

**THE EFFECT OF DIFFERENT FORMS OF NITRIC OXIDE
RADICAL ON RABIES VIRUS REPLICATION**

WANWARANG HIRIOTE

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE (MICROBIOLOGY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY**

2000

ISBN 974-664-722-9

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

TH
W251e
8000

48305

4036440 SCMI/M : MAJOR : MICROBIOLOGY ; M.Sc. (MICROBIOLOGY)

KEY WORDS : RABIES/ NITRIC OXIDE

WANWARANG HIRIOTE : THE EFFECT OF DIFFERENT FORMS OF NITRIC OXIDE RADICAL ON RABIES VIRUS REPLICATION. THESIS ADVISORS : SUKATHIDA UBOL, Ph.D., MOLVIBHA VONGSAKUL, Ph.D., MATHUROSE PONGLIKITMONGKOL, Ph.D. 106 p. ISBN 974-664-722-9.

Rabies or hydrophobia is the disease of the central nervous system, which causes cerebral damage and impairment of neuronal function. The pathophysiology of this disease is partially known. Death of neurons by apoptosis during rabies virus infection has been recently found. This death mechanism involves activation of caspases and up-regulation of inducible NOS (iNOS) gene expression. NO is produced in reduced form (NO^\bullet) and oxidized form (NO^+). In order to understand the role of NO^\bullet and NO^+ on rabies pathogenesis, we studied the effect of both NO^\bullet and NO^+ on rabies virus replication in vitro.

In this study, rabies virus infected mouse neuroblastoma cell cultures were treated with NO^\bullet and NO^+ generated from SNP, sodium nitroprusside, in the presence of ascorbate and SNP alone, respectively. The results showed that NO^\bullet delayed the replication of rabies virus and production of infectious particles by 4 hours detected by FA staining and plaque assay. The level of infectious particle production was also suppressed by NO^\bullet . In contrast, NO^+ did not show any effect on rabies virus replication. The mechanism of delay replication was investigated by monitoring rabies virus gene expression using RT-PCR and time course of viral protein synthesis by specific monoclonal antibody. It was found that NO^\bullet suppressed and delayed expression of NS gene by 3 hours, while expression of N, M, G, and L genes were only suppressed but not delayed. Delayed expression of NS gene subsequently led to late synthesis of NS protein.

In conclusion, we have demonstrated that NO^+ has no effect on rabies virus replication, whereas in vitro NO^\bullet functions as anti-rabies virus agent. This free radical molecule exerts its activity through suppression of viral gene expression but have not effect on viral protein synthesis.

4036440 SCMI/M : สาขาวิชา : จุลชีววิทยา ; วท.ม. (จุลชีววิทยา)

วรรณวรงค์ หิริโอตปี: การศึกษาอิทธิพลของไนตริกออกไซด์ในรูปฟอร์มต่างๆต่อการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า (THE EFFECT OF DIFFERENT FORMS OF NITRIC OXIDE RADICAL ON RABIES VIRUS REPLICATION). คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : ศุขชิตา อุบล, Ph.D., มลวิภา วงษ์สกุล, Ph.D., มรุรส พงษ์ลิขิตมงคล, Ph.D., 106 หน้า. ISBN 974-664-722-9

โรคพิษสุนัขบ้าหรือโรคกลัวน้ำเป็นโรคที่เกี่ยวข้องกับระบบประสาทส่วนกลางซึ่งก่อให้เกิดความคิดปกติในสมอง โดยพยาธิสภาพของโรคทราบเพียงบางส่วนเท่านั้น แต่จากผลการวิจัยเมื่อไม่นานมานี้พบว่าในระหว่างที่มีการติดเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าเซลล์ประสาทจะเกิดการตายแบบ apoptosis โดยกลไกการตายดังกล่าวเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นเอนไซม์ caspase และการ upregulation ของยีน inducible NOS (iNOS) ซึ่งทำให้เกิดการผลิต NO ในรูปของออกซิไดซ์ฟอร์ม (NO^+) และรีดิวซ์ฟอร์ม (NO^\bullet) ดังนั้นเพื่อให้เข้าใจบทบาทของ NO^+ และ NO^\bullet ต่อการเกิดพยาธิสภาพของโรคพิษสุนัขบ้า เราจึงทำการศึกษาอิทธิพลของ NO^+ และ NO^\bullet ต่อการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า

ในการศึกษานี้ เซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงที่ติดเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าจะได้รับ NO^+ จาก SNP หรือ Sodium nitroprusside และ NO^\bullet จาก SNP ร่วมกับ ascorbate จากการตรวจสอบโดยวิธี plaque assay และ FA staining พบว่า NO^\bullet สามารถทำให้การเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าและการผลิตไวรัสที่ติดเชื้อได้ล่าช้าไป 4 ชั่วโมง และ NO^\bullet ยังสามารถลดปริมาณการผลิตไวรัสที่ติดเชื้อได้อีกด้วยแต่สำหรับ NO^+ นั้นไม่มีผลต่อเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า โดยกลไกที่ทำให้เกิดการล่าช้านี้จะตรวจสอบจากการแสดงออกของยีนไวรัสพิษสุนัขบ้าด้วยวิธี RT-PCR และดูจากช่วงเวลาในการสร้างโปรตีนโดยใช้วิธี specific monoclonal antibody staining จากการศึกษาพบว่า NO^\bullet ทำให้การแสดงออกของยีน NS ลดลงและล่าช้าออกไป 3 ชั่วโมงและในขณะเดียวกันยังทำให้การแสดงออกของยีน N, M, G และ L ลดลงอีกด้วย แต่ NO^\bullet ไม่มีผลต่อเวลาการแสดงออกของยีนเหล่านี้ จากการที่ยีน NS มีการแสดงออกช้ากว่าปกตินั้นเป็นผลให้การสังเคราะห์โปรตีน NS ช้าลงไปด้วย

จากข้อมูลดังกล่าวสรุปได้ว่าเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าไม่ได้รับผลกระทบจาก NO^+ ในขณะที่ NO^\bullet มีหน้าที่ในการต่อต้านเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า โดยข้อมูลอิสระจากการแสดงออกของยีนไวรัสแต่ไม่มีผลต่อการสังเคราะห์โปรตีนของเชื้อไวรัสชนิดนี้