

การศึกษาภาคใด”ปรากฏการณ์รอดพ้น”ของไขสันหลังและก้านสมองในผู้ป่วยโรคพิษสุนัขบ้าและ
การศึกษาโครงสร้างของเซลล์ประสาทและมัยอิลิน



นางสาวศศิวิมล จันทรากูร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2547

ISBN : 974-53-1512-5

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**MECHANISMS OF “ESCAPE PHENOMENON” OF SPINAL CORD AND BRAINSTEM
IN HUMAN RABIES AND STUDY OF NEURONAL CYTOSKELETON AND MYELIN
INTEGRITY**

Miss Sasiwimon Chuntrakul

**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Medical Science**

Faculty of Medicine


Chulalongkorn University

Academic Year 2004

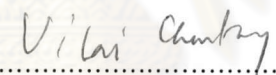
ISBN : 974-53-1512-5

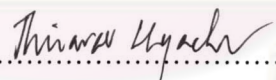
Thesis Title Mechanisms of “Escape Phenomenon” of Spinal Cord and Brainstem in
Human Rabies and Study of Cytoskeleton and Myelin Integrity.
By Miss Sasiwimon Chuntrakul
Field of study Medical Science
Thesis Advisor Professor Thiravat Hemachudha, M.D.
Thesis Coadvisor Assistant Professor Poonlarp Cheepsunthorn, Ph.D.


Accepted by the Faculty of Medicine, Chulalongkorn University in Partial
Fulfillment of the Requirements for the Master’s Degree



.....Dean of the Faculty of Medicine
(Professor Pirom Kamolratanakul, M.D.)

THESIS COMMITTEE


.....Chairman
(Associate Professor Vilai Chentanez, M.D.)


.....Thesis Advisor
(Professor Thiravat Hemachudha, M.D.)


.....Thesis Coadvisor
(Assistant Professor Poonlarp Cheepsunthorn, Ph.D.)


.....Member
(Assistant Professor Wanla Kulwichit, M.D.)

ศศิวิมล จันทร์ชากร : ไวรัสพิษสุนัขบ้ากับระบบประสาทส่วนกลาง : การศึกษาโครงสร้างของเซลล์ประสาทและมัยอิลิน
ในผู้ป่วยที่มีอาการแบบต่างๆ (RABIES VIRUS INFECTION AND THE CNS : ANALYSIS OF NEURONAL
CYTOSKELETON AND MYELIN IN DIFFERENT CLINICAL FORMS OF HUMAN RABIES.) อ. ที่ปรึกษา : ศ.
นพ.ธีระวัฒน์ เหมะจุธา, อ.ที่ปรึกษาร่วม : ผศ.ดร.พูลลาภ ฉิมศุทนต์ ISBN 974-53-1512-5.

โรคพิษสุนัขบ้ามีอาการทางคลินิก 2 แบบคือ แบบดุร้ายและแบบอัมพาต โดยพบว่าในแต่ละส่วนของระบบประสาท
ส่วนกลางมีลักษณะการกระจายตัวของไวรัสที่เหมือนกันในระยะแรกที่มีอาการทางคลินิก โดยเฉพาะในส่วนของก้านสมองและไข
สันหลัง เมื่อตรวจคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าสมองในผู้ป่วยที่มีอาการทางคลินิกทั้ง 2 แบบพบว่ามีลักษณะที่คล้ายกัน นอกจากความผิดปกติ
ในส่วนของก้านสมอง, ไขสันหลัง, thalamus, basal ganglia และ hippocampus ในส่วนของ subcortical และ deep white matter เป็น
อีกตำแหน่งที่พบสัญญาณความผิดปกติจากการตรวจคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าสมอง (magnetic resonance imaging(MRI)) อย่างไรก็ตาม
อาการทางคลินิกของผู้ป่วยโรคพิษสุนัขบ้าทั้ง 2 แบบมีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน ผู้ป่วยแบบอัมพาตจะมีอาการแขนขาอ่อนแรงซึ่ง
เกิดจากความผิดปกติของประสาทส่วนปลายไม่ใช่จาก motor neuron แม้ว่าเชื้อไวรัสจะกระจายอยู่อย่างหนาแน่นในส่วน of spinal
cord motor neuron หรือ anterior horn cell โดยอาการอ่อนแรงนี้จะไม่พบในผู้ป่วยที่มีอาการแบบดุร้ายจนกว่าจะถึงระยะสุดท้าย ซึ่ง
แตกต่างอย่างชัดเจนกับโรคสมองอักเสบอื่นที่เริ่มมีอาการทางสมองตั้งแต่ระยะแรกของโรค ด้วยเหตุที่ผู้ป่วยโรคพิษสุนัขบ้าไม่มี
พยาธิสภาพของระบบประสาทส่วนกลาง วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้จึงศึกษาในส่วน of ก้านสมองและไขสันหลัง (ซึ่งเป็น
ส่วนที่มีหน้าที่หลักในการควบคุมระดับความรู้สึกร่างกาย) ในผู้ป่วยโรคพิษสุนัขบ้าทั้ง 2 แบบที่ทนต่อวิธีการตายด้วย apoptosis รวมถึง
ศึกษาส่วนประกอบของ white matter เพื่อตอบคำถามถึงความผิดปกติจากการตรวจคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าสมอง ว่ามีความผิดปกติใน
ส่วน of axon หรือ myelin

ในการศึกษานี้ใช้เทคนิค immunohistochemistry (IHC) และ transferase-mediated dUTP-digoxigenin nick end
labeling (TUNEL) ในการตรวจหาปริมาณไวรัสพิษสุนัขบ้าและ cytochrome C (ซึ่งใช้เป็นตัวแทนของการเกิด mitochondrial outer
membrane permeabilization (MOMP)) และ apoptosis ตามลำดับ โดยการวิเคราะห์ส่วนประกอบของ white matter จะใช้วิธีการ
ตรวจหา tubulin และ MBP ซึ่งเป็นส่วนประกอบของ axon และ myelin ตามลำดับ โดยเทคนิค IHC

โดยทำการศึกษาจากชิ้นเนื้อ paraffin embedded จากส่วนต่างๆของสมองและไขสันหลังจากผู้ป่วยโรคพิษสุนัขบ้า 7 คน
(อาการแบบดุร้าย 4 คนและแบบอัมพาต 3 คน) คนละ 15 ส่วน จากการศึกษาพบว่าการหลังของ cytochrome C ในก้านสมองและไข
สันหลังไม่มีความสัมพันธ์กัน แม้ว่าจะพบ apoptosis อย่างหนาแน่น และในความเป็นจริง cytochrome C เป็นตัวหลักที่เหนี่ยวนำให้
เกิด apoptosis, การที่ไม่พบ MOMP อาจเป็นผลมาจากความล่าช้าของการตายของเซลล์ประสาทในสมองแต่ละส่วน การเกิด
apoptosis ในระยะสุดท้ายอาจจะเกิดจากการที่ไม่สามารถหลีกเลี่ยงการตายจากกลไกอื่น เช่น เกิดจากการขาดออกซิเจน (hypoxia)
และการเปลี่ยนแปลงอื่นๆหลังจากที่ผู้ป่วยเสียชีวิตแล้ว

จากการศึกษาพบว่าไม่มีความสัมพันธ์ระหว่างระดับของ apoptosis และ MOMP และ ระยะเวลาที่มีชีวิตอยู่หลังจากได้รับ
เชื้อ (survival period) และอาการทางคลินิกของโรค, tubulin และ MBP ยังคงอยู่แสดงว่าไม่ใช่สาเหตุที่ทำให้เกิดความผิดปกติจาก
การตรวจคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าสมอง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สาขาวิชา..วิทยาศาสตร์การแพทย์.....ลายมือชื่อนิติศ.....ศศิวิมล จันทร์ชากร
ปีการศึกษา...2547.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

###457 52540 30 : MAJOR MEDICAL SCIENCE

KEY WORDS : RABIES VIRUS / APOPTOSIS / SPINAL CORD / BRAINSTEM /
CYTOSKELETON / MYELINSASIWIMON CHUNTRAKUL : RABIES VIRUS INFECTION AND THE CNS : ANALYSIS OF NEURONAL
CYTOSKELETON AND MYELIN IN DIFFERENT CLINICAL FORMS OF HUMAN RABIES. THESIS
ADVISOR : PROF. THIRAVAT HEMACHUDHA, M.D., THESIS CO-ADVISOR : ASST. PROF. POONLARP
CHEEPSUNTHORN, PH.D. 57 pp. ISBN 974-53-1512-5.

Two classical forms of human rabies, furious or encephalitic and dump or paralytic rabies, share a similar pattern of regional virus antigen distribution in the central nervous system (CNS) with a predilection of brainstem and spinal cord during the early clinical phase. Magnetic resonance imaging (MRI) of the brain also appeared similar in both forms. Besides abnormalities in brainstem, spinal cord, thalamus, basal ganglia and hippocampus, subcortical and deep white matter were another areas where hyperintensity T2 signals can be demonstrated. Nevertheless, clinical manifestations are totally different. Paralytic rabies patient exhibited lower motor neuron type of weakness of all limbs. Despite the abundant presence of rabies virus antigen in the spinal cord motoneuron or anterior horn cell, clinical weakness, on the other hand, appears to be the result of peripheral nerve dysfunction. Weakness of the extremities does not appear in furious rabies patient until coma develops. Another intriguing feature in human rabies is the preservation of consciousness until the pre-terminal phase. This is clearly different to other forms of viral encephalitides in which degradation of consciousness is a hall mark of the disease. Since pathology of the CNS in human rabies is unremarkable with scant inflammation and necrosis, this project aimed to determine whether spinal cord and brainstem (major controller of consciousness level) of both forms of human rabies are more resistant to the process of apoptosis of extrinsic and intrinsic pathways. Further, integrity of white matter structures were also sought out to determine whether there were any abnormalities in axon or myelin to explain those abnormal signals in white matter areas.

In order to fulfill objectives, immunohistochemical (IHC) and terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-digoxigenin nick end labeling (TUNEL) techniques were used to demonstrate and quantify rabies virus antigen and evidence of cytochrome C leakage [representing mitochondrial outer membrane permeabilization (MOMP)] and apoptosis respectively. Analysis of white matter components, tubulin and myelin basic protein (MBP), was done by IHC technique.

Of 15 CNS regions from 7 rabies patients (4 furious and 3 paralytic), there was a relative absence of cytochrome C leakage in spinal cord and brainstem despite a massive degree of apoptosis (TUNEL). Owing to the fact that cytochrome C is a major inducer of apoptosis and caspase cascade, absence of MOMP may result to delay in neuronal death in such regions. Apoptosis at later stage may be unavoidable as a consequence of other apoptotic mechanisms, hypoxic insult and postmortem changes. There was no correlation between the degree of apoptosis and MOMP and survival periods and clinical forms of the disease. Tubulin and myelin basic protein (MBP) appeared intact suggesting that such abnormal MRI signals might be explained by other underlying mechanisms.

Field of study Medical Science.....Student's signature.....*Sasiwimon Chuntrakul*
Academic year 2004.....Advisor's signature.....*Thiravat Hemachudha*
Coadvisor's signature.....*Poonlarp Cheepsunthorn*

ACKNOWLEDGEMENTS

For the success of this thesis, I would like to give my sincere thank to many persons involved during my study. First of all, I would like to express my deepest gratitude and appreciation to my advisor, Prof. Thiravat Hemachudha, M.D., Department of Medicine, and my co-advisor, Asst.Prof. Poonlarp Cheepsunthorn Ph.D., Department of Anatomy for considerable guidance of basic research concept which I always remind throughout my thesis work. My cordially thanks to the examination committee, Assoc.Prof.Dr. Vilai Chinthanet, Department of Anatomy, Dr.Vonlar Kulvichit, Department of Medicine.

I would like to sincerely thank Asst.Prof.Dr. Shanop Shuangshote and Mr.Preecha Ruangvetvorachai, Department of Pathology Faculty of Medicine, Chulalongkorn University for their considerate guidance basic of neuropathologist and instructions on laboratory techniques.

I would also thank all the members of Molecular Biology Laboratory for Neurological Diseases especially Miss.Supaporn Wacharaplusadee, chief, for best suggestions and all my friends for their helps, supports and friendship.

Last, but not least I would like to give whole heart to my delicate family; dear father, mother and lovely brother for their understanding and encouragement throughout my life.

This work was supported by National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, National Science and Technology Development Agency, Thailand and Faculty of Medicine, Chulalongkorn University.

TABLE OF CONTENTS

	Page
Abstract (Thai).....	iv
Abstract (English).....	v
Acknowledgements	vi
Table of Contents.....	vii
List of Tables.....	x
List of Figures.....	xi
List of Abbreviations.....	xii
Chapter	
I. Introduction.....	1
- Background and Rationale.....	1
- Research question.....	5
- Objectives.....	6
- Hypothesis.....	6
- Key words.....	6
II. Literature Reviews.....	8
- Molecular composition and morphology of rabies virus particles.....	8
- Genome organization.....	11

	Page
- Transport of rabies virus to the CNS.....	14
- Spread of virus within the CNS.....	15
- Neuronal dysfunction and death.....	16
- Abnormality of neurotransmitter functions.....	17
- Ion channels changed.....	17
- Nitric oxide neurotoxicity.....	18
- Neuronal cell death.....	18
III. Materials and Methods.....	22
- Samples.....	23
- Slides preparation.....	24
- Immunoperoxidase staining.....	24
- Detection of apoptosis.....	25
- Controls.....	26
- Quantitation.....	27
- Data analysis.....	27
IV. Results.....	28
V. Discussion and Conclusion.....	35

	Page
References.....	38
Appendices.....	48
Appendix A.....	49
Appendix B.....	53
Biography.....	57



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF TABLES

Table	Page
1. Characteristics of patients with rabies.....	23
2. Primary antibody.....	24
3. Distribution of rabies virus, cytochrome C and TUNEL assay in CNS of human encephalitic rabies.....	32
4. Distribution of rabies virus, cytochrome C and TUNEL assay in CNS of human paralytic rabies.....	33



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF FIGURES

Figure	Page
1. Structure of rabies virus.....	11
2. Conceptual framework of the experiment designs.....	22
3. Negative control in experiment.....	26
4. Negative control staining in rabies infected tissue 200X.....	28
5. Rabies virus staining 200X.....	29
6. Cytochrome C staining 200X.....	30
7. TUNEL staining 200X (neuronal-negative).....	31
8. TUNEL staining 200X (neuronal-positive).....	31
9. MBP staining 200X (white matter).....	34
10. MBP staining 200X (grey matter).....	34



 ศูนย์วิทยทรัพยากร
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF ABBREVIATIONS

ABLV	Australian Bat Lyssavirus
AHC	Anterior Horn Cell
Bax	Bcl-2 associated X protein
CNS	Central Nervous System
CAT	Computerized Axial Tomography
CTL	Cytotoxic T Lymphocyte
CVS	Challenge Virus Strain
DFA	Direct Fluorescent Assay
DNA	Deoxyribo Nucleic Acid
DUVV	Duvenhage Virus
EBL-1	European Bat Lyssavirus type1
EBL-2	European Bat Lyssavirus type2
EM	Electron Microscopy
ER	Endoplasmic Reticulum
G	Glycoprotein
IHC	Immunohistochemistry
KOTV	Kotonkon Virus
L	Large protein
LBV	Lagos Bat Virus
LC8	Motor Protein Dynein Light Chain
Le	Leader Sequence
M	Matrix protein
MBP	Myelin Basic Protein
mRNA	Massenger Ribonucleic Acid
MRI	Magnetic Resonance Imaging
MOKV	Mokola virus

MOMP	Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization
N	Nucleoprotein
NA	Neuroblastoma cell line
NASBA	Nucleic Acid Sequence Based Amplification
NC	Nucleic Acid
NK	Natural Killer cell
OBOV	Obonhiang Virus
PBS	Phosphate Buffer Saline
PEP	Postexposure Prophylaxis
PV	Pasture Virus
P75NTR	P75 Neurotrophin Receptor
RBUV	Rochambeau Virus
RNA	Ribonucleic Acid
RNP	Riboprotein
RT-PCR	Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction
RV	Rabies Virus
TNF	Tumor Necrosis Factor
Tr	Trailer Sequence
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP nick-end-labeling.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย