

## บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: MRG5580131

ชื่อโครงการ: ผลของอินเตอร์ลิวคิน 17 ต่อการทำงานของนิวโทรฟิลบริเวณปอดที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบ

ชื่อนักวิจัย และสถาบัน: อาจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.พงศกร เชื่อมไมตรี

คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ศาสตราจารย์ ดร.วัชระ กสิณฤกษ์

คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.รุ่งโรจน์ ธนาวงษ์นุเวช

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อีเมล: phongsakorn.c@cmu.ac.th

ระยะเวลาโครงการ: กรกฎาคม 2555 ถึง กรกฎาคม 2557

นิวโทรฟิลเคลื่อนที่เข้าสู่ปอดหรือถุงลมในกรณีของปอดอักเสบภายใต้อิทธิพลของ IL-17 และอาจสร้างความเสียหายกับเนื้อเยื่อปอดได้เนื่องจากการทำหน้าที่ของเซลล์นี้ การศึกษานี้ทำการศึกษาทบทวนของ IL-17 ที่มีต่อการทำหน้าที่ของนิวโทรฟิลในหลอดทดลอง (*in vitro*) โดยการแบ่งกลุ่มหนูทดลองออกเป็น 4 กลุ่มและทำการติดเชื้อหนูทดลองด้วย 1) PBS (Ctrl), 2) Influenza A virus (H1N1) ร่วมกับแบคทีเรีย *Klebsiella pneumoniae* (Mix), 3) influenza A (Flu) และ 4) *Klebsiella pneumoniae* (KP) โดยทำการติดเชื้อหนูนาน 7 วัน จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างไขกระดูก น้ำล้างปอด (BAL) และตัวอย่างชิ้นเนื้อปอด ผลการศึกษาพบว่าหนูกลุ่ม Mix และ Flu มีน้ำหนักตัวลดลงอย่างมีนัยสำคัญ หนูกลุ่ม Flu มีอัตราการตายสูงสุดเมื่อสิ้นสุดการทดลอง เซลล์จากน้ำล้างปอดของหนูกลุ่ม Mix และ KP พบนิวโทรฟิลเป็นจำนวนมาก ส่วนในกลุ่ม Flu พบลิ้มโฟไซต์เป็นองค์ประกอบหลัก ผลทางจุลพยาธิวิทยาของรอยโรคที่ปอดพบคะแนนเฉลี่ยใกล้เคียงกัน คือ คะแนน 2-3 จาก 4 ในหนูกลุ่ม Mix, Flu และ KP ตัวอย่างเซลล์นิวโทรฟิลที่แยกได้จากไขกระดูกนำมากระตุ้นเบื้องต้นด้วย mouse rIL-17A protein (rIL-17A) จากนั้นทดสอบการทำหน้าที่ของเซลล์ ได้แก่ oxidative burst (ROS) และ phagocytosis โดย flow cytometry ทดสอบการทำลายแบคทีเรียโดย bacterial killing MTT assay และปริมาณการผลิตโครงสร้าง Neutrophil Extracellular Traps (NETs) โดย fluorescent plate reader นอกจากนี้นำเซลล์นิวโทรฟิลจากไขกระดูกมาตรวจสอบการแสดงออกของยีน IL-1 $\beta$ , IL-17A และ IL-17RA ด้วยวิธี real-time PCR (qRT-PCR) ผลจากการกระตุ้นเซลล์ด้วย rIL-17A พบว่านิวโทรฟิลของทั้ง 4 กลุ่มทดลองมีปริมาณการสร้าง ROS เพิ่มขึ้น การทดสอบ phagocytosis ไม่พบความแตกต่างระหว่างเซลล์กลุ่มที่ได้รับ (+) และไม่ได้รับ (-) rIL-17A ผลการทำลายแบคทีเรียภายในเซลล์พบเปอร์เซ็นต์ของการทำลายเพิ่มขึ้นในเซลล์ที่ได้รับ rIL-17A ในกลุ่ม Flu ผลการกระตุ้นเซลล์ด้วย rIL-17A ต่อการสร้าง NETs พบว่าเซลล์ในกลุ่ม Mix มีการสร้าง NETs เพิ่มขึ้น ในขณะที่อีก 3 กลุ่มมีการสร้าง NETs ลดลงอย่างมีนัยสำคัญโดยเฉพาะจากกลุ่ม Flu การตรวจสอบการแสดงออกของยีน IL-1 $\beta$ , IL-17A และ IL-17RA จากเซลล์นิวโทรฟิลของหนูในแต่ละกลุ่มพบความแตกต่างของการแสดงออกของยีน IL-1 $\beta$  และ IL-17A โดยพบการแสดงออกของยีน IL-17A เพิ่มขึ้นในกลุ่ม Mix และ Flu ส่วนการแสดงออกของยีน IL-17RA พบการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นในทุกกลุ่มทดลอง โดยสรุป นิวโทรฟิลได้รับอิทธิพลจาก IL-17 ในเนื้อเยื่อและอาจส่งผลให้มีการทำหน้าที่ของเซลล์ที่เปลี่ยนแปลงได้ในระหว่างการติดเชื้อบริเวณปอด ซึ่งผลจากการทำหน้าที่ของเซลล์นี้อาจสร้างความเสียหายให้กับเนื้อเยื่อปอดมากขึ้นได้

คำหลัก: อินเตอร์ลิวคิน 17 การทำงานของนิวโทรฟิล ปอดอักเสบ หนูทดลอง

## Abstract

---

**Project Code:** MRG5580131

**Project Title:** Effects of IL-17 on neutrophil functions in experimentally-induced lung inflammation

**Investigators:** Dr. Phongsakorn Chuammitri

Faculty of Veterinary Medicine, Chiang Mai University

Professor Dr. Watchara Kasinrek

Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University

Professor Dr. Roongroje Thanawongnuwech

Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University

**E-mail Address:** phongsakorn.c@cmu.ac.th

**Project Period:** July 2012 – July 2014

Interleukin 17 (IL-17) mediates neutrophils migration into the lungs during acute inflammation. As a consequence, lung tissues could be damaged by neutrophil functions. In present study, we ask whether IL-17 can play the role in the activation of neutrophil functions *in vitro* following viral and bacterial infections in mouse model. Mice were divided into 4 groups and intranasally challenged as follows: 1) PBS (Ctrl), 2) Influenza A (H1N1) & *Klebsiella pneumoniae* (Mix), 3) Influenza A alone (Flu), and 4) *K. pneumoniae* (KP) alone. Bone marrow (BM), bronchoalveolar lavage cells (BAL), and lung specimens were collected 7-day post challenge for further analysis. Average BW of mice in Mix and Flu groups declined significantly. Mice in Flu had the highest mortality rate. Neutrophils were a major cell type in BAL from Mix and KP whereas lymphocytes were outnumbered in Flu. Lesions in the lungs revealed moderate severity (score = 2-3/4) in Mix, Flu, and KP. Isolated BM-derived neutrophils were subjected to *in vitro* priming with mouse recombinant IL-17A protein (rIL-17A) followed by various functional assays. Oxidative burst (ROS) and phagocytosis of fluorescently labeled *K. pneumoniae* were assessed by flow cytometry. ROS levels in rIL-17A primed cells showed significant elevation. Phagocytosis showed no significant difference between (+) or (-) rIL-17A groups. Moreover, only primed cells in the Flu caused an increase in bacterial destruction in MTT assay. Neutrophil Extracellular Traps (NETs) formation as an extracellular function was fluorescently quantified. Most rIL-17A primed cells were found to decrease in NET production with one exception in Mix that resulted in release more NETs to supernatant. We next monitored gene expression of IL-1 $\beta$ , IL-17A, and IL-17A receptor (IL-17RA) in isolated neutrophils by real-time PCR (qPCR). IL-17A mRNA showed an increased expression in Mix and Flu; IL-1 $\beta$  mRNA had only increased in Flu; IL-17RA showed constitutive expression in all treatment groups. In summary, neutrophils are implicated in tissue damages during acute lung inflammation since their functions may have been influenced by IL-17.

**Keywords:** interleukin 17, neutrophil functions, lung inflammation, mouse