22.
- Wasinpiyamongkol L, Patramool S, Luplertlop N, et al. Blood-feeding and immunogenic *Aedes aegypti* saliva proteins. *Proteomics* 2010; 10: 1906-16.
- Ward et al, 1978
- Watts DM, Burke DS, Harrison BA, Whitmire

- RE, Nisalak A. Effect of temperature on the vector efficiency of *Aedes aegypti* for dengue 2 virus. *Am J Trop Med Hyg* 1987; 36: 143-52.
- World Health Organization (WHO). Fact sheet on dengue. Geneva: WHO, 2007.
- Xu W, Peng Z, Simons FE. Isolation of a cDNA encoding a 30 kDa IgE binding protein of mosquito *Aedes aegypti* saliva. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 101: S203.
- Zhang M, Zheng X, Wu Y, *et al.* Quantitative analysis of replication and tropisms of dengue virus type 2 in *Aedes albopictus*. *Am J Trop Med Hyg* 2010; 83: 700-7.