

APOPTOSIS OF NEURONS AND INFLAMMATORY CELLS IN THE CENTRAL NERVOUS
SYSTEM OF CANINE RABIES.



Miss Sirinapa Srikam

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHULALONGKORN UNIVERSITY

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

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic Year 2013

Copyright of Chulalongkorn University

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

การตายของเซลล์ประสาทและเซลล์อักเสบในระบบประสาทส่วนกลางในสุนัขที่เป็นโรคพิษสุนัขบ้า



นางสาวศิริินภา ศรีคำ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHULALONGKORN UNIVERSITY

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2556

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การตายของเซลล์ประสาทและเซลล์อักเสบในระบบ
ประสาทส่วนกลางในสุนัขที่เป็นโรคพิษสุนัขบ้า

โดย

นางสาวศิริินภา ศรีคำ

สาขาวิชา

วิทยาศาสตร์การแพทย์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ชนพ ช่างโซติ

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะแพทยศาสตร์

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ ไชยณ นภารัตน์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(ศาสตราจารย์ ดร. แพทย์หญิง วิไล ชินธเนศ)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ชนพ ช่างโซติ)

.....กรรมการ

(ดร. สุภาภรณ์ วัชรพฤษชาติ)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(นายสัตวแพทย์ วีระ เทพสุเมธานนท์)

ศิริินภา ศรีคำ : การตายของเซลล์ประสาทและเซลล์อักเสบในระบบประสาทส่วนกลาง ในสุนัขที่เป็นโรคพิษสุนัขบ้า. (APOPTOSIS OF NEURONS AND INFLAMMATORY CELLS IN THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM OF CANINE RABIES.) อ.ที่ปรึกษา วิทยานิพนธ์หลัก: ศ. นพ. ชนพ ช่วงโชติ, 65 หน้า.

โรคพิษสุนัขบ้าเป็นโรคติดเชื้อร้ายแรงทางระบบประสาท มีสองกลุ่มอาการคือแบบคลุ้มคลั่งและแบบอ่อนแรง (เซื่องซึมในสุนัข) ซึ่งกลไกการเกิดโรคของสองกลุ่มอาการยังไม่แน่ชัด การศึกษาก่อนหน้านี้ในผู้ป่วยและสุนัขที่เป็นโรคพิษสุนัขบ้าที่ระยะท้ายของโรคไม่พบความแตกต่างของทั้งสองกลุ่มอาการ ต่อมาเมื่อมีการศึกษาในสุนัขบ้าที่ระยะแรกของโรค พบความแตกต่างกันในสองกลุ่มอาการ โดยการศึกษาภาพสมองและไขสันหลังด้วยเครื่องสแกนแม่เหล็กไฟฟ้าพบความผิดปกติในกลุ่มอาการเซื่องซึมมากกว่ากลุ่มอาการคลุ้มคลั่ง การศึกษาการอักเสบพบการอักเสบเด่นชัดในกลุ่มอาการเซื่องซึม ในขณะที่การศึกษาปริมาณเชื้อพิษสุนัขบ้าพบว่าในกลุ่มอาการคลุ้มคลั่งมีปริมาณไวรัสมากกว่า การค้นพบนี้บ่งบอกว่า ความแตกต่างระหว่างโรคพิษสุนัขบ้าแบบคลุ้มคลั่งและแบบอ่อนแรงพบเฉพาะในระยะแรกของโรค

การตายของเซลล์มีบทบาทสำคัญในการป้องกันการติดเชื้อโดยการกำจัดเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัส เชื้อไวรัสโรคพิษสุนัขบ้าสายพันธุ์ไม่รุนแรง (attenuated strains) มีความสามารถในการเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์ประสาท ในขณะที่เชื้อไวรัสโรคพิษสุนัขบ้าสายพันธุ์รุนแรง (wild-type) เหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์อักเสบ อย่างไรก็ตามการศึกษาส่วนใหญ่ทำการศึกษาในระยะท้ายของโรค การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษารูปแบบการตายของเซลล์ระหว่างกลุ่มอาการคลุ้มคลั่งและกลุ่มอาการอ่อนแรงของโรคพิษสุนัขบ้าในระยะแรกของโรค ว่ามีความแตกต่างกันหรือไม่

โดยทำการศึกษาในตัวอย่างสุนัขที่ติดเชื้อพิษสุนัขบ้าตามธรรมชาติชนิดคลุ้มคลั่งและชนิดเซื่องซึม 17 ตัวอย่าง ประกอบด้วย ตัวอย่างในระยะแรกของโรค แบ่งเป็นกลุ่มอาการคลุ้มคลั่ง 5 ตัวอย่าง กลุ่มเซื่องซึม 6 ตัวอย่าง และตัวอย่างในระยะท้ายของโรค กลุ่มละ 3 ตัวอย่าง ที่บริเวณ สมอง ก้านสมอง และไขสันหลัง โดยใช้เทคนิค Tunel ในการตรวจสอบ

ผลการศึกษาพบการตายของเซลล์ประสาทและเซลล์อักเสบที่บริเวณก้านสมองและไขสันหลัง ซึ่งพบบริเวณก้านสมองมากที่สุด โดยที่พบในกลุ่มเซื่องซึมมากกว่ากลุ่มคลุ้มคลั่ง และพบแค่ในระยะแรกของโรค การตายของเซลล์ประสาทจะเกิดขึ้นในการติดเชื้อพิษสุนัขบ้าตามธรรมชาติซึ่งพบเฉพาะในระยะแรกของโรค ซึ่งการตายของเซลล์ประสาทที่พบมากบริเวณก้านสมองในระยะแรกของโรคนั้นอาจจะช่วยในการป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อพิษสุนัขบ้าไปยังสมองในกลุ่มอ่อนแรง และอธิบายถึงระยะเวลาการมีชีวิตของกลุ่มอาการอ่อนแรงที่มากกว่าในกลุ่มอาการคลุ้มคลั่งอีกด้วย

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์

ลายมือชื่อนิสิต

ปีการศึกษา 2556

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

5374689330 : MAJOR MEDICAL SCIENCE

KEYWORDS: RABIES CANINE RABIES FURIOUS PARALYTIC APOPTOSIS

SIRINAPA SRIKAM: APOPTOSIS OF NEURONS AND INFLAMMATORY CELLS IN THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM OF CANINE RABIES.. ADVISOR: PROF. SHANOP SHUANGSHOTI, M.D., 65 pp.

Rabies encephalitis is a fatal infectious disease that is often neglected. The pathogenesis of encephalitic (furious) and paralytic (dumb) rabies, the two distinct clinical subtypes of rabies in dogs and humans, is not fully understood. Earlier studies in human at the late stage of disease or at postmortem did not show differences between the two forms. In contrast, recent studies at the early stage of rabies infection in dogs have demonstrated differences in terms of neuroimaging (more disturbance in dumb rabies), inflammatory response (more pronounced in dumb rabies), and viral burden (more virus in furious dogs). These findings imply that differences between the furious and paralytic rabies are present only at the early stage of infection. Apoptosis plays an important role as a defensive mechanism in eliminating virus-infected cells. While attenuated strains of rabies virus induce apoptosis of neurons, the wild-type (virulent) virus produces apoptosis of inflammatory cells. Most of the studies were, however, performed at the terminal stage of infection. The current study was aimed to determine whether there are differences in the pattern of apoptosis between furious and dumb rabies at the early stage of disease. 17 rabid dogs were studied, including the early stage of furious (N=5) and dumb (N=6) rabies, and the terminal stage of rabies (3 of each clinical forms). For all cases, apoptosis was evaluated by TUNEL technique on the frontal lobe, hippocampus, brainstem, and spinal cord. TUNEL-positive neurons and inflammatory cells were detected at the brainstem (most prominent) and spinal cord, and they were found exclusively at the early stage of infection. These TUNEL-positive cells were more abundant in the dumb as compared to furious rabies. Neuronal apoptosis does occur in natural rabies infection but it is observed only at the early stage of disease. Prominent apoptosis of neurons in the brainstem level at the early stage of paralytic rabies might impede viral propagation into the brain and explains the longer survival time in paralytic as compared to furious rabies.

Field of Study: Medical Science

Student's Signature

Academic Year: 2013

Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดีเนื่องจากได้รับความอนุเคราะห์ของท่านอาจารย์ที่ปรึกษา ศาสตราจารย์ นพ.ชนพ ช่างโชติ ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ให้คำปรึกษา ข้อชี้แนะ ในงานวิจัยนี้ และการดูแลอย่างใส่ใจตลอดหลักสูตรที่ผู้วิจัยศึกษาอยู่ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณต่อความกรุณาเป็นอย่างสูง

ขอกราบขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร. แพทย์หญิง วิไล ชินธเนศ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ดร. สุภาภรณ์ วชรพฤษชาติ และนายสัตวแพทย์ วีระ เทพสุเมธานนท์ คณะกรรมการวิทยานิพนธ์ที่กรุณาให้คำแนะนำ และช่วยตรวจสอบปรับปรุงแก้ไขข้อบกพร่องของวิทยานิพนธ์ในการศึกษาครั้งนี้

ขอขอบพระคุณนายปรีชา เรืองเวชรชัย หัวหน้าห้องปฏิบัติการพยาธิวิทยา ที่ให้ความรู้และคำแนะนำทางด้านเทคนิคทางอนุชีววิทยา คุณจุฑามาศ วงศ์ภูมิ นายวัลลภ ลิขิตสุนทรวงศ์ และสมาชิกห้องปฏิบัติการทุกคน ในด้านความช่วยเหลือ คำแนะนำและกำลังใจจนกระทั่งงานสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี และขอขอบคุณสถานเสาวภา สภากาชาดไทย ที่อนุเคราะห์ตัวอย่างสุนัขบ้าที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณคุณแม่ พ่อ คุณแม่ พี่ชาย และเพื่อนๆ พี่ๆ ทุกคนที่ให้ความช่วยเหลือ และให้กำลังใจที่ต็มใจจนสำเร็จการศึกษาในครั้งนี้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฌ
สารบัญภาพ.....	ญ
สารบัญแผนภูมิ.....	ฎ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ.....	ฏ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา (background and rational).....	1
1.2 คำถามงานวิจัย (research questions).....	2
1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย (research objectives).....	2
1.4 สมมติฐานการวิจัย (research hypothesis).....	2
1.5 รูปแบบการวิจัย (research design).....	2
1.6 กรอบความคิดงานวิจัย (conceptual framework).....	3
1.7 ข้อตกลงเบื้องต้น (assumption).....	4
1.8 คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย (operation definitions).....	4
1.9 คำสำคัญ (keywords).....	4
1.10 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย (expected benefit and application).....	4
1.11 ลำดับขั้นตอนในการเสนอผลการวิจัย.....	5
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	6
2.1 โรคพิษสุนัขบ้า.....	6
2.2 ไวรัสพิษสุนัขบ้า.....	6
2.3 โครงสร้างของไวรัสพิษสุนัขบ้า.....	6
2.3 การติดเชื้อและวงจรชีวิตของไวรัสพิษสุนัขบ้า.....	7
2.4 ระยะของโรคพิษสุนัขบ้า.....	8
2.5 อาการในคนที่เป็นโรคพิษสุนัขบ้า.....	9

2.6 กระบวนการตายของเซลล์ (apoptosis).....	10
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทำวิจัย	13
3.1 ระเบียบวิธีวิจัย (research methodology).....	13
3.2 การเก็บตัวอย่าง (sample collection).....	14
3.3 เครื่องมือ วัสดุอุปกรณ์และสารเคมีในการทำวิจัย.....	17
3.4 วิธีการทดลอง (method).....	19
3.5 การรวบรวมข้อมูล (data collection).....	22
3.6 การวิเคราะห์ข้อมูล (data analysis).....	22
บทที่ 4 ผลการวิจัย	24
4.1 ผลการเปรียบเทียบการตายของเซลล์ประสาทในสุนัขบ้าชนิดกลุ่มคลั่งและเซื่องซึม	24
4.2 ผลการเปรียบเทียบการตายของเซลล์อักเสบในสุนัขบ้าชนิดกลุ่มคลั่งและเซื่องซึม.....	27
บทที่ 5 อภิปรายผลการวิจัย.....	33
รายการอ้างอิง	36
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	65

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 แสดงส่วนต่างๆของสมองและไขสันหลังของตัวอย่าง FFPE block ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้	15
ตารางที่ 2 แสดงผลการวิเคราะห์หาการตายของเซลล์ประสาทเชิงปริมาณของระบบประสาทในสุนัข บ้าชนิดคลุ้มคลั่งและชนิดเชื่องซึม	24
ตารางที่ 3 แสดงผลการวิเคราะห์หาการตายของเซลล์อักเสบเชิงปริมาณของระบบประสาทในสุนัขบ้า ชนิดคลุ้มคลั่งและชนิดเชื่องซึม	28



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1 เชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า (Matthias J. Schnell <i>et al.</i> 2010).....	7
ภาพที่ 2 Formalin-fixed paraffin embedded block (FFPE block).....	13
ภาพที่ 3 แสดงการย้อม TUNEL สไลด์ tonsil ซึ่งใช้เป็น control.....	17
ภาพที่ 4 แสดงผลการย้อม TUNEL : แสดงการตายของเซลล์ประสาท และเซลล์อักเสบ ที่ก้านสมอง ใน early stage.....	31
ภาพที่ 5 แสดงผลการย้อม TUNEL : ไม่พบการตายของเซลล์ประสาทและเซลล์อักเสบใน late stage ทั้งในกลุ่มเชิงซึม (A, C, E) และกลุ่มคลุ้มคลั่ง (B, D, F).....	32

สารบัญแผนภูมิ

หน้า

แผนภูมิที่ 1 แสดงผลการตายของเซลล์ประสาทที่ก้านสมองใน early stage (% TUNEL positive neuron)	26
แผนภูมิที่ 2 แสดงค่าเฉลี่ยการตายของเซลล์ประสาทที่ก้านสมองใน early stage.....	27
แผนภูมิที่ 3 แสดงการตายของเซลล์อักเสบที่ก้านสมองใน early stage (TUNEL positive inflammatory cell / 0.0705 mm ²).....	30
แผนภูมิที่ 4 แสดงค่าเฉลี่ยการตายของเซลล์อักเสบที่ก้านสมองใน early stage.....	30



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

คำย่อ	ความหมาย
AchR	Nicotinic Aetylcholine Rceptor
RNA	Ribonucleic acid
MRI	Magnetic Resonance Imaging
DAB	3,3 Diaminobenzidine Tetrahydrochloride
ml	Mililiter
μ l	Microliter
μ g	Microgram
PBS	Phosphate Buffer Saline
<i>et al.</i>	Et. Alii(Latin), and other.

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา (background and rational)

โรคพิษสุนัขบ้า เป็นโรคติดต่ออันตรายจากสัตว์สู่คนที่รู้จักกันมาช้านานกว่า 5000 ปี องค์การอนามัยโลก (WHO) ได้ให้ความสำคัญ เนื่องจากผู้ติดเชื้อมักจะเสียชีวิตทุกราย ในแต่ละปีพบผู้เสียชีวิตของผู้ป่วยจากโรคพิษสุนัขบ้าทั่วโลกระหว่าง 35,000 ถึง 55,000 ราย [1-3] และในปี 2011 พบจำนวนผู้เสียชีวิตเพิ่มขึ้น ถึง 70,000 ราย [4] ซึ่งมีอุบัติการณ์สูงสุดในแถบทวีปเอเชียและแอฟริกา เช่น ประเทศอินเดีย ปากีสถาน บังคลาเทศ และจีน มีการรายงานการเสียชีวิตหลายพันคนต่อปี โดยพบว่าสุนัขบ้าเป็นสาเหตุหลักของการเสียชีวิตในคน ประเทศไทยเป็นอีกประเทศหนึ่งที่พบโรคพิษสุนัขบ้าทั้งในคนและในสัตว์ ซึ่งมีการรายงานผู้เสียชีวิตจากโรคพิษสุนัขบ้าเฉลี่ย 21 รายต่อปี [2, 3] ซึ่งพบว่าสุนัขเป็นสาเหตุหลักในการเกิดโรคพิษสุนัขบ้าในคนถึงร้อยละ 82

โรคพิษสุนัขบ้า เป็นโรคติดเชื้อทางระบบประสาทที่มีสาเหตุมาจากเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า (Rabies virus) ที่อยู่ใน Family Rhabdoviridae, Genus Lyssavirus [3, 5, 6, 7] ซึ่งการสัมผัส น้ำลายของสัตว์ที่ติดเชื้อ เป็นเส้นทางหลักในการส่งต่อเชื้อไวรัส [8, 9] หลังจากได้รับเชื้อพิษสุนัขบ้า ไวรัสจะมีการแบ่งตัวและเพิ่มปริมาณอย่างรวดเร็ว แล้วแพร่กระจายไปในสมอง [5, 6]

สามารถจำแนกอาการได้เป็น 2 แบบคือ อาการแบบคลุ้มคลั่ง (furious หรือ encephalitis rabies) โดยจะมีอาการทางสมอง กลัวน้ำ กลัวลม และอาการแบบอ่อนแรง (เซื่องซึมในสุนัข) (dumb หรือ paralytic rabies) [10, 11] ซึ่งจะมีอาการแขนขาอ่อนแรง เซื่องซึม โดยอัตราส่วนของผู้ป่วยแบบคลุ้มคลั่งพบมากกว่าแบบอ่อนแรงคือ 3:1 เท่า [6] โดยที่แบบอ่อนแรงจะเสียชีวิตในเวลา 11 วัน ซึ่งช้ากว่าแบบคลุ้มคลั่งคือ 5.7 วัน [10, 12]

ที่ผ่านมาได้มีการศึกษาเกี่ยวกับพยาธิกำเนิดของอาการคลุ้มคลั่งและอ่อนแรง เพื่อค้นหาสาเหตุที่ทำให้เกิดความแตกต่างของอาการในโรคพิษสุนัขบ้า ซึ่งไม่พบความแตกต่างจากการศึกษาในคนที่เป็โรคพิษสุนัขบ้า เกี่ยวกับการกระจายตัวของแอนติเจนเชื้อพิษสุนัขบ้าและการอักเสบ [13] ลำดับสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสจากสมองในคนและสุนัขที่เป็นโรคพิษสุนัขบ้า [14] การศึกษาภาพสมองและไขสันหลังในผู้ป่วยด้วยเครื่องสแกนแม่เหล็กไฟฟ้า (MRI) [5] แต่พบความแตกต่างกันของรูปแบบการกระจายตัวของเชื้อพิษสุนัขบ้า การอักเสบและการศึกษาภาพสมองและไขสันหลังด้วยเครื่องสแกนแม่เหล็กไฟฟ้า (MRI) ในสุนัขบ้าที่แสดงอาการในระยะแรกของโรค โดยที่ในสุนัขบ้าที่แสดงอาการในระยะท้ายไม่พบความแตกต่าง [15, 16] แสดงให้เห็นว่าในระยะแรกของโรคพิษสุนัขบ้า จะความพบแตกต่างกันในหลายๆด้านในทั้งสองกลุ่มอาการ

โดยทั่วไปพบว่าการตายของเซลล์เกี่ยวข้องกับการป้องกันการแพร่กระจายของไวรัสภายในร่างกาย [17, 18] โดยทำให้เกิดการตายของเซลล์ที่ติดเชื้อ [19] ในขณะที่ไวรัสพิษสุนัขบ้าได้พัฒนากลไกในการหลีกเลี่ยงในการป้องกันของร่างกาย [20] มีการศึกษาพบการตายของเซลล์อักเสบ แต่ไม่พบการตายของเซลล์ประสาท ในการติดเชื้อพิษสุนัขบ้าตามธรรมชาติ [21, 22, 23] แต่อย่างไรก็ตาม การศึกษาเหล่านั้นได้ทำการศึกษาในระยะท้ายของโรค ในขณะที่การศึกษาส่วนใหญ่ที่พบความแตกต่างในหลายๆด้านของทั้งสองกลุ่มอาการจะพบในระยะแรกของโรค ดังนั้นรูปแบบการตายของเซลล์ก็น่าจะมีความแตกต่างกัน

ผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะศึกษารูปแบบการตายของเซลล์ประสาทและเซลล์อักเสบในระบบประสาทส่วนกลางในสุนัขที่เป็นโรคพิษสุนัขบ้าทั้งแบบกลุ่มอาการคลุ้มคลั่งและในกลุ่มเชื่องซึมว่ามีความแตกต่างกันหรือไม่

1.2 คำถามงานวิจัย (research questions)

รูปแบบการตายของเซลล์ประสาทและเซลล์อักเสบในโรคพิษสุนัขบ้าชนิดคลุ้มคลั่งและเชื่องซึมมีความแตกต่างกันหรือไม่

1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย (research objectives)

เพื่อศึกษาการตายของเซลล์ประสาทและเซลล์อักเสบในระบบประสาทส่วนกลางในสุนัขที่เป็นโรคพิษสุนัขบ้าทั้ง 2 แบบอาการ

1.4 สมมติฐานการวิจัย (research hypothesis)

สุนัขบ้าชนิดเชื่องซึมอาจมีการตายของเซลล์ประสาทที่อาจจะเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ช่วยชะลอเชื้อไวรัสไม่ให้แพร่กระจายเข้าสู่สมองโดยเร็ว

1.5 รูปแบบการวิจัย (research design)

เป็นงานวิจัยเชิงพรรณนา (descriptive study)

1.6 กรอบความคิดงานวิจัย (conceptual framework)



1.7 ข้อตกลงเบื้องต้น (assumption)

1. ตัวอย่างชิ้นเนื้อสมองและไขสันหลัง ได้จากสุนัขที่ติดเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าตามธรรมชาติ (street virus)
2. สุนัขทุกตัวผ่านการตรวจวินิจฉัยยืนยันว่าเป็นโรคพิษสุนัขบ้าชนิดอาการคลุ้มคลั่ง (furious) และ อาการเซื่องซึม (dumb) โดยสัตวแพทย์ผู้เชี่ยวชาญจากหน่วยชันสูตรโรค พิษสุนัขบ้า สถานเสาวภา สภากาชาดไทย

1.8 คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย (operation definitions)

1. ระยะ early stage คือกลุ่มที่แสดงอาการในระยะแรกของโรค โดยสุนัขจะถูกทำให้เสียชีวิตอย่างสงบใน 24 ชั่วโมงหลังจากแสดงอาการ (คลุ้มคลั่ง กัด มีนิสัยเปลี่ยนไปจากเดิม ซึม) โดยการควบคุมดูแลจากสัตวแพทย์
2. ระยะ late stage คือกลุ่มที่แสดงอาการในระยะท้ายของโรค (ขาอ่อนแรงจนเป็นอัมพาต ระบบหายใจขัดข้อง) โดยจะเป็นสุนัขที่ไม่ได้ถูกสังเกตอาการตั้งแต่แรก ซึ่งจะถูกกักไว้จนเสียชีวิตเอง

1.9 คำสำคัญ (keywords)

Rabies

Canine rabies

Furious rabies

Paralytic rabies

Apoptosis

1.10 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับการวิจัย (expected benefit and application)

ทราบถึงการตายของเซลล์ประสาทและเซลล์อักเสบในระบบประสาทส่วนกลางในสุนัขที่โรคพิษสุนัขบ้า ซึ่งอาจช่วยส่งเสริมความเข้าใจของกลไกการเกิดอาการที่ต่างกันทั้งสองกลุ่มอาการมากยิ่งขึ้น

1.11 ลำดับขั้นตอนในการเสนอผลการวิจัย



บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 โรคพิษสุนัขบ้า

โรคพิษสุนัขบ้ามีการติดเชื้อผ่านทางสารคัดหลั่งของสัตว์ที่ติดเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า (Rabies virus) เป็นหลัก [8] ซึ่งในคนมักได้รับเชื้อจากการถูกสุนัขบ้ากัด โดยที่ระดับความรุนแรงนั้นจะขึ้นอยู่กับตำแหน่งที่ถูกกัด คุณภาพและปริมาณของเชื้อพิษสุนัขบ้าในน้ำลาย [6] ซึ่งถ้าตำแหน่งที่ถูกกัดนั้นมี nicotinic acetylcholine receptor (AChR) ในระดับสูง ก็จะมีความเสี่ยงในการเสียชีวิตสูง และหากอยู่ใกล้กับระบบประสาทส่วนกลาง (CNS) เช่น ที่ใบหน้า, ศีรษะ ก็จะทำให้มีระยะฟักตัวของโรคสั้นกว่า ส่งผลให้มีความเสี่ยงในการเสียชีวิตมากกว่าร้อยละ 80 เมื่อเทียบกับตำแหน่งอื่นๆ เช่นที่ ขา แขน ลำตัว

2.2 ไวรัสพิษสุนัขบ้า

เชื้อไวรัสอันเป็นสาเหตุของโรคพิษสุนัขบ้าคือ *Rabies virus* ซึ่งเป็น non segmented single-stranded negative-sense RNA virus ใน family rhabdoviridae (genus Lyssavirus) มี 11 genotypes ได้แก่ rabies virus ซึ่งทำให้เกิดพิษสุนัขบ้า, Lagos bat virus, Mokola virus, Duvenhage virus, European bat Lyssavirus biotype 1, European bat lyssavirus biotype 2 และ Australian bat Lyssavirus [9, 24] Aravan virus, Khujand virus, Irkut virus และ West Caucasian Bat virus [25, 26] Rabies virus นี้มีรูปร่างคล้ายกระสุนปืน (bullet shape) ด้านหนึ่งมีปลายโค้งมน อีกด้านตัดตรง ด้านเป็นช่องขนาด 180x75 นาโนเมตร

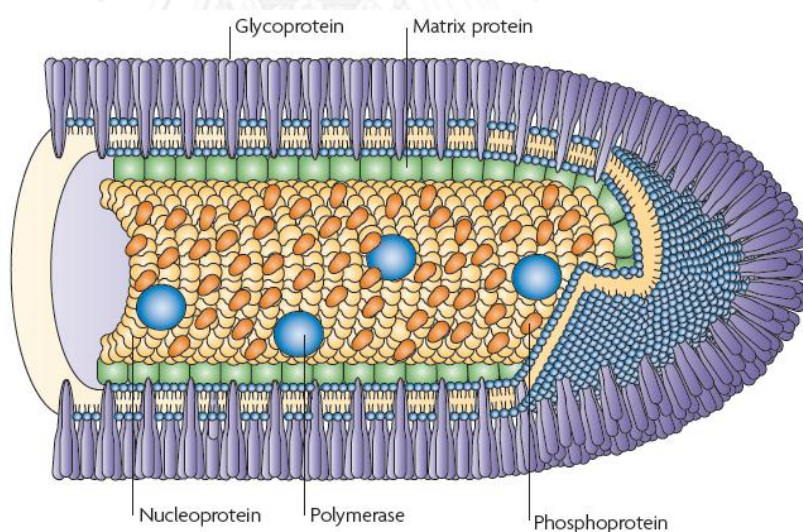
2.3 โครงสร้างของไวรัสพิษสุนัขบ้า

โครงสร้างไวรัสประกอบด้วยโปรตีนทั้งหมด 5 ชนิด ได้แก่ glycoprotein (G), matrix protein (M), phosphoprotein (P), nucleocapsid protein (N), และ RNA-dependent RNA polymerase (L) [1] ซึ่งแบ่งออกได้เป็น 2 ส่วน คือ envelope และ nucleocapsid (รูปที่ 1)

ส่วน envelope ประกอบด้วย lipid bilayer ที่มี glycoprotein (G) อยู่ชั้นนอกสุด ทำหน้าที่จับกับ receptor ของเซลล์ที่ติดเชื้อเพื่อในการเข้าเซลล์ของไวรัส และเคลื่อนย้ายภายในเซลล์ด้วย axonal transport [4,5] ต่อมาเป็นชั้นของเรียกว่า matrix protein (M) ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวเชื่อมของส่วน envelope กับ ส่วน nucleocapsid และบีบในส่วนของ ribonucleoprotein

(RNP) ที่อยู่ในส่วนของ nucleocapsid ให้เป็นรูปคล้ายหัวกระสุนปืน และช่วยไวรัสในการ budding ร่วมกับ glycoprotein (G) [24]

ส่วน nucleocapsid เป็นส่วนของ ribonucleoprotein (RNP) ที่ประกอบด้วย phosphoprotein (P), nucleoprotein (N), และ RNA transcriptase (L) เรียงตัวเป็นรูปบันไดวน โดย Rabies virus มีจีโนมที่ประกอบด้วย 11,932 nucleotide โดยที่ nucleoprotein (N) ทำหน้าที่ควบคุมการกระบวน transcription และกระบวนการ replication [27] phosphoprotein (P) เป็นส่วนประกอบของ viral RNA polymerase ส่วน RNA transcriptase (L) เป็น polymerase complex ในกระบวนการ transcription และ replication [4] ซึ่งลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของ leader และ trailer ของปลายทั้งสองของ RNA จะไม่มีการสังเคราะห์เป็นโปรตีน โดยมีตำแหน่ง leader sequence ที่ 3' end ซึ่งจะมีการเรียงลำดับพันธุกรรมของยีนต่างๆดังนี้คือ N, P, M, G และ L gene โดยมี intergenic regions (IGRs) เป็นตัวคั่น [4] ซึ่ง IGRs มีความสำคัญในการควบคุมการแสดงออกของยีนของไวรัส [28, 29]



ภาพที่ 1 เชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า (Matthias J. Schnell *et al.* 2010)

2.3 การติดเชื้อและวงจรชีวิตของไวรัสพิษสุนัขบ้า

โรคพิษสุนัขบ้าส่วนใหญ่เกิดจากการกัด หรือช่วนจากสัตว์ที่ติดเชื้อพิษสุนัขบ้า [5-7] ไวรัสจะเข้าสู่ระบบประสาทผ่านทาง nicotinic acetylcholine receptor บริเวณ neuromuscular

junction โดยการเกาะติดของ glycoprotein กับ receptor โดยวิธีการ endocytosis แล้วหลอมรวมกับ lysosome เอนไซม์ภายใน lysosome จะทำหน้าที่ปลดปล่อย nucleocapsid เข้าสู่ไซโทพลาสซึมของเซลล์ และเข้าสู่กระบวนการผลิตส่วนประกอบของไวรัส (virion component) ได้แก่ transcription, replication และ protein synthesis โดย viral RNA polymerase จะใช้ genome ของ RNA เป็นต้นแบบในกระบวนการ transcription แล้วจะได้ mRNA ของยีน G, M, P, N, และ L (และได้ส่วนที่ไม่มีมีการ translation คือ non translated leader RNA transcript) ต่อมา mRNA จะเกิดกระบวนการ translation ทำให้ได้โปรตีน 5 ชนิด ส่วน viral RNA polymerase ก็เข้าสู่กระบวนการ replication ได้ anti-genome RNA ซึ่งจะใช้เป็นต้นแบบในการเพิ่มจำนวนจีโนมอาร์เอ็นเอของไวรัส โดยจะทำให้ได้ RNP ผ่านกระบวนการ encapsidation หลังจากนั้นก็ไปรวมตัวกับ G และ M เพื่อรวมตัวกันเป็นไวรัสตัวใหม่ที่ผิวเซลล์ และจะแทรกตัวออกจาก plasma membrane เพื่อขนส่ง rabies virus ไปในระบบประสาทส่วนกลางต่อไป [24] ด้วยวิธี retrograde fast axon และจะแพร่กระจายไปยังเนื้อเยื่ออื่นๆ เช่น รูขุมขน กระจกตา ต่อม้ำลาย ที่เป็นแหล่งในการแพร่เชื้อต่อไป [31] RNA protein complex ของ ไวรัสพิษสุนัขบ้า จะทำให้เกิด intracellular matrix ที่เรียกว่า Negri bodies ซึ่งใช้การตรวจหาเชื้อ rabies virus ได้ [32]

2.4 ระยะของโรคพิษสุนัขบ้า แบ่งออกเป็น 4 ระยะ ได้แก่

1. ระยะฟักตัวหรือ incubation period ในระยะนี้จะไม่แสดงอาการผิดปกติ โดยที่ระยะเวลาฟักตัวจะขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายๆอย่าง เช่น ระยะทางระหว่างบาดแผลกับสมอง ความรุนแรงของแผล ซึ่งจะมีระยะเวลาน้อยกว่า 7 วัน หรือนานจนถึง 6 ปี [33]
2. ระยะ prodromal จะเริ่มแสดงอาการผิดปกติ เช่น เชื่องซึม มีไข้ ไม่กินอาหาร นอกจากนี้พฤติกรรมอาจมีการเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม เช่น จากนิ่งๆจะเริ่มก้าวร้าว
3. ระยะ neurological จะเป็นระยะที่ใช้แบ่งกลุ่มอาการ
 - กลุ่มคลุ้มคลั่ง จะแสดงอาการก้าวร้าว คลุ้มคลั่ง ไวต่อสิ่งเร้า
 - กลุ่มอ่อนแรง จะแสดงอาการอัมพาตเป็นหลัก เชื่องซึม
4. ระยะ coma เป็นระยะที่ไม่รู้สึกตัว ระบบหายใจล้มเหลวและเสียชีวิต [34]

2.5 อาการในคนที่เป็นโรคพิษสุนัขบ้า แบ่งออกได้เป็น 2 ชนิดดังนี้

1. อาการแบบคลุ้มคลั่ง (encephalitic rabies)

อาการในกลุ่มนี้จะพบ 75 เปอร์เซ็นต์ จะมีระยะการดำเนินโรคเร็วและมักจะเสียชีวิตภายใน 7 วัน (เฉลี่ย 5 วัน) โดยจะมีอาการดังนี้ [32]

1) fluctuation of consciousness ผู้ป่วยจะมีอาการกระวนกระวาย ตื่นเต้น ตอบสนองต่อสิ่งเร้า เช่น แสง เสียง สลับกับภาวะรู้สึกตัวปกติ และจะรุนแรงขึ้น อาการนี้จะดำเนินไปประมาณ 2-3 วัน หลังจากนั้นจะเริ่มมีอาการซึมและไม่รู้สึกตัวใน 24 ชั่วโมง ความดันต่ำ ช็อก และอาจอาเจียนเป็นเลือดร่วมด้วย

2) phobic spasms จะมีอาการกลัวน้ำ กลัวลมขณะที่รู้สึกตัว อาจมีภาวะกล่องเสียงเกร็ง (laryngeal spasms) เมื่อผู้ป่วยเริ่มซึมจะมีอาการถอนหายใจเป็นพักๆ (inspiratory spasms)

3) autonomic stimulation ผู้ป่วยจะมีน้ำลายมากผิดปกติ รูม่านตาไม่ตอบสนอง แต่ในบางครั้งจะหดตัวหรือขยายเต็มที่เป็นระยะสั้นๆ มีอาการขนลุก มีอาการคันบริเวณถูกสัตว์กัด (local neuropathic symptoms) อาจปวดแสบปวดร้อนและอาจแพร่กระจายไปทั่วแขนและขาได้

2. อาการแบบอ่อนแรงหรืออาการอัมพาต (paralytic rabies)

อาการในกลุ่มนี้จะพบ 25 เปอร์เซ็นต์ จะมีการดำเนินโรคช้าและมักจะเสียชีวิตใน 11.5- 13 วัน ผู้ป่วยกลุ่มนี้จะมีสติรับรู้ปกติ แต่จะแสดงอาการที่สำคัญคือ อาการแขน ขาอ่อนแรง โดยจะมีอาการคล้ายกับผู้ป่วยเส้นประสาทอักเสบชนิด Guillian Barre Syndrome [35, 36] คือ ใบหน้าอ่อนแรง (facial palsy) กล้ามเนื้อบริเวณต้นแขน ต้นขาอ่อนแรงทั้งสองข้างพร้อมกัน และไม่พบ deep tendon reflex [36] นอกจากนี้อาจพบลักษณะของอาการถอนหายใจ แต่ไม่ชัดเจน บางครั้งอาจหายใจไม่ได้หากอาการรุนแรงขึ้น

อาการในสุนัขที่เป็นโรคพิษสุนัขบ้า แบ่งได้เป็น 2 ชนิด [37] คือ

1. อาการแบบคลุ้มคลั่ง, ดุร้าย (furious rabies)

2. อาการแบบเซื่องซึม (dumb rabies)

อาการของโรคมะมี 3 ระยะ คือ

ระยะอาการเริ่มแรก (prodome) สุนัขจะแสดงอาการนี้ 1-3 วันแรก หลังจากได้รับเชื้อ สุนัขจะเริ่มมีอุปนิสัยและอารมณ์ เปลี่ยนแปลงไปจากเดิม หงุดหงิด เริ่มมีไข้ อาจสังเกตเห็นได้จากมุมกบวมแดง จะกินน้ำ อาหารน้อยลง

ระยะตื่นเต้น (excite stage) เป็นระยะที่ระบบประสาทตอบสนองอย่างฉับไวและรุนแรงต่อสิ่งกระตุ้น (hyperactive) หากแสดงอาการกระวน กระวาย กัดสิ่งที่อยู่รอบตัว บางครั้งรุนแรงจนเลือดออก แล้วเริ่มวิ่งไปทั่ว เหาหอนผิดปกติ แสดงอาการบ้าอย่างชัดเจน จะจัดอยู่ในกลุ่มคลุ้มคลั่งดุร้าย แต่หากมีอาการซึม ชื่อย่อน ลึนห้อย น้ำลายไหล กินอาหารไม่ได้ จะจัดอยู่ในกลุ่มอาการเชื่องซึม

ระยะอัมพาต (paralytic stage) เป็นระยะที่มีอาการเป็นอัมพาตเริ่มจากขาหลังจนลามทั้งตัว ระบบหายใจล้มเหลว และตายอย่างรวดเร็ว

2.6 กระบวนการตายของเซลล์ (apoptosis)

การตายของเซลล์ (apoptosis) เป็นแบบแผนการตายของเซลล์ (programmed cell death) เป็นกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับการรักษาความสมดุลของสิ่งมีชีวิตและการป้องกันการติดเชื้อ [38] เป็นกลไกภายในเซลล์ซึ่งเกิดได้จากการกระตุ้นหลายปัจจัย ทำให้เซลล์หดตัวลง พบโครมาตินหนาแน่น ที่เรียกว่า pyknosis และถูกเก็บกินโดยเซลล์ข้างเคียงหรือ phagocyte ซึ่งจะไม่พบสารภายในเซลล์ไม่รั่วไหลสู่ภายนอก แตกต่างจากการตายแบบ necrosis ที่จะพบเซลล์บวม พบ cytoplasmic vacuoles มีการฉีกขาดของผนังของ organelle และมีการฉีกขาดของผนังเซลล์ ส่งผลให้เกิดการแตกของเซลล์ ทำให้สารภายในเซลล์ออกสู่ภายนอก ซึ่งจะชักนำเซลล์อีกเสบเข้าสู่บริเวณนั้นและเกิดการอักเสบตามมา [39, 40] กระบวนการ apoptosis สำคัญในการการพัฒนาของสิ่งมีชีวิต เช่น การพัฒนาของอวัยวะต่างๆ ควบคุม hematopoietic progenitor cell และกำจัดเซลล์ที่ผิดปกติ เช่น เซลล์ที่มีสารพันธุกรรมเสียหายอย่างถาวรหรือเซลล์ที่มีการเจริญเติบโตผิดปกติ และรวมถึงเซลล์ที่มีการติดเชื้อไวรัสเพื่อป้องกันการแพร่กระจายของไวรัสด้วย ซึ่งเมื่อเซลล์ได้รับการกระตุ้นจะเกิดการย่อยโปรตีนภายในเซลล์โดยการทำงานของโปรตีนในกลุ่ม caspases รวมถึงย่อย nucleus ของเซลล์ด้วยส่งผลให้เกิดการแตกหักของสารพันธุกรรม (DNA fragmentation) ซึ่งเป็นลักษณะเด่นของการตายของเซลล์แบบนี้ [39, 40] โปรตีนในกลุ่ม caspases แบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่มคือ initiators เช่น caspase-2,-8,-9 และ caspase 10 กลุ่ม effectors หรือ executioners เช่น caspase-3,-6 และ caspase 7 และกลุ่ม inflammatory caspases เช่น caspase-1,-4,- และ caspase-5 กลไกการเกิด apoptosis อาจแบ่งออกได้เป็นสองแบบหลักคือ extrinsic หรือ death receptor pathway และ intrinsic pathway หรือ mitochondria pathway [40]

extrinsic pathway จะถูกกระตุ้นผ่าน death receptor ที่เป็น receptor ที่อยู่ใน superfamily tumor necrosis factors receptors (TNFR) เช่น TNFR, Fas และ TRAIL เมื่อมีการจับกันของ receptor จะส่งผลให้เกิดการกระตุ้น caspase-8 ผ่านทาง death-inducing signaling complex (DISC) [40, 41]

intrinsic pathway กลไกการเหนี่ยวนำให้เกิด apoptosis จากสัญญาณภายในเซลล์ (intracellular signal) ซึ่งสัญญาณภายในเซลล์แบ่งได้เป็น สัญญาณที่เมื่อขาดสัญญาณนี้จะทำให้เกิด apoptosis เช่น growth factor, ฮอร์โมน และ cytokine บางตัว และสัญญาณที่เมื่อมีสัญญาณนี้จะกระตุ้นให้เกิดการ apoptosis เช่น รังสี สารพิษ ภาวะขาดออกซิเจนในเซลล์ อนุมูลอิสระ และการติดเชื้อไวรัส ซึ่งสัญญาณต่างๆจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของผนังด้านในของ mitochondria ส่งผลให้เกิดการรั่วไหลของ pro apoptosis protein เช่น cytochrome-c ซึ่งอยู่ภายใน mitochondria ออกสู่ภายนอก โดย cytochrome-c จะไปจับและกระตุ้นกับ Apaf-1 กับ procaspase-9 รวมตัวเป็น apoptosome ส่วน Smac/ DIABLO และ HtrA2/ Omi ที่อยู่ใน mitochondria ก็สามารถยับยั้งการทำงานของ inhibitors of apoptosis protein (IAP) ส่งผลให้เกิด apoptosis ได้เช่นกัน [40]

นอกจากกลไก extrinsic pathway และ intrinsic pathway การเกิด apoptosis ยังเกิดได้จากกลไก perforin/ granzyme pathway ซึ่งเป็นกลไกที่ cytotoxic T-lymphocyte (CTLs) และ natural killer cell (NK cells) ใช้ในการกำจัดเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสและเซลล์ที่เปลี่ยนรูปร่าง (transformed cells) กลไกการ apoptosis แบบนี้จะเกิดจาก CTLs หรือ NK cells หลัง cytoplasmic granule toxins ด้วยวิธี exocytosis สารเหล่านี้ประกอบไปด้วย membrane-disrupting protein เช่น perforin และโปรตีนในกลุ่ม granzymes ที่มีคุณสมบัติเป็น serine proteases [42]

กลไกการเกิดโรค (pathogenesis) ที่ทำให้เกิดความแตกต่างกันของอาการระหว่างกลุ่มอาการคลุ้มคลั่งและกลุ่มอาการอ่อนแรงในโรคพิษสุนัขบ้ายังคงไม่เป็นที่เข้าใจ ได้มีการศึกษาในผู้ป่วยโรคพิษสุนัขบ้าที่มีชีวิตอยู่ เกี่ยวกับภาพสมองและไขสันหลังด้วยเครื่องสแกนแม่เหล็กไฟฟ้า (MRI) [5] ศึกษาในผู้ป่วยโรคพิษสุนัขบ้าที่เสียชีวิต เกี่ยวกับการกระจายตัวของแอนติเจนเชื้อพิษสุนัขบ้าและการอักเสบในแต่ละส่วนของระบบประสาทส่วนกลาง [13] ศึกษาลำดับสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสจากสมองในคนและสุนัขที่เป็นโรคพิษสุนัขบ้าที่ glycolprotein gene, nucleoprotein และ gene phosphoprotein gene [14] ไม่พบความแตกต่างระหว่างสองอาการ

แต่ก็ได้มีการศึกษาตัวอย่างสมองของสุนัขที่เป็นโรคพิษสุนัขบ้า ด้วยเครื่องสแกนแม่เหล็กไฟฟ้า (MRI) ร่วมกับการวัดปริมาณไวรัส และ cytokine [15] พบว่าตัวอย่างสมองของสุนัขที่เป็นโรคพิษสุนัขบ้าในระยะท้ายไม่พบความแตกต่าง แต่การศึกษาตัวอย่างในระยะเริ่มแรกของโรค พบว่าตัวอย่างสมองของสุนัขกลุ่มอาการคลุ้มคลั่งมีปริมาณไวรัสสูงกว่ากลุ่มอาการเซื่องซึม ในขณะที่ตัวอย่างสมองของสุนัขกลุ่มอาการแบบเซื่องซึมพบการอักเสบและพบปริมาณ cytokine ในระดับที่สูงกว่า ซึ่งผลสอดคล้องกับการศึกษาที่พบว่า ในส่วนก้านสมอง (brainstem) พบการอักเสบมาก

ในขณะที่พบปริมาณไวรัสที่สมองของตัวอย่างกลุ่มอาการแบบเซ็งซิม [16] อาจกล่าวได้ว่าการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันบริเวณก้านสมอง (brainstem) อาจจะมีบทบาทสำคัญต่อการแพร่ของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าไปยังสมองในกลุ่มอาการอ่อนแรง

ผลการศึกษาเหล่านี้แสดงให้เห็นว่า ระยะแรกของโรคพิษสุนัขบ้า จะพบความแตกต่างกันในหลายๆด้านระหว่างกลุ่มอาการคลุ้มคลั่งและกลุ่มอาการอ่อนแรง แต่จะไม่พบความแตกต่างกันในระยะท้ายของโรค

การศึกษาโดยทั่วไปแสดงให้เห็นว่าการตายของเซลล์เกี่ยวข้องกับการป้องกันการเผยแพร่ของไวรัสภายในร่างกายและมีบทบาทสำคัญในการกำจัดเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัส [18, 43] มีการรายงานไวรัสมาทำให้เซลล์ตายโดยการเกิด apoptosis [19, 44] ขณะที่ไวรัสพิษสุนัขบ้าสามารถพัฒนากลไกในการหลีกเลี่ยงการป้องกันของร่างกาย [20] โดยพบว่าไวรัสพิษสุนัขบ้าทำให้เกิดการตาย (apoptosis) ของ migratory T-cell โดยหลังจากที่เซลล์ประสาทได้รับเชื้อไวรัสแล้วจะไปกระตุ้นการตายของ migratory T-cell ผ่าน Fas-FasL Apoptosis โดยเซลล์ประสาทที่ติดเชื้อจะผลิต FasL ไปจับกับ Fas receptor บน migratory T-cell เกิดเป็น Fas-FasL interaction แล้วแปลงสัญญาณไปกระตุ้น caspase-cascade ต่อไป [45] การตายของเซลล์ประสาทถูกพบในการศึกษาในการติดเชื้อ attenuate strain ใน in vivo [23, 46-48] มีการศึกษาในคนที่เป็โรคพิษสุนัขบ้า ไม่พบการตายของเซลล์ประสาท แต่พบการตายของเซลล์ไมโครเกลีย (microglial cell) [21] กล่าวได้ว่าการตายของเซลล์ประสาทไม่มีบทบาทสำคัญในคนที่เป็โรคพิษสุนัขบ้า ยกเว้นในผู้ป่วยโรคเอดส์สองรายที่เป็โรคพิษสุนัขบ้าแล้วพบการเกิด apoptosis ของเซลล์ประสาท [49] แต่การศึกษาในสุนัขที่เป็โรคพิษสุนัขบ้า พบการแค้ตายของเซลล์อีกเสบ [22, 23] ดังนั้น ในการติดเชื้อตามธรรมชาติจะพบเพียงการตายของเซลล์อีกเสบแต่ไม่พบการตายของเซลล์ประสาท อย่างไรก็ตาม การศึกษาทั้งหมดนั้นได้ทำการศึกษาในตัวอย่งระยะท้ายของโรค ซึ่งการศึกษาที่พบความแตกต่างระหว่างกลุ่มอาการคลุ้มคลั่งและแบบอ่อนแรงนั้น พบที่ระยะแรกของโรค ดังนั้นการตายของเซลล์ก็อาจจะพบความแตกต่างเช่นกัน

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทำวิจัย

3.1 ระเบียบวิธีวิจัย (research methodology)

กลุ่มประชากรเป้าหมาย (target population)

คือ สุนัขที่ติดเชื้อโรคพิษสุนัขบ้าตามธรรมชาติ

ประชากรตัวอย่าง (population to be sample)

คือ เนื้อเยื่อของสมอง (brain) และไขสันหลัง (spinal cord) จากสุนัขบ้าชนิดอาการคลุ้มคลั่ง (furious) และชนิดเซื่องซึม (dumb) ที่อยู่ในรูป formalin-fixed paraffin embedded block (FFPE block) โดยสุนัขทุกตัวเป็นสุนัขบ้าที่ได้มาจากสถานเสาวภา สภากาชาดไทย ที่ได้รับการตรวจวินิจฉัยจากหน่วยชันสูตรโรคพิษสุนัขบ้าว่าเป็นโรคพิษสุนัขบ้า



ภาพที่ 2 Formalin-fixed paraffin embedded block (FFPE block)

ขนาดของประชากรตัวอย่าง (sample size)

เนื่องจากการศึกษาในครั้งนี้มีข้อจำกัดในแง่ของจำนวนขนาดตัวอย่างสมองและไขสันหลังในสุนัขบ้าที่มีจำนวนน้อย การศึกษานี้จึงจะทำการศึกษาโดยใช้ขนาดตัวอย่างจำนวน 17 ตัวอย่าง แบ่งเป็น

- กลุ่มอาการคลุ้มคลั่งจำนวน 8 ตัวอย่าง
 - early stage 5 ตัวอย่าง
 - late stage 3 ตัวอย่าง
- กลุ่มอาการเซื่องซึมจำนวน 9 ตัวอย่าง
 - early stage 6 ตัวอย่าง
 - late stage 3 ตัวอย่าง

early stage คือ กลุ่มที่แสดงอาการในระยะแรกของโรค โดยสุนัขจะถูกทำให้เสียชีวิตอย่างสงบใน 24 ชั่วโมงหลังจากแสดงอาการ โดยการควบคุมดูแลจากสัตวแพทย์

late stage คือ กลุ่มที่แสดงอาการในระยะท้ายของโรค โดยจะเป็นสุนัขที่ไม่ได้ถูกสังเกตอาการตั้งแต่แรก ซึ่งจะถูกกักไว้จนเสียชีวิตเอง

โดยทั้งสองกลุ่มจะทำการศึกษาในส่วนของ frontal, hippocampus, brainstem (midbrain, pons, medulla) และ spinal cord ส่วน cervical – thoracic levels และ lumbar-sacrum levels

รวมจำนวนตัวอย่างเนื้อเยื่อสุนัขบ้าที่ศึกษาคือ 17 ราย

3.2 การเก็บตัวอย่าง (sample collection)

ชิ้นเนื้อที่นำมาศึกษานั้น อยู่ในรูป formalin-fixed paraffin embedded block (FFPE block) ที่ได้มาจากสุนัขที่เป็นโรคพิษสุนัขบ้าตามธรรมชาติที่มีผู้ส่งให้สถานเสาวภา ซึ่งสัตวแพทย์จะทำการวินิจฉัยจากสังเกตการแสดงออกของสุนัข โดยจะทำการเก็บน้ำลายหลังจากสุนัขเริ่มแสดงอาการเพื่อทำการตรวจยืนยันการติดเชื้อพิษสุนัขบ้าด้วยเทคนิค nucleic acid sequence-based amplification (NASBA) [50] หากผลตรวจพบว่าติดเชื้อสุนัขบ้าจริง จะทำการสังเกตพัฒนาการอาการสุนัขต่อ เพื่อแยกกลุ่มอาการว่าเป็น สุนัขบ้าที่อยู่ในกลุ่มอาการคลุ้มคลั่ง (furious) หรือกลุ่มอาการเซื่องซึม (dumb)

โดยในกลุ่มคลุ้มคลั่ง (furious) สุนัขจะมีอาการดุร้าย กระวนกระวาย ตื่นเต้น เข้าทำร้ายหรือกัด ไล่ต้อนสิ่งกระตุ้น ส่วนในกลุ่มเซื่องซึม (dumb) สุนัขจะมีอาการขาหลังอ่อนแรง ปากอ้า น้ำลายไหล เซื่องซึม โดยจะทำให้สุนัขเสียชีวิตอย่างสงบใน 24 ชั่วโมงหลังจากแสดงอาการ จากการควบคุมดูแลจากสัตวแพทย์ โดยจะถือว่าเป็นกลุ่มที่แสดงอาการในระยะแรกของโรค (early stage) ส่วนสุนัขที่ไม่ได้ถูกสังเกตอาการตั้งแต่แรกจะถูกกักไว้จนเสียชีวิตเอง ซึ่งจะถือว่าเป็นกลุ่มที่แสดงอาการในระยะท้ายของโรค (late stage)

หลังจากนำส่วนของสมองและไขสันหลังผ่านการแช่ในน้ำยา 10% formalin แล้วจะทำการตัดแยกสมองและไขสันหลังเป็นส่วนต่าง ๆ แล้วนำไปผ่านกระบวนการให้อยู่ในรูปของ Formalin-fixed paraffin embedded block (FFPE block) ซึ่งตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาคั้งนี้ประกอบไปด้วย กลุ่มอาการคลุ้มคลั่งจำนวน 8 ตัวอย่าง แบ่งเป็น early stage 5 ตัวอย่าง late stage 3 ตัวอย่าง และกลุ่มอาการเซื่องซึมจำนวน 9 ตัวอย่าง แบ่งเป็น early stage 6 ตัวอย่าง late stage 3 ตัวอย่าง

โดยแต่ละตัวอย่างจะแบ่งออกเป็น frontal FFPE block, hippocampus FFPE block, brainstem (midbrain, pons, medulla FFPE block) และ spinal cord ส่วน cervical cord FFPE block – thoracic cord FFPE block และ lumbar cord FFPE block – sacrum cord FFPE block ซึ่งจะทำการตัด 1 สไลด์/ 1 block แล้วทำการย้อมดูการตายของเซลล์ด้วยเทคนิค TUNEL ซึ่งจะทำการย้อมสไลด์ tonsil ซึ่งใช้เป็น control ควบคู่กับทุกสไลด์ของตัวอย่างที่ย้อมศึกษา

Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) เป็นวิธีตรวจสอบ DNA fragmentation ในเซลล์ที่เกิด apoptosis โดยหลักการ คือ การแทรกอนุพันธ์ของ dUTP (deoxyuridine 5'triphosphate) นำไปเติมที่ปลายของ DNA ที่แตกหักด้วยปฏิกิริยา terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) แล้วทำการติดตามด้วยแอนติบอดีที่ติดด้วยสารเรืองแสง

ตารางที่ 1 แสดงส่วนต่างๆของสมองและไขสันหลังของตัวอย่าง FFPE block ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้

Case	CNS Regions				
	Frontal	Hippocampus	Brainstem	C-T	L-S
Furious					
Early stage					
1	√	√	√	X	X
2	√	√	√	X	X
3	√	√	√	√	√
4	√	√	√	√	√
5	√	√	√	X	X
Late stage					
1	√	√	√	√	√
2	√	√	√	√	√
3	√	√	√	√	√
Dumb					
Early stage					

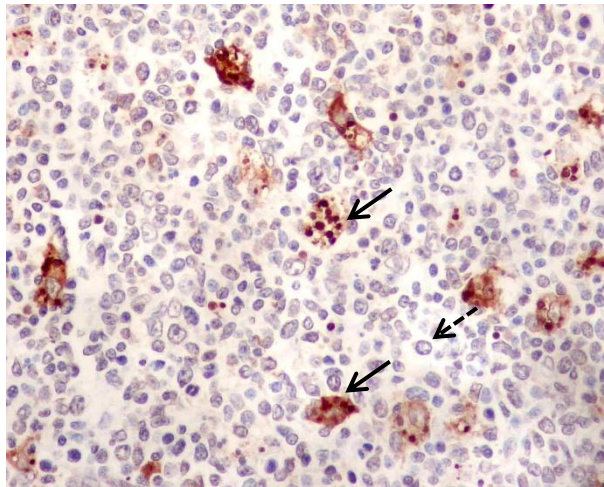
Case	CNS Regions				
	Frontal	Hippocampus	Brainstem	C-T	L-S
1	√	√	√	√	√
2	√	√	√	√	√
3	√	√	√	X	X
4	√	√	√	√	√
5	√	√	√	X	X
6	√	√	√	X	X
Late stage					
1	√	X	√	√	√
2	√	√	√	√	√
3	√	√	√	√	√

หมายเหตุ

C-T คือ spinal cord ส่วน cervical - thoracic cord levels

L-S คือ spinal cord ส่วน lumbar – sacral levels

X = ไม่ได้ทำการศึกษาเนื่องจากไม่มีตัวอย่าง



ภาพที่ 3 แสดงการย้อม TUNEL สไลด์ tonsil ซึ่งใช้เป็น control
(ลูกศรเส้นทึบ : positive control, ลูกศรเส้นประ : negative control)

3.3 เครื่องมือ วัสดุอุปกรณ์และสารเคมีในการทำวิจัย

เครื่องมือ

1. เครื่องเตรียมบล็อกชิ้นเนื้อ หรือ embedded (Leica, Germany)
2. cold plate
3. เครื่องตัดชิ้นเนื้อ หรือ microtome (Thermo electron corporation, USA)
4. อ่างน้ำลอยชิ้นเนื้อ (floating bath)
5. เครื่อง hybridizer (DAKO cytometric)
6. เครื่องปั่นเหวี่ยง (vortex mixer)
7. ตู้อบร้อน (hot air oven)
8. ตู้เย็นเก็บสารเคมี
9. กล้องจุลทรรศน์ (light microscope)
10. OLYMPUS Microscope Digital Camera DP21

วัสดุอุปกรณ์

1. paraffin
2. cassette
3. ปากคีบ (forceps)
4. coplin staining jar
5. นาฬิกาจับเวลา
6. slide superfrost plus (Thermo scientific, USA)
7. microcentrifuge tube: 1.5 ml.
8. parafilm
9. microscope glass cover slip
10. plastic cover slip
11. pipette tip 10, 20, 100, 200, 1000 μ l (Axygen, USA)
12. automatic adjustable micropipette: 0.5-10 μ l, 10-100 μ l, 20-200 μ l, 100-1000 μ l (Biohit, Finland)
13. cool - box
14. racks, staining dish
15. ถาดพลาสติก
16. กระบอกตวง
17. ถุงมือ

สารเคมี

1. absolute, 95%, 70% alcohol
2. xylene

3. distilled water
4. hematoxyline
5. eosin
6. lithium
7. diluent
8. protenase K
9. peroxidase blocking
10. ApopTag Plus Peroxidase *In Situ* Apoptosis Detection kit (Millipore, US & CA)
11. phosphate buffer saline (PBS)
12. DAB (3,3 diaminobenzidine tetrahydrochloride anhydrous)
13. 10% Neutral buffer formaline
14. mounting media

3.4 วิธีการทดลอง (method)

ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง

1. นำ Formalin-fixed paraffin embedded block (FFPE block) มาวางบน cold plate เพื่อให้ block เย็นก่อนตัด
2. ตัด tissue section ด้วยเครื่อง microtome (Thermo electron corporation, USA) ให้มีความหนาประมาณ 2 - 3 ไมครอน ให้ได้ section เป็นแถบยาวติดต่อกัน (ribbon)
3. นำ tissue section ไปลอยใน 30% alcohol แล้วใช้ slide ซ้อน tissue section ไปลอยในอ่างน้ำลอยชิ้นเนื้อ (floating bath) ที่มีอุณหภูมิประมาณ 43 องศาเซลเซียส เพื่อป้องกันการเกิดฟองอากาศและยับย่นที่ tissue section แล้วใช้ slide superfrost plus ซ้อน tissue section ขึ้นมาให้อยู่ส่วนกลางๆของสไลด์
4. หลังจากนั้นนำสไลด์ไปอบใน hot air oven อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ใช้เวลาอบทิ้งไว้ทั้งคืน (over night) สำหรับสไลด์ย้อม TUNEL

ขั้นตอนการย้อมสไลด์ชิ้นเนื้อ

ขั้นตอนการย้อม Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) สำหรับการตรวจสอบการตายของเซลล์ด้วย ApopTag Plus Peroxidase *In Situ* Apoptosis Detection kit (Millipore, US & CA) ในอัตราส่วน (dilution) 1: 9

1. deparaffinized
 - นำสไลด์เรียงลงใน rack แล้วจุ่มลงใน xylene 3 โถๆละประมาณ 5 นาทีรวมเป็น 15 นาที
 - จุ่มสไลด์ตัวอย่างใน 95% alcohol 3 โถๆละประมาณ 10 dips
 - เรียงสไลด์จากใน rack ลงใน jar
 - ล้างตัวอย่างด้วยการแช่ด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้งๆละ 3 นาที
2. pretreat tissue
 - หยุด proteinase K (20 µg/mL) ลงบนสไลด์ ใช้เวลา 15 นาที
 - ล้างตัวอย่างด้วยการแช่ด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้งๆละ 3 นาที
3. quench endogenous peroxidase
 - หยุด Peroxidase blocking ลงบนสไลด์ ใช้เวลา 5 นาที
 - ล้างตัวอย่างด้วยการแช่ด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้งๆละ 3 นาที
4. เตรียม working strength TdT enzyme (บน cool - box) 10 µL/1 slide ประกอบด้วย
 - reaction buffer 7.7 µL
 - TdT enzyme 3.3 µL
5. apply equilibration buffer
 - หยุด equilibration buffer 20 µL/1 slide ใช้เวลา 7 วินาที
6. apply working Strength TdT enzyme
 - หยุด working Strength TdT enzyme ที่เตรียมไว้ลงบนสไลด์ให้ท่วมตัวอย่าง แล้วปิดด้วย plastic cover slip
 - นำสไลด์เข้าเครื่อง humidified chamber ที่ 37 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 1 ชั่วโมง
7. เตรียม stop/ wash buffer ประกอบด้วย
 - Wash buffer 20 µL
 - น้ำกลั่น 680 µL
8. apply stop/ wash buffer

- เมื่อครบ 1 ชั่วโมงแล้ว ค่อยๆดึง plastic cover slip ออกแล้วหยุด stop/ wash buffer ลงบนสไลด์ ใช้เวลา 10 นาทีที่อุณหภูมิห้อง
9. apply anti-Digoxigenin conjugate
 - ล้างตัวอย่างด้วยการแช่ด้วย phosphate buffer saline (PBS) 3 ครั้งๆละ 1 นาที
 - หยุด mouse anti- Digoxigenin 20 μ L/1 slide ใช้เวลา 30 นาที
 10. wash in phosphate buffer saline (PBS)
 - ล้างตัวอย่างด้วยการแช่ด้วย phosphate buffer saline(PBS) 3 ครั้งๆละ 2 นาที
 11. เตรียม working strength peroxidase substrate 150 μ L ประกอบด้วย
 - DAB (3,3 diaminobenzidine tetrahydrochloride anhydrous) 3 μ L
 - DAB dilution buffer 147 μ L
 12. develop color in peroxidase substrate (DAB)
 - หยุด working strength peroxidase substrate ให้ท่วมตัวอย่างบนสไลด์ 5 นาที
 13. wash specimen
 - ล้างตัวอย่างด้วยน้ำประปาไหลผ่าน ใช้เวลา 3-5 นาที
 14. counter stain specimen
 - counter stain ตัวอย่างด้วย Hematoxilin solution
 - ล้างตัวอย่างด้วยน้ำประปาไหลผ่าน ใช้เวลา 3-5 นาที
 - จุ่มสไลด์ตัวอย่างใน Lithium ประมาณ 10 dips
 - จุ่มสไลด์ตัวอย่างใน 95% alcohol ประมาณ 10 dips
 - จุ่มสไลด์ตัวอย่างใน absolute alcohol ประมาณ 10 dips
 - จุ่มสไลด์ตัวอย่างใน xylene ประมาณ 10 dips
 15. mounting slides ด้วย mounting media แล้วปิดด้วย microscope glass cover slip

3.5 การรวบรวมข้อมูล (data collection)

1. นำสไลด์ตัวอย่างที่ผ่านการย้อม TUNEL แล้วไปทำการดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (light microscope) สไลด์ตัวอย่างที่พบเซลล์ที่ย้อมติด TUNEL ก็นำไปถ่ายภาพเพื่อทำการนับเซลล์ต่อไป

2. ทำการถ่ายภาพในแต่ละส่วนของสมองและไขสันหลัง ด้วยกล้องดิจิทัล OLYMPUS Microscope Digital Camera DP21 โดยเลือกซูมถ่ายภาพจากบริเวณที่มีเซลล์ประสาทและเซลล์อักเสบให้ทั่วขึ้นเนื้อ โดยจะมีพื้นที่ประมาณ 0.71-1.41 ตารางมิลลิเมตร ต่อภาพสมองและไขสันหลังแต่ละภาพ

3. ทำการบันทึกไฟล์ภาพขนาด 1200x1600 jpg. แล้วนำภาพมาเข้าโปรแกรม Adobe Photoshop และทำการนับเซลล์ด้วยวิธี manual สำหรับเซลล์ประสาท (neuron) จะทำการนับเซลล์ที่ย้อมติด TUNEL ซึ่งจะให้ป็น positive neuron และนับเซลล์ที่ย้อม TUNEL ไม่ติด ซึ่งจะให้ป็น negative neuron โดยเซลล์ประสาทที่นับจะต้องเห็น nucleolus ชัดเจน ส่วนเซลล์อักเสบ (inflammatory cell) จะทำการนับเฉพาะเซลล์ที่ย้อมติด TUNEL ซึ่งจะให้ป็น positive inflammatory cell แล้วทำการบันทึกข้อมูล จากนั้นนำผลนับมาให้อาจารย์ที่ปรึกษาพิจารณาอีกที หากความเห็นตรงกันก็นำผลที่นับมาคำนวณค่าการตายของเซลล์ประสาทและเซลล์อักเสบของแต่ละส่วนของสมองและไขสันหลัง

4. คำนวณค่าการตายของเซลล์ (apoptosis)

% TUNEL positive neuron

$$= \text{Positive neuron} \times 100 / \text{total neuron}$$

โดยที่ Total neuron คือ positive neuron + negative neuron

TUNEL positive inflammatory cell / 0.0705 mm²

$$= \text{Positive inflammatory cell} / \text{total pictures of region}$$

3.6 การวิเคราะห์ข้อมูล (data analysis)

1. เปรียบเทียบการตายของเซลล์ประสาทและเซลล์อักเสบในระบบประสาทส่วนกลางในสุนัขที่เป็นโรคพิษสุนัขบ้าทั้ง 2 แบบอาการโดยวิธีพรรณนา

2. นำข้อมูลที่ได้จากการคำนวณการตายของเซลล์ประสาทและเซลล์อักเสบมาทดสอบด้วยหลักการทางสถิติว่ามีความแตกต่างกันหรือไม่ระหว่างสุนัขบ้าทั้ง 2 ชนิดอาการโดยใช้วิธีการ

ทดสอบแบบ Man-Whitney U test (asymptotic significance, 1 tailed) บนโปรแกรม SPSS software version 18.0 (IBM corporation, Somer, USA) เมื่อ p value < 0.05 เป็นค่าความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ



บทที่ 4
ผลการวิจัย

4.1 ผลการเปรียบเทียบการตายของเซลล์ประสาทในสุนัขบ้าชนิดคลุ้มคลั่งและเชื่องซึม

ตารางที่ 2 แสดงผลการวิเคราะห์หาการตายของเซลล์ประสาทเชิงปริมาณของระบบประสาทในสุนัขบ้าชนิดคลุ้มคลั่งและชนิดเชื่องซึม

	% TUNEL positive neuron				
	CNS Regions				
	Frontal	Hippocampus	Brainstem	C-T	L-S
Furious					
Early stage					
1	0	0	21.39	NA	NA
2	0	0	4.35	NA	NA
3	0	0	41.67	6.38	31.25
4	0	0	18	0	8.96
5	0	0	0	NA	NA
Late stage					
6	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0
Dumb					
Early stage					
1	0	0	81.99	34.82	61.54
2	0	0	70.18	50	41.5
3	0	0	83.19	NA	NA
4	0	0	75	0	0
5	0	0	19.01	NA	NA
6	0	0	61.05	NA	NA
Late stage					
7	0	NA	0	0	0

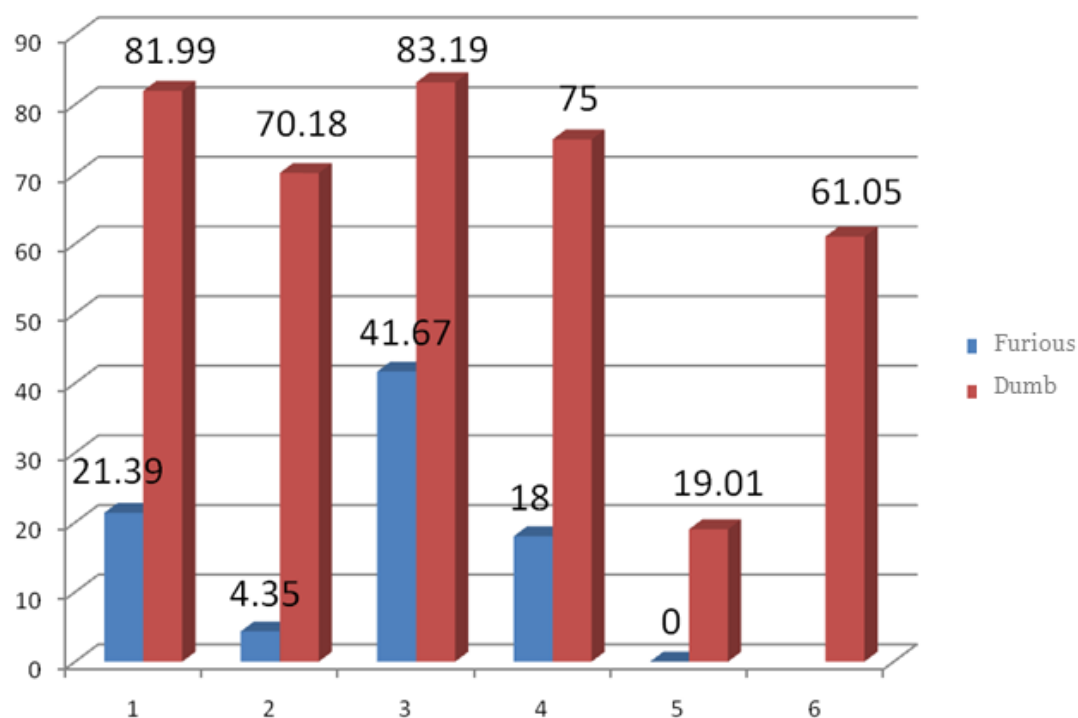
% TUNEL positive neuron					
CNS Regions					
8	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0

C-T : cervical - thoracic cord levels, L-S = lumbar - sacral cord levels, NA = Not available

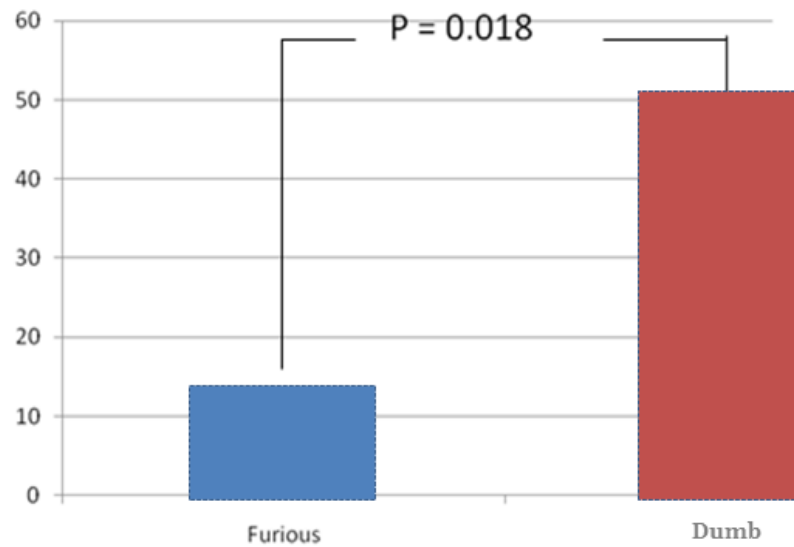
ผลแสดงการตายของเซลล์ประสาทที่แสดงในตารางที่ 2 พบการตายของเซลล์ประสาททั้งในตัวอย่างสุนัขบ้ากลุ่มอาการคลุ้มคลั่งและกลุ่มอาการเซื่องซึม ในระยะแรกของโรค (early stage) ที่บริเวณก้านสมอง (brainstem) และไขสันหลัง (spinal cord) ส่วนบริเวณ frontal และ hippocampus ไม่พบการตายของเซลล์ สำหรับในระยะท้ายของโรค (late stage) ทั้งในกลุ่มอาการคลุ้มคลั่งและกลุ่มอาการเซื่องซึม ไม่พบการตายของเซลล์ประสาทเลยในทุกบริเวณทั้งสมองส่วน frontal, hippocampus, ก้านสมอง (brainstem) และไขสันหลัง (spinal cord) ดังภาพที่ 5 แสดงตัวอย่างของสมองและไขสันหลังที่ทำการย้อม TUNEL แล้วไม่พบการตายของเซลล์ประสาทเลย

ซึ่งในตัวอย่างที่มีการศึกษาครบทุกบริเวณทั้งที่บริเวณ frontal, hippocampus, ก้านสมอง (brainstem) และไขสันหลัง (spinal cord) จะพบการตายของเซลล์ประสาทปริมาณมากที่บริเวณก้านสมอง (brainstem) และลดลงที่บริเวณไขสันหลัง (spinal cord) ตัวอย่างสุนัขบ้ากลุ่มอาการคลุ้มคลั่ง (furious) ในตัวอย่างที่ 3 พบการตายของเซลล์ประสาทที่บริเวณก้านสมอง (brainstem) 41.67 % ส่วนที่ไขสันหลัง (spinal cord) บริเวณ cervical - thoracic cord levels พบการตายของเซลล์ประสาท 6.38 % และพบ 31.25 % บริเวณ lumbar - sacral cord levels, ตัวอย่างที่ 4 บริเวณก้านสมอง (brainstem) พบการตายของเซลล์ประสาทที่ 18 % ที่ไขสันหลัง (spinal cord) บริเวณ lumbar - sacral cord levels พบการตายของเซลล์ประสาท 8.96 % ส่วนที่บริเวณ cervical - thoracic cord levels ไม่พบการตายของเซลล์ประสาทเลย ในตัวอย่างสุนัขบ้ากลุ่มอาการเซื่องซึม (dumb) ตัวอย่างที่ 1 พบการตายของเซลล์ประสาทที่บริเวณก้านสมอง (brainstem) 81.99 % ส่วนที่ไขสันหลัง (spinal cord) บริเวณ cervical - thoracic cord levels พบการตายของเซลล์ประสาท 34.82 % และพบ 61.54 % บริเวณ lumbar - sacral cord levels, ตัวอย่างที่ 2 บริเวณก้านสมอง (brainstem) พบการตายของเซลล์ประสาทที่ 70.18 % ที่ไขสันหลัง (spinal cord) บริเวณ cervical - thoracic cord levels พบการตายของเซลล์ประสาท 50 % ส่วนที่บริเวณ lumbar - sacral cord levels พบ 41.5 % สำหรับตัวอย่างที่ 4) พบการตายของเซลล์ประสาทที่ก้านสมอง (brainstem) เท่านั้นซึ่งพบ 75 % ส่วนในบริเวณไขสันหลัง (spinal cord) ไม่พบการตายของเซลล์ประสาทเลย

จะเห็นว่าที่บริเวณก้านสมอง (brainstem) ในระยะแรกของโรค (early stage) แสดงแนวโน้มชัดเจนว่า ในตัวอย่างสุนัขกลุ่มเซื่องซึมพบการตายของเซลล์ประสาทมากกว่าในตัวอย่างสุนัขกลุ่มคลุ้มคลั่งในทุกตัวอย่างที่ทำการศึกษา ซึ่งแสดงแนวโน้มที่เห็นได้ชัดเจนดังแผนภูมิที่ 1 โดยค่าเฉลี่ยการตายของเซลล์ประสาทที่บริเวณก้านสมอง (brainstem) ในระยะแรกของโรค (early stage) นี้ พบว่ากลุ่มเซื่องซึม (dumb) มีค่าเฉลี่ยการตายของเซลล์ประสาทมากกว่ากลุ่มคลุ้มคลั่ง (furious) อย่างมีนัยสำคัญ (กลุ่มเซื่องซึม 49.48 ± 95 กลุ่มคลุ้มคลั่ง 13.718 ± 9.11 $P=0.018$) ดังแผนภูมิที่ 2 โดยตัวอย่างการย้อม TUNEL ที่บริเวณก้านสมอง (brainstem) ในระยะแรกของโรค (early stage) ที่แสดงการตายของเซลล์ประสาทในตัวอย่างสุนัขกลุ่มเซื่องซึมมากกว่าที่พบในตัวอย่างสุนัขกลุ่มคลุ้มคลั่ง ดังภาพที่ 4



แผนภูมิที่ 1 แสดงผลการตายของเซลล์ประสาทที่ก้านสมองใน early stage (% TUNEL positive neuron)



แผนภูมิที่ 2 แสดงค่าเฉลี่ยการตายของเซลล์ประสาทที่ก้านสมองใน early stage

4.2 ผลการเปรียบเทียบการตายของเซลล์อักเสบในสุนัขบ้าชนิดคลุ้มคลั่งและเชื่องซึม

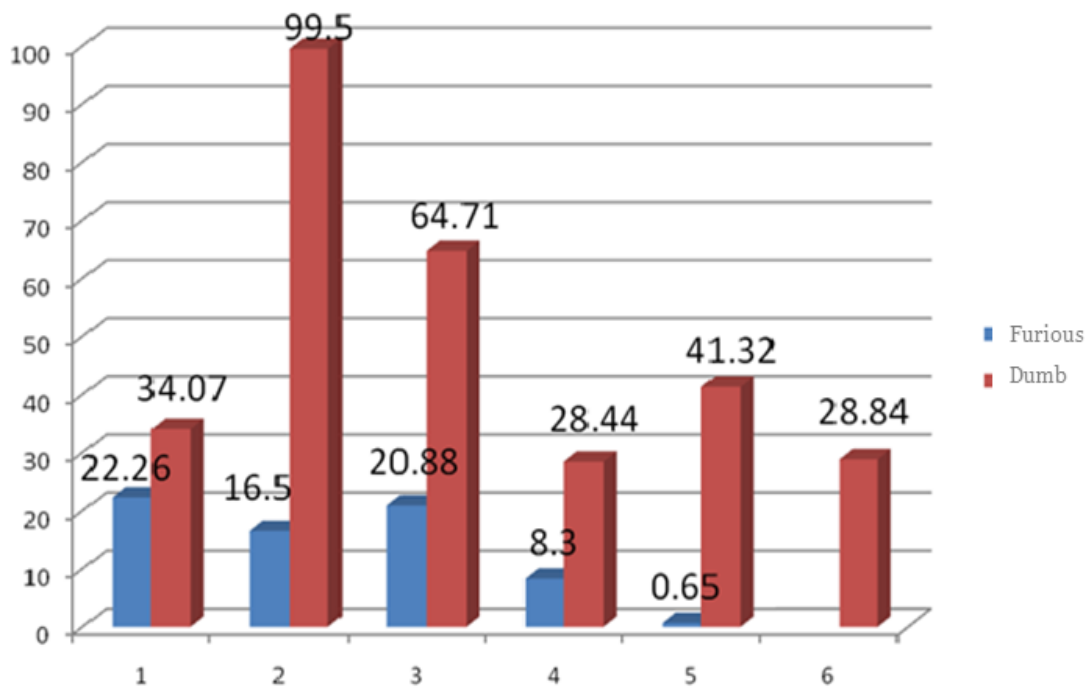
ตารางที่ 3 แสดงผลการวิเคราะห์หาการตายของเซลล์อักเสบเชิงปริมาณของระบบประสาทในสุนัขบ้าชนิดคลุ้มคลั่งและชนิดเชื่องซึม

Furious	TUNEL positive inflammatory cell / 0.0705 mm ²				
	CNS Regions				
	Frontal	Hippocampus	Brainstem	C-T	L-S
Early stage					
1	0	0	22.26	NA	NA
2	0	0	16.5	NA	NA
3	0	0	20.88	16.48	53.29
4	0	0	8.3	0	16.26
5	0	0	0.65	NA	NA
Late stage					
6	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0
Dumb					
Early stage					
1	0	0	34.07	60.21	46.2
2	0	0	99.5	94.83	40.21
3	0	0	64.71	NA	NA
4	0	0	28.44	0.29	0
5	0	0	41.32	NA	NA
6	0	0	28.84	NA	NA
Late stage					
7	0	NA	1	2.7	3.67
8	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0

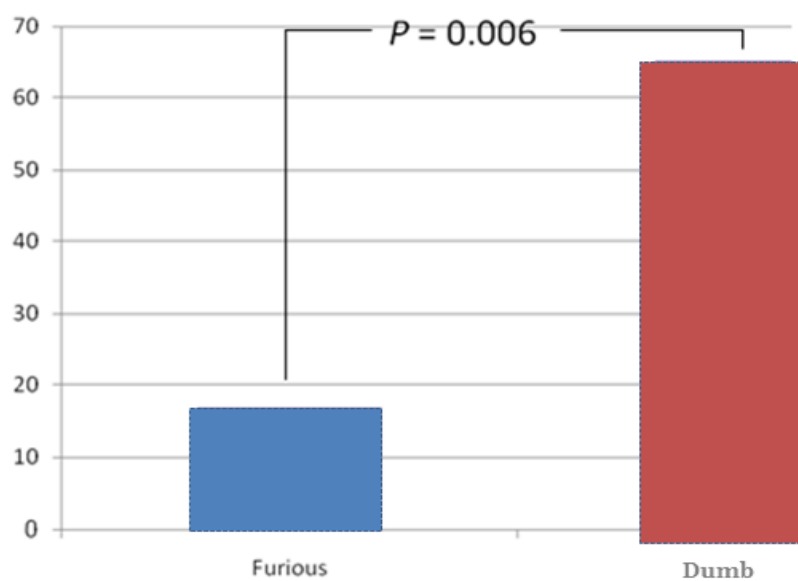
C-T : cervical - thoracic cord levels, L-S = lumbar - sacral cord levels, NA = Not available

ผลแสดงการตายของเซลล์อักเสบที่แสดงในตารางที่ 3 พบการตายของเซลล์อักเสบทั้งในตัวอย่างสุนัขบ้ากลุ่มอาการคลุ้มคลั่งและกลุ่มอาการเซื่องซึม ในระยะแรกของโรค (early stage) ที่บริเวณก้านสมอง (brainstem) และไขสันหลัง (spinal cord) ส่วนบริเวณ frontal และ hippocampus ไม่พบการตายของเซลล์อักเสบเช่นเดียวกับเซลล์ประสาท สำหรับในระยะท้ายของโรค (late stage) ทั้งในกลุ่มอาการคลุ้มคลั่งและกลุ่มอาการเซื่องซึม ไม่พบการตายของเซลล์อักเสบเลยในทุกบริเวณทั้งสมองส่วน frontal, hippocampus, ก้านสมอง (brainstem) และไขสันหลัง (spinal cord) ยกเว้นในตัวอย่างที่ 7 ที่เป็นตัวอย่างสุนัขบ้ากลุ่มอาการเซื่องซึม ที่พบการตายของเซลล์อักเสบเล็กน้อยบริเวณก้านสมอง (brainstem) และไขสันหลัง (spinal cord) ภาพที่ 5 แสดงตัวอย่างภาพของสมองและไขสันหลังที่ทำการย้อม TUNEL แล้วไม่พบการตายของเซลล์อักเสบเลย

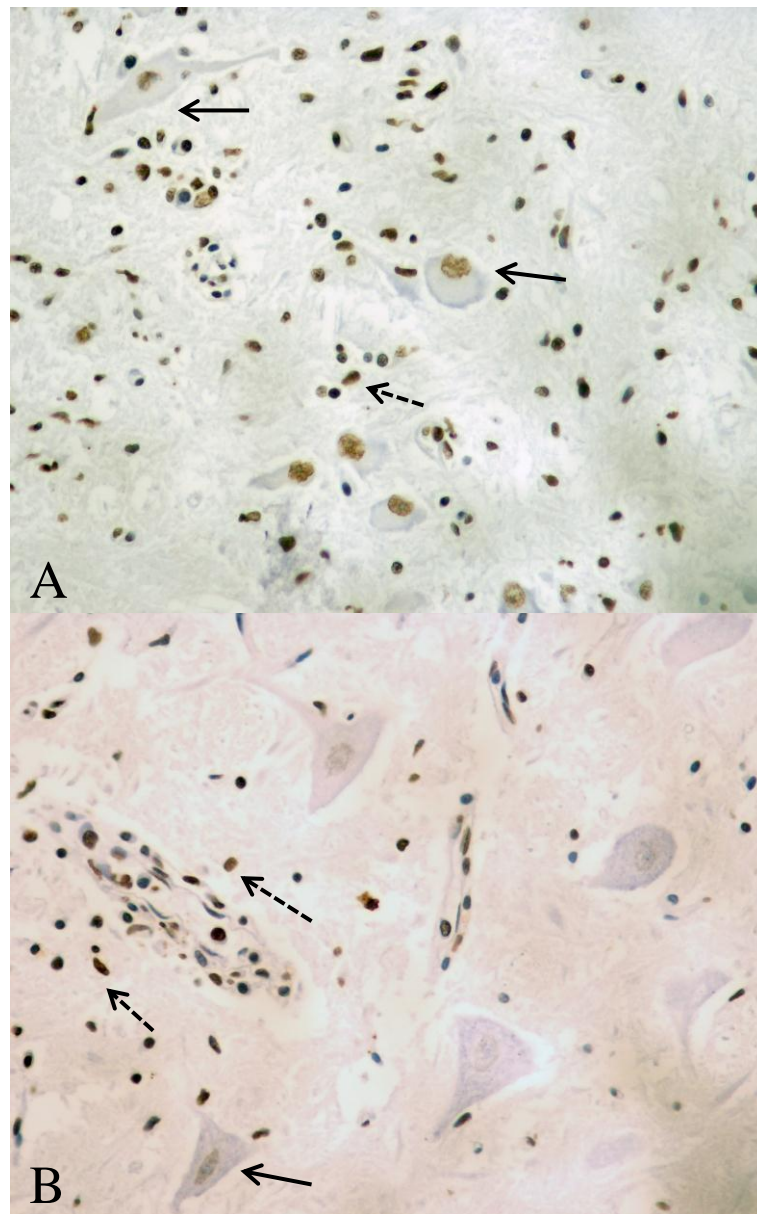
จะเห็นว่าที่บริเวณก้านสมอง (brainstem) ในระยะแรกของโรค (early stage) แสดงแนวโน้มชัดเจนว่า ในตัวอย่างสุนัขกลุ่มเซื่องซึมพบการตายของเซลล์อักเสบมากกว่าในตัวอย่างสุนัขกลุ่มคลุ้มคลั่งในทุกตัวอย่างที่ทำการศึกษา ซึ่งแสดงแนวโน้มที่เห็นได้ชัดเจนดังแผนภูมิที่ 3 ซึ่งผลพบว่าในตัวอย่างสุนัขกลุ่มเซื่องซึม พบค่าการตายของเซลล์อักเสบ (TUNEL positive inflammatory cell/ 0.0705 mm²) อยู่ที่ 34.07, 99.5, 64.71, 28.44, 41.32 และ 28.84 ในตัวอย่างที่ 1-6 ตามลำดับ และพบค่าการตายของเซลล์อักเสบ (TUNEL Positive Inflammatory Cell/ 0.0705 mm²) อยู่ที่ 22.26, 16.5, 20.88, 8.3 และ 0.65 ในตัวอย่างที่ 1-5 ของตัวอย่างสุนัขกลุ่มคลุ้มคลั่งตามลำดับ โดยค่าเฉลี่ยการตายของเซลล์อักเสบที่บริเวณก้านสมอง (brainstem) ในระยะแรกของโรค (early stage) นี้ พบว่ากลุ่มเซื่องซึม (dumb) มีค่าเฉลี่ยการตายของเซลล์อักเสบมากกว่ากลุ่มคลุ้มคลั่ง (furious) อย่างมีนัยสำคัญ (กลุ่มเซื่องซึม 65.07 ± 24 กลุ่มคลุ้มคลั่ง 17.082 ± 16.42 $P=0.006$) ดังแผนภูมิที่ 4 โดยภาพที่ 4 แสดงตัวอย่างการย้อม TUNEL ที่บริเวณก้านสมอง (brainstem) ในระยะแรกของโรค (early stage) ที่แสดงการตายของเซลล์อักเสบในตัวอย่างสุนัขกลุ่มเซื่องซึมที่พบมากกว่าในตัวอย่างสุนัขกลุ่มคลุ้มคลั่ง



แผนภูมิที่ 3 แสดงการตายของเซลล์อักเสบที่กำนสมองใน early stage (TUNEL positive inflammatory cell / 0.0705 mm²)



แผนภูมิที่ 4 แสดงค่าเฉลี่ยการตายของเซลล์อักเสบที่กำนสมองใน early stage



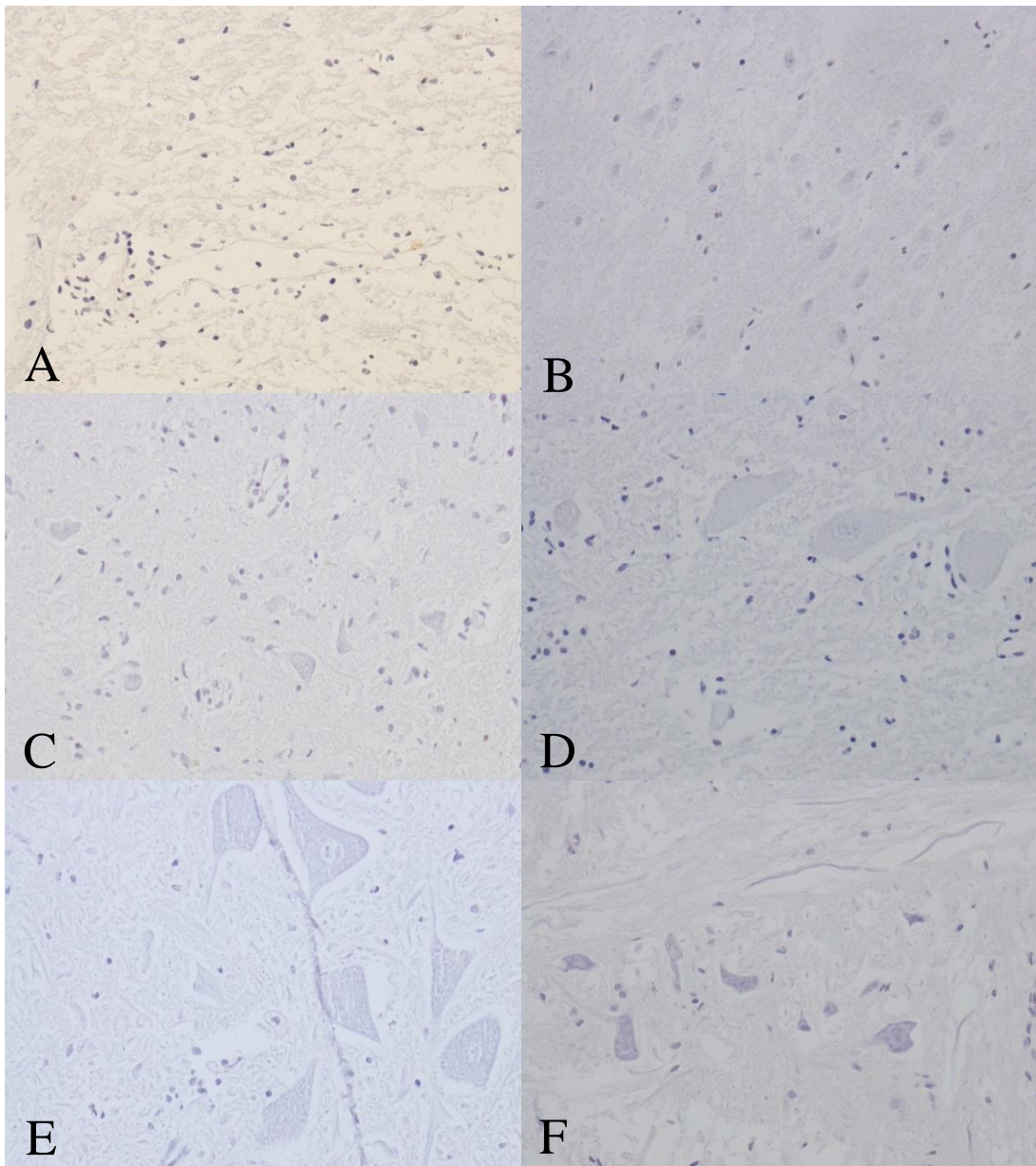
ภาพที่ 4 แสดงผลการย้อม TUNEL : แสดงการตายของเซลล์ประสาท และเซลล์อักษะ ที่ก้านสมองใน early stage

(จากกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยายขนาด 400 เท่า)

รูป A : กลุ่มอาการเซ็งซิม

รูป B : กลุ่มอาการคัมคั้ง

การตายของเซลล์ประสาท (ลูกศรเส้นทึบ), เซลล์อักษะ (ลูกศรเส้นประ)



ภาพที่ 5 แสดงผลการย้อม TUNEL : ไม่พบการตายของเซลล์ประสาทและเซลล์อักเสบใน late stage ทั้งในกลุ่มเชิงซีม (A, C, E) และกลุ่มคลุ้มคลั่ง (B, D, F)

(จากกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยายขนาด 400 เท่า)

รูป A, B : บริเวณ frontal

รูป C, D : บริเวณ hippocampus

รูป E, F : บริเวณ spinal cord

บทที่ 5

อภิปรายผลการวิจัย

โรคพิษสุนัขบ้า เป็นโรคติดเชื้อทางระบบประสาทที่มีสาเหตุมาจากเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า (Rabies virus) การติดเชื้อโรคพิษสุนัขบ้าในคนและสุนัขก่อให้เกิดอาการ 2 รูปแบบคือแบบคลุ้มคลั่ง และแบบอ่อนแรง (เซื่องซึมในสุนัข) ซึ่งระยะเวลาตั้งแต่เริ่มแสดงอาการจนกระทั่งเสียชีวิต โดยเฉลี่ยจะยาวนานกว่าในผู้ป่วยที่แสดงอาการแบบอ่อนแรง (11 วัน) เมื่อเทียบกับผู้ป่วยที่แสดงอาการแบบคลุ้มคลั่ง (5.7 วัน) [10,11]

พยาธิกำเนิดของอาการทั้งสองแบบที่ต่างกันนี้ ยังไม่ทราบแน่ชัด จากการศึกษาก่อนหน้านี้ ไม่พบความแตกต่างของตัวเชื้อพิษสุนัขบ้า ที่ศึกษาโดยการถอดรหัสพันธุกรรมของยีนไวรัสชนิด glycoprotein (G), nucleoprotein (N) และ phosphoprotein (P) gene จากสมองของคนและสุนัขที่ติดเชื้อพิษสุนัขบ้าในระยะท้ายของโรค [14] จากการศึกษาภาพสมองด้วยเครื่องสแกนแม่เหล็กไฟฟ้า (MRI) ในผู้ป่วย ก็ไม่พบความแตกต่างกันระหว่างสองกลุ่มอาการ [5] รวมทั้งไม่พบความแตกต่างของการกระจายตัวของเชื้อไวรัสในสมองและไขสันหลังจากการตรวจศพคนไข้ที่เสียชีวิต [13] การอักเสบในระบบประสาทก็พบเพียงเล็กน้อยในผู้ป่วยทั้งสองกลุ่มอาการ [13]

อย่างไรก็ตาม การศึกษาการกระจายของเชื้อพิษสุนัขบ้าในสมองสุนัขบ้าในระยะแรกของโรค พบปริมาณแอนติเจนและ RNA ของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าในสุนัขบ้าแบบคลุ้มคลั่ง มากกว่าในสุนัขบ้ากลุ่มอาการเซื่องซึม [15,16] และจากการศึกษาภาพสมองด้วยเครื่องสแกนแม่เหล็กไฟฟ้า (MRI) และการตรวจวัดระดับการแสดงออกของยีน cytokine พบว่าในสุนัขบ้ากลุ่มอาการเซื่องซึมมีการแสดงออกของยีนในกลุ่มนี้มากกว่าสุนัขบ้าแบบคลุ้มคลั่ง โดยการแสดงออกของยีน interleukin-1 β และ interferon- γ จะพบเฉพาะในสุนัขบ้ากลุ่มอาการเซื่องซึมเท่านั้น [15] นอกจากนี้ MRI ในสุนัขบ้ากลุ่มอาการเซื่องซึมยังพบสัญญาณ fluid attenuated inversion recovery (FLAIR) สูงบริเวณก้านสมอง [51] บ่งบอกถึง neural tract ที่เสียหาย ซึ่งสัมพันธ์กับการอักเสบรุนแรงที่บริเวณดังกล่าวของสุนัขบ้ากลุ่มอาการเซื่องซึม [15,16] การอักเสบโดยเฉพาะที่ก้านสมอง และการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันของสุนัขบ้ากลุ่มอาการเซื่องซึมจึงน่าจะเป็นปัจจัยหนึ่งที่ส่งผลให้ปริมาณไวรัสที่พบในสุนัขบ้าแบบเซื่องซึม มีปริมาณที่น้อยกว่าสุนัขบ้าที่แสดงอาการคลุ้มคลั่ง [16]

Apoptosis เป็นกลไกการตายชนิดหนึ่งของเซลล์ซึ่งเกิดจากการกระตุ้นผ่าน death pathway ภายในเซลล์ จัดเป็นกลไกหนึ่งในการลดการแพร่กระจายของเชื้อไวรัสของร่างกายโดยการทำลายเซลล์ที่มีการติดเชื้อไวรัส [39] โดยไวรัสหลายชนิดสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการ apoptosis ในเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัส เช่น vesicular stomatitis virus สามารถเพิ่มระดับการแสดงออกของโปรตีน

Bax ซึ่งจัดเป็น pro death molecule สามารถกระตุ้นให้เกิด apoptosis ผ่าน intrinsic pathway นอกจากนี้โปรตีนของไวรัสบางตัวยังสามารถหลบหลีกการเกิด apoptosis ได้ เช่น ในการติดเชื้อ adenovirus จะยับยั้งการเกิด apoptosis โดยการทำลาย p53 โดยโปรตีนของไวรัสที่ชื่อ E1B-55K ซึ่ง p53 เป็น transcriptional factor ทำหน้าที่ในการควบคุม cell cycle [40]

ในการติดเชื้อโรคพิษสุนัขบ้าตามธรรมชาตินั้น ไวรัสสามารถหลีกเลี่ยงการป้องกันของร่างกายได้ โดยพบการตายแบบ apoptosis ของ T lymphocyte ที่เคลื่อนที่เข้าสู่เนื้อเยื่อระบบประสาทส่วนกลาง ด้วยกลไก Fas/ FasL apoptosis pathway ซึ่งการติดเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าจะการเพิ่มการแสดงออกของ Fas ligand ของเซลล์ประสาท ส่งผลให้เมื่อจับกับ Fas receptor ของ lymphocyte จะกระตุ้นให้ lymphocyte ตายแบบ apoptosis ซึ่งเป็นกลไกสำคัญของไวรัสในการหลบเลี่ยงการถูกกำจัด โดยเซลล์อักเสบ ทำให้เชื้อแพร่กระจายได้ดียิ่งขึ้น [45] ในการติดเชื้อพิษสุนัขบ้าตามธรรมชาติโดยส่วนใหญ่แล้วจึงพบ apoptosis เฉพาะกับเซลล์อักเสบเท่านั้น [21-23] โดยไม่พบ apoptosis ของเซลล์ประสาท (neuron) [21, 22, 48, 49, 52] ยกเว้นในผู้ป่วยโรคเอดส์ 2 รายที่เป็นโรคพิษสุนัขบ้า แล้วมีรายงานว่าตรวจพบ apoptosis ของเซลล์ประสาท [49]

สำหรับเชื้อพิษสุนัขบ้าสายพันธุ์ห้องปฏิบัติการ พบว่ามีความหลากหลายของเชื้อ ซึ่งมีผลต่อการเหนี่ยวนำการตายของเซลล์ต่างๆ โดยจากการศึกษาที่ผ่านมาพบการตายของเซลล์ของหนูที่เป็นมะเร็งต่อมลูกหมาก (AT3) ที่ติดเชื้อพิษสุนัขบ้าแบบรุนแรง (CVS) [53] และเชื้อพิษสุนัขบ้า ERA (Evelyn Rotnycki Abelseth) ซึ่งเป็นสายพันธุ์ไม่รุนแรง (attenuated strain) เหนี่ยวนำให้เกิดการตายของ Jurkat T-cells ในหลอดทดลอง [54] โดยพบการตายของเซลล์ประสาทจากเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าสายพันธุ์ไม่รุนแรงครั้งแรกใน Neuroblastoma cell line [55] และในอีกหลาย ๆ การศึกษาต่อมา [46, 47, 53, 56] ในหนูที่ได้รับเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าสายพันธุ์ไม่รุนแรง (CVS-11) ก็พบการตายของเซลล์ประสาทแบบ apoptosis [23] กล่าวโดยสรุปคือ เชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าตามธรรมชาติมีความรุนแรงสูง กระตุ้นให้เกิด apoptosis ของเซลล์อักเสบ แต่ไม่ทำให้เซลล์ประสาทตาย ในทางตรงกันข้าม เชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าสายพันธุ์ห้องปฏิบัติการมักมีความรุนแรงน้อย ทำให้เกิด apoptosis ของเซลล์ประสาท และกระตุ้นให้มีกระบวนการอักเสบได้มาก

สืบเนื่องจากการศึกษาในสุนัขบ้าก่อนหน้านี้นี้ที่พบการอักเสบที่มากกว่าในสุนัขบ้าแบบเชื่องซึม (ซึ่งเป็นลักษณะที่สอดคล้องกับเชื้อที่ไม่รุนแรงมาก ที่มักทำให้เกิด apoptosis ของเซลล์ประสาท) โดยเฉพาะที่ก้านสมอง [15,16] และลักษณะอีกหลายประการที่แตกต่างกันระหว่างสุนัขทั้งสองกลุ่มอาการในระยะแรกของโรค (ซึ่งจะไม่พบเมื่อการดำเนินโรคไปถึงระยะท้าย) คณะผู้วิจัยจึงมีสมมุติฐานว่า อาจมีการตายของเซลล์ประสาทแบบ apoptosis ในสุนัขบ้าแบบเชื่องซึม อาจจะเป็น

อีกปัจจัยหนึ่ง (ที่นอกเหนือไปจากการอักเสบ) ที่ช่วยชะลอเชื้อไวรัสไม่ให้แพร่กระจายเข้าสู่สมอง โดยเร็ว

จากการศึกษาครั้งนี้ พบว่าได้ผลเป็นไปตามสมมุติฐานคือพบ apoptosis ของเซลล์ประสาท โดยเฉพาะที่บริเวณก้านสมอง ในสุนัขที่บ้าแบบเชื่องซึม จำนวนเซลล์อักเสบที่เกิด apoptosis ก็มีความสอดคล้องกับปริมาณเซลล์อักเสบที่พบได้มากกว่าในสุนัขบ้าแบบเชื่องซึมเช่นกัน เป็นที่น่าสังเกตว่าการตายของเซลล์ประสาทนี้ จะตรวจพบได้เฉพาะในระยะแรกของโรคเท่านั้น กล่าวคือ เมื่อโรคดำเนินไปถึงระยะท้าย ก็จะไม่พบ apoptosis ของเซลล์ประสาทซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ที่ไม่พบการตายของเซลล์ประสาทในการติดเชื้อตามธรรมชาติ เพราะที่ผ่านมาเป็นการศึกษาที่ระยะท้ายของโรคทั้งสิ้น [21-23]

การตายของเซลล์ประสาทแบบ apoptosis ที่พบเฉพาะในช่วงแรกของโรคนี้ สันนิษฐานได้ว่าอาจมีเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าหลายสายพันธุ์ในระยะเริ่มแรกของโรค ซึ่งคณะผู้วิจัยกำลังทำการถอดรหัสพันธุกรรมอยู่ในโครงการวิจัยอีกโครงการหนึ่ง รวมทั้งกำลังศึกษาการแสดงออกของยีนไวรัสพิษสุนัขบ้าคือยีน glycoprotein (G), nucleoprotein (N) และ phosphoprotein (P) ด้วย จากการศึกษาที่ผ่านมา พบว่าไวรัสพิษสุนัขบ้าสายพันธุ์รุนแรงพบอัตราส่วนของยีน G/N และพบการตายของ primary neuron cell line ต่ำกว่าที่พบไวรัสพิษสุนัขบ้าสายพันธุ์ไม่รุนแรง [57] และใน recombinant virus ที่มียีน G สองชุดในสายพันธุกรรม จะทำให้เกิดการตายของเซลล์ (apoptosis) มากกว่าไวรัสที่มียีน G เพียงชุดเดียว [58]

ข้อจำกัดของการศึกษาในครั้งนี้ คือจำนวนตัวอย่างที่ใช้ศึกษามีค่อนข้างน้อย โดยเฉพาะในส่วนของไขสันหลัง จึงควรที่จะทำการศึกษาเพิ่มเติมต่อไปในอนาคต เพื่อยืนยันสิ่งที่ตรวจพบในการศึกษาครั้งนี้

โดยสรุป คณะผู้วิจัยตรวจพบการตายของเซลล์ประสาทแบบ apoptosis ในระบบประสาทส่วนกลางของสุนัขบ้าที่ติดเชื้อตามธรรมชาติที่มีอาการในระยะเริ่มแรกของโรค โดยพบการตายของเซลล์ประสาทมากที่สุดที่ก้านสมองของสุนัขบ้าแบบเชื่องซึม การตายของเซลล์ประสาทนี้น่าจะเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ขัดขวางไม่ให้เชื้อไวรัสแพร่เข้าสู่สมองได้โดยง่าย และอาจอธิบายถึงระยะเวลาการอยู่รอดที่ยาวนานกว่าของสุนัขรวมไปถึงผู้ป่วยกลุ่มอ่อนแรงแม่เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่มีอาการคลุ้มคลั่ง

รายการอ้างอิง

1. Hemachudha, T., et al., *Failure of therapeutic coma and ketamine for therapy of human rabies*. J Neurovirol, 2006. 12(5): p. 407-9.
2. Chuxnum T., Choomkasian P., *Epidemiology of Human Rabies in Thailand., B.E.2546 - -2550 (2003 – 2007 AD)*. Tren Res Sci Technol, 2: p. 71-5.
3. World Health Organization, *WHO expert consultation on rabies: first report*. 2005. Geneva: WHO.
4. Global Alliance for Rabies Control. <http://www.rabiescontrol.net>.
5. Laothamatas, J., et al., *MR imaging in human rabies*. AJNR Am J Neuroradiol, 2003. 24(6): p. 1102-9.
6. Hemachudha T., Laothamatas J., Rupprecht CE., *Human rabies: A disease of complex neuropathogenetic mechanisms and diagnostic challenges*. Lancet Neurol, 2002. 1: p. 101-9
7. Hemachudha T., *Rabies*. In: Vinken P, Briyn GW, Klawans HL (eds). *Handbook of Clinical Neurology, Revised Series*. Amsterdam. Elsevier Science Publishers, 1989. p. 383-404.
8. Winkler WG., Fashinell TR., Leffingwell L., Howard P., Conomy JP., *Airborne rabies transmission in a laboratory worker*. JAMA, 1973. 226: p. 1219-21.
9. Hemachudha T., Wacharapluesadee S., Laothamatas J., Wilde H., *Rabies*. Curr Neurol Neurosci, 2006. 6: p. 460-8.
10. Mitrabhakdi E., Shuangshoti S., Wannakrairot P., Lewis RA., Susuki K., Laothamatas J., Hemachudha T., *Difference in neuropathogenetic mechanisms in human furious and paralytic rabies*. J Neurol Sci, 2005. 238: p. 3-10.
11. Hemachudha T., Ugolini G., Wacharapluesadee S., Sungkarat W., Shuangshoti S., Laothamatas J., *Human rabies: neuropathogenesis, diagnosis and management*. Lancet Neurol, 2013. 12: p. 498-513.
12. Hemachudha T., Wacharapluesadee S., Mitrabhakdi E., Wilde H., Morimoto K., Lewis RA., *Pathophysiology of human paralytic rabies*. J Neurovirol, 2005. 11: p. 93-100.

13. Tirawatnpong S., Hemachudha T., Manutsathit S., Shuangshoti S., Phanthumchida K., Phanuphak P., *Regional distribution of rabies viral antigen in central nervous system of human encephalitic and paralytic rabies*. J Neurol Sci, 1989. 92: p. 91-9.
14. Hemachuda T., Wacharapluesadee S., Lumlertdaecha B., Orciari LA., Rupprecht CE., La-Ongpant M., et al., *Sequence analysis of rabies virus in humans exhibiting encephalitis or paralytic rabies*. J Infect Dis, 2003. 188: p. 960-6.
15. Laothamatas, J., et al., *Furious and paralytic rabies of canine origin: neuroimaging with virological and cytokine studies*. J Neurovirol, 2008. 14(2): p. 119-29.
16. Shuangshoti, S., et al., *Reduced viral burden in paralytic compared to furious canine rabies is associated with prominent inflammation at the brainstem level*. BMC Vet Res, 2013. 9: p. 31.
17. Dietzschold B, Morimoto K, Hooper D.C. Mechanisms of virus-induced neuronal damage and the clearance of viruses from the CNS. *Curr. Top. Microbiol. Immunol* 2001; 253: 145–155.
18. Yan X, Mohankumar P.S, Dietzschold B, Schnell M.J, Fu Z.F. The rabies virus glycoprotein determines the distribution of different rabies virus strains in the brain. *J. Neurovirol* 2002; 8(4): 345–352.
19. Razvi E. S. and Welsh R. M. Apoptosis in viral infections. *Advances in Virus Research* 1995; 45: 1–60.
20. Lafon M., *Evasive strategies in rabies virus infection*. Adv Virus Res, 2011. 79: p. 33-53.
21. Jackson A.C., Randle E., Lawrance G., and Rossiter J.P., *Neuronal apoptosis does not play an important role in human rabies encephalitis*. Journal of NeuroVirology, 2008. 14(5): p. 368–75.
22. Suja MS., Mahadevan A., Madhusudhana SN., Vijayasarathi SK., and Shankar SK., *Neuroanatomical mapping of rabies nucleocapsid viral antigen distribution and apoptosis in pathogenesis in street dog rabies-an immunohistochemical study*. Clinical Neuropathology, 2009. 28(2): p. 113–24.

23. Suja MS., Mahadevan A., Madhusudana SN., Shankar SK., *Role of apoptosis in rabies viral encephalitis: a comparative study in mice, canine, and human brain with a review of literature.* Patholog Res Int 2011, 2011. p. 374286.
24. Wunner W. *Rabies virus.* In :Jackson AC., Wanner WH, editor. Rabies. Amsterdam. Academic Press, 2002. p. 23-77.
25. Arai YT., Kuzmin IV., Kameoka Y., Botvinkin AD., *New lyssavirus genotype from the Lesser Mouse-eared Bat (Myotis blythi), Kyrgyzstan.* Emerg Infect Dis, 2003. 9: p. 333-7.
26. Botvinkin AD., Poleschuk EM., Kuzmin IV., Borisova TI., Gazaryan SV., et al., *Novel lyssaviruses isolated from bats in Russia.* Emerg Infect Dis, 2003. 9: p. 1623-5.
27. Wu X., Gong X., Foley H.D., Schnell M.J., Fu Z.F., *Both viral transcription and replication are reduced when the rabies virus nucleoprotein is not phosphorylated.* J Virol, 2002. 76: p. 4153-4161.
28. Finke S., J.H Cox., and K.K. Conzelmann., *Differential transcription attenuation of rabies virus genes by intergenic regions: generation of recombinant viruses overexpressing the polymerase gene.* J Virol, 2000. 74(16): p. 7261-9.
29. Albertini A.A., R.W Ruigrok., and D. Blondel., *Rabies virus transcription and replication.* Adv Virus Res, 2011. 79: p. 1-22.
30. Charlton K.M. and G.A. Casey., *Experimental oral and nasal transmission of rabies virus in mice.* Can J Comp Med, 1979. 43(1): p. 10-5.
31. Jackson A.C., *Pathogenesis.* Rabies., ed. A.a.W. Jackson, H.W. . 2007, London: Academic press.
32. Hemachudha T., *Rabies.* In: Roos K. *Central Nervous System Infectious Disease and Therapy.* New York: Marcel Dekker, 1997. p. 573-600.
33. Roy A., Phares T.W., Koprowski H., and Hooper D.C., *Failure to open the Blood brain barrier and deliver immune effectors to central nervous system tissue leads to the lethal outcome of silver-haired bat rabies virus infection.* J Virol, 2006. 81: p. 1110-8.

34. Hanlon C.A., Niezgoda M. and Rupprecht C.E., *Rabies in terrestrial animals*. Rabies., ed. A.C. Jackson. 2007, London: Academic press.
35. Sheikh KA., Ramos- Alvares M., Jackson AC., Li CY., Asbury Ak., and Griffin JW., *Overlap of pathology in paralytic rabies and axonal Guillain-Barré syndrome*. Ann Neurol, 2005. 57(5): p. 768-72.
36. Hemachudha T., Phanthumchinda K., Phanuphak P., and Manutsathit S., *Myoedema as a clinical sign in paralytic rabies*. Lancet, 1987. 1: p. 1210.
37. Makonnen F., *Pathogenesis of rabies virus Infection in dog*. J Infectious diseases, 1988. 10(4): p. 678-83.
38. Schmitz I., Kirchhoff S., Krammer P.H., *Regulation of death receptormediated apoptosis pathways*. Int. J. Biochem. Cell Biol, 2000. 32: p. 11–2, 1123–36.
39. Barber GN., *Host defense, viruses and apoptosis*. Cell Death and Differentiation, 2001. 8: p. 113-26.
40. Elmore SS., *Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death*. Toxicol Pathol, 2007. 35(4): p. 495–516.
41. Liam P., Grant N., Caitlin C., Matthew G., Michael T., *Greenwood Anti-apoptosis and cell survival: A review*. Biochimica et Biophysica Acta, 2011. 1813: p. 238–59.
42. Joseph A., Trapani and Mark J. Smyth., *Funtional significance of thw perforin/granzyme cell death pathway*. Nature Rev, 2002.
43. Dietzschold B., Morimoto K., Hooper D.C., *Mechanisms of virus-induced neuronal damage and the clearance of viruses from the CNS*. Curr. Top. Microbiol. Immunol, 2001. 253: p. 145–55.
44. Thompson C.B., *Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease*. Science, 1995. 267: p. 1456–62
45. Baloul L., Camelo S., Lafon M., *Up-regulation of Fas ligand (FasL) in the central nervous system: a mechanism of immune evasion by rabies virus*. J Neurovirol, 2004. 10: p. 372-82.
46. Jackson A.C., and Park H., *Apoptotic cell death in experimental rabies in suckling mice*. Acta Neuropathologica, 1998. 95(2): p. 159–64.

47. Theerasurakarn S., and Ubol S., *Apoptosis induction in brain during the fixed strain of rabies virus infection correlates with onset and severity of illness*. *Journal of NeuroVirology*, 1998. 4(4): p. 407–14.
48. Yan X., Prośniak M., Curtis M. T et al. Silver-haired bat rabies virus variant does not induce apoptosis in the brain of experimentally infected mice. *Journal of NeuroVirology* 2001; 6: 518–527.
49. Adle-Biassette H., Bourhy H., Gisselbrecht M., et al., *Rabies encephalitis in a patient with AIDS: a clinicopathological study*. *Acta Neuropathologica*, 1996. 92(4): p. 415–20.
50. Wirblich C., and Schnell M.J., *Rabies virus (RV) glycoprotein expression levels are not critical for pathogenicity of RV*. *J Virol*, 2011. 85(2): p. 697-704.
51. Laothamatas J., Sungkarat W., Hemachudha T., *Neuroimaging in rabies*. *Adv Virus Res*, 2011. 79: p. 309–27.
52. Ubol S., Kasisith J., Pitidhamabhorn D., and Tepsumethanol V., *Screening of pro-apoptotic genes upregulated in an experimental street rabies virus-infected neonatal mouse brain*. *Microbiology and Immunology*, 2005. 49(5): p. 423–31.
53. Jackson A. C., and Rossiter J. P., *Apoptosis plays an important role in experimental rabies virus infection*. *Journal of Virology*, 1997. 71(7): p. 5603–07.
54. Thoulouze M. I., Rossiter J. P., Montano-Hirose J. A., and Lafon M., *Rabies virus infects mouse and human lymphocytes and induces apoptosis*. *Journal of Virology*, 1997. 71: p. 5603– 07.
55. Ubol S., Sukwattanapan C., and Utaisinchaoen P., *Rabies virus replication induces Bax-related, caspase dependent apoptosis in mouse neuroblastoma cells*. *Virus Research*, 1998. 56(2): p. 207–15.
56. Rutherford M., and Jackson A. C., *Neuronal apoptosis in immunodeficient mice infected with the challenge virus standard strain of rabies virus by intracerebral inoculation*. *Journal of NeuroVirology*, 2004. 10(6): p. 409–13.

57. Morimoto K., et al., *Pathogenicity of different rabies virus variants inversely correlates with apoptosis and rabies virus glycoprotein expression in infected primary neuron cultures.* J Virol, 1999. 73(1): p. 510-8.
58. Faber M., et al., *Overexpression of the rabies virus glycoprotein results in enhancement of apoptosis and antiviral immune response.* J Virol, 2002. 76(7): p. 3374-81.





ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

**ตารางผลการวิเคราะห์การตายของเซลล์อักเสบและเซลล์ประสาทในสุนัขบ้าชนิดกลุ่มคลั่ง
(Furious) ในระยะแรกของโรค (Early stage) บริเวณก้านสมอง (Brainstem)
และไขสันหลัง (Spinal cord)**

Case 1

Brainstem	Positive inflammatory cell	TUNEL positive inflammatory cell / 0.0705 mm ²	Negative neuron	Positive neuron	Total neuron	% TUNEL positive neuron
21248_001	21		2	3		
21248_002	36		9	2		
21248_003	25		6	3		
21248_004	41		4	1		
21248_005	20		2	1		
21248_006	9		5	2		
21248_007	35		4	5		
21248_008	31		3	7		
21248_009	18		4	2		
21248_010	33		4	1		
21248_011	15		6	1		
21248_012	19		15	0		
21248_013	21		14	5		
21248_014	22		5	2		
21248_015	28		6	3		
21248_016	31		5	5		
21248_017	36		7	3		
21248_018	15		12	0		
21248_019	23		8	0		
21248_020	3		7	0		
21248_021	15		11	0		
21248_022	10		17	0		
21248_023	22		13	0		
21248_024	26		5	3		
21248_025	23		3	2		
21248_026	11		5	2		
21248_027	20		5	1		
21248_028	25		6	3		
21248_029	21		12	1		
21248_030	37		9	1		
21248_031	23		7	0		
21248_032	26		6	1		
21248_033	28		3	3		
21248_034	22		2	6		
21248_035	12		0	1		
21248_036	23		9	3		
21248_037	22		9	0		
21248_038	12		8	1		
21248_039	16		8	0		
21248_040	11		8	2		

21248_041	14		8	0		
21248_042	14		6	3		
21248_043	42		6	1		
total pictures: 43	957	22.26	294	80	374	21.39

Case 2

Brainstem	Positive inflammatory cell	TUNEL positive inflammatory cell / 0.0705 mm ²	Negative neuron	Positive neuron	Total neuron	% TUNEL positive neuron
22848_001	32		6	3		
22848_002	19		5	2		
22848_003	23		4	0		
22848_004	25		2	0		
22848_005	6		16	3		
22848_006	8		13	0		
22848_007	22		7	0		
22848_008	8		16	0		
22848_009	15		5	0		
22848_010	35		5	0		
22848_011	5		4	0		
22848_012	15		6	0		
22848_013	27		4	0		
22848_014	17		6	0		
22848_015	19		14	0		
22848_016	20		11	0		
22848_017	21		13	0		
22848_018	4		13	0		
22848_019	7		15	0		
22848_020	2		11	0		
total pictures: 20	330	16.5	176	8	184	4.35

Case 3

Brainstem	Positive inflammoty cell	TUNEL positive inflammatory cell / 0.0705 mm ²	Negative neuron	Positive neuron	Total neuron	% TUNEL positive neuron
11/48_01	12		2	3		
11/48_02	12		0	2		
11/48_03	15		1	1		
11/48_04	20		0	2		
11/48_05	27		1	1		
11/48_06	28		1	2		
11/48_07	45		0	4		
11/48_08	33		3	0		
11/48_09	15		2	0		
11/48_10	24		1	0		
11/48_11	17		1	0		
11/48_12	8		1	0		
11/48_13	26		3	0		
11/48_14	15		2	0		
11/48_15	25		2	0		
11/48_16	21		1	0		
11/48_017	12		0	0		
total pictures: 17	355	20.88	21	15	36	41.67

Spinal cord: cervical - thoracic cord levels	Positive inflammatory cell	TUNEL positive inflammatory cell / 0.0705 mm ²	Negative neuron	Positive neuron	Total neuron	% TUNEL positive neuron
D2270064	23		0	0		
D2270065	14		4	0		
D2270066	11		2	0		
D2270067	2		1	0		
D2270068	17		2	0		
D2270069	38		2	0		
D2270070	42		3	1		
D2270071	26		3	1		
D2270072	33		2	0		
D2270073	38		1	0		
D2270074	36		4	1		
D2270076	0		3	0		
D2270077	7		2	0		
D2270078	12		1	0		
D2270079	19		2	0		
D2270080	0		2	0		
D2270081	6		1	0		
D2270082	6		3	0		
D2270083	4		2	0		
D2270084	7		3	0		
D2270085	5		1	0		
total pictures: 21	364	16.48	44	3	47	6.38

Spinal cord: lumbar - sacral cord levels	Positive inflammatory cell	TUNEL positive inflammatory cell / 0.0705 mm ²	Negative neuron	Positive neuron	Total neuron	% TUNEL positive neuron
D2270087	64		2	2		
D2270088	38		1	0		
D2270089	68		1	1		
D2270090	89		1	0		
D2270091	30		2	0		
D2270092	40		2	0		
D2270093	44		2	2		
total pictures: 7	373	53.29	11	5	16	31.25

Case 4

Brainstem	Positive inflammatoty cell	TUNEL positive inflammatory cell / 0.0705 mm ²	Negative neuron	Positive neuron	Total neuron	% TUNEL positive neuron
443/49_01	7		0	0		
443/49_02	0		3	0		
443/49_03	0		11	0		
443/49_04	0		3	0		
443/49_05	1		3	0		
443/49_06	0		10	0		
443/49_07	19		4	3		
443/49_08	33		2	6		
443/49_09	21		1	0		
443/49_10	2		4	0		
total pictures: 10	83	8.3	41	9	50	18

Spinal cord: lumbar - sacral cord levels	Positive inflammatoty cell	TUNEL positive inflammatory cell / 0.0705 mm ²	Negative neuron	Positive neuron	Total neuron	% TUNEL positive neuron
D8140001	37		0	0		
D8140002	10		2	0		
D8140003	27		2	0		
D8140004	29		2	0		
D8140005	16		3	0		
D8140006	9		5	4		
D8140007	2		2	0		
D8140008	21		2	1		
D8140009	8		2	0		
D8140010	27		2	1		
D8140011	22		3	0		
D8140012	22		2	0		
D8140013	7		2	0		
D8140014	2		1	0		
D8140015	16		5	0		
D8140016	17		6	0		
D8140017	21		2	0		
D8140018	29		2	0		
D8140020	4		5	0		
D8140021	9		2	0		
D8140022	2		2	0		
D8140023	3		3	0		
D8140024	34		4	0		
total pictures: 23	374	16.48	61	6	67	8.96

Case 5

Brainstem	Positive inflammatory cell	TUNEL positive inflammatory cell / 0.0705 mm ²	Negative neuron	Positive neuron	Total neuron	% TUNEL positive neuron
364-48_001	3		11	0		
364-48_002	1		2	0		
364-48_003	0		3	0		
364-48_004	0		2	0		
364-48_005	1		5	0		
364-48_006	1		3	0		
364-48_007	5		4	0		
364-48_008	0		7	0		
364-48_009	1		2	0		
364-48_010	0		2	0		
364-48_011	0		5	0		
364-48_012	0		4	0		
364-48_013	0		5	0		
364-48_014	0		9	0		
364-48_015	0		5	0		
364-48_016	1		4	0		
364-48_017	0		6	0		
364-48_018	0		8	0		
364-48_019	0		13	0		
364-48_020	0		7	0		
total pictures: 20	13	0.65	107	0	107	0



ตารางผลการวิเคราะห์การตายของเซลล์อักเสบและเซลล์ประสาทในสุนัขบ้าชนิดเชื้อซิม
(Dumb) ในระยะแรกของโรค (Early stage) บริเวณก้านสมอง (Brainstem)
และไขสันหลัง (Spinal cord)

Case 1

Brainstem	Positive inflammatory cell	TUNEL positive inflammatory cell / 0.0705 mm ²	Negative neuron	Positive neuron	Total neuron	% TUNEL positive neuron
400/48_001	26		2	12		
400/48_002	19		5	3		
400/48_003	27		1	11		
400/48_004	26		0	11		
400/48_005	39		0	2		
400/48_006	44		1	8		
400/48_007	40		2	9		
400/48_008	54		4	7		
400/48_009	35		2	3		
400/48_010	29		0	7		
400/48_011	47		3	8		
400/48_012	21		0	2		
400/48_013	31		2	3		
400/48_014	16		2	3		
400/48_015	16		1	4		
400/48_016	23		2	5		
400/48_017	46		3	6		
400/48_018	29		0	17		
400/48_019	18		3	6		
400/48_020	27		4	10		
400/48_021	17		1	3		
400/48_022	23		0	6		
400/48_023	29		1	6		
400/48_024	26		0	6		
400/48_025	66		1	4		
400/48_026	119		0	5		
400/48_027	27		0	6		
total pictures: 27	920	34.07	40	173	213	81.99

Spinal cord: cervical - thoracic cord levels	Positive inflammatory cell	TUNEL positive inflammatory cell / 0.0705 mm ²	Negative neuron	Positive neuron	Total neuron	% TUNEL positive neuron
D2140089	87		3	5		
D2140090	49		1	2		
D2140091	21		2	0		
D2140092	39		1	4		
D2140093	57		4	5		
D2140094	54		4	1		
D2140095	100		1	0		
D2140096	98		0	4		
D2140097	62		3	2		
D2140098	77		1	0		
D2140099	64		3	4		
D2140100	59		0	1		
D2140101	21		0	3		
D2140102	40		3	0		
D8140001	5		6	0		
D8140002	9		2	0		
D8140003	11		2	0		
D8140004	7		2	0		
D8140005	3		4	0		
D8140007	3		4	0		
D8140008	1		1	0		
D8140009	8		4	0		
D8140010	5		2	0		
D8140011	32		1	2		
D8140012	52		0	3		
D8140013	63		1	2		
D8140014	103		0	1		
D8140015	10		3	0		
D8140016	6		4	0		
D8140017	3		3	0		
D8140018	1		3	0		
D8140019	2		2	0		
D8140020	7		3	0		
total pictures: 33	1987	60.21	73	39	112	34.82

Spinal cord: lumbar - sacral cord levels	Positive inflammato y cell	TUNEL positive inflammatory cell / 0.0705 mm ²	Negative neuron	Positive neuron	Total neuron	% TUNEL positive neuron
D2270042	68		1	2		
D2270043	89		1	0		
D2270044	40		0	2		
D2270045	28		0	1		
D2270046	11		4	0		
D2270047	23		0	1		
D2270048	30		1	0		
D2270049	48		0	2		
D2270051	28		1	1		
D2270052	60		0	6		
D2270053	49		1	4		
D2270054	37		1	3		
D2270055	31		1	0		
D2270056	47		3	0		
D2270057	48		0	0		
D2270058	103		1	3		
D2270059	67		2	2		
D2270060	69		1	1		
D2270061	19		1	1		
D2270062	32		1	3		
total pictures: 20	924	46.2	20	32	52	61.54

Case 2

Brainstem	positive inflammatory cell	TUNEL Positive Inflammatory Cell / 0.0705 mm ²	negative neuron	positive neuron	total neuron	% TUNEL Positive Neuron
R148_001	104		0	6		
R148_002	94		2	5		
R148_003	95		2	0		
R148_004	131		1	0		
R148_005	145		4	0		
R148_006	115		0	4		
R148_007	63		0	5		
R148_008	55		0	3		
R148_009	99		2	1		
R148_010	67		0	1		
R148_011	55		1	1		
R148_012	54		1	0		
R148_013	141		1	0		
R148_014	131		0	1		
R148_015	73		0	2		
R148_016	55		1	2		
R148_017	206		0	1		
R148_018	46		1	4		
R148_019	160		0	2		
R148_020	101		1	2		
total pictures: 20	1990	99.5	17	40	57	70.18

Spinal cord: cervical - thoracic cord levels	Positive inflammatory cell	TUNEL positive inflammatory cell / 0.0705 mm ²	Negative neuron	Positive neuron	Total neuron	% TUNEL positive neuron
D2270006	64		3	0		
D2270007	68		3	0		
D2270008	51		2	0		
D2270009	70		3	0		
D2270010	68		2	0		
D2270011	48		1	1		
D2270012	42		2	2		
D2270013	82		0	3		
D2270014	89		0	4		
D2270016	143		0	2		
D2270017	80		3	2		
D2270018	70		3	0		
D2270019	197		3	1		
D2270020	123		0	4		
D2270021	84		1	2		
D2270022	95		0	2		
D2270023	46		0	2		
D2270024	98		2	3		
total pictures: 18	1707	94.83	28	28	56	50

Spinal cord: lumbar - sacral cord levels	Positive inflammatory cell	TUNEL positive inflammatory cell / 0.0705 mm ²	Negative neuron	Positive neuron	Total neuron	% TUNEL positive neuron
D2270026	94		0	0		
D2270027	50		1	4		
D2270028	105		1	2		
D2270029	87		2	3		
D2270030	37		0	3		
D2270031	66		0	2		
D2270032	78		0	3		
D2270034	14		1	0		
D2270035	7		2	1		
D2270036	10		2	1		
D2270037	0		3	0		
D2270038	1		4	0		
D2270039	10		1	0		
D2270040	4		4	0		
total pictures: 14	563	40.21	21	19	40	47.5

Case 3

Brainstem	positive inflammoty cell	TUNEL Positive Inflammatory Cell / 0.0705 mm ²	negative neuron	positive neuron	total neuron	% TUNEL Positive Neuron
45748_001	47		2	0		
45748_002	74		2	0		
45748_003	93		1	5		
45748_004	82		1	1		
45748_005	72		0	2		
45748_006	72		0	1		
45748_007	45		0	3		
45748_008	47		2	2		
45748_009	63		0	0		
45748_010	98		0	0		
45748_011	77		0	2		
45748_012	95		0	4		
45748_013	68		1	5		
45748_014	84		1	11		
45748_015	95		0	0		
45748_016	26		1	1		
45748_017	33		3	0		
45748_018	79		0	2		
45748_019	93		0	2		
45748_020	70		1	1		
45748_021	76		0	2		
45748_022	58		0	2		
45748_023	75		0	0		
45748_024	78		0	3		
45748_025	55		0	2		
45748_026	50		0	8		
45748_027	31		0	11		
45748_028	94		0	1		
45748_029	55		2	1		
45748_030	25		1	1		
45748_031	32		1	1		
45748_032	45		0	5		
45748_033	47		0	10		
45748_034	66		0	5		
total pictures: 34	2200	64.71	19	94	113	83.19

Case 4

Brainstem	positive inflammatory cell	TUNEL Positive Inflammatory Cell / 0.0705 mm ²	negative neuron	positive neuron	total neuron	% TUNEL Positive Neuron
15350_001	25		0	2		
15350_002	23		0	2		
15350_003	16		0	4		
15350_004	26		2	1		
15350_005	19		0	4		
15350_006	31		0	1		
15350_007	27		5	2		
15350_008	13		0	0		
15350_009	16		0	3		
15350_010	21		2	5		
15350_011	24		1	1		
15350_012	44		1	2		
15350_013	30		3	5		
15350_014	34		3	2		
15350_015	42		0	3		
15350_016	34		1	2		
15350_017	23		0	2		
15350_018	22		0	1		
15350_019	17		0	2		
15350_020	48		0	2		
15350_021	14		2	2		
15350_022	23		1	3		
15350_023	15		2	2		
15350_024	31		0	2		
15350_025	38		0	3		
15350_026	23		0	5		
15350_027	28		0	2		
15350_028	15		0	4		
15350_029	30		0	1		
15350_030	68		1	3		
15350_031	42		0	1		
15350_032	36		1	2		
15350_033	31		1	2		
15350_034	16		1	6		
15350_035	19		2	3		
15350_036	25		3	2		
15350_037	55		1	1		
15350_038	56		0	4		
15350_039	77		0	4		
15350_040	31		2	6		
15350_041	20		0	4		
15350_042	46		0	7		
15350_043	12		1	2		
total pictures:	1223	28.44	36	117	156	75

43						
----	--	--	--	--	--	--

Spinal cord: cervical - thoracic cord levels	Positive inflammatory cell	TUNEL positive inflammatory cell / 0.0705 mm ²	Negative neuron	Positive neuron	Total neuron	% TUNEL positive neuron
D8140022	0		4	0		
D8140023	0		3	0		
D8140024	0		2	0		
D8140025	0		4	0		
D8140026	1		2	0		
D8140027	0		2	0		
D8140028	0		5	0		
D8140030	0		1	0		
D8140031	0		3	0		
D8140032	0		6	0		
D8140033	0		5	0		
D8140034	0		5	0		
D8140035	4		5	0		
D8140036	0		2	0		
D8140037	0		6	0		
D8140038	0		6	0		
D8140039	0		5	0		
total pictures: 17	5	0.29	66	0	66	0

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวศิริินภา ศรีคำ เกิดวันที่ 19 มกราคม พ.ศ. 2531 จังหวัดนครสวรรค์

ประวัติการศึกษา

ระดับปริญญาตรี สำเร็จการศึกษาวิทยาศาสตร์บัณฑิต (วท.บ) วิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ปีการศึกษา 2553

ระดับปริญญาโท ศึกษาต่อวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต แขนงอณูชีววิทยาและพันธุศาสตร์ สาขาวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อ พ.ศ. 2553

การนำเสนอผลงาน นำเสนอผลงานในหัวข้อ “การตายของเซลล์ประสาทและเซลล์อักเสบในระบบประสาทส่วนกลางในสุนัขที่เป็นโรคพิษสุนัขบ้า” ในงานประชุมวิชาการ The 15th Khon Kaen Veterinary Annual International Conference 2014 คณะสัตวแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น และได้รับรางวัล The best Poster Presentation



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY