เซลล์ที่มีคุณสมบัติเป็น แนชเชอรัล คิลเลอร์ ในผู้ป่วยโรคพิษสุนัขบ้า

นางสาว ทวีพร พันธุ์พาณิชย์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สหสาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ.2535

ISBN 974-579-871-1

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

018213 I15220941

CELLS WITH NATURAL KILLING ACTIVITY IN HUMAN RABIES

Miss TAWEEPORN PHANPANICH

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science

Inter-Department of Medical Microbiology

Graduate School

Chulalongkorn University

1992

ISBN 974-579-871-1

Thesis Title	Cells with Natural Killing Activity in Human Rabies
By	Miss Taweeporn Phanpanich
Inter-Department	Medical Microbiology
Thesis Advisor	Professor Thiravat Hemachudha, M.D.

Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in partial fulfillment of the requirements for the Master's degree.

Thavorn Vajrabhaya
.....Dean of the Graduate School

(Professor Thavorn Vajrabhaya, Ph.D.)

Thesis committee :

Reutai Sakulramrung
.....Chairman

(Associate Professor Reutai Sakulramrung, M.D., Ph.D.)

Thiravat Hemachudha
.....Thesis Advisor

(Professor Thiravat Hemachudha, M.D.)

Molvibha Vongsakul
.....Member

(Assistant Professor Molvibha Vongsakul, Ph.D.)

Copyright of the Graduate School, Chulalongkorn University

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

ทวีพร พันธุ์พาณิชย์ : เซลล์ที่มีคุณสมบัติเป็น แนชเชอรัล คิลเลอร์ ในผู้ป่วยโรคพิษสุนัขบ้า (CELLS WITH NATURAL KILLING ACTIVITY IN HUMAN RABIES) อ.ที่ปรึกษา : ศ. นพ.ธีระวัฒน์ เหมะจุฑา, 101 หน้า. ISBN 974-579-871-1

การวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อตรวจหาความผิดปกติของเซลล์ที่มีคุณสมบัติเป็น แนชเชอรัล คิลเลอร์ (Natural Killer ; NK) ทั้งในด้านปริมาณและการทำงานในเลือดของผู้ป่วยโรคพิษสุนัขบ้า โดยใช้ immunocytochemical technique และ 4-hr microcytotoxicity assay ตามลำดับ

เลือดของผู้ป่วยโรคพิษสุนัขบ้าจำนวน 13 ราย (สมองอักเสบ 10 ราย และอัมพาต 3 ราย) ถูกนำมาหาปริมาณของ NK cells โดยใช้ mouse monoclonal ต่อ human CD 56 และ CD 57 พร้อมกันนี้ ได้ตรวจการทำงานของเซลล์ที่มีคุณสมบัติเป็น แนชเชอรัล คิลเลอร์ โดยอ่านผลการปล่อย ^{51}Chromium จากเซลล์เป้าหมาย K-562 ที่ถูกทำลายภายหลังปฏิกิริยา 4-hr microcytotoxicity โดยมีคนปกติ 31 ราย และผู้ป่วยสมองอักเสบจากเชื้ออื่น ๆ ซึ่งไม่เสียชีวิต 6 รายเป็น control

ปริมาณของ NK cells เมื่อย้อมด้วย Anti CD 56 พบว่าไม่มีความแตกต่างระหว่างผู้ป่วยโรคพิษสุนัขบ้าและคนปกติ ($p > 0.05$) ส่วนในผู้ป่วยสมองอักเสบจากเชื้ออื่นพบว่ามี 2 ใน 6 รายเท่านั้นที่มี CD 56 เซลล์ต่ำ และเมื่อใช้ Anti CD 57 พบว่า ทั้งผู้ป่วยโรคพิษสุนัขบ้าและผู้ป่วยสมองอักเสบจากเชื้ออื่นมีปริมาณ CD 57 เซลล์น้อยกว่าคนปกติ ($p < 0.001$) ในด้านการทำงานของเซลล์ที่มีคุณสมบัติเป็นแนชเชอรัล คิลเลอร์นั้น พบว่าไม่มีความแตกต่างกัน ระหว่างผู้ป่วยโรคพิษสุนัขบ้าและคนปกติ ($p > 0.05$) ส่วนในผู้ป่วยสมองอักเสบจากเชื้ออื่นนั้น ค่ากระจายมากจึงไม่นำมาเปรียบเทียบ และผลจากการกระตุ้นด้วย α-IFN และ IL-2 พบว่า ทั้งในคนปกติและผู้ป่วยโรคพิษสุนัขบ้าสามารถถูกกระตุ้นให้มีการทำงานเพิ่มขึ้นได้ ในขณะที่ผู้ป่วยโรคสมองอักเสบจากเชื้ออื่นกระตุ้นไม่ขึ้น ซึ่งน่าจะแสดงว่า NK cells ในผู้ป่วยเหล่านี้ทำงานเต็มกำลังที่สุดแล้ว

ผลการศึกษานี้ ไม่สามารถแสดงถึงความผิดปกติด้านการทำงานในระดับพื้นฐานของ NK cells ในผู้ป่วยโรคพิษสุนัขบ้า เช่นที่เคยมีรายงานในสัตว์ทดลอง และจำนวนของ CD 56 เซลล์ ก็ไม่ได้มีการเปลี่ยนแปลงแต่อย่างใด แต่การที่ NK cells มีสภาพเหมือนที่พบในคนปกติ กล่าวคือ ยังสามารถถูกกระตุ้นได้อีกจาก α-IFN และ IL-2 ซึ่งแสดงถึงภาวะการทำงานไม่เต็มที่ อาจเป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้ไม่สามารถยับยั้งการขยายตัวลุกลามของไวรัสได้ทันท่วงที ผู้ป่วยทุกรายจึงเสียชีวิต

ภาควิชา จุลชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต ทวีพร พันธุ์พาณิชย์

สาขาวิชา สหสาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา ธีระ เหมะจุฑา

ปีการศึกษา 2534 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม -

ปกรณ์ดีนอกบันทึกแผ่นนี้ ตามประสงค์ของเจ้าของผลงานนี้ ห้ามมิให้ผู้ใดทำซ้ำ

TAWEEPORN PHANPANICH : CELLS WITH NATURAL KILLING ACTIVITY IN HUMAN RABIES. THESIS ADVISOR : PROFESSOR THIRAVAT HEMACHUDHA. 101 PP. ISBN 974-579-871-1.

The objective of this study is to determine whether there are defects in cells with natural killing (NK) activity in human rabies. Number and functions of NK cells were studied by immunocytochemical technique and 4-hr microcytotoxicity assay with K-562 myeloid cell line respectively.

Thirteen rabies patients (10 encephalitis and 3 paralysis) were included in this study. Determination of numbers of cells in peripheral blood with CD 56 and CD 57 phenotype was performed by using mouse monoclonal antibodies. A standard ^{51}Cr release assay in a 4-hr microcytotoxicity system using K-562 as targets was used to determine NK function. Thirty-one healthy volunteers (blood donors) and six non-fatal patients with non-rabies encephalitis served as controls.

Results showed that numbers of cells with CD 56 phenotype in the peripheral blood were comparable among rabies and control groups ($p>0.05$). Two of 6 non-rabies encephalitic patients had significant reduction of cells with this phenotype. All rabies and non-rabies encephalitic patients had a significant reduction of cells with CD 57 phenotype ($p<0.001$) as compared to healthy controls. NK functions in rabies patients and controls were comparable ($p>0.05$) whereas those in non-rabies encephalitis group were heterogeneous with wide variation. In vitro stimulation with α-IFN and IL-2 showed that only cells from control and rabies groups, but not those from non-rabies patients, could be further inducible. These indicated that natural killing function of non-rabies encephalitic patients were already maximally stimulated.

Our study could not demonstrate base-line functional defects of NK cells in human rabies patients as previously suggested in experimental animals and number of cells with CD 56 phenotype were unchanged. It still could not be explained why cells with CD 57 phenotype in patients with CNS infections were significantly reduced. However, a suboptimal NK cell function in rabies patients, as demonstrated by an in vitro stimulation with α-IFN and IL-2, may contribute to the rapid spread of rabies throughout the nervous system.

ภาควิชา จุลชีววิทยา ..... ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา สหสาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์ .....

ปีการศึกษา ๒๕๓๔ ..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

ACKNOWLEDGEMENT

I wish to express my profound gratitude to the following person who have helped, supported and advised me in this work.

My deepest appreciation to

Dr. Thiravat Hemachudha, M.D., Professor of Neurology Division, Department of Medicine, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, for his continual interest, devotion, suggestion, attention, encouragement, and kindness throughout my study. I thank him and am most grateful.

Dr. Molvibha Vongsakul, Ph.D., Assistant Professor of Department of Microbiology, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok, for her kindness, valuable advice and helpful suggestions.

Dr. Reutai Sakulramrung, M.D., Ph.D.,Associate Professor of Immunology Division, Department of Medicine, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, for her kindness and helpful suggestions.

Dr. Praphan Phanuphak , M.D., Ph.D., Professor of Immunology Division, Department of Medicine, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, for his helpful suggestions.

Dr. Sathaporn Manutsathit, M.D., Bumrasanaradura Communicable Disease Control Hospital, Bangkok, for his excellent cooperation in the study of human rabies.

I am pleased to acknowledge all subjects who donated blood for my studies.

This work was supported by grants from Queen Saovabha Memorial Institute, Thai Red Cross Society.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CONTENT

Page

THAI ABSTRACT..... iv

ENGLISH ABSTRACT..... v

ACKNOWLEDGEMENT..... vi

LIST OF TABLES..... xi

LIST OF FIGURES..... xii

ABBREVIATIONS..... xiv

OBJECTIVES..... xvi

CHAPTER

I. INTRODUCTION..... 1

II. LITERATURE REVIEW

CLINICAL FEATURES OF RABIES..... 7

1. Incubation Period..... 8

2. Prodrome..... 8

3. Acute Neurological Phase..... 9

4. Coma..... 10

5. Recovery..... 10

PATHOGENESIS..... 11

IMMUNE RESPONSE TO RABIES INFECTION..... 15

NATURAL KILLER (NK) CELLS..... 19

1. Characteristics and Distribution..... 19

2. Mechanism of NK cell mediated cytotoxicity... 21

Page

3. Regulation of NK cell function..... 24

4. Role of NK cells in vivo..... 26

III. MATERIALS AND METHODS

1. Sites of study..... 29

2. Materials..... 29

2.1 Rabies Patients..... 29

2.2 Patients with Non-Rabies Encephalitis..... 30

2.3 Normal Healthy Control..... 30

3. Preparation of Peripheral Blood Mononuclear Cells..... 31

3.1 Collection of Blood Specimen..... 31

3.2 Mononuclear Cells Separation..... 31

4. Immunoperoxidase Staining..... 31

4.1 Cytocentifugation Step..... 31

4.2 Staining..... 32

4.3 Method of Quantitation..... 34

5. Determination of Factor Affecting the Immunoperoxidase Staining, ABC Technique..... 35

Affecting on Antibodies..... 35

6. Specificity of Reaction in Immunoperoxidase Staining, ABC Technique..... 36

7. 4-hr Microcytotoxicity Assay..... 36

7.1 Preparation of Effector Cells..... 36

7.2 Preparation of Target Cells..... 36

Page

7.2.1 Target Cell Cultures..... 36

7.2.2 Target Cell Labelling..... 37

7.3 Assay..... 37

8. In Vitro Activation of Cytotoxic Cells..... 39

9. Statistical Analysis..... 39

IV. RESULTS

1. Immunoperoxidase Staining for Detection of NK Cells in Peripheral Blood..... 40

2. Specificity of Reaction in Immunoperoxidase Staining, ABC Technique..... 41

3. Quantitation of Natural Killer (NK) Cells in Peripheral Blood of Rabies Patients and Normal Healthy Controls..... 41

4. The Natural Killing Activities of Peripheral Blood Mononuclear Cells in Rabies Patients and Normal Healthy Controls..... 41

5. NK cells Function and Number in Non-Rabies Encephalitic Patients..... 42

6. In Vitro Activation..... 42

V. DISCUSSION..... 44

Conclusions..... 48

REFERENCES..... 64

APPENDIX I..... 95

APPENDIX II..... 98

CURRICULUM VITAE..... 101

LIST OF TABLES

Table page

1. Characteristics of patients with rabies..... 50
2. Checkerboard titration for the determination of optimal dilution of anti CD 56 (1° Ab) and 2° Ab..... 51
3. Checkerboard titration for the determination of optimal dilution of anti CD 57 (1° Ab) and 2° Ab..... 52
4. Numbers of cells with CD 56 and CD 57 phenotype in PBMC of controls and rabies 53
5. Activity of cells with natural killing function in lytic unit (LU)/10^7 cells of PBMC of controls and rabies..... 54

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF FIGURES

Figure page

1. Clinical pattern of human encephalitic rabies..... 55
2. Clinical pattern of human paralytic rabies..... 56
3. Immunoperoxidase staining of cells with CD 56 or CD 57 phenotype in PBMC..... 57
4. Least squares analysis for the determination of lytic unit (LU)..... 58
5. Percentage of CD 56 positive cells in PBMC from individuals with rabies and controls..... 59
6. Percentage of CD 57 positive cells in PBMC from individuals with rabies, non-rabies encephalitis and controls..... 60
7. Activity of cells with natural killing function in lytic units/10^7 cells of PBMC from individuals with rabies and controls..... 61
8. Percentage of CD 56 positive cells and NK activity in non-rabies encephalitic patients..... 62

Page

9. Activity of cells with natural killing function in lytic unit/10^7 cells of PBMC from individuals with rabies, non-rabies encephalitis and controls cultured overnight without additive (C), with 100 units recombinant alpha-interferon (IFN) or 100 units recombinant interleukin-2 (IL-2)..... 63

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ABBREVIATIONS

$1^{\cdot}$	=	Primary
$2^{\cdot}$	=	Secondary
$^{\cdot}C$	=	Celcius (Centrigrade)
Ab	=	Antibody
Ag	=	Antigen
CD	=	Cluster of Differentiation
CNS	=	Central Nervous System
CVS	=	Challenge Virus Standard strain
DDDW	=	Double Distilled Deionized Water
ed.	=	editor
ERA	=	Evelyn-Rokitnicki-Abelseth strain
et al	=	et alii
FCS	=	Fetal Calf Serum
G protein	=	Glycoprotein
g	=	gramme
HEP	=	High Egg Passage strain
HR	=	Heart Rate
hr	=	hour
IgG	=	Immunoglobulin G
IP	=	Immunoperoxidase
l	=	litre

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

min.	=	minute
mg	=	milligramme
ml	=	millilitre
ul	=	microlitre
M	=	molar
MW	=	Molecular Weight
N	=	Normal
N protein	=	Nucleocapsid protein
PBMC	=	peripheral blood mononuclear cell
PBS	=	Phosphate Buffered Saline
PVC	=	Premature Ventricular Contraction
rpm	=	round per minute

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

OBJECTIVE

To determine whether there is defect in natural killing mechanism in human rabies patients (in term of number and function)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย