



## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

### โครงการ

ผลของอินเทอร์เน็ตลิวคิน 17 ต่อการทำงานของ  
นิวโทรฟิลบริเวณปอดที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบ

โดย

อาจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.พงศกร เชื่อมไมตรี

กรกฎาคม 2557

สัญญาเลขที่ MRG5580131

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

ผลของอินเทอร์เน็ตลิวคิน 17 ต่อการทำงานของ  
นิวโทรฟิลบริเวณปอดที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบ

โดย

อ.น.สพ.ดร.พงศกร เชื่อมไมตรี	มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
ศ.ดร.วัชระ กสิณฤกษ์	มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
ศ.น.สพ.ดร.รุ่งโรจน์ ธนาวงษ์นุเวช	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

## กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัย (ทุนพัฒนาศักยภาพในการทำงานวิจัยของอาจารย์รุ่นใหม่ ประจำปี 2555) จากสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ คุณสินีนาถ สันติธีรากล นักวิจัยประจำศูนย์เครื่องมือวิจัยทางวิทยาศาสตร์การแพทย์ (Medical Science Research Equipment Center) คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ให้ความช่วยเหลือในการตรวจวิเคราะห์เซลล์โดย Flow cytometry สัตวแพทย์หญิง จิราภรณ์ ศรีทัน หน่วยชันสูตรโรคสัตว์ และคุณณัฐพงศ์ วังใน ห้องปฏิบัติการกลาง คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ช่วยเตรียมสไลด์ทางจุลพยาธิวิทยา ตลอดจนนักวิทยาศาสตร์ เจ้าหน้าที่ และบุคลากรของคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ทุกท่าน ที่ช่วยอำนวยความสะดวกต่าง ๆ จนเป็นผลให้การศึกษาวิจัยครั้งนี้ สำเร็จลุล่วงได้

คณะผู้วิจัย

กรกฎาคม 2557

## บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: MRG5580131

ชื่อโครงการ: ผลของอินเตอร์ลิวคิน 17 ต่อการทำงานของนิวโทรฟิลบริเวณปอดที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบ

ชื่อนักวิจัย และสถาบัน: อาจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.พงศกร เชื่อมไมตรี

คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ศาสตราจารย์ ดร.วัชร 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

## บทสรุปโครงการ (Executive Summary)

การระบาดของเชื้อไวรัสก่อโรคไข้หวัดใหญ่ (influenza virus) ในประเทศไทยส่งผลเสียต่อสุขภาพของผู้ป่วยที่ติดเชื้อโดยเฉพาะอย่างยิ่งในรายที่มีภาวะแทรกซ้อนของการติดเชื้อปอดซึ่งจำเป็นต้องได้รับการดูแลรักษาอย่างใกล้ชิดในโรงพยาบาล นอกจากนี้ยังพบการระบาดติดต่อระหว่างมนุษย์และสัตว์ ซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อทางด้านเศรษฐกิจ สังคม การแพทย์และสาธารณสุข เซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันที่พบว่ามีส่วนสำคัญในการตอบสนองต่อเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ในปอด ได้แก่ ลิมโฟไซต์ (lymphocyte) แมคโครฟาจ (macrophage) นิวโทรฟิล (neutrophil) และเซลล์อื่น ๆ เช่น เซลล์เยื่อบริเวณทางเดินหายใจ การตอบสนองต่อการติดเชื้อไวรัสฯ ของเซลล์แต่ละชนิดดังกล่าวล้วนแล้วแต่มีบทบาทและหน้าที่เฉพาะ

การศึกษานี้จำลองเหตุการณ์การติดเชื้อร่วมกันระหว่างเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่และแบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินหายใจ โดยสายพันธุ์ของไวรัสที่ใช้ในการศึกษา คือ pandemic H1N1 Influenza A/SW/Thailand/CU-RA29/2009 ซึ่งพบการระบาดและก่อโรคระบบทางเดินหายใจในสุกร และอาจพบการส่งต่อเชื้อจากสุกรติดต่อกับคนและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมอื่น ๆ ได้ และแบคทีเรียแกรมลบชนิด *Klebsiella pneumoniae* ซึ่งมักพบเสมอว่าเป็นสาเหตุร่วมของการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจของผู้ป่วย ในขั้นตอนการศึกษาเบื้องต้นคณะผู้วิจัยได้ดำเนินการศึกษาเพื่อตรวจหาไตเตอร์และคำนวณค่าเฉลี่ยปริมาณไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ที่นำมาใช้ทดลอง โดยการตรวจด้วยวิธี 1.) 50% Egg Infective Dose (EID<sub>50</sub>) 2.) 50% Tissue Culture Infective Dose (TCID<sub>50</sub>) 3.) Viral plaque formation assay และ 4.) 50% Mouse Infective Dose (MID<sub>50</sub>) เพื่อนำมาคำนวณปริมาณไวรัสที่จะใช้ในการทดลองติดเชื้อร่วมกันระหว่างไวรัสและแบคทีเรียในหนูทดลอง จากที่ได้กล่าวแล้วข้างต้นว่าเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันที่พบว่ามีส่วนสำคัญในการตอบสนองต่อเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ในปอดมีเซลล์ที่เกี่ยวข้องหลากหลายชนิด แต่ชนิดที่คณะผู้วิจัยได้ให้ความสนใจในการศึกษาในครั้งนี้ ได้แก่ เซลล์นิวโทรฟิลซึ่งเป็นเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิด (innate immune cells) ที่พบการเคลื่อนที่แทรกเข้าสู่น้ำเยื่อของทางเดินหายใจส่วนต้นและส่วนปลาย เมื่อเกิดการติดเชื้อของระบบทางเดินหายใจแบบเฉียบพลัน (acute respiratory infection) และเซลล์ชนิดนี้อาจสร้างความเสียหายให้กับเนื้อเยื่อบริเวณปอดได้

การเคลื่อนที่ของนิวโทรฟิลเข้าสู่ปอดได้รับอิทธิพลจากไซโตไคน์ (cytokine) ชนิดหนึ่งซึ่งมีความสำคัญยิ่ง ได้แก่ อินเตอร์ลิวคิน (interleukin, IL) ในกลุ่ม IL-17 ซึ่งมีการศึกษาเกี่ยวกับผลของ IL-17 ในการกระตุ้นให้นิวโทรฟิลเคลื่อนที่เข้าสู่ปอดเป็นจำนวนมาก แต่การศึกษาเกี่ยวกับผลของ IL-

17 ในการกระตุ้นให้นิวโทรฟิลทำหน้าที่กลับมามีอยู่จำนวนจำกัด ดังนั้นการศึกษานี้จึงมุ่งเน้นในการศึกษาบทบาทของ IL-17 ที่มีต่อการทำหน้าที่ของนิวโทรฟิลในหลอดทดลอง (*in vitro*) โดยการทดลองติดเชื้อในหนูทดลองด้วยไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ดังกล่าวข้างต้นหรือแบคทีเรีย *Klebsiella pneumoniae* จากนั้นจึงทำการแยกนิวโทรฟิลจากไขกระดูก เพื่อนำมาศึกษาเกี่ยวกับการทำหน้าที่ของเซลล์นิวโทรฟิล (neutrophil functions) โดยแบ่งเป็น 2 ประเภท ได้แก่ การทำหน้าที่ภายในเซลล์ (intracellular functions) และการทำหน้าที่ภายนอกเซลล์ (extracellular function) ในขั้นตอนการศึกษานำเซลล์นิวโทรฟิลที่แยกได้มากระตุ้นเบื้องต้น (priming) ด้วย recombinant IL-17A และทำการทดสอบการสร้าง reactive oxygen species (ROS) ในกระบวนการ oxidative burst การเก็บกินแบคทีเรียที่ย้อมสีฟลูออเรสเซนต์ (phagocytosis) และการทำลายแบคทีเรียมีชีวิต (bacterial killing MTT assay) ซึ่งทั้ง 3 กระบวนการเป็นการทำหน้าที่ภายในเซลล์นิวโทรฟิล นอกจากนี้ยังตรวจวัดปริมาณการผลิตโครงสร้าง Neutrophil Extracellular Traps (NETs) ซึ่งเป็นการทดสอบการทำงานภายนอกเซลล์ของนิวโทรฟิลด้วย ส่วนน้ำล้างปอด และตัวอย่างชิ้นเนื้อปอด นำมาศึกษาจำนวนเซลล์ที่เคลื่อนที่เข้าสู่ปอดและตอบสนองต่อการติดเชื้อฯ จากรอยโรคบริเวณปอด เซลล์นิวโทรฟิลจากไขกระดูกจำนวนหนึ่งนำมาสกัดแยกอาร์เอ็นเอ (RNA) เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีน IL-1 $\beta$ , IL-17A และ IL-17RA ด้วยวิธี real-time PCR (qRT-PCR)

รายงานการศึกษานี้จะนำเสนอมุมมองที่เกี่ยวข้องกับ IL-17 และการทำหน้าที่ของนิวโทรฟิลในกรณีของการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ pandemic influenza virus H1N1 ในแบบจำลองของโรคปอดอักเสบและติดเชื้อในหนูทดลอง เพื่อใช้เป็นข้อมูลของการศึกษาอื่น ๆ ต่อไป

## สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	i
บทคัดย่อภาษาไทย	ii
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	iii
บทสรุปโครงการ	iv
สารบัญเรื่อง	vi
สารบัญตาราง	vii
สารบัญรูปภาพ	viii
บทนำและความสำคัญเกี่ยวกับปัญหาวิจัย	1
ทบทวนวรรณกรรม	2
วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	6
ระเบียบวิธีวิจัย	7
ผลการวิจัย	23
สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย	40
เอกสารอ้างอิง	46
Output ที่ได้จากโครงการ	53

## สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	การตรวจไตเตอร์และคำนวณค่าเฉลี่ยปริมาณไวรัส	7
2	การติดเชื้อไวรัสในหนูทดลอง	7
3	Oligonucleotide primers สำหรับตรวจการแสดงออกของยีนในหนูทดลอง	19

## สารบัญรูปภาพ

รูปภาพที่		หน้า
1	ลักษณะเซลล์ MDCK ภายใต้กล้องจุลทรรศน์	24
2	ลักษณะเซลล์ MDCK ที่เกิด CPE รูปแบบต่าง ๆ	25
3	Plaque formation จากไวรัส swine A/Thailand/CU-RA29/2009 (H1N1) บน MDCK	25
4	Plaque formation ภายใต้กล้องจุลทรรศน์	26
5	ชิ้นเนื้อปอดจากหนูทดลองที่ได้รับเชื้อไวรัส swine A/Thailand/CU-RA29/2009 (H1N1) โดยการหยอดจุ่ม	27
6	จุลพยาธิวิทยาของปอดจากหนูทดลองที่ได้รับเชื้อไวรัส H1N1 และตายในระหว่างการทดลอง	27
7	จุลพยาธิวิทยาของปอดจากหนูทดลองที่ได้รับเชื้อไวรัส H1N1 เมื่อสิ้นสุดการทดลอง	28
8	การเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักเฉลี่ยของหนูในแต่ละวันของการทดลอง	29
9	เปอร์เซ็นต์ของหนูที่รอดชีวิตในแต่ละกลุ่มทดลอง	30
10	เซลล์นิวโทรฟิลจากไขกระดูกของหนูทดลอง	30
11	ข้อมูลแผนภูมิแท่งแสดงปริมาณเซลล์ที่แยกได้จากน้ำล้างปอด (BAL) ของหนูทดลอง	31
12	ข้อมูล flow cytometry แสดง intracellular ROS ที่สร้างขึ้นโดยนิวโทรฟิล	32
13	ข้อมูล flow cytometry แสดง phagocytosis โดยนิวโทรฟิล	33
14	การทำลายเชื้อแบคทีเรียภายในเซลล์นิวโทรฟิล (Bactericidal Assay)	34
15	Neutrophil Extracellular Traps (NETs) โดยเซลล์นิวโทรฟิล	35
16	ระดับคะแนนรอยโรคบริเวณปอดของหนู	36
17	รอยโรคบริเวณปอดของหนูทดลอง	36
18	Real-time PCR plots	38
19	ระดับการแสดงออกของยีนที่ทำการตรวจสอบโดย quantitative real-time PCR	39

## บทนำและความสำคัญเกี่ยวกับปัญหาวิจัย

### (Introduction to the research problem and its significance)

ประเทศไทยเป็นหนึ่งในพื้นที่ที่พบการระบาดของโรคไข้หวัดใหญ่ที่สำคัญและสถานการณ์ของโรคยังพบอย่างต่อเนื่องและพบการระบาดติดต่อระหว่างมนุษย์และสัตว์ ผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่โดยเฉพาะอย่างยิ่งในรายที่มีภาวะแทรกซ้อนของการติดเชื้อปอดจะต้องได้รับการดูแลรักษาอย่างใกล้ชิดในโรงพยาบาล และผลจากความเจ็บป่วยดังกล่าวทำให้ผู้ป่วยเหล่านั้นต้องขาดงาน ประสบปัญหาจากค่าใช้จ่ายในการรักษาพยาบาลและผลกระทบทางด้านเศรษฐกิจ สังคม การแพทย์ และสาธารณสุขอื่น ๆ ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อเนื่องในส่วนของ การเพิ่มขึ้นของภาระด้านงบประมาณในภาครัฐ ที่ต้องช่วยเหลือทางด้านสุขภาพของประชาชน

ภาวะการติดเชื้อแทรกซ้อนในระบบทางเดินหายใจอาจส่งผลให้เกิด Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS) และ Acute Lung Injury (ALI) ซึ่งพบได้เสมอในผู้ป่วยหนักที่ติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์รุนแรง (highly pathogenic influenza viruses) หรือผู้ป่วยที่พบการติดเชื้อร่วมของเชื้อโรคอื่น ๆ เช่น *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae* และ *Candida albicans* เป็นต้น ภาวะแทรกซ้อนดังกล่าวอาจส่งผลให้ผู้ป่วยอยู่ในภาวะวิกฤตหนักและต้องพักรักษาในโรงพยาบาลซึ่งมีค่าใช้จ่ายในการรักษาพยาบาลที่เพิ่มขึ้น (Holloway and Schwacha, 2012) ภาวะ ARDS มีลักษณะจำเพาะเมื่อทำการตัดชิ้นเนื้อปอด (biopsy) คือ ประกอบด้วย hyaline membrane และภายใน intra-alveolar จะพบเม็ดเลือดแดงและเซลล์นิวโทรฟิล และยังพบ diffuse alveolar damage กระจายทั่วไป สาเหตุของการเกิด ARDS และ ALI มักพบว่าเกิดจากภาวะปอดอักเสบ (pneumonia) และการติดเชื้อในกระแสเลือด (sepsis) (Ware and Matthay, 2000) การศึกษาในรูปแบบการเกิด ALI ในสัตว์ทดลอง (animal models) พบความสัมพันธ์ของการเกิด ALI ในลักษณะของ neutrophil-dependent แต่ที่เป็นลักษณะที่เป็นแบบ neutrophil-independent ก็พบได้เช่นกัน เช่น ในกรณีของผู้ป่วยที่เป็น profound neutropenia (Ware and Matthay, 2000)

เพื่อกำจัดสาเหตุของการติดเชื้อของระบบทางเดินหายใจในระยะเริ่มต้น การกระตุ้นให้เกิดการเคลื่อนที่ของเซลล์นิวโทรฟิลให้เข้ามายังบริเวณที่พบการติดเชื้อในปอดหรือถุงลมและการกระตุ้นการทำงานของเซลล์ชนิดดังกล่าว ทั้งจากการกระตุ้นการทำงานของกระบวนการทำลายเชื้อโรคทั้งแบบภายในเซลล์ (intracellular killing mechanisms) เช่น การสร้างสารสื่อกลางออกซิเจน (reactive oxygen species, ROS) ในกระบวนการ oxidative burst กระบวนการเก็บกินและ

ทำลายเชื้อโรค (phagocytosis and killing) และการปลดปล่อยแกรนูลและเอนไซม์ (degranulation/exocytosis) และแบบภายนอกเซลล์ (extracellular killing mechanism) ที่เรียกว่า “Neutrophil Extracellular Trap (NET)” ที่มีการปล่อยองค์ประกอบของดีเอ็นเอ โปรตีน ฮิสโตน (histones) แกรนูล เอนไซม์ และสารพิษอื่น ๆ ออกจากเซลล์ อาจส่งผลต่อพยาธิสภาพที่รุนแรงยิ่งขึ้นบริเวณปอด

อินเทอร์ลิวคิน (interleukin) 17 (IL-17) เป็นไซโตไคน์ที่สำคัญที่ช่วยดึงดูดและก่อให้เกิดการสะสมของนิวโทรฟิลในปอดในผู้ป่วยที่พบภาวะ ARDS/ALI โดยมี IL-17 ได้เสมอบริเวณถุงลม (alveolar tissue) และเนื้อเยื่อปอด (lung parenchyma) จากข้อมูลงานวิจัยในปัจจุบันที่ยังมีข้อมูลในเชิงจำกัดว่าการทำงานของเซลล์นิวโทรฟิลนั้นได้รับผลการกระตุ้นจาก IL-17 โดยตรงได้หรือไม่ นอกจากนี้ รายงานเพียงจำนวนหนึ่งเท่านั้นที่รายงานเกี่ยวกับ NET ที่ทำให้เกิดความเสียหายบริเวณปอดโดยเฉพาะอย่างยิ่งจากการติดเชื้อไข้หวัดใหญ่ (Narasaraju *et al.*, 2011; Narayana Moorthy *et al.*, 2013) การกระตุ้นเบื้องต้นโดยการเสริม IL-17 ligand และการกระตุ้นการทำงานของนิวโทรฟิลในหนูทดลองส่งผลให้เกิดการอักเสบของเนื้อเยื่อปอดจากการกระทำของนิวโทรฟิลที่ถูกกระตุ้นได้หรือไม่นั้นยังไม่เคยมีการรายงาน ดังนั้นงานวิจัยขั้นนี้จึงขอเสนอผลการเสริม IL-17 ที่ช่วยกระตุ้นการทำงานของนิวโทรฟิลและส่งผลต่อพยาธิสภาพของปอดตามมา ที่สามารถตรวจวัดได้ทั้งแบบในหลอดทดลอง (*in vitro*) และในร่างกาย (*in vivo*) ตามลำดับ

## บททวนวรรณกรรม (Literature review)

นิวโทรฟิลเคลื่อนที่แทรกเข้าสู่เนื้อเยื่อของทางเดินหายใจส่วนต้นและส่วนปลาย เมื่อมีการติดเชื้อของระบบทางเดินหายใจทั้งแบบเฉียบพลันและแบบเรื้อรัง ดังเช่นในกรณีที่พบภาวะ Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS) หอบหืด (asthma), bronchiectasis, โรคหลอดลมอักเสบเรื้อรัง (chronic bronchitis) ปอดอุดกั้นเรื้อรัง (COPD) และ cystic fibrosis หรือโรคปอดเรื้อรังอื่น ๆ ภาวะนี้ส่วนใหญ่จะเกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่เข้าสู่ปอดของเซลล์นิวโทรฟิลโดยสามารถตรวจพบได้จากการล้างปอดและหลอดลม (BAL) และการเก็บเสมหะส่งตรวจ (sputum collection)

การติดเชื้อไวรัสในระบบทางเดินหายใจที่พบว่ามีอาการรุนแรงครั้งใหญ่ของโรคและกระจายกินพื้นที่กว้าง เช่น ตัวอย่างของการระบาดของโรคไข้หวัดใหญ่ (influenza) เมื่อปี ค.ศ. 1918 และการระบาดล่าสุดของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H5N1, pandemic H1N1, respiratory syncytial virus ในมนุษย์ หนูและลิง ก่อให้เกิดความเสียหายต่อเนื้อเยื่อปอดและภาวะ Acute Lung Injury (ALI) จากการรายงานขององค์การอนามัยโลก (WHO) การติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สามารถสร้าง

ความเสียหายอย่างรุนแรงต่อเนื้อเยื่อของปอดโดยก่อให้เกิดภาวะ ARDS และการติดเชื้อไวรัสชนิดนี้ยังสามารถเชื่อมโยงต่อการเสียชีวิตของผู้ป่วยในบางกรณีด้วย ทั้งนี้เนื่องจากไวรัสบางสายพันธุ์ที่มีความรุนแรงสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการเคลื่อนที่แทรกเข้าสู่เนื้อเยื่อปอดของเซลล์นิวโทรฟิล

เซลล์นิวโทรฟิลเป็นเซลล์ที่สำคัญในระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิดและมีหน้าที่ต่อสู้กับการติดเชื้อ เซลล์นิวโทรฟิลถูกสร้างขึ้นภายในไขกระดูก (bone marrow) และเคลื่อนที่ออกสู่ภายนอกไขกระดูกเพื่อทำหน้าที่เนื่องจากมีความสามารถในการทำลายเชื้อโรคหลากหลายวิธีที่ประกอบรวมอยู่ภายในเซลล์ ได้แก่ กระบวนการทำลายเชื้อภายในเซลล์โดยกระบวนการเก็บกิน (phagocytosis) และการปล่อยแกรนูลเพื่อทำลายเชื้อ (degranulation) เช่น elastase การสร้างสารสื่อกลางออกซิเจน (reactive oxygen species, ROS) (Van Ziffle and Lowell, 2009) นอกจากนี้ยังพบความสามารถของเซลล์ในการทำลายเชื้อโรคนอกเซลล์ (extracellular killing) โดยกระบวนการที่เรียกว่า “Neutrophil Extracellular Traps” หรือ “NETs” ด้วยการปล่อยโครงสร้างคล้ายตาข่ายเพื่อดักจับเชื้อโรคที่อยู่โดยรอบเซลล์ (Brinkmann *et al.*, 2004) โครงสร้างดังกล่าวมีการรายงานการค้นพบในเซลล์นิวโทรฟิลและเฮปโตโรฟิลของทั้งสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม สัตว์ปีกและปลา (Chuammitri *et al.*, 2009; Ermert *et al.*, 2009; Palic *et al.*, 2007) ภายในโครงสร้าง NETs ประกอบด้วย nuclear materials, โปรตีนฮิสโตน (histones) ดีเอ็นเอ (DNA) แกรนูลที่บรรจุอยู่ภายในเซลล์หลากหลายชนิด (cytoplasmic granules) เปปไทด์ที่มีประจุ (charged peptides) และโปรตีน ตลอดจนอนุมูลอิสระ (free radicals) โครงสร้าง NETs ช่วยจับและทำลายเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ นอกจากนี้ยังมีส่วนช่วยในการตอบสนองต่อเชื้อรา (fungi) โปรโตซัว (protozoa) และเชื้อไวรัส เช่น ไวรัสไข้หวัดใหญ่ (influenza virus) (Narasaraju *et al.*, 2011; Narayana Moorthy *et al.*, 2013)

การค้นพบเซลล์ในตระกูล Th17 lineage ในปี 2005 ทำให้ทราบว่าเซลล์ชนิดนี้มีส่วนเกี่ยวข้องอย่างยิ่งในระบบภูมิคุ้มกันที่มีต่อการติดเชื้อ (Gaffen *et al.*, 2011) โดยการผลิตไซโตไคน์ชนิด IL-17 ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ (Inflammation) โรคเสื่อม (degenerative disorders) การต่อต้านเนื้อเยื่อตนเอง (autoimmunity) และเกี่ยวข้องกับการต่อต้านเชื้อโรคนอกเซลล์ (extracellular pathogen) (Gaffen *et al.*, 2011) ไซโตไคน์ (IL-17) ในกลุ่มนี้ประกอบด้วยสมาชิกจำนวน 6 ชนิด ได้แก่ IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E (IL-25) และ IL-17F (Pappu *et al.*, 2012) จากข้อมูลงานวิจัยทำให้ทราบว่าประสิทธิภาพในการทำงานของ IL-17A มีประสิทธิภาพดีที่สุด (Bosmann and Ward, 2012) ลองลงมาได้แก่ IL-17F และ IL-17A/F (Kolls and Lindén, 2004) โดยเฉพาะในกรณีเกิดภาวะติดเชื้อในกระแสเลือด (sepsis) เซลล์ที่มีหน้าที่ใน

การผลิต IL-17 ที่เป็นหลัก คือ Th17 cells โดยที่ปริมาณของ IL-17 ที่พบเป็นจำนวนมากในร่างกาย จะพบเป็นจำนวนมากภายในปอดของคนหรือหนูสุขภาพดี (Liang *et al.*, 2007; Miyamoto *et al.*, 2003) ในปัจจุบันนอกเหนือจาก Th17 cells แล้วยังมีเซลล์อื่น ๆ ในระบบภูมิคุ้มกันที่สามารถผลิต IL-17 ได้ด้วยเช่นกัน เซลล์เหล่านั้น ได้แก่ invariant NKT cells (iNKT),  $\gamma\delta$  T cell และ paneth cells เป็นต้น (Ferretti *et al.*, 2003) ในปัจจุบันเป็นที่ยอมรับกันว่า “นิวโทรฟิล” มีความสามารถในการผลิต IL-17 ในลักษณะของ primary IL-17-secreting subset of cells (Ferretti *et al.*, 2003; Garraud *et al.*, 2012) โมเลกุล IL-17 ที่ถูกสร้างขึ้นจากเซลล์ชนิดต่าง ๆ ดังกล่าวข้างต้น สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการผลิต pro-inflammatory mediators ชนิดอื่น ได้แก่ IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, CCL20 และ G-CSF ส่งผลให้เกิดการเคลื่อนที่ของนิวโทรฟิลเข้ามายังบริเวณที่มีสารสื่อการอักเสบนั้น (Bosmann and Ward, 2012)

โมเลกุล IL-17 ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นใหม่ (de novo synthesis) ช่วยให้เซลล์นิวโทรฟิลเคลื่อนที่เข้าสู่บริเวณ bronchoalveolar space ได้จากหลาย ๆ วิธี (Miyamoto *et al.*, 2003) มีรายงานกล่าวว่าโมเลกุล IL-17 อาจถูกสร้างขึ้นจากการกระตุ้นบริเวณ Toll-like receptor 4 (TLR-4) จากการติดเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ (Miyamoto *et al.*, 2003) โมเลกุล IL-17 ส่งผลต่อการทำหน้าที่ของเซลล์บางชนิด เช่น airway epithelial cells, fibroblasts, B- และ T-lymphocytes และเซลล์ในกลุ่ม myelomonocytic cells ซึ่งเซลล์ดังกล่าวนี้พบตัวรับ IL-17 (IL-17R) บนผิวเซลล์อยู่ก่อนแล้ว (Laan *et al.*, 2002) โมเลกุล IL-17A ไม่เพียงแต่ช่วยในการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันในระหว่างการติดเชื้อแบบเฉียบพลัน แต่ยังช่วยให้เกิดการสะสมของนิวโทรฟิลบริเวณที่พบการติดเชื้อได้เป็นอย่างดี จากผลการทดลองของ Miyamoto และคณะ พบการสะสมของเซลล์นิวโทรฟิลเป็นจำนวนมากบริเวณ bronchoalveolar space เมื่อทำการให้ lipopolysaccharides (LPS) จากเชื้อ *Escherichia coli* ในหนูทดลอง ระดับการแสดงออกของ mRNA ของ IL-17 ปรากฏที่จุดสูงสุดใน 2 วัน ภายหลังจากการให้ LPS เข้าสู่หลอดลมและยังคงปรากฏอยู่และทำการตรวจวัดได้อยู่ในช่วงระยะเวลา 1 ถึง 3 วัน (Ferretti *et al.*, 2003) ผลการวิจัยดังกล่าวสอดคล้องกับผลการวิจัยก่อนหน้านี้ที่ทำการติดเชื้อไวรัส เช่น adenovirus หรือ influenza virus ที่แสดงว่าการติดเชื้อไวรัสดังกล่าวส่งผลต่อการแสดงออกของ IL-17A และยังคงส่งผลต่อการแสดงออกของยีน G-CSF ซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการผลิตเซลล์แกรนูโลไซต์ (granulopoiesis) (Ferretti *et al.*, 2003; Miyamoto *et al.*, 2003) เพื่ออธิบายการทำงานของ IL-17 ที่มีต่อเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิด (innate immunity) การฉีด IL-17A เข้าทางจมูกส่งผลต่อการเคลื่อนที่ของนิวโทรฟิลในหนูทดลอง และเมื่อให้แอนติบอดีต่อต้าน IL-17 (anti-IL-17 antibody) ร่วมด้วย กลับทำให้ปริมาณการ

เคลื่อนที่ของนิวโทรฟิลลดลงได้ (Ferretti *et al.*, 2003; Lindén *et al.*, 2005) IL-17A ส่งผลต่อการเพิ่มขึ้นของเอนไซม์หลายชนิดในนิวโทรฟิลและการเพิ่มขึ้นของเอนไซม์ elastase (ELA) และ myeloperoxidase (MPO) ในเซลล์นิวโทรฟิลของหนูมักพบร่วมกับการปรากฏตัวรับ IL-17A receptor (IL-17RA) ที่พร้อมทำหน้าที่ได้ (Hoshino *et al.*, 2000) ในกรณีของผู้ป่วยที่มีภาวะ ARDS, chronic bronchitis, COPD และ cystic fibrosis มักพบระดับของ ELA เพิ่มขึ้นได้เสมอ (Balloy *et al.*, 2003) เมื่อทำการเสริม recombinant IL-17A เข้าสู่ร่างกายหนูทดลองพบการเพิ่มสูงขึ้นของเอนไซม์ ELA และ MPO จากเซลล์นิวโทรฟิลที่อยู่ภายในเนื้อเยื่อปอดและหลอดลม แต่ไม่ส่งผลต่อเอนไซม์ดังกล่าวของนิวโทรฟิลในเลือด (circulating neutrophils) (Hoshino *et al.*, 2000)

นิวโทรฟิลช่วยปกป้องเซลล์ร่างกายจากการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ (Narasaraju *et al.*, 2011) โดยพบว่านิวโทรฟิลมีจำนวนเพิ่มขึ้นภายใน 24 ชั่วโมงภายใน ร่วมกับเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันชนิดอื่น ๆ ในเนื้อเยื่อปอดและหลอดลมภายหลังได้รับ LPS, lipoteichoic acid (LTA) และ peptidoglycan (PGN) (Balloy *et al.*, 2003; Ferretti *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2011) มีข้อมูลสนับสนุนว่าในหนูที่มีจำนวนเซลล์นิวโทรฟิลที่ถูกทำให้ลดจำนวนลง (depleted neutrophils) มีลักษณะการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่บริเวณปอดที่รุนแรงและยากที่จะควบคุม (Hamada *et al.*, 2009; Tate *et al.*, 2009) โดยรวมแล้วเซลล์นิวโทรฟิลที่มีความสามารถในการทำลายเชื้อโรคทั้งแบบภายในและภายนอกเซลล์อาจสร้างความเสียหายให้กับเนื้อเยื่อปอดได้ มีหลักฐานยืนยันเกี่ยวกับวิถีการส่งสัญญาณของ Raf-MEK-ERK ที่เป็นผลมาจากการกระตุ้น NADPH oxidase (Hakkim *et al.*, 2011) และอาจเกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้าง NETs ได้กล่าวคือ การปรากฏของ IL-17A, IL-8 และ IL-6 ในสภาพแวดล้อมโดยรอบของนิวโทรฟิลอาจช่วยให้เกิดการปล่อยโครงสร้าง NETs ผ่านการส่งสัญญาณข้างต้นแต่ยังไม่ได้รับการยืนยันในสิ่งที่เกิดขึ้น นอกเหนือจากหน้าที่ในการช่วยทำลายเชื้อโรคของ NETs แล้ว โครงสร้างดังกล่าวที่ประกอบด้วยเอนไซม์และองค์ประกอบอื่น เช่น ROS ที่อาจส่งผลให้เกิดความเสียหายในบริเวณพื้นที่ที่พบโครงสร้าง NETs ที่ถูกสร้างขึ้นจากการติดเชื้อหรือการอักเสบ (Brinkmann *et al.*, 2004) เมื่อนิวโทรฟิลได้รับการกระตุ้นจากเชื้อโรคหรือสิ่งกระตุ้นที่เหมาะสม เซลล์พร้อมที่จะทำงานในทันทีและเมื่อเสร็จสิ้นภารกิจต่าง ๆ เซลล์จะเข้าสู่กระบวนการตายแบบ apoptosis หรือกระบวนการตายจาก NETs หรือโดยวิธีการอื่น (Pinheiro da Silva and Nizet, 2009) การปลดปล่อยแกรนูลภายในเซลล์นิวโทรฟิลและโครงสร้าง NETs บริเวณปอดจากการถูกกระตุ้นอาจส่งผลให้เกิดการลดการตอบสนองของเซลล์ลิมโฟไซต์ได้ การปรับสมดุลของการสร้าง NETs บริเวณที่พบการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่อาจช่วยจำกัดความเสียหายที่มีต่อเนื้อเยื่อ และน่าจะ

ใช้เป็นแนวทางในการรักษาภาวะปอดอักเสบที่เกิดจากโรคไข้หวัดใหญ่ (influenza pneumonitis) ได้ (Narasaraju *et al.*, 2011)

การบรรเทาผลของเซลล์นิวโทรฟิลที่ถูกกระตุ้นด้วย IL-17A โดยการใช้ยากลุ่ม glucocorticoids ในกรณีของผู้ป่วยด้วยภาวะ ARDS ที่พบปอดอักเสบจากนิวโทรฟิลอาจไม่สามารถทำได้ในผู้ป่วยทุกราย ดังนั้นเพื่อเป็นการแก้ปัญหาดังกล่าวจึงจำเป็นต้องหาแนวทางอื่นในการแก้ไขเร่งด่วน (Creed *et al.*, 2009) จากข้อมูลที่มีอยู่ทำให้พอทราบและอธิบายได้ว่าอาจมีปัจจัยอื่นนอกเหนือจากปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับเซลล์นิวโทรฟิลที่ส่งผลต่อการต่อต้านการอักเสบบริเวณปอดที่ผลส่วนใหญ่ที่ได้รับไม่ประสบความสำเร็จเท่าที่ควร เพื่อเป็นการเติมช่องว่างในส่วนของความรู้ที่ยังขาดหายไปนี้ รายงานการศึกษาระดับนี้จึงขอนำเสนอมุมมองที่เกี่ยวข้องกับ IL-17 และการทำหน้าที่ของนิวโทรฟิลในกรณีของการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ pandemic influenza virus H1N1 A/SW/Thailand/CU-RA29/2009 ที่แยกได้จากสุกรที่ใช้ในการศึกษาเป็นแบบจำลองของโรคปอดอักเสบและติดเชื้อในหนูทดลอง

## วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย (Objectives)

คณะผู้วิจัยได้ตั้งวัตถุประสงค์ของโครงการวิจัยจำนวน 3 ข้อ คือ

1. เพื่อตรวจวัดไตเตอร์และคำนวณค่าเฉลี่ยปริมาณไวรัส (viral titer endpoint) ของไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ pandemic H1N1 Influenza A/SW/Thailand/CU-RA29/2009 โดยทำการตรวจวัดไตเตอร์ในไขไก่ฟัก เซลล์เพาะเลี้ยงและหนูทดลอง
2. เพื่อศึกษาผลของการกระตุ้นเซลล์นิวโทรฟิลที่แยกได้จากหนูที่ทำการทดลองติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ฯ (ข้อ 1.) หรือแบคทีเรีย ด้วย recombinant IL-17A ต่อการทำหน้าที่ทั้งแบบการทำหน้าที่ภายในเซลล์ (intracellular functions) และการทำหน้าที่ภายนอกเซลล์ (extracellular function)
3. เพื่อแสดงรูปแบบและความรุนแรงของรอยโรคบริเวณปอดของหนูทดลองซึ่งเป็นผลจากการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ฯ (ข้อ 1.) หรือแบคทีเรีย และการทำหน้าที่ของเซลล์นิวโทรฟิลที่ตอบสนองต่อการติดเชื้อฯ

## ระเบียบวิธีวิจัย (Materials and Methods)

### รูปแบบการทดลองและการเก็บตัวอย่าง (Experimental Designs/Sample collection)

#### การทดลองที่ 1: การตรวจไตเตอร์และคำนวณค่าเฉลี่ยปริมาณไวรัส (ตารางที่ 1)

ชนิดของเชื้อไวรัส ใช้หัดใหญ่	ความเข้มข้นของไวรัส ( $10^{-2}$ ถึง $10^{-7}$ )	ค่าไตเตอร์ (End-point dilution)	ลักษณะที่ตรวจวัด (monitoring parameters)
Pandemic H1N1 A/SW/Thailand/ CU-RA29/2009	$n = 5$ ต่อความเข้มข้น	TCID <sub>50</sub>	การเกิด cytopathic effects (CPE) กับเซลล์เพาะเลี้ยง
	$n = 5$ ต่อความเข้มข้น	EID <sub>50</sub>	การมีชีวิตอยู่ของลูกไก่ในไข่ไก่ ฟัก (viability of inoculated eggs)
	$n = 4$ ต่อความเข้มข้น	Plaque forming unit (PFU)	ลักษณะของการเกิด plaque กับเซลล์เพาะเลี้ยง (plaque formation)
	$n = 5$ ต่อความเข้มข้น	MID <sub>50</sub> / LD <sub>50</sub>	อาการทางคลินิก/การตายของ หนูทดลอง (clinical signs/death)

#### การทดลองที่ 2 การติดเชื้อไวรัสในหนูทดลอง

ทดลองติดเชื้อหนูทดลองด้วยไวรัสใช้หัดใหญ่ Influenza virus A/CU-RA29/2009 ปริมาณไวรัสได้จากการคำนวณโดยผลการทดลองที่ 1 หรือทำการทดลองติดเชื้อร่วมกับเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ *Klebsiella pneumoniae* เพื่อจำลองภาวะการติดเชื้อแทรกซ้อนของทางเดินหายใจในหนูทดลอง จำนวน 3 ครั้งการทดลองที่เป็นอิสระต่อกัน โดยการออกแบบการทดลองดังแสดงในตารางที่ 2

กลุ่มทดลอง	จำนวนหนู (n)	รูปแบบการติดเชื้อ (I.N.)	วันที่ทำการติดเชื้อ
กลุ่มที่ 1 (Ctrl)	3-4	30 $\mu$ L PBS (กลุ่มควบคุม)	วันที่ 0
กลุ่มที่ 2 (Mix)	4-5	30 $\mu$ L Influenza A (V) ร่วมกับ	วันที่ 0 (V)
		30 $\mu$ L <i>Klebsiella pneumoniae</i> (KP)	วันที่ 4 (KP)
กลุ่มที่ 3 (Flu)	4-5	30 $\mu$ L Influenza A	วันที่ 0
กลุ่มที่ 4 (KP)	4-5	30 $\mu$ L <i>Klebsiella pneumoniae</i>	วันที่ 4

I.N. = intranasal route, PBS = phosphate buffered saline

ทดสอบการทำหน้าที่ของเซลล์นิวโทรฟิล (cellular functions) ที่แยกได้จากไขกระดูกของหนูทดลองภายหลังการติดเชื้อฯ นาน 7 วัน

## วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

### วิธีการทดลอง

#### 1. หนูทดลอง

หนูทดลองพันธุ์ BALB/cMlac ปลอดเชื้อโรค อายุ 8-10 สัปดาห์ คณะแพศ น้ำหนักระหว่าง 18 ถึง 23 กรัม ที่ได้รับจากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล นำมาเลี้ยงในอาคารสัตว์ทดลอง คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ โดยผ่านการพิจารณาเห็นชอบโดยคณะกรรมการจรรยาบรรณสัตว์ทดลอง ประจำคณะสัตวแพทยศาสตร์ฯ (ใบอนุญาตเลขที่ อ.1/2555) หนูทดลองทั้งหมดได้รับอาหาร น้ำ อย่างเพียงพอและไม่จำกัดทั้งก่อนและในระหว่างการทดลอง เลี้ยงภายในห้องควบคุมอุณหภูมิระหว่าง 25-27 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์อยู่ระหว่าง 30-70 เปอร์เซ็นต์ ได้รับแสงสว่างตามมาตรฐานการเลี้ยง คือ วงรอบเวลาการให้แสงสว่างและความมืด คือ 12 ชั่วโมง

#### 2. ไวรัส

เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ Pandemic (H1N1) Influenza virus (A/SW/Thailand /CU-RA29/2009) (Sreta *et al.*, 2010) ที่แยกได้จากสุกรป่วย โดยได้รับความอนุเคราะห์ตัวอย่างไวรัสจากหน่วยชั้นสูตโรคสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย นำไวรัสมาเพิ่มจำนวนในไข่ไก่ฟักอายุ 10 วัน และแยกเก็บของเหลวที่มีไวรัสจากบริเวณ allantoic cavity ของเหลวที่ได้นำมารองและแบ่งเก็บในหลอดทดลองที่อุณหภูมิตดลบ 70 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้

#### 3. เซลล์เพาะเลี้ยง

เซลล์เพาะเลี้ยงชนิด Madin–Darby canine kidney (MDCK) นำมาเพาะเลี้ยงและเพิ่มจำนวนในถาดเลี้ยงเซลล์ที่บรรจุอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco®, Life Technologies) ที่เติม 10 เปอร์เซ็นต์ Fetal bovine serum (FBS, Gibco®) และยาปฏิชีวนะ (DMEM w/ 10% FBS & ABO) นำเซลล์ไปบ่มเลี้ยงในตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส (37 °C) ภายใต้บรรยากาศที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์

(5% CO<sub>2</sub>) เลี้ยงเซลล์จนมีลักษณะของเซลล์ที่แผ่ชั้นเดียวกินพื้นที่ประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ของภาชนะเลี้ยง (90% confluent monolayer) ก่อนนำมาใช้ในการทดลอง

### การทดลองที่ 1: การตรวจไตเตอร์และคำนวณค่าเฉลี่ยปริมาณไวรัส

#### 1) การตรวจไตเตอร์และคำนวณค่าเฉลี่ยปริมาณไวรัสโดย 50% Egg Infective Dose (EID<sub>50</sub>)

ไข่ไก่ฟักอายุ 10 วัน ที่ใช้ในการคำนวณค่า EID<sub>50</sub> ได้รับจากบริษัทเบทาโกรภาคเหนือ เกษตรอุตสาหกรรมจำกัด นำไข่ไก่มาส่องภายใต้หลอดไฟของกล่องสำหรับส่องไข่ไก่ ใช้ดินสอลากเส้นตรงตำแหน่งของ air space บนผิวเปลือกไข่และวาดจุดสำหรับกำหนดตำแหน่งที่ใช้เจาะและฉีดไวรัสเข้าสู่ไข่ไก่ฟัก โดยปกติแล้วจุดนั้นจะอยู่เหนือเส้นที่ลากไว้ประมาณ 4 มิลลิเมตร โดยหลีกเลี่ยงไม่ให้จุดพาดทับตำแหน่งของเส้นเลือด

เตรียมไวรัสสำหรับฉีดโดยการเจือจางไวรัสเข้มข้นที่แยกได้ในข้อ 2. ตามลำดับแบบ 10 เท่า (10-fold dilution) โดยใช้สารละลาย Hank's Balanced Salt Solution (HBSS, Sigma-Aldrich) โดยให้ความเข้มข้นเป็น 10<sup>-2</sup> ถึง 10<sup>-7</sup> dilution ภายในห้องปฏิบัติการระดับ Biosafety Level 2 plus (BSL-2+) โดยมีจำนวนไข่ไก่ที่ใช้ในแต่ละความเข้มข้นของไวรัสเท่ากับ 5 ฟองต่อความเข้มข้น จากนั้นทำการดูไวรัสที่เจือจางแล้วในแต่ละความเข้มข้นจำนวน 150 ไมโครลิตร (μl) ผสมกับ 100 μl ของปฏิชีวนะ (5% Gentamicin) นำไวรัสฯ มาฉีดเข้าบริเวณจุดบนเปลือกไข่ที่ได้ทำการระบุตำแหน่งไว้ล่วงหน้าแล้ว ซึ่งได้แก่บริเวณ allantoic cavity โดยวิธีการปลอดเชื้อ นำไข่ไก่ที่ฉีดเชื้อไวรัสแล้วไปฟักต่อในตู้ฟักไข่ที่ตั้งอุณหภูมิที่ 37°C ความชื้นสัมพัทธ์เท่ากับ 55 เปอร์เซ็นต์ นาน 5 วัน ภายในห้องปฏิบัติการ BSL2+ บันทึกการมีชีวิตของไข่ไก่ฟักทุกวัน วันละอย่างน้อยหนึ่งครั้ง ค่าไตเตอร์หรือ EID<sub>50</sub>/mL คำนวณโดยใช้วิธีการของ (Reed and Muench, 1938)

#### 2) การตรวจไตเตอร์และคำนวณค่าเฉลี่ยปริมาณไวรัสโดย 50% Tissue Culture Infective Dose (TCID<sub>50</sub>)

ปิเปตต์เซลล์เพาะเลี้ยงชนิด MDCK (2 × 10<sup>4</sup> เซลล์) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM w/ 10% FBS & ABO ลงในภาชนะเลี้ยงเซลล์ชนิด 24 หลุม (24-well plate) จำนวน 5 หลุมต่อความเข้มข้นของไวรัส นำเซลล์ไปบ่มในตู้บ่มที่ 37°C, 5% CO<sub>2</sub> จนได้เซลล์เพาะเลี้ยงที่มีลักษณะ 90% confluent monolayer ก่อนการทดสอบ

ตรวจสอบลักษณะและความสมบูรณ์ของเซลล์เพาะเลี้ยงภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่างแบบหัวกลับ (inverted microscope) เทอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้งและล้างเซลล์ด้วยสารละลาย

Phosphate Buffered Saline (PBS) อุณหภูมิ 4°C ไวรัสที่ได้ทำการเจือจางตามลำดับแบบ 10 เท่าในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM โดยมีความเข้มข้นของไวรัสเท่ากับ  $10^{-1}$  ถึง  $10^{-5}$  จำนวน 300  $\mu\text{l}$  ใส่ลงในเซลล์เพาะเลี้ยง บ่มเซลล์นาน 60 นาทีในตู้บ่มที่  $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  เพื่อให้ไวรัสติดเข้าเซลล์ โดยในระหว่างทำการบ่มทุก ๆ 10 นาที ให้เอียงภาชนะเพื่อให้ไวรัสกระจายได้ทั่วถึง เมื่อครบกำหนดเวลาดูดไวรัสและอาหารเลี้ยงเซลล์จากแต่ละหลุมทิ้ง ล้างเซลล์ด้วยสารละลาย PBS จำนวน 2 ครั้งแล้วจึงเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ลงไป นำภาชนะที่ทำการติดเชื้อไวรัสเรียบร้อยแล้วไปใส่ในตู้บ่ม ทำการบ่มเซลล์ต่ออีก 5 วัน ณ ห้องปฏิบัติการระดับ BSL-2+ ตรวจสอบลักษณะของการเกิด cytopathic effect (CPE) ทุกวันและจดบันทึก เช่น ลักษณะของการเกิด rounded cells, granularity, vacuolization, syncytia formation หรือ focus formation ในวันที่ 5 ของการทดลอง ดูอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ล้างเซลล์ด้วยสารละลาย PBS และตรึงเซลล์ด้วยการเติม 250  $\mu\text{l}$  สารละลาย 10% ฟอร์มาลิน นาน 20 นาทีที่อุณหภูมิห้อง ล้างเซลล์ด้วยสารละลาย PBS และย้อมสีเซลล์ด้วย 10% crystal violet นาน 10 นาทีก่อนล้างออกด้วยน้ำสะอาดและผึ่งภาชนะให้แห้ง ค่าไตเตอร์หรือ  $\text{TCID}_{50}/\text{mL}$  คำนวณโดยใช้วิธีการของ Reed and Muench

### 3) การตรวจไตเตอร์ไวรัสโดยวิธี Viral plaque formation assay

ปิเปตต์เซลล์เพาะเลี้ยงชนิด MDCK ( $2 \times 10^4$  เซลล์) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM w/ 10% FBS & ABO ลงในภาชนะเลี้ยงเซลล์ชนิด 24 หลุม (24-well plate) จำนวน 4 หลุมต่อความเข้มข้นของไวรัส นำเซลล์ไปบ่มในตู้บ่มที่  $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  จนได้เซลล์เพาะเลี้ยงที่มีลักษณะ 90% confluent monolayer ก่อนการทดสอบ ตรวจสอบลักษณะและความสมบูรณ์ของเซลล์เพาะเลี้ยงภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่างแบบหัวกลับ เทอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้งและล้างเซลล์ด้วยสารละลาย PBS อุณหภูมิ 4°C เพื่อชะล้างเซลล์ที่ตายให้หลุดไป ปิเปตต์ไวรัสที่ได้ทำการเจือจางตามลำดับแบบ 2 เท่าในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM โดยมีความเข้มข้นของไวรัสเท่ากับ  $10^{-1}$  ถึง  $10^{-6}$  จำนวน 500  $\mu\text{l}$  ใส่ลงในเซลล์เพาะเลี้ยง บ่มเซลล์นาน 60 นาทีในตู้บ่มที่  $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  เพื่อให้ไวรัสติดเข้าเซลล์ โดยในระหว่างทำการบ่มทุก ๆ 10 นาที ให้เอียงภาชนะเพื่อให้ไวรัสกระจายได้ทั่วถึง เมื่อครบกำหนดเวลาดูดไวรัสและอาหารเลี้ยงเซลล์จากแต่ละหลุมทิ้ง ล้างเซลล์ด้วยสารละลาย PBS จำนวน 3 ครั้ง แล้วจึงเติมวุ้นกึ่งแข็ง (Methylcellulose [MC] overlay media) จำนวน 300  $\mu\text{l}$  ลงในแต่ละหลุม ส่วนประกอบของ MC overlay media ประกอบด้วย 1) 0.6% Methylcellulose 2) DMEM w/ 5% FBS & ABO และ 3) 10%  $\text{NaHCO}_3$  solution ที่ผสมเข้ากันและอุ่นที่อุณหภูมิ  $37^{\circ}\text{C}$  ก่อนนำมาเติมลงในเซลล์ จากนั้นนำภาชนะไปใส่ในตู้บ่ม ทำการบ่มเซลล์ต่ออีก 3-5 วัน ณ ห้องปฏิบัติการระดับ BSL-

2+ เมื่อครบกำหนดเวลา ดูด MC overlay media ทั้งและล้างเซลล์ด้วยสารละลาย PBS จำนวน 2 ครั้งและตรึงเซลล์ด้วย 250  $\mu$ l สารละลาย 10% พอร์มาลิน นาน 20 นาทีที่อุณหภูมิห้อง ล้างเซลล์ด้วยสารละลาย PBS และย้อมสีเซลล์ด้วย 10% crystal violet นาน 10 นาทีก่อนล้างออกด้วยน้ำสะอาดและฝั่งสภาพหลุมให้แห้ง ค่าไตเตอร์หรือ plaque forming unit (PFU) คำนวณได้จากการนับจำนวน plaque ของไวรัสที่เกิดขึ้น (เซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสจะปรากฏบริเวณใส ย้อมไม่ติดสีหรือย้อมติดสีจาง) จำนวนระหว่าง 10 ถึง 100 plaques เพื่อหาค่าเฉลี่ยคณิตศาสตร์ (average) ก่อนนำมาแทนค่าโดยอาศัยสูตรในการคำนวณ คือ

$$\text{PFU/mL} = \# \text{ of plaques observed} / (\text{dilution factor}) \times 0.5 \text{ ml virus added}$$

สำหรับจำนวน plaque ที่คำนวณได้น้อยกว่า 10 ต่อหลุม ถือว่ามีค่าต่ำกว่าวิธีที่ใช้นี้จะตรวจสอบได้

#### 4) การตรวจไตเตอร์ และคำนวณค่าเฉลี่ยปริมาณไวรัสโดย 50% Mouse Infective Dose (MID<sub>50</sub>) โดยการติดเชื้อในหนูทดลอง

หนูทดลองพันธุ์ BALB/cMlac ปลอดเชื้อโรค อายุ 8-10 สัปดาห์ นำมาติดเชื้อไวรัสในห้องปฏิบัติการระดับ BSL-2+ โดยการวางยาสลบหนูทดลองโดยการเหนี่ยวนำสลบโดยการฉีดยาสลบชนิด Tiletamine + Zolazepam (Zoletil<sup>®</sup>, Virbac) ปริมาณ 40/80 mg/kg (Gargiulo *et al.*, 2012) ร่วมกับ Medetomidine HCl (Nature Vet, Australia) ปริมาณ 1 mg/kg เข้าช่องท้อง (IP) ตามวิธีการของ Bachoual *et al.*, 2011 เมื่อหนูสลบแล้วจึงหยอดจมูกด้วยไวรัสที่ได้ทำการเจือจางในสารละลาย PBS จนได้ความเข้มข้นของไวรัสเท่ากับ  $10^{-1}$  ถึง  $10^{-5}$  จำนวน 50 ไมโครลิตรเข้าทางช่องจมูก (intranasal route, I.N.) โดยมีจำนวนหนูทดลองในแต่ละความเข้มข้นของไวรัสเท่ากับ 5 ตัว ( $n = 5$ ) สังเกตและบันทึกอาการป่วยที่เกี่ยวข้องกับระบบทางเดินหายใจ หรืออาการอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องของหนูทดลองภายหลังการติดเชื้อไวรัสใช้หวัดใหญ่เป็นระยะเวลา 10 วัน เมื่อครบกำหนดเวลาการทดลอง ทำการการุณยฆาตหนูทดลองทั้งหมด บันทึกรอยโรคที่ตรวจพบจากระดับสูตรซาก เก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อปอดและหลอดลมจากหนูทดลอง ตลอดจนเนื้อเยื่อของ หัวใจ ตับ ไต ม้าม ลำไส้ และทางเดินอาหาร แช่ลงในสารละลาย 10% buffered formalin เพื่อเตรียมสไลด์ทางจุลพยาธิวิทยา ค่าไตเตอร์หรือ MID<sub>50</sub>/mL คำนวณโดยใช้วิธีการของ Reed and Muench

## การทดลองที่ 2 การติดเชื้อไวรัสและแบคทีเรียในหนูทดลอง

ทดลองติดเชื้อหนูทดลองด้วยไวรัสไข้หวัดใหญ่ Influenza virus A/CU-RA29/2009 ปริมาณไวรัสได้จากการคำนวณโดยผลการทดลองที่ 1 หรือทำการทดลองติดเชื้อร่วมกับเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ *Klebsiella pneumoniae* เพื่อจำลองภาวะการติดเชื้อแทรกซ้อนของทางเดินหายใจในหนูทดลอง จำนวน 3 ครั้งการทดลองที่เป็นอิสระต่อกัน โดยการออกแบบการทดลองดังแสดงใน**ตารางที่ 2**

### 1) การทดลองติดเชื้อไวรัสร่วมกับแบคทีเรียในหนูทดลอง (*in vivo* viral-bacterial infection)

หนูทดลองสายพันธุ์ BALB/cMlac อายุ 8-10 สัปดาห์ นำมาแบ่งเป็น 4 กลุ่มแบบสุ่ม ในแต่ละกลุ่มมีจำนวน 3-5 ตัว ดังแสดงในตารางที่ 2 หนูกลุ่มที่ 2 และ 3 นำมาติดเชื้อไวรัส pandemic H1N1 Influenza virus (A/SW/Thailand /CU-RA29/2009) โดยการหยอดจุมูก (50 ไมโครลิตรใน PBS) ภายใต้ภาวะสลบ โดยมีจำนวนไวรัสเท่ากับ  $5 \times 50\%$  Mouse Infective Dose ( $MID_{50}$ ) ซึ่งเป็นค่าที่ได้จากการคำนวณจากการทดลองที่ 1 สังเกตอาการหนูทดลองที่ได้รับเชื้อไวรัสนาน 7 วัน และในวันที่ 4 หลังการติดเชื้อไวรัส ทำการติดเชื้อซ้ำหนูทดลองในกลุ่มที่ 2 และติดเชื้อหนูทดลองกลุ่ม 4 ด้วยแบคทีเรียชนิด *Klebsiella pneumoniae* ขนาด  $10^5$  colony-forming units (cfu) จำนวน 50 ไมโครลิตรใน PBS โดยการหยอดจุมูก สังเกตอาการป่วย/ตายของหนูทดลอง เมื่อครบกำหนด 7 วัน นับตั้งแต่เริ่มต้นการทดลอง หนูทดลองจะถูกการุณยฆาต เก็บตัวอย่างน้ำล้างปอด และเซลล์จากไขกระดูกเพื่อนำมาแยกเซลล์นิวโทรฟิล เก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อปอดและหลอดลมเพื่อเตรียมสไลด์ทางจุลพยาธิวิทยา

### 2) การเหนี่ยวนำสลบและการุณยฆาต (Anesthesia and Euthanasia)

หนูทดลองถูกเหนี่ยวนำสลบโดยการฉีดยาสลบชนิด Tiletamine + Zolazepam ร่วมกับ Medetomidine HCl เข้าช่องท้อง เมื่อหนูสลบแล้วจึงทำการุณยฆาตโดยการทำให้ cervical dislocation ตามวิธีการแนะนำของ The Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 2011, 8th Edition, Institute for Laboratory Animal Research.

### 3) การเตรียมแบคทีเรียชนิด *Klebsiella pneumoniae* (KP)

นำแบคทีเรียชนิด *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 27736) มาเพิ่มจำนวนในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Luria-Bertani Broth (LB broth) ในตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิ 37 °C และมีระบบการเขย่า 120 ครั้งต่อนาที (120 rpm) นาน 18 ชั่วโมง (Ye *et al.*, 2001) จนได้จำนวนเซลล์อยู่ในช่วงของ

log phase หรือวัดค่าการดูดกลืนแสง (optical density; OD) ที่ 600 นาโนเมตร (nm) ได้เท่ากับ 0.4-0.6 และนำมาคำนวณจำนวนแบคทีเรีย (CFU/mL) โดยใช้สูตร

$$y = OD_{600} \times (5.09 \times 10^8) + (-8.3 \times 10^8)$$

ซึ่งค่าเฉลี่ยของจำนวนแบคทีเรียเมื่อวัดค่า OD ได้อยู่ระหว่าง 0.4-0.6 จะมีจำนวนแบคทีเรียเท่ากับ  $10^8$  cfu/mL ปรับปริมาณแบคทีเรียให้เหมาะสมในแต่ละการทดลอง

#### 4) การย้อมติดสีฟลูออเรสเซนซ์แบคทีเรียชนิด *Klebsiella pneumoniae*

นำแบคทีเรียในข้อ 3) ที่เพิ่มจำนวนแล้ว ( $10^8$  cfu/mL) นำเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดมาฆ่าด้วยความร้อน (heat-killed) ในอ่างน้ำปรับอุณหภูมิคงที่ที่  $60^\circ\text{C}$  นาน 90 นาที ดัดแปลงจาก Chuammitri *et al.*, 2011 แล้วจึงนำแบคทีเรียที่ได้มาปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm นาน 5 นาที นำเซลล์แบคทีเรียภายหลังการปั่นเหวี่ยงมาเจือจางด้วยสารละลาย PBS pH 7.2-7.4 และเตรียมย้อมติดสีฟลูออเรสเซนซ์ด้วยสี Hoechst 33342 trihydrochloride, trihydrate (Life Technologies) ความเข้มข้น  $0.5 \mu\text{g/mL}$  (Lebaron and Joux, 1994) และนำไปบ่มที่  $37^\circ\text{C}$  นาน 20 นาทีในที่มืด

#### 5) การคัดแยกเซลล์นิวโทรฟิลจากไขกระดูก

หลังการการุณยฆาต (euthanasia) นำท่อนกระดูกจากขาของหนูทดลอง คือ กระดูก femurs นำมาตัดบริเวณปลายกระดูกทั้งสองข้างโดยวิธีกึ่งปลอดเชื้อและเก็บเซลล์ไขกระดูกตามวิธีของ Lim *et al.*, 2011 นำเซลล์ไขกระดูกมาละลายในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด RPMI-1640 (Gibco<sup>®</sup>) ที่เติม 10% Fetal Bovine Serum (FBS)

นำเซลล์ไขกระดูกมาแยกด้วยวิธี discontinuous density gradient โดย Histopaque 1.077/1.119 (Sigma-Aldrich) ตามวิธีของ Luo and Dorf, 2001 โดยการปั่นเหวี่ยงที่ 700 xg นาน 30 นาที อุณหภูมิ  $4^\circ\text{C}$  (Allegra X-15R Centrifuge, Beckman Coulter) เก็บเซลล์นิวโทรฟิลที่อยู่ระหว่างรอยต่อของชั้น 1.077/1.119 แล้วจึงย่อยเม็ดเลือดแดงปนเปื้อนเซลล์ด้วย  $1 \times$  ACK buffer นาน 30 วินาที อุณหภูมิ  $37^\circ\text{C}$  สูตรสำหรับเตรียม ACK buffer คือ  $\text{NH}_4\text{Cl}$  8.29 กรัม  $\text{KHCO}_3$  1 กรัม  $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot \text{H}_2\text{O}$  0.0372 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร ปรับ pH ให้เท่ากับ 7.4 (Southgate *et al.*, 2008) ล้างเซลล์ และนำก้อนเซลล์ (pellet) มาละลายในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 (Gibco<sup>®</sup>) ที่เติม 1% FBS นิวโทรฟิลที่แยกได้นำมาตรวจสอบความบริสุทธิ์และการมีชีวิตด้วย cytopsin และย้อมสี Wright Rapid Stain และ 0.4% Trypan Blue Solution (Sigma-Aldrich) เซลล์ที่นำมาใช้ในการทดลองมีชีวิตมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ ปรับเซลล์ให้มีความเข้มข้น  $1 \times 10^6$  เซลล์ต่อมิลลิลิตรก่อนนำไปใช้

## 6) การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเซลล์นิวโทรฟิลจากไขกระดูกด้วยการย้อมโมเลกุล Ly-6G/Ly-6C (Gr-1) และตรวจวัดด้วยวิธี Flow cytometry

ภายหลังการแยกเซลล์นิวโทรฟิลจากไขกระดูกในข้อ 5) แบ่งเซลล์จำนวน  $1 \times 10^5$  เซลล์ใน RPMI-1640 ใส่ใน microcentrifuge tube (1.5 mL) ปั่นตกตะกอนเซลล์ ดูด RPMI-1640 ที่ทิ้งไปเติม 100  $\mu$ L blocking buffer (1X PBS+2% BSA) เพื่อละลายก้อนเซลล์ เติม 0.25  $\mu$ g ของ Alexa Fluor<sup>®</sup> 647 anti-mouse Ly-6G/Ly-6C (Gr-1) Clone RB6-8C5 (BioLegend<sup>®</sup>) ลงผสม vortex เซลล์ และบ่มในที่มืด อุณหภูมิ 4 °C นาน 30 นาที เมื่อครบเวลา ล้างเซลล์ด้วย 500  $\mu$ L washing buffer (1X PBS w/2% FCS, 0.1% Sodium Azide) vortex และปั่น 6,500 rpm, 1 นาที จำนวน 2 ครั้ง ดูดของเหลวทิ้งอย่างระวัง ละลายก้อนเซลล์ใน 250  $\mu$ L ของ 1% paraformaldehyde (PFA) ส่งตรวจวิเคราะห์โดย CyAn ADP High-Performance Flow Cytometer (Beckman-Coulter) โดยใช้ Excitation Laser Line ที่ 642 nm หรือที่ parameter FL8 เก็บข้อมูลจำนวน 10,000 events นำข้อมูลมาวิเคราะห์รูปแบบของ fluorescence (FL) และ Side scatter (SSC) โดยโปรแกรมสำเร็จรูป FCS Express 4 Flow cytometry (De Novo Software) ตรวจสอบค่า Mean Fluorescent Intensity (MFI) จากเซลล์เพื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้ทำการย้อมสี (unstained ใช้เป็นค่าแบคกราวนด์)

## 7) การเก็บตัวอย่างน้ำล้างปอด (Bronchoalveolar lavage, BAL)

เก็บน้ำล้างปอด (BAL) จากหนูภายหลังการุณยฆาต ตามวิธีการของ Bachoual *et al.*, 2011; Hamada *et al.*, 2009; Narasaraju *et al.*, 2011 โดยมีการดัดแปลง วิธีการโดยย่อ เปิดช่องอกโดยวิธีการปลอดเชื้อ ทำการกรีดผ้าหloedมและฉีดสารละลาย PBS จำนวน 500  $\mu$ L จำนวน 2 ครั้งเพื่อล้างปอด (lavage) ดูดเก็บตัวอย่างน้ำล้างปอดใส่หลอดทดลองและแช่เย็นในน้ำแข็ง แล้วจึงทำการปั่นเหวี่ยงน้ำล้างปอดที่ 400 xg นาน 15 นาทีที่ 4 °C ตะกอนเซลล์นำมาละลายในสารละลาย PBS ที่ทำการเติม 0.03% bovine serum albumin (BSA, Sigma-Aldrich) ปั่นเซลล์ (cytospin) เตรียมสไลด์และย้อมสี Wright Rapid Stain เพื่อทำการแยกชนิดของเม็ดเลือด (differential cell counts) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง

## 8) การทดสอบการทำหน้าที่ของเซลล์นิวโทรฟิล (Neutrophil functional assays)

เซลล์นิวโทรฟิลที่แยกได้จากไขกระดูกของหนูทดลองภายหลังการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ หรือแบคทีเรียชนิด *Klebsiella pneumoniae* นาน 7 วัน (จากข้อที่ 2) นำมากระตุ้นเบื้องต้น (priming) ด้วย Mouse IL-17A Recombinant Protein (rIL-17A, eBioscience) ความเข้มข้น

สุดท้าย 100 ng/mL (Freitas *et al.*, 2009; Hoshino *et al.*, 2000; Hoshino *et al.*, 1999) หรือ PBS ใช้เป็นเซลล์ควบคุม นาน 30 นาที ทำการทดลองซ้ำกับเซลล์จำนวนอย่างน้อย 2 หลุม (duplicate wells) จากนั้นทำการทดสอบการทำหน้าที่ของเซลล์ฯ ดังนี้

### 8.1) การตรวจสอบ Reactive Oxygen Species (ROS) ภายในนิวโทรฟิล

การทดสอบการสร้าง reactive oxygen species (ROS) ของเซลล์นิวโทรฟิลจำนวน  $1 \times 10^5$  เซลล์ภายในภาตหลุม (96-well plate) ภายหลังกระตุ้นเซลล์เบื้องต้น ปั่นเหวี่ยงภาตหลุมที่ 1,200 rpm (LMC-3000 Laboratory Centrifuge, BioSan) นาน 5 นาที นำเซลล์มากระตุ้นอีกครั้งด้วย Phorbol-12-myristate-13-Myristate Acetate (PMA, EMD Millipore) ความเข้มข้นสุดท้าย 100 nM/mL ใน HBSS +  $\text{Ca}^{2+}$  &  $\text{Mg}^{2+}$  นาน 15 นาทีในตู้บ่มฯ เมื่อครบกำหนดเวลา เติม fluorescent probe (Carboxyl-H<sub>2</sub>DCFDA, Life Technologies) เพื่อตรวจสอบการสร้างออกซิเดชันภายในเซลล์ (ROS) เก็บรักษาเซลล์ในตู้บ่มเซลล์อีกครั้งนาน 15 นาที เมื่อครบกำหนดเวลา นำภาตหลุมไปปั่นเหวี่ยง (1,200 rpm นาน 5 นาที) ดูดของเหลวด้านบนทิ้ง ล้างเซลล์ด้วย PBS นำภาตหลุมไปปั่นเหวี่ยงและดูดของเหลวด้านบนทิ้ง เติม 1% PFA ลงในแต่ละหลุม (250  $\mu\text{L}$ ) เพื่อตรึงเซลล์ ดูดตัวอย่างเซลล์ในแต่ละหลุมใส่หลอดทดลอง เก็บรักษาที่ 4 °C ก่อนส่งตัวอย่างเพื่อตรวจวิเคราะห์โดย CyAn ADP Flow Cytometer โดยใช้ Excitation Laser Line ที่ 488 nm หรือที่ parameter FL1 เก็บข้อมูลจำนวน 10,000 events นำข้อมูลมาวิเคราะห์รูปแบบของ FL และ SSC โดยโปรแกรมสำเร็จรูป FCS Express 4 Flow cytometry ตรวจสอบค่า MFI จากเซลล์ของกลุ่มที่ไม่ได้รับและได้รับ rIL-17A และเซลล์ที่ไม่ได้ทำการย้อมสี (unstained ใช้เป็นค่าแบคกราวนด์)

### 8.2) การทดสอบกระบวนการฟาโกไซโตซิส (Phagocytosis)

ประเมินความสามารถของกระบวนการฟาโกไซโตซิสโดยใช้แบคทีเรียแกรมลบชนิด *Klebsiella pneumoniae* (KP) ที่ย้อมติดสีฟลูออเรสเซนต์จากการเตรียมในข้อ 4) โดยนำแบคทีเรียมาห่อหุ้มด้วยแอนติบอดี (opsonize) โดยใช้ 10% normal mouse serum ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 20 นาที เติม opsonized bacteria ลงในเซลล์นิวโทรฟิลจำนวน  $1 \times 10^5$  เซลล์ (Moore *et al.*, 2003) ที่ผ่านการกระตุ้นเบื้องต้นด้วย rIL-17A หรือ PBS แล้วโดยมีอัตราส่วนของเซลล์ต่อแบคทีเรียเท่ากับ 1 ต่อ 10 (MOI = 1:10) ปั่นเหวี่ยงภาตหลุมที่ 1,200 rpm นาน 5 นาที เพื่อให้เซลล์สัมผัสกับแบคทีเรีย บ่มเซลล์ในตู้บ่มเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> นาน 60 นาที เมื่อครบกำหนดเวลา ปั่นเหวี่ยงภาตหลุม ดูดของเหลวด้านบนทิ้ง ล้างเซลล์และแบคทีเรียส่วนเกินออกจากหลุมด้วย PBS (4

°C) และเติม 1 % PFA ลงในหลุม (250  $\mu$ L) เพื่อตรึงเซลล์ ดูดตัวอย่างเซลล์ในแต่ละหลุมใส่หลอดทดลอง เก็บรักษาที่ 4 °C ก่อนส่งตัวอย่างเพื่อตรวจวิเคราะห์โดย CyAn ADP Flow Cytometer โดยใช้ Excitation Laser Line ที่ 405 nm หรือที่ parameter FL6 เก็บข้อมูลจำนวน 10,000 events นำข้อมูลมาวิเคราะห์รูปแบบของ FL และ SSC โดยโปรแกรมสำเร็จรูป FCS Express 4 Flow cytometry ตรวจสอบค่า MFI จากเซลล์ของกลุ่มที่ไม่ได้รับและได้รับ rIL-17A และเซลล์ที่ไม่ได้ทำการย้อมสี (unstained ใช้เป็นค่าแบคกราวนด์)

### 8.3) การทำลายเชื้อแบคทีเรียภายในเซลล์นิวโทรฟิล (Bactericidal Assay)

ตรวจสอบการทำลายเชื้อแบคทีเรียภายในเซลล์ด้วยวิธี Thiazoyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT) bactericidal assay โดยวิธีที่ดัดแปลงจาก Chuammitri *et al.*, 2011 ด้วยการนำแบคทีเรียที่มีชีวิตจากข้อ 3) นำมาห่อหุ้มด้วยแอนติบอดีก่อนนำมาทดสอบ ทำการทดลองคล้ายกับในข้อ 8.2) เมื่อเติมแบคทีเรียลงในหลอดแล้ว นำเซลล์และแบคทีเรียไปบ่ม (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>) นาน 45 นาที เมื่อครบเวลา นำหลอดไปปั่นเหวี่ยง (1,200 rpm นาน 5 นาที) ดูดของเหลวภายหลังการปั่นทิ้งบางส่วน จากนั้นเติมน้ำกลั่นลงในหลุมเพื่อทำการย่อยเซลล์นิวโทรฟิลให้แตก เติม LB broth ลงในหลอดหลุม นำหลอดไปบ่มที่ 37 °C นาน 90 นาที เติม filtered sterile MTT (Sigma-Aldrich) 2  $\mu$ g/mL ที่ละลายใน LB broth ลักษณะปรากฏเป็นสารละลายสีเหลืองอ่อน นำหลอดหลุมไปบ่มที่ 37 °C นาน 15-30 นาทีเพื่อให้เกิดสีม่วงของ Formazan ซึ่งเกิดจากการรีดักชันของ tetrazolium โดย NAD(P)H-dependent oxidoreductase จากนั้นเติม Dimethyl sulfoxide (DMSO) เพื่อละลาย Formazan นำหลอดไปปั่นเหวี่ยง ดูดของเหลวด้านบนนำไปใส่หลอดหลอดใหม่ อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer (Anthos Labtec Instruments) ในการทดลองทุกครั้งจะเตรียมหลุมที่เติมเฉพาะแบคทีเรียสำหรับการอ้างอิงรวมไว้ด้วยทุกครั้งของการทดลอง นำค่าที่วัดได้มาคำนวณค่าการทำลายเชื้อแบคทีเรียซึ่งสัมพันธ์กับจำนวนแบคทีเรียที่มีชีวิตที่เหลืออยู่ (Percentage killing) โดยใช้สูตร

$$\% \text{ of killing} = 100 - (\text{OD}_{\text{test}} / \text{OD}_{\text{Bact only}}) \times 100$$

### 8.4) การตรวจวัดปริมาณการสร้าง Neutrophil Extracellular Traps (NETs) โดย fluorescent plate reader

ตรวจสอบการสร้างโครงสร้าง NETs ซึ่งเป็นการทำหน้าที่ในการทำลายภายนอกเซลล์ โดยการเติมนิวโทรฟิลจำนวน  $1 \times 10^5$  เซลล์ต่อหลุม ลงในหลอดหลุมชนิด 96-well flat plate ภายหลังการกระตุ้นเบื้องต้น เติมสิ่งกระตุ้นการสร้างโครงสร้าง NETs ได้แก่ PMA (100 nM) ใน HBSS +

Ca<sup>2+</sup> & Mg<sup>2+</sup> บ่มเซลล์นาน 150 นาที (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>) เพื่อให้เซลล์เกิดการสร้างโครงสร้าง NETs (Lim *et al.*, 2011; Medina, 2009) เมื่อครบกำหนดเวลา ดูดของเหลวในหลุมทิ้งไป (225 µL) พยายามอย่ารบกวนเซลล์ที่ตกตะกอนอยู่ที่ก้นหลุม นำภาชนะไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,200 rpm นาน 5 นาที เติม ice-cold RPMI 1640 จำนวน 200 µL ลงในแต่ละหลุม ผสมเซลล์ด้วยการใช้ปิเปตผสมขึ้น-ลงอย่างแรงหลาย ๆ ครั้ง นำภาชนะไปปั่นเหวี่ยง ดูดของเหลวใสด้านบน (supernatant fluid) จำนวน 200 µL ย้ายไปเติมในภาชนะหลุมขึ้นใหม่ ย้อมสีฟลูออเรสเซนต์ชนิด Hoechst 33342 ความเข้มข้น 5 mg/mL จำนวน 50 µL เพื่อย้อมโครงสร้างดีเอ็นเอ (DNA) ที่ปรากฏเป็นส่วนหนึ่งของโครงสร้าง NETs (Farrera and Fadeel, 2013) บ่มเซลล์ในที่มืด ห่อฟอยด์ให้กับภาชนะเพื่อป้องกันแสงและเก็บรักษาภาชนะไว้ที่ 4 °C ตรวจสอบระดับการเรืองแสงของโครงสร้าง NETs ด้วยเครื่อง Synergy™ HT Multi-Detection Microplate Reader (BioTek) โดยใช้ช่วงคลื่นสำหรับการเร้า (excitation) เท่ากับ 360 nm และช่วงคลื่นของการเรืองแสง (emission) เท่ากับ 470 nm บันทึกข้อมูลเป็น relative fluorescent unit (RFU) โดยเก็บข้อมูลในระดับความไว (sensitivity) เท่ากับ 50, 75 และ 100 เปอร์เซ็นต์

#### 8.5) การตรวจสอบโครงสร้าง NETs ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

ตรวจสอบการสร้างโครงสร้าง NETs ซึ่งเป็นการทำหน้าที่ในการทำลายภายนอกเซลล์ นำแผ่นปิดสไลด์กระจกทรงกลมขนาด 13 มิลลิเมตรที่เคลือบด้วย 0.001% poly-L-lysine มาวางในภาชนะหลุมแบบ 24-well plate เติมเซลล์จำนวน 2.5 × 10<sup>4</sup> เซลล์บริเวณกึ่งกลางแผ่นปิดสไลด์กระตุ้นเซลล์เบื้องต้น นาน 30 นาที (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>) จากนั้นจึงเติม 100 nM PMA ใน HBSS + Ca<sup>2+</sup> & Mg<sup>2+</sup> บ่มเซลล์ 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> นาน 150 นาที (Ermer *et al.*, 2009) ในระหว่างการบ่มเซลล์ เติม PMA เพิ่มเติมลงบนสไลด์ เมื่อครบเวลา 60 และ 120 นาทีภายหลังเริ่มต้นกระตุ้นเซลล์ เมื่อครบกำหนดเวลา ปั่นเหวี่ยงภาชนะที่ 1,200 rpm นาน 5 นาที จากนั้นทำการล้างเซลล์ด้วย PBS (4 °C) และเติม 4% PFA ลงในหลุมเพื่อตรึงเซลล์ นาน 25 นาที ล้างเซลล์ด้วย PBS จำนวน 3 ครั้ง และนำแผ่น circular cover glass มาวางบนสไลด์กระจกขนาด 1 × 3 นิ้ว ย้อมนิวเคลียสและโครงสร้าง NETs ด้วย Fluoroshield mounting medium ที่มีสีฟลูออเรสเซนต์ชนิด DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenyl indole, Sigma-Aldrich) ผสมอยู่ ตรวจสอบการสร้าง NETs ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ Axio Scope A1 (Carl Zeiss) ใช้ช่วงคลื่นสำหรับการเร้า (excitation) เท่ากับ 380 nm เก็บบันทึกภาพด้วยเลนส์ใกล้วัตถุ (objective lens) กำลังขยายต่ำ (5X) (Bruns *et*

al., 2010; Remijnsen et al., 2010) สไลด์บางส่วนภายหลังการกระตุ้นเซลล์นาน 150 นาทีแล้ว นำมาย้อมสี Wright Rapid Stain

## 9) จุลพยาธิวิทยา (Histopathology)

เก็บตัวอย่างปอดของหนูทดลองภายหลังการดมยา (วันที่ 7 ของการทดลอง) ด้วยการผูกเชือกเพื่อรัดปอดทางด้านซ้ายและขวาและฉีดสารละลาย 10% บัฟเฟอร์ฟอร์มาลินเข้าบริเวณปอดจนเต็มแน่น ตัดแยกปอดออกจากช่องอกและแช่ในสารละลาย 10% บัฟเฟอร์ฟอร์มาลิน นาน 24 ชั่วโมง ก่อนนำลงบล็อกชิ้นเนื้อและตัดบล็อกชิ้นเนื้อให้มีความหนาประมาณ 5 ไมครอน ย้อมสีชิ้นเนื้อ (H&E staining) ประเมินรอยโรคโดยการให้คะแนน (histopathological score) จากสไลด์ทางจุลพยาธิวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่างโดยพยาธิสัตวแพทย์ผู้เชี่ยวชาญจำนวน 3 ท่าน โดยที่ผู้ประเมินไม่ทราบว่ารอยโรคที่พบเกิดขึ้นในหนูทดลองในกลุ่มใด (blind test) การให้คะแนนรอยโรคยึดถือตามการรายงานของ Crowe et al., 2009 โดยมีหลักเกณฑ์การให้คะแนนรอยโรคบริเวณปอด ดังนี้ คะแนนระดับศูนย์ (0) ไม่พบการอักเสบและเซลล์อักเสบหรือพบจำนวนน้อย คะแนนระดับหนึ่ง (1) พบ perivascular cuff, peribronchiolar inflammation จากเซลล์อักเสบ พบเลือดออก (hemorrhage) กินเนื้อที่ประมาณ 5-10% ของเนื้อปอด คะแนนระดับสอง (2) คล้ายกับระดับคะแนน 1 หรือพบการอักเสบระดับไม่รุนแรง (mild) มีขอบเขตการกระจายน้อยกว่า 25% ของเนื้อปอด คะแนนระดับสาม (3) คล้ายคะแนนระดับ 1 หรือพบการอักเสบระดับกลาง (moderate) มีขอบเขตการกระจายระหว่าง 25 ถึง 50% ของเนื้อปอด คะแนนระดับสี่ (4) คล้ายคะแนนระดับ 1 หรือพบการอักเสบระดับรุนแรง (severe) มีขอบเขตการกระจายเกินกว่าครึ่งหนึ่ง (>50%) ของเนื้อปอด

## 10) การตรวจสอบการแสดงออกของยีนในเซลล์นิวโทรฟิลที่ตอบสนองต่อการอักเสบบริเวณปอด ภายหลังการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ หรือแบคทีเรียชนิด *Klebsiella pneumoniae* โดยวิธี Real-time PCR (qPCR)

เซลล์นิวโทรฟิลที่คัดแยกจากไขกระดูก ดังวิธีการในข้อ 5) และถูกเก็บรักษาเซลล์ในสารรักษาสภาพอาร์เอ็นเอ (RNA) ชนิด RNAlater® (Ambion, Life Technologies) ตามวิธีการที่บริษัทผู้ผลิตแนะนำ นำอาร์เอ็นเอที่เก็บรักษาไว้มาสกัด total RNA เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของ messenger RNAs (mRNA) จากยีน IL-1 $\beta$  (IL1b), IL-17A (IL17a), IL-17RA (IL17ra) โดยมียีน GAPDH (gapdh) เป็นยีนตัวควบคุม (housekeeping gene) คู่มือโปรแกรมได้รับการออกแบบโดยอาศัยข้อมูลของยีนจากฐานข้อมูลสาธารณะ คือ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> และ

[http://asia.ensembl.org/Mus\\_musculus/Info/Index](http://asia.ensembl.org/Mus_musculus/Info/Index) โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป Primer3 Plus (<http://primer3plus.com/>) และ Unipro UGENE version 1.7.2 (<http://ugene.unipro.ru/>) ในการออกแบบ (Okonechnikov *et al.*, 2012) รายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 3

Target gene	Forward primer (5'–3')	Reverse primer (5'–3')	Genbank accession	Product size (bp)
IL-1 $\beta$	GTGGCAGCTACCTGTGTCTT	GGAGCCTGTAGTGCAAGTTGT	NM_008361	164
IL-17A	TCTCCACCGCAATGAAGACC	CACACCCACCAAGCATCTTCT	NM_010552	202
IL-17RA	GTGGATCTGTTGCCCTACGG	CCAGCACTTGAGAGAGCACA	NM_008359	158
GAPDH	TGATGGGTGTAACACGAG	AGTGATGGCATGGACTGTGG	NM_008084	152

ตัวอย่างเซลล์นิวโทรฟิลนำมาสกัดแยกอาร์เอ็นเอด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป NucleoSpin<sup>®</sup> RNA (MACHEREY-NAGEL) ตามวิธีการที่บริษัทผู้ผลิตแนะนำ นำอาร์เอ็นเอที่สกัดได้มาตรวจวัดความเข้มข้นโดย DU<sup>®</sup> 730 nanoVette UV/Vis spectrophotometer (Beckman Coulter) สำหรับปฏิกิริยาถูกโซ่โพลิเมอเรสแบบ Reverse Transcription (RT-PCR) เริ่มด้วยการสังเคราะห์ complementary DNA (cDNA synthesis) ด้วยการถอดรหัส RNA จำนวน 2  $\mu$ g จาก total RNA โดยการทำงานของเอนไซม์ reverse transcriptase โดย Tetro cDNA Synthesis Kit (Bioline USA) โดยในหนึ่งปฏิกิริยา (20  $\mu$ L) ประกอบด้วย 4  $\mu$ L ของ 5x RT Buffer, 1  $\mu$ L ของ 10mM dNTP mix, 1  $\mu$ L ของ Oligo (dT)<sub>18</sub> (10  $\mu$ M/ $\mu$ L), 4  $\mu$ L ของ Random Hexamer (10  $\mu$ M/ $\mu$ L), 1  $\mu$ L ของ Ribosafe RNase Inhibitor (10 U/ $\mu$ L), 1  $\mu$ L ของ Tetro Reverse Transcriptase (200U/ $\mu$ L), 2  $\mu$ g ของ Total RNA และ DEPC-treated H<sub>2</sub>O เติมจนครบปริมาตร 20  $\mu$ L

เพิ่มปริมาณ cDNA ด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (Thermal cycler) รุ่น G-STORM GS1 (Somerton Biotechnology, UK) โดยมี PCR profiles ที่มีรายละเอียด คือ บ่มตัวอย่างที่ 1.) อุณหภูมิ 25 °C นาน 10 นาที 2.) อุณหภูมิ 45 °C นาน 30 นาที 3.) อุณหภูมิ 85 °C นาน 5 นาที 4.) นำตัวอย่างแช่น้ำแข็ง (4 °C) และเก็บรักษาตัวอย่าง cDNA ที่อุณหภูมิ -20 °C เพื่อการเก็บรักษาในระยะยาวหรือจนกว่าจะนำมาตรวจวิเคราะห์

### Quantitative real-time PCR

ทำการการวิเคราะห์เชิงปริมาณ (quantitative analysis) ของ transcript ของยีน IL-1 $\beta$ , IL-17A, IL-17RA และ GAPDH จาก cDNA โดยวิธี Real-time PCR (qPCR) ด้วย SensiFAST

SYBR<sup>®</sup> Hi-ROX Kit (Bioline) โดยเครื่อง Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System (Life Technologies) ที่อ่านค่าปฏิกิริยาจากถาดหลุมแบบ optical 96-well reaction plate โดยใช้คู่มือที่แสดงในตารางที่ 3 โดยในปฏิกิริยาปริมาตร 20  $\mu\text{L}$  ประกอบด้วย 2x SensiFAST SYBR Hi-ROX Mix ปริมาตร 10  $\mu\text{L}$ , 10  $\mu\text{M}$  forward primer ปริมาตร 0.8  $\mu\text{L}$  (final concentration 400 nM), 10  $\mu\text{M}$  reverse primer ปริมาตร 0.8  $\mu\text{L}$  (final concentration 400 nM) cDNA ที่ได้จากการสังเคราะห์ก่อนหน้านี้ปริมาตร 1  $\mu\text{L}$  (100 ng) และ H<sub>2</sub>O ปริมาตร 7.4  $\mu\text{L}$  โดยมี PCR protocol ลักษณะ 2-step cycling ที่มีรายละเอียดดังนี้ 1.) ขั้นตอน initial denaturation ที่ 95 °C นาน 2 นาที จำนวน 1 รอบ 2.) ขั้นตอน denaturation ที่ 95 °C นาน 5 วินาที จำนวน 40 รอบ และ 3.) ขั้นตอน Annealing/Extension นาน 30 วินาที จำนวน 40 รอบ และเมื่อใกล้เสร็จสิ้นขั้นตอนในแต่ละรอบ เครื่องจะทำการตรวจจับสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์และเก็บบันทึกข้อมูลเพื่อการวิเคราะห์ สำหรับอุณหภูมิที่ใช้เพื่อการ annealing ของยีน IL-1 $\beta$  และ GAPDH เท่ากับ 59 °C ส่วน IL-17A และ IL-17RA มีค่าเท่ากับ 60 °C ในแต่ละตัวอย่างที่ตรวจวิเคราะห์จะทำการตรวจซ้ำจำนวน 2 หลุม (duplicate wells)

ภายหลังปฏิกิริยา PCR ทำการวิเคราะห์ Dissociation curve เพื่อยืนยันว่าผลิตภัณฑ์ (PCR product) ที่ได้จากวิธี real-time PCR ในแต่ละหลุมทดสอบเป็นผลิตภัณฑ์ที่ถูกต้องซึ่งจะแสดง peak เดี่ยว ๆ ที่อุณหภูมิสูง ( $T_m$ ) โดยการตั้งค่า Dissociation protocol ได้แก่ ขั้นตอนที่ 1 อุณหภูมิ 95 °C นาน 15 วินาที ขั้นตอนที่ 2 อุณหภูมิ 60 °C นาน 30 วินาที และขั้นตอนที่ 3 อุณหภูมิ 95 °C นาน 15 วินาที เมื่อปฏิกิริยาเสร็จสมบูรณ์ ทำการแปลผลการตรวจวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมการแปลผลอัตโนมัติ SDS Software v1.4 ที่ติดตั้งมาพร้อมกับเครื่อง real-time PCR เพื่อการแปลผล Relative Quantification Study (RQ) ซึ่งตัวอย่างที่ให้ผลบวกจะปรากฏกราฟ amplification curve ของสี SYBR Green 1 ที่ 528 nm เหนือเส้น baseline threshold value ของสี ROX (passive dye) ที่ 610 nm โดยมี comparative threshold cycle ( $C_T$ ) cut-off value ที่ 35

การวิเคราะห์ข้อมูลการแสดงออกของยีนแบบสัมพัทธ์ (relative expression) ได้จากการคำนวณค่า  $C_T$  ของยีนที่สนใจ (target) และยีนที่เป็น endogenous control (ณ ที่นี้ คือ ยีน GAPDH ที่ใช้ normalize loading variations ในปฏิกิริยาของ real-time PCRs) นำค่า  $C_T$  target ลบออกด้วยค่า  $C_T$  GAPDH เพื่อให้ได้ค่า  $\Delta C_T$  จากนั้นจึงนำค่า  $\Delta C_T$  ของยีนที่สนใจจากตัวอย่างในแต่ละกลุ่มทดลอง คือ กลุ่ม Control, Mix, Flu และ KP มาคำนวณค่า  $\Delta\Delta C_T$  เช่น  $\Delta\Delta C_T$  (Mix) คำนวณ

จาก  $\Delta C_T (Mix) - \Delta C_T (Control)$  คำนวณจำนวนเท่าของการแสดงออกของยีน (fold difference) โดยใช้สูตร  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  (Livak and Schmittgen, 2001)

นำผลิตภัณฑ์จาก real-time PCR มาตรวจหาแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะ ด้วย 2% agarose gel ใน 0.5X TAE โดยการเติมผลิตภัณฑ์จาก qPCR จำนวน 8  $\mu$ L ผสมกับ loading dye จำนวน 2  $\mu$ L หยดลงในหลุมเจล เปิดกระแสไฟฟ้า 50 volts ปลอ่ยให้ดีเอ็นเอเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้า นาน 30 นาที จากนั้นทำการย้อมเจลด้วย ethidium bromide เจือจางในน้ำ (ความเข้มข้นสุดท้าย 0.5 mg/mL) นาน 15 นาที ก่อนล้างเจลด้วยน้ำสะอาด และตรวจดูแถบ DNA ที่เกิดขึ้นภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต บันทึกภาพเจล

### 11) การวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลที่ได้จากการทดลองจำนวน 3 ครั้ง นำมาวิเคราะห์หา outlier โดย Grubbs' test หรือ extreme studentized deviate (ESD) method ก่อนนำมาวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป JMP<sup>®</sup> version 7 (SAS Institute) โดยใช้วิธีการทางสถิติ คือ Unpaired *t* test สำหรับข้อมูลที่มีกลุ่มทดลองจำนวน 2 กลุ่ม หรือวิธี one-way ANOVA เมื่อมีกลุ่มทดลองมากกว่า 2 กลุ่ม ข้อมูลอัตราการตายของหนูทดลองนำมาวิเคราะห์ทางสถิติด้วย Log-rank (Mantel-Cox) test ผลของการวิเคราะห์ทางสถิติที่ถือว่ามีความสำคัญ เมื่อ  $p \leq 0.05$  และทำการทดสอบหลังการวิเคราะห์ (post-hoc test) โดยวิธี Tukey-Kramer Honest Significant Difference (HSD) รายงานข้อมูลเป็นค่าเฉลี่ยเลขคณิต (mean) และค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (standard error, SE) ข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์ทางสถิตินำมาสร้างเป็นแผนภูมิโดยโปรแกรมสำเร็จรูป GraphPad Prism เวอร์ชัน 5.0 (GraphPad Software) ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์แสงสว่างหรือฟลูออเรสเซนส์นำมาระบุตำแหน่ง ใส่แถบมาตราวัดขนาดและนำมาประกอบเป็นภาพชุด โดยโปรแกรมสำเร็จรูป ADOBE<sup>®</sup> Photoshop CS4 (Adobe Systems)

การนำเสนอ gene expression profiling ของ individual data points นำเสนอในรูปแบบ Heatmap และ Hierarchical Clustering โดยโปรแกรม Genesis version 1.7.6 Gene Expression Similarity Investigation Suit (Sturn *et al.*, 2002) โดยอาศัยข้อมูล  $-\Delta\Delta C_T$  (Schmittgen and Livak, 2008) ของแต่ละ individual data points ในรูปแบบ tab-delimited text file format ก่อน log transformation เป็น  $\text{Log}_2$  ข้อมูลที่นำเสนอและสีที่ปรากฏบ่งบอกถึงระดับการแสดงออก (expression data) สำหรับ hierarchical clustering นั้นเป็นข้อมูลชนิด

unfiltered data ก่อนถูกสร้างเป็น unsupervised hierarchical clustering โดย average linkage method ด้วย Euclidean distance (Eisen *et al.*, 1998)

## ผลการวิจัย

### 1. ค่าไตเตอร์ของไวรัสที่ได้จากการคำนวณ 50% Egg Infective Dose (EID<sub>50</sub>)

เมื่อทำการฉีดเชื้อไวรัสเข้าสู่บริเวณ allantoic cavity ของไข่ไก่ฟัก พบลักษณะของความผิดปกติของโครงสร้างเส้นเลือดบริเวณเปลือกไข่ หรือความไวต่อการตอบสนองต่อแสงที่ส่องผ่านเปลือกไข่ของตัวอ่อนในไข่ไก่ฟักลดลง ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 ภายหลังจากการฉีดเชื้อเป็นต้นไปและพบการตายของตัวอ่อนในไข่ไก่ฟักหลังจากฉีดเชื้อนาน 48 ชั่วโมงเป็นต้นไป เมื่อนำข้อมูลไข่ไก่ที่ปกติ (-) และไข่ไก่ที่ผิดปกติ (+) ภายหลังจากการฉีดเชื้อฯ ของแต่ละความเข้มข้นของไวรัสมาคำนวณค่าไตเตอร์ (EID<sub>50</sub>) โดยวิธี ของ Reed and Muench ดังวิธีการคำนวณดังนี้

Log of virus dilution	Infected test units	Cumulative infected (A)	Cumulative non-infected (B)	Ratio of A/(A+B)	Percent infected
-2	5/5	20	0	20/20	100
-3	4/5	15	1	15/16	93.75
-4	5/5	11	1	11/12	91.67
-5	5/5	6	1	6/7	85.71
-6	1/5	1	5	1/6	16.67
-7	0/5	0	10	0/10	0

### สูตรสำหรับการคำนวณ

$$\text{ค่า proportionate distance (PD)} = \frac{(\% \text{ การติดเชื้อที่มากกว่า } 50\% - 50\%)}{(\% \text{ การติดเชื้อที่มากกว่า } 50\% - \% \text{ การติดเชื้อที่ต่ำกว่า } 50\%)}$$

$$\text{แทนค่าในสูตรด้านบน} \quad PD = \frac{(85.71-50)}{(85.71-16.67)} \quad PD = 0.52$$

$$\text{Log EID}_{50} = \text{log dilution ที่มีค่ามากกว่า } 50\% + [PD \times \text{log dilution factor}]$$

$$-5.52 = (-5) + (0.52 \times -1)$$

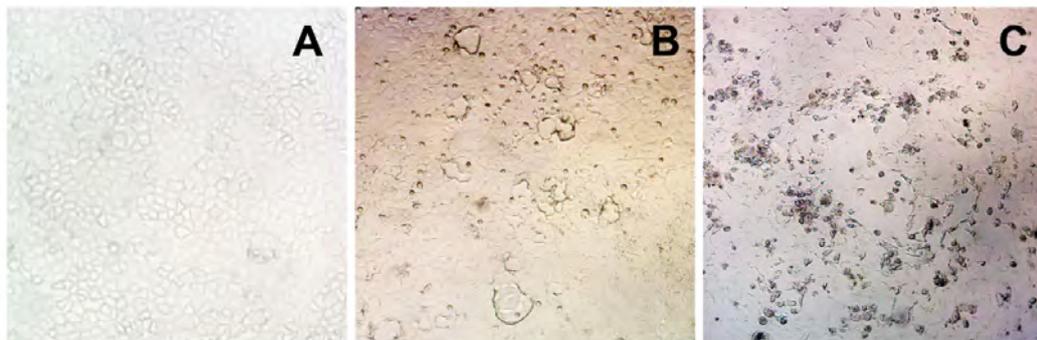
ไตเตอร์ของไวรัสเท่ากับ  $10^{5.5}$  EID<sub>50</sub> ต่อ 0.1 mL หรือเท่ากับ  $10^{[(5.5 - (-1))]}$  EID<sub>50</sub> ต่อมิลลิลิตร (mL)

สรุป ไตเตอร์ของไวรัสในไข่ไก่ฟัก เท่ากับ  $10^{6.5}$  EID<sub>50</sub>/mL

## 2. ค่าไตเตอร์ของไวรัสที่ได้จากการคำนวณ 50% Tissue Culture Infective Dose (TCID<sub>50</sub>)

เมื่อทำการติดเชื้อไวรัสที่ได้ทำการเจือจางตามลำดับแบบ 10 เท่าลงในเซลล์เพาะเลี้ยง MDCK และบ่มเซลล์นาน 5 วัน เมื่อตรวจสอบลักษณะของการเกิด cytopathic effect (CPE) ของเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสด้วยกล้องจุลทรรศน์แสงสว่างแบบหัวกลับพบลักษณะ CPE ของเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัส (รูปที่ 1) โดยไม่พบลักษณะ CPE ในเซลล์ MDCK ที่ไม่ได้ติดเชื้อไวรัส เมื่อนำเซลล์ที่ทำการติดเชื้อไวรัสมาย้อมด้วยสี crystal violet และส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์แสงสว่างพบลักษณะของเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสแบบ rounded cells, granularity, vacuolization, syncytia formation หรือ focus formation (รูปที่ 2)

ค่าไตเตอร์ของไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยงหรือ TCID<sub>50</sub>/mL เมื่อคำนวณโดยใช้วิธีการของ Reed and Muench ค่าที่ได้เท่ากับ  $10^{5.3}$  TCID<sub>50</sub>/mL

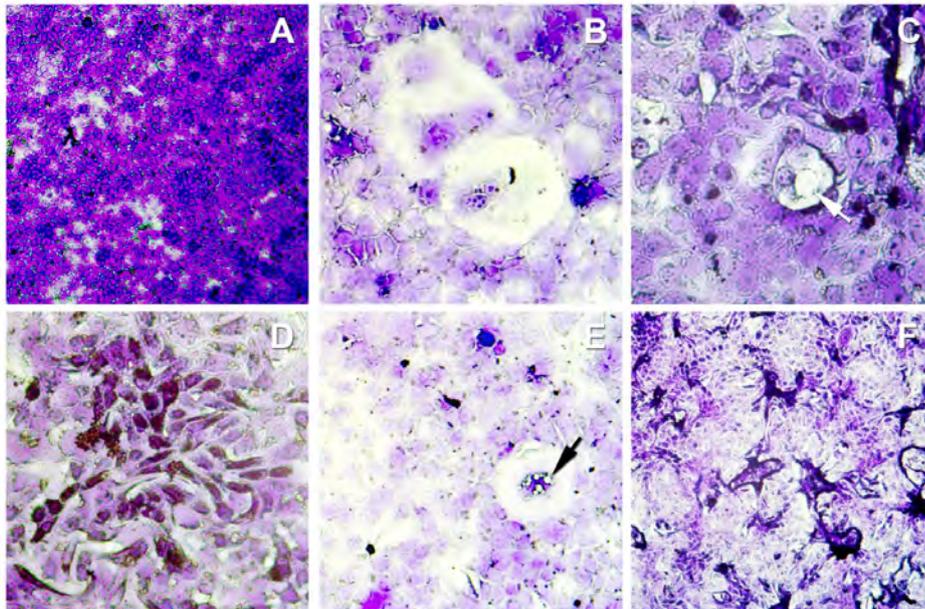


รูปที่ 1 แสดงลักษณะเซลล์ MDCK ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (A) เซลล์ MDCK ปกติ (B) เซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสพบลักษณะของ CPE (C) เซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสที่ตายและเกิดการลอกหลุด (ภาพถ่ายที่กำลังขยาย 5x objective lens)

## 3. การตรวจไตเตอร์ไวรัสโดยวิธี Viral plaque formation assay

เมื่อทำการติดเชื้อไวรัสลงในเซลล์เพาะเลี้ยง MDCK และบ่มเซลล์นาน 5 วัน เมื่อตรวจสอบลักษณะของการเกิด plaque ซึ่งเป็นบริเวณที่ไวรัสติดเชื้อเข้าสู่เซลล์และเพิ่มจำนวนจนเป็นเหตุให้เกิดการทำลายเซลล์จนปรากฏเป็นบริเวณใส ย้อมสี crystal violet ไม่ติดสีหรือย้อมติดสีจางกว่าบริเวณรอบข้าง (รูปที่ 3 และ 4) พบลักษณะของการเกิด plaque ขนาดเล็กประมาณ 1-2 มิลลิเมตร (รูปที่ 3) จากเซลล์ที่ถูกรื้อทำลายจนเซลล์ลอกหลุด ณ ระดับความเจือจางของไวรัสที่ -1 ระดับของความเจือจางของไวรัสที่ -2 ถึง -5 พบการเกิด plaque แต่มีลักษณะที่มองเห็นด้วยตาเปล่าที่แตกต่างจากข้างต้น คือ พบลักษณะการเกิด plaque ที่ไม่พบการลอกหลุดของเซลล์แต่มีลักษณะปรากฏเป็นวงสีจางขนาดประมาณ 1-2 มิลลิเมตร เมื่อนับจำนวน plaque (10-100) ที่ปรากฏที่

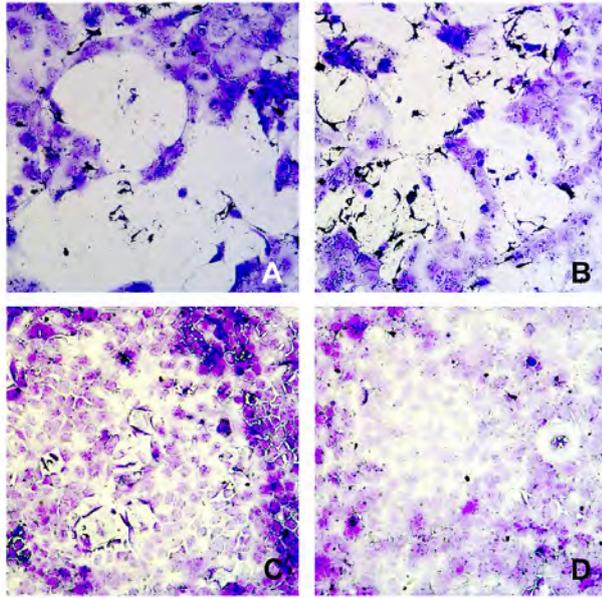
ระดับความเจือจางของไวรัสต่าง ๆ หากค่าเฉลี่ยและนำมาคำนวณค่า PFU/mL สามารถคำนวณได้ คือ  $4.2 \times 10^4$  PFU/mL



รูปที่ 2 แสดงลักษณะเซลล์ MDCK ที่เกิด CPE รูปแบบต่าง ๆ (A) เซลล์ MDCK ปกติ (B) ลักษณะของ giant cells และ syncytium (C) aberrant; large inclusion body (ปลายลูกศร) (D) cellular granulation (E) giant cells ที่มี perinuclear vacuoles (F) advanced CPE และ focus formation ภาพถ่ายที่กำลังขยาย 5x (A, F) และ 10x (B-D) objective lens



รูปที่ 3 Plaque formation จากไวรัส swine A/Thailand/CU-RA29/2009 (H1N1) บน MDCK ที่เลี้ยงใน 24-well tissue culture plate

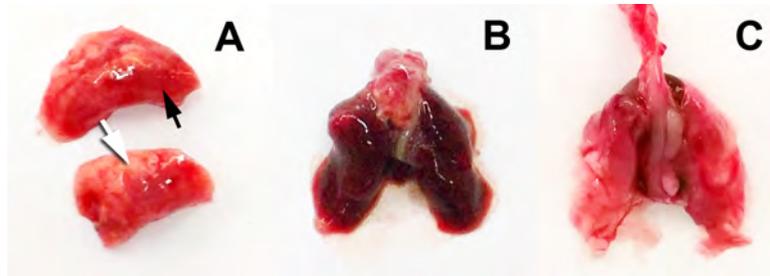


รูปที่ 4 Plaque formation ภายใต้อัตมาจูงจลทรศน์ พบบริเวณ plaque ที่เกิดจากการลอกหลุดของเซลล์ (A-B) และการเกิด plaque ที่เซลล์ย้อมติดสีจางกว่าบริเวณข้างเคียง (C-D) (ภาพถ่ายที่กำลังขยาย 5x objective lens)

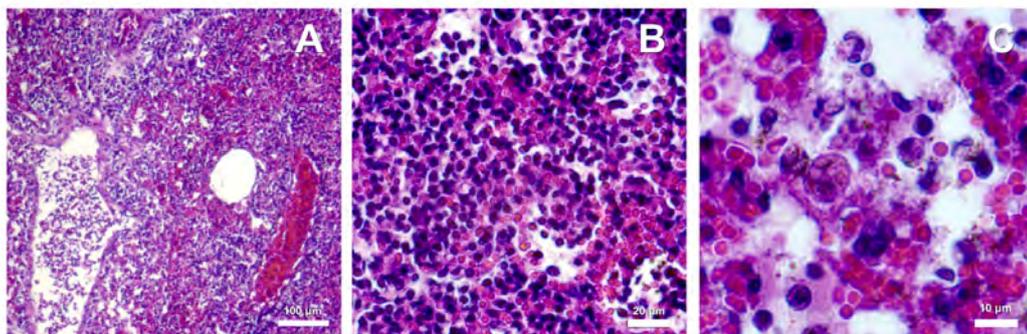
#### 4. การตรวจไตเตอร์ และคำนวณค่าเฉลี่ยปริมาณไวรัสโดย 50% Mouse Infective Dose (MID<sub>50</sub>) โดยการติดเชื้อในหนูทดลอง

ผลจากการติดเชื้อไวรัสในหนูทดลองที่มีสุขภาพแข็งแรงนาน 10 วันด้วยเชื้อไวรัสฯ พบความผิดปกติของหนูทดลองอันเกี่ยวข้องกับอาการของการเกิดโรคหวัด (Flu-like symptoms) และอาการอื่น ๆ ได้แก่ หายใจเร็วและหอบ (hyperpnea) ซึม (depression) เบื่ออาหาร (anorexia or inappetence) ในหนูทดลองที่ได้รับไวรัสเจือจางระดับ  $10^{-1}$  ถึง  $10^{-3}$  ประมาณวันที่ 5 ของการทดลองเป็นต้นไป ในหนูกลุ่มที่ได้รับไวรัสเจือจางระดับ  $10^{-4}$  ถึง  $10^{-5}$  พบว่ามีหนูบางตัวเท่านั้นที่มีลักษณะหายใจเร็วในบางวัน ไม่พบอาการซึมและเบื่ออาหาร ส่วนในหนูกลุ่มควบคุม (ไม่ได้รับไวรัส) ไม่พบความผิดปกติใด ๆ ตลอดระยะเวลาทดลอง ในระหว่างการทดลองพบว่า มีหนูจำนวน 2 ตัว จากกลุ่มที่ได้รับไวรัส  $10^{-1}$  และ  $10^{-2}$  อย่างละตัวตายในระหว่างการทดลองอันเนื่องมาจากปัญหาของระบบทางเดินหายใจ (พบการตายในวันที่ 6 และวันที่ 8 ของการทดลองตามลำดับ) ผลการผ่าชันสูตรพบลักษณะของเนื้อปอดที่มีการคั่งของเลือด ส่งผลให้ปอดมีลักษณะปรากฏเป็นสีแดงคล้ำ (รูปที่ 5B) หนูที่เหลือทั้งหมดได้ถูกฉีดยาสลบเกินขนาดเพื่อทำการุณยฆาต (euthanasia) และทำการผ่าชันสูตร (necropsy) และเก็บตัวอย่างอวัยวะเพื่อทำการวินิจฉัยทางจุลพยาธิวิทยา (histopathology) ผลการผ่าชันสูตรและผลทางจุลพยาธิวิทยาพบการอักเสบและติดเชื้อบริเวณเนื้อเยื่อปอดและหลอดลม ในหนูกลุ่มที่ได้รับไวรัสเจือจางระดับ  $10^{-1}$  ถึง  $10^{-4}$  (รูปที่ 6 และ 7) เมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มที่ได้รับไวรัสเจือจาง  $10^{-4}$  (ส่วนใหญ่)  $10^{-5}$  (ทั้งกลุ่ม) และกลุ่มควบคุม ที่ตรวจไม่พบรอยโรคจากการผ่าชันสูตรและผลจากการตรวจทางจุลพยาธิวิทยา

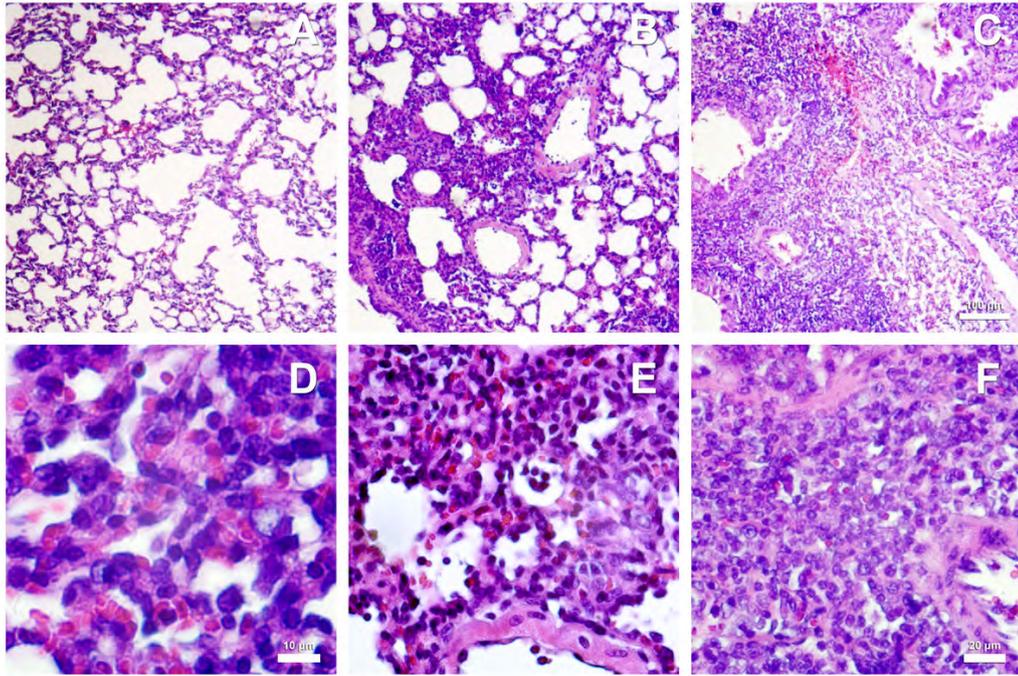
ค่าไตเตอร์จากการติดเชื้อไวรัสในหนูทดลองหรือ MID<sub>50</sub>/mL คำนวณโดยใช้วิธีการของ Reed and Muench มีค่าเท่ากับ 10<sup>3.8</sup> MID<sub>50</sub>/mL



รูปที่ 5 ชิ้นเนื้อปอดจากหนูทดลองที่ได้รับเชื้อไวรัส swine A/Thailand/CU-RA29/2009 (H1N1) โดยการหยอดจมูก (A) รอยโรคบริเวณปอดที่เกิดปอดอักเสบ (ลูกศรสีดำ) เปรียบเทียบกับบริเวณที่ปกติ (ลูกศรสีขาว) (B) ชิ้นเนื้อปอดจากหนูที่ตายจากการติดเชื้อฯ ในระหว่างการทดลอง (วันที่ 6 ของการทดลอง) (C) ชิ้นเนื้อปอดจากหนูทดลองภายหลังสิ้นสุดการทดลอง (วันที่ 10) พบการติดเชื้อบริเวณปอดหลายบริเวณ



รูปที่ 6 จุดพยาธิวิทยาของปอดจากหนูทดลองที่ได้รับเชื้อไวรัส H1N1 และตายในระหว่างการทดลอง (A-C) พบการสะสมของเม็ดเลือดแดงเป็นจำนวนมากภายในถุงลม หลอดลมขนาดเล็กและหลอดเลือด ตลอดจนการสะสมของเซลล์อักเสบแบบ polymorphonuclear cells (PMNs) เป็นจำนวนมากรวมทั้ง mononuclear cells ภาพถ่ายที่กำลังขยาย 5x (A), 20x (B) และ 40x (C) objective lens



รูปที่ 7 จุลพยาธิวิทยาของปอดจากหนูทดลองที่ได้รับเชื้อไวรัส H1N1 เมื่อสิ้นสุดการทดลอง (A) เนื้อเยื่อปอดจากหนูที่ไม่ได้รับเชื้อไวรัส (B-F) เนื้อเยื่อปอดของหนูกลุ่มที่ได้รับเชื้อไวรัส พบการสะสมของเซลล์อักเสบชนิด mononuclear cells เป็นจำนวนมากบริเวณผนังกันและเนื้อเยื่อระหว่างถุงลม (alveolar septa) และภายในถุงลม ภาพถ่ายที่กำลังขยาย 5x (A-C), 20x (E & F) และ 40x (D) objective lens

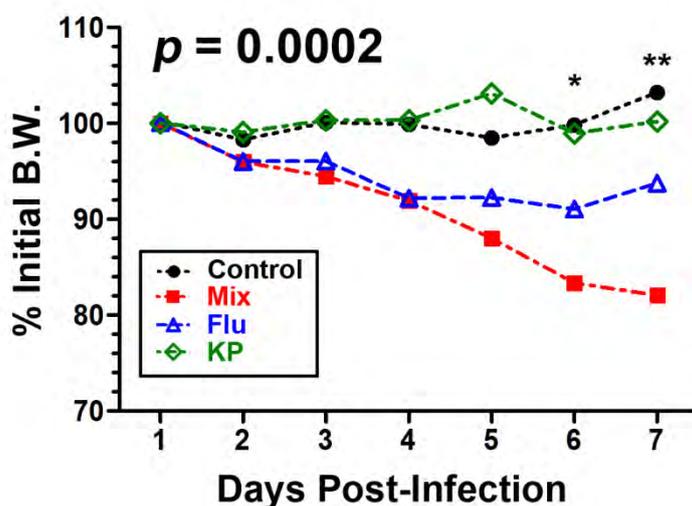
ผลการทดลองทั้งหมดข้างต้นทำให้ทราบค่าไตเตอร์ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ Pandemic H1N1 Influenza A/SW/Thailand/ CU-RA29/2009 (ตารางด้านล่าง) ที่จะนำไปใช้ในการติดเชื้อหนูทดลองเพื่อทดสอบผลของอินเตอร์ลิวคิน 17 ในการกระตุ้นการทำงานเบื้องต้นของนิวโทรฟิลที่ได้จากการคัดแยกจากหนูทดลองที่ได้รับการติดเชื้อไวรัสฯ และตรวจสอบระดับความรุนแรงของพยาธิสภาพบริเวณเนื้อเยื่อปอดของหนูทดลองภายหลังจากการที่หนูได้รับการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H1N1 (2009) ที่มีความสัมพันธ์กับการเคลื่อนที่เข้าสู่เนื้อเยื่อปอดของนิวโทรฟิล

ชนิดของไวรัส	ค่าที่ตรวจวัด
เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์	$10^{5.3}$ TCID <sub>50</sub> /mL
Pandemic H1N1	$10^{6.5}$ EID <sub>50</sub> /mL
Influenza A/SW/Thailand/	$4.2 \times 10^4$ PFU/mL
CU-RA29/2009	$10^{3.8}$ MID <sub>50</sub> /mL

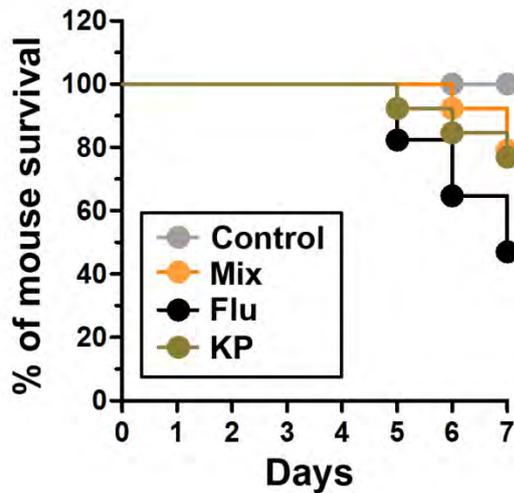
## 5. ผลการทดลองติดเชื้อไวรัสร่วมกับแบคทีเรียในหนูทดลอง (*in vivo* viral-bacterial infection)

ทดลองติดเชื้อ Pandemic H1N1 Influenza A/SW /Thailand /CU-RA29/2009 หรือแบคทีเรียชนิด *Klebsiella pneumoniae* ให้กับหนูทดลองสายพันธุ์ BALB/cMlac อายุ 8-10 สัปดาห์ (กลุ่มละ 3-5 ตัว) อันประกอบด้วย กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุมได้รับสาร PBS (Control) กลุ่มที่ 2 ได้รับเชื้อไวรัส Influenza ร่วมกับเชื้อแบคทีเรีย (Mix) กลุ่มที่ 3 ได้รับเชื้อไวรัสเพียงอย่างเดียว (Flu) กลุ่มที่ 4 ได้รับเชื้อแบคทีเรียชนิด *Klebsiella pneumoniae* เพียงอย่างเดียว (KP) โดยการหยอดจมูกและสังเกตอาการป่วยที่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อของทางเดินหายใจหรือการตายนาน 7 วัน ผลการบันทึกน้ำหนักตัวของหนูทดลองมีชีวิตที่เปลี่ยนแปลงไปในแต่ละวันพบการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักเฉลี่ยของหนูทดลองที่ลดลงในกลุ่ม Mix และ Flu อย่างมีนัยสำคัญ ( $p = 0.0002$ ) ในวันที่ 7 หลังจากได้รับเชื้อ ในขณะที่หนูทดลองในกลุ่ม Control และ KP มีน้ำหนักที่คงที่หรือมีน้ำหนักเพิ่มขึ้นเล็กน้อย (รูปที่ 8)

เมื่อทำการสังเกตและบันทึกอาการหนูทดลองในแต่ละกลุ่มทดลอง พบว่า หนูในกลุ่ม Control แสดงอาการปกติตลอดระยะเวลาของการทดลอง หนูในกลุ่ม Mix, Flu และ KP แสดงอาการที่เกี่ยวข้องกับระบบทางเดินหายใจและอาการผิดปกติทั่วไป คือ เบื่ออาหาร (anorexia) หายใจถี่ (hyperpnea, breathing with difficulty) ไม่เคลื่อนไหว (inactivity) ขนตั้งฟู (ruffled fur) สุมตัวรวมกัน (huddling behavior) ในจำนวนหนูที่แสดงอาการป่วยมีหนูจำนวนหนึ่งที่ตายลง ในระหว่างการทดลองอันเป็นผลสืบเนื่องจากการได้รับเชื้อไวรัส (Flu) แบคทีเรีย (KP) หรือการได้รับเชื้อทั้งสองชนิด (Mix) โดยมีเปอร์เซ็นต์ของหนูที่รอดชีวิต (% survival) เมื่อสิ้นสุดการทดลองเท่ากับ 100% (Control), 79.12% (Mix), 47.06% (Flu) และ 76.92% (KP) ตามลำดับ (รูปที่ 9)



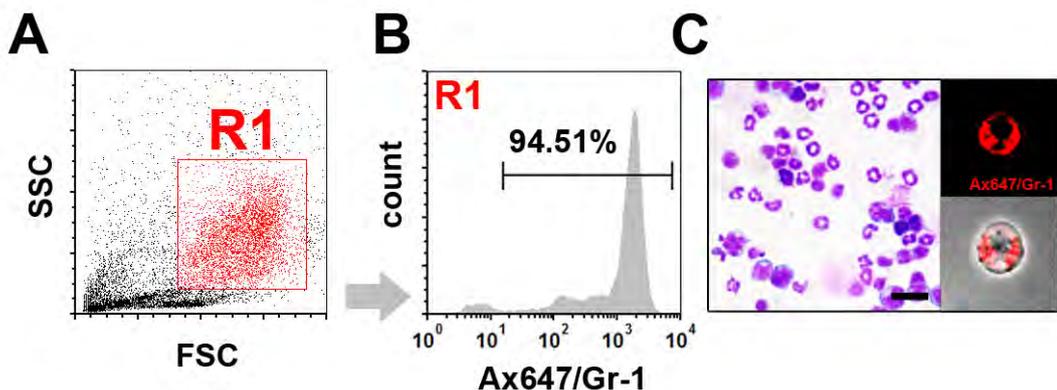
รูปที่ 8 แสดงการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักเฉลี่ยของหนูในแต่ละวันของการทดลอง (ข้อมูลจากจำนวนหนูทั้งหมดของ 3 การทดลอง,  $n = 3-5$  ตัว/กลุ่ม ทดสอบสถิติโดยวิธี ANOVA, \*,  $p < 0.05$ , \*\*,  $p < 0.01$ )



รูปที่ 9 แสดงเปอร์เซ็นต์ของหนูที่รอดชีวิตในแต่ละกลุ่มทดลอง (ข้อมูลจากจำนวนหนูทั้งหมดของ 3 การทดลอง,  $n = 3-5$  ตัว/กลุ่ม ทดสอบสถิติโดยวิธี log-rank test,  $p = 0.0064$ )

## 6. ผลการแยกเซลล์นิวโทรฟิลจากไขกระดูกของหนูทดลองและการเก็บน้ำล้างปอด

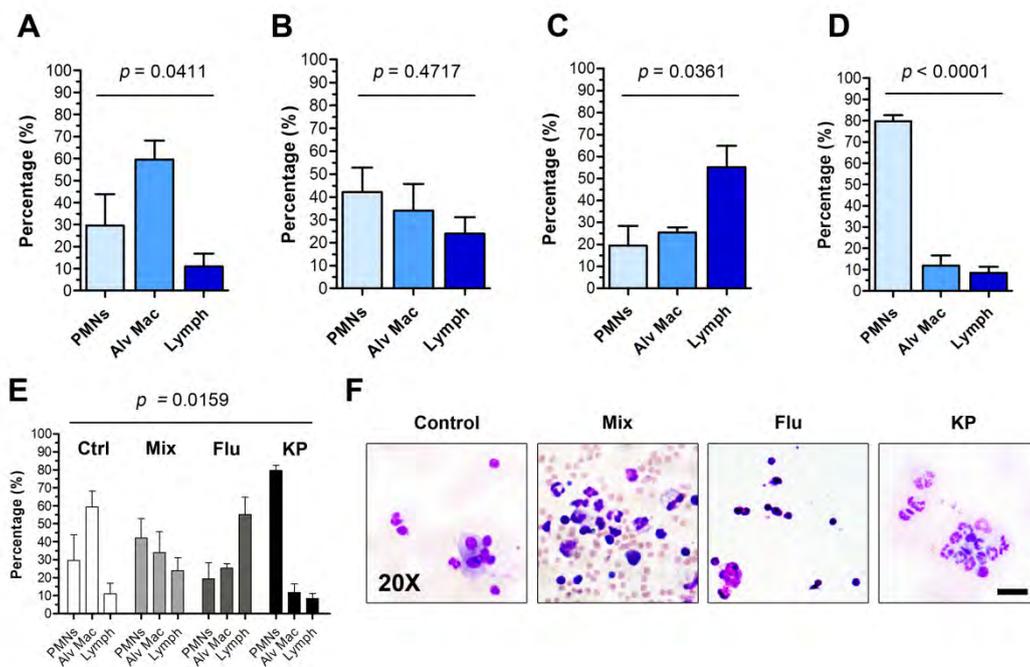
เซลล์นิวโทรฟิลที่แยกได้จากไขกระดูกของหนูทดลองในแต่ละกลุ่ม นำมาตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วย cyospin และย้อมสี Wright Rapid Stain พบเซลล์ส่วนใหญ่เป็นเซลล์ในกลุ่มนิวโทรฟิลและ polymorphonuclear leukocytes (PMNs) ดังแสดงในรูปที่ 10 และเมื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเซลล์นิวโทรฟิลจากไขกระดูกด้วยการย้อมโมเลกุล Gr-1 และตรวจวัดด้วยวิธี Flow cytometry พบว่าเซลล์ที่ย้อมติด Gr-1 มีปริมาณเฉลี่ยเท่ากับ 94.51 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาณเซลล์ที่แยกได้จากไขกระดูกแสดงถึงเซลล์ในตระกูล PMNs และนิวโทรฟิล (รูปที่ 10) เซลล์ที่แยกได้ข้างต้นมีความบริสุทธิ์สูงและสามารถนำมาใช้ในการทดลองอื่น ๆ ต่อไป



รูปที่ 10 แสดงเซลล์นิวโทรฟิลจากไขกระดูกของหนูทดลอง (A) ข้อมูล dot plot จาก flow cytometer แสดงกลุ่มของนิวโทรฟิล/แกรนูโลไซต์ (R1) ก่อนการย้อมโมเลกุล Ly-6G (Gr-1) ที่จำเพาะกับนิวโทรฟิลของหนู (B) ฮิสโตแกรมแสดงจำนวนเปอร์เซ็นต์ของเซลล์จาก R1 ที่ถูกระบุว่าเป็นนิวโทรฟิล (C) ภาพถ่ายจากการเตรียม cyospin และย้อมสีเซลล์ที่แยกได้จากไขกระดูกด้วย Wright Rapid Stain หรือ Alexa Fluor 647 Ly-6G/Ly6C (Gr-1) ถ่ายที่กำลังขยาย 20x objective lens แถบมาตราวัดขนาดเท่ากับ 20  $\mu\text{m}$

## 7. ผลการแยกชนิดของเซลล์เม็ดเลือดขาวจากน้ำล้างปอด (Differential count of BAL cells)

เซลล์เม็ดเลือดขาวที่เก็บได้จากน้ำล้างปอด (BAL) ของหนูในแต่ละกลุ่มทดลอง เมื่อจำแนกเซลล์ที่เป็นองค์ประกอบด้วยการย้อมสี Wright Rapid Stain และส่องตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง (รูปที่ 11) พบว่าน้ำล้างปอดของหนูในกลุ่มควบคุม (Ctrl) ประกอบด้วยเซลล์กลุ่ม alveolar macrophage เป็นส่วนใหญ่ กลุ่ม Mix ประกอบด้วยเซลล์นิวโทรฟิลและเซลล์ alveolar macrophage ในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน ส่วนกลุ่ม Flu เซลล์ที่เป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่ คือ ลิมโฟไซต์ และกลุ่มสุดท้าย คือ กลุ่ม KP มีเซลล์นิวโทรฟิลเป็นองค์ประกอบหลักในน้ำล้างปอด เมื่อทดสอบทางสถิติของปริมาณเซลล์เม็ดเลือดขาวที่เป็นองค์ประกอบในแต่ละกลุ่มทดลองพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ( $p = 0.0159$ ) รูปที่ 11E



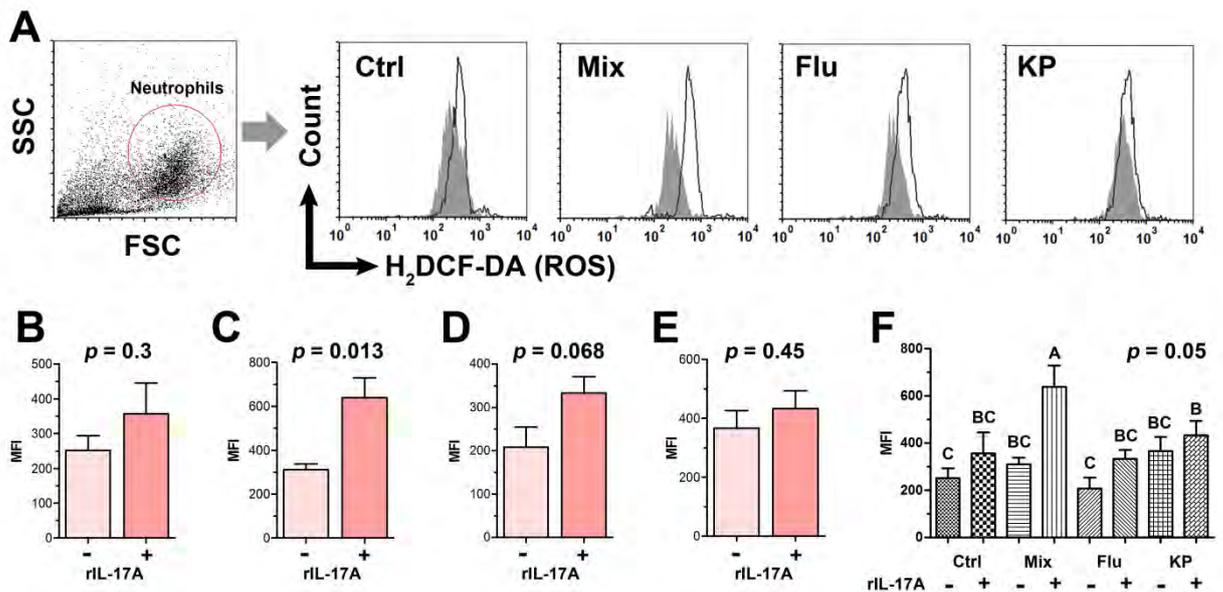
รูปที่ 11 ข้อมูลแผนภูมิแท่งแสดงปริมาณเซลล์ที่แยกได้จากน้ำล้างปอด (BAL) ของหนูทดลองในกลุ่ม (A) Control (B) Mix (C) Flu (D) KP และ (E) ข้อมูลรวมทุกกลุ่มทดลอง ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยและค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (Mean  $\pm$  SE) จากการทดลองจำนวน 2 ครั้ง โดยมีจำนวนหนู ( $n$ ) เท่ากับ 3-5 ตัว/กลุ่ม ทำการทดสอบทางสถิติโดยวิธี ANOVA (F) ภาพถ่ายลักษณะเซลล์จากน้ำล้างปอดที่แยกได้จากหนูทดลองในแต่ละกลุ่มย้อมสี Wright Rapid Stain ถ่ายที่กำลังขยาย 20x objective lens แถบมาตรฐานวัดขนาดเท่ากับ 20  $\mu$ m

8. ผลการทดสอบการทำหน้าที่ของเซลล์นิวโทรฟิล (Neutrophil functional assays) ที่แยกได้จากไขกระดูกของหนูทดลองภายหลังการติดเชื้อฯ

เซลล์นิวโทรฟิลที่แยกได้จากไขกระดูกของหนูทดลองภายหลังการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่หรือแบคทีเรียชนิด *Klebsiella pneumoniae* นำมากระตุ้นเบื้องต้น (priming) ด้วย mouse IL-17A หรือ PBS และทำการทดสอบการทำหน้าที่ของเซลล์ฯ ดังนี้

8.1 การตรวจสอบ Reactive Oxygen Species (ROS) ภายในนิวโทรฟิล

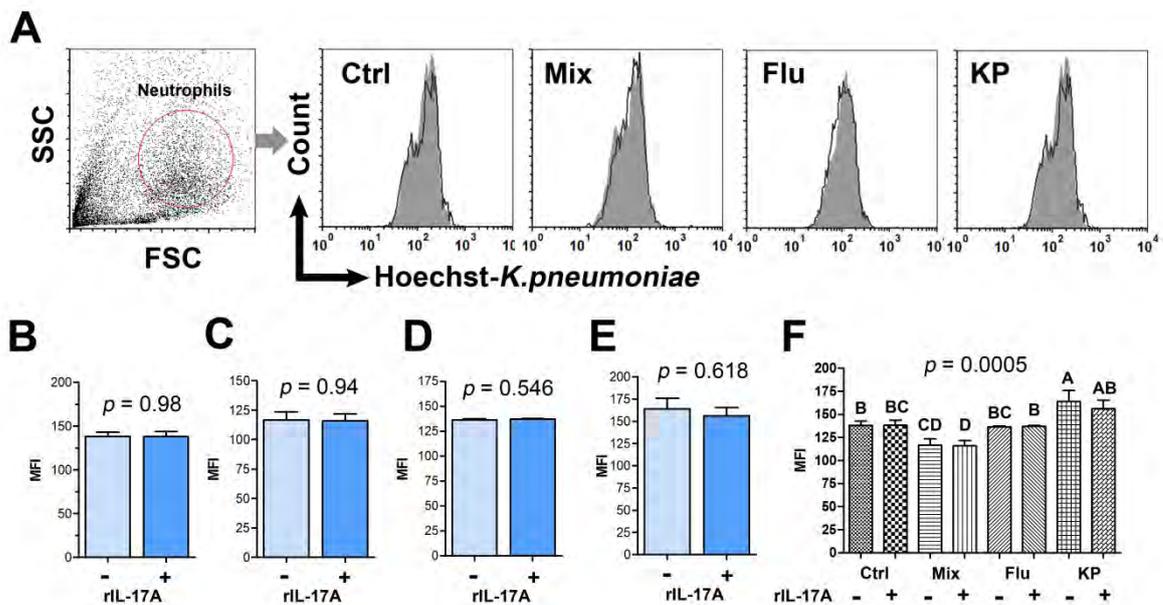
การกระตุ้นเซลล์นิวโทรฟิลด้วย rIL-17A ในหลอดทดลองและทำการตรวจวัด ROS พบว่าเซลล์ในกลุ่มที่ได้รับ rIL-17A มีปริมาณ ROS ที่เซลล์สร้างขึ้นสูงกว่าเซลล์ในกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นจาก PBS ในทุกกลุ่มหนูทดลอง (รูปที่ 12) และพบว่าปริมาณ ROS ที่เซลล์ที่ได้รับ rIL-17A สร้างขึ้นมีปริมาณสูงชันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในหนูกลุ่ม Mix ( $p = 0.013$  รูปที่ 12C) ส่วนในกลุ่มอื่น ๆ นั้นพบว่าเซลล์ที่ได้รับการกระตุ้นจาก rIL-17A มีปริมาณ ROS เพิ่มสูงขึ้นกว่ากลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นจาก PBS ด้วย ผลการเปรียบเทียบปริมาณ MFI ทุกกลุ่มทดลองแสดงให้เห็นว่าเซลล์ในกลุ่ม Mix มีปริมาณ ROS ที่เซลล์สร้างขึ้นสูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มอื่น ( $p = 0.005$  รูปที่ 12F)



รูปที่ 12 ข้อมูล flow cytometry แสดง intracellular ROS ที่สร้างขึ้นโดยนิวโทรฟิล (A) gated neutrophils ของหนูในกลุ่ม Control, Mix, Flu และ KP ที่ได้รับ rIL-17A (solid line) และไม่ได้รับ rIL-17A (filled histogram) ข้อมูล histogram ตัวแทนผลการทดลองจากการทดลองจำนวน 3 ครั้ง (B-E) แผนภูมิแท่งแสดงปริมาณ intracellular ROS ของหนูทดลองในกลุ่ม (B) Control (C) Mix (D) Flu (E) KP และ (F) ข้อมูลรวมทุกกลุ่มทดลอง ค่าที่แสดงเป็นค่า mean fluorescent intensity (MFI) และค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (SE) จากการทดลองจำนวน 3 ครั้ง โดยมีจำนวนหนู (n) เท่ากับ 3-5 ตัว/กลุ่ม ทำการทดสอบทางสถิติโดยวิธี Student *t* test (B-E) หรือ one-way ANOVA (F) และตามด้วย Tukey-Kramer HSD multiple comparison test (ตัวอักษร A-C บนแผนภูมิที่ไม่เหมือนกันแสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ)

## 8.2 การทดสอบกระบวนการเก็บกิน (Phagocytosis)

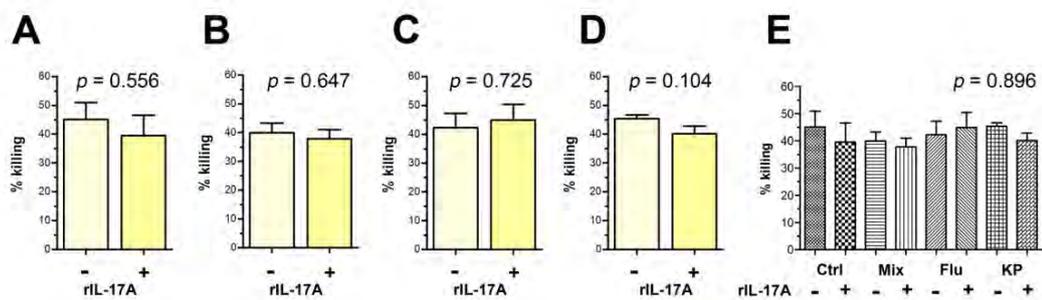
กระบวนการเก็บกินหรือฟาโกไซโตซิสของเซลล์ในกลุ่มที่ได้รับ rIL-17A พบว่าปริมาณการเก็บกินลดลงเล็กน้อยในหนูกลุ่ม KP เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับแต่เพียง PBS อย่างไม่มีนัยสำคัญ (รูปที่ 13) สำหรับในหนูกลุ่มอื่นพบว่าปริมาณการเก็บกินมีค่าที่ค่อนข้างคงที่ เมื่อเปรียบเทียบกับระหว่างกลุ่มหนูทดลองพบว่าหนูในกลุ่ม KP มีกิจกรรมของกระบวนการเก็บกินสูงสุดและแตกต่างจากกลุ่ม Mix อย่างมีนัยสำคัญ ( $p = 0.0005$  รูปที่ 13F)



รูปที่ 13 ข้อมูล flow cytometry แสดง phagocytosis โดยนิวโทรฟิล (A) gated neutrophils ของหนูในกลุ่ม Control, Mix, Flu และ KP ที่ได้รับ rIL-17A (solid line) และไม่ได้รับ rIL-17A (filled histogram) ข้อมูล histogram ตัวแทนผลการทดลองจากการทดลองจำนวน 3 ครั้ง (B-E) แผนภูมิแท่ง แสดง MFI ของ phagocytosis ของหนูทดลองในกลุ่ม (B) Control (C) Mix (D) Flu (E) KP และ (F) ข้อมูลรวมทุกกลุ่มทดลอง ค่าที่แสดงเป็นค่า MFI  $\pm$  SE จากการทดลองจำนวน 3 ครั้ง โดยมีจำนวนหนู ( $n$ ) เท่ากับ 3-5 ตัว/กลุ่ม ทำการทดสอบทางสถิติโดยวิธี Student  $t$  test (B-E) หรือ one-way ANOVA (F) และตามด้วย Tukey-Kramer HSD multiple comparison test (ตัวอักษร A-D บนแผนภูมิที่ไม่เหมือนกันแสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ)

### 8.3 ผลการทดสอบการทำลายเชื้อแบคทีเรียภายในเซลล์ (Bactericidal assay)

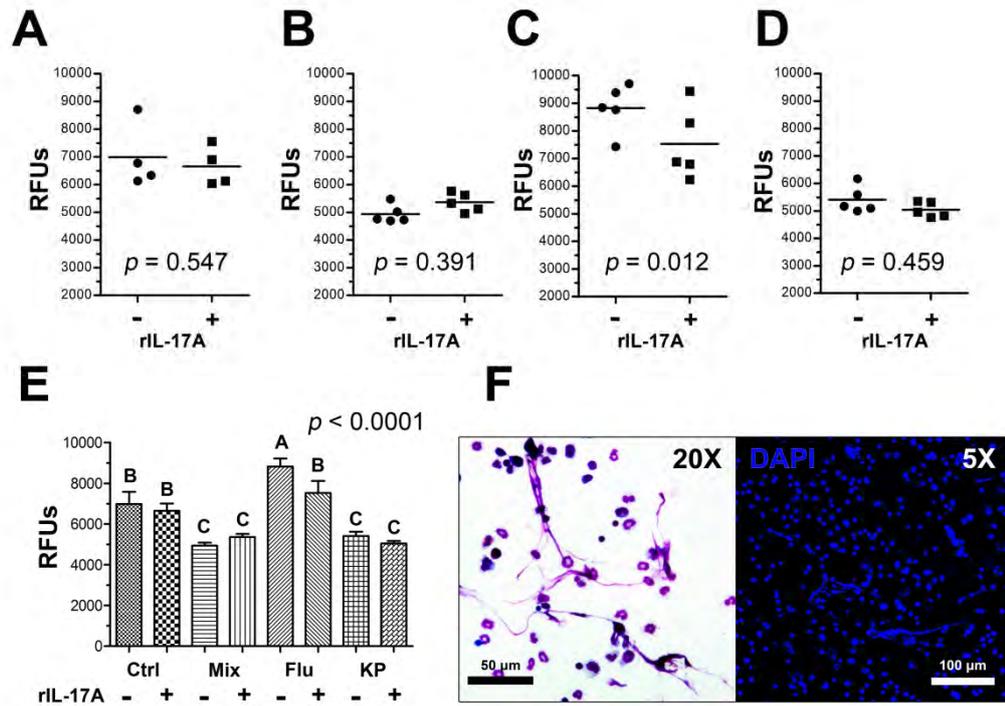
ผลการตรวจสอบการทำลายเชื้อแบคทีเรีย *Klebsiella pneumoniae* โดยเซลล์นิวโทรฟิล ด้วยวิธี MTT bactericidal assay พบว่าเซลล์นิวโทรฟิลจากหนูในกลุ่ม Control, Mix และ KP ที่ไม่ได้รับ rIL-17A มีความสามารถในการทำลายแบคทีเรียที่สูงกว่าเซลล์ที่ได้รับ rIL-17A ยกเว้นเซลล์จากหนูกลุ่ม Flu เพียงกลุ่มเดียวที่มีเปอร์เซ็นต์ในการทำลายแบคทีเรียเพิ่มขึ้น (รูปที่ 14C) แต่โดยภาพรวมแล้วความสามารถในการทำลายเชื้อแบคทีเรียของเซลล์นิวโทรฟิลแม้ว่าจะได้รับการกระตุ้นจาก rIL-17A หรือไม่ก็ตามจากหนูทั้งสี่กลุ่มไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ( $p = 0.8962$  รูปที่ 14E)



รูปที่ 14 การทำลายเชื้อแบคทีเรียภายในเซลล์นิวโทรฟิล (Bactericidal Assay) (A) แผนภูมิแท่งแสดงเปอร์เซ็นต์การทำลายเชื้อของหนูในกลุ่ม Control (B) Mix (C) Flu (D) KP และ (E) ข้อมูลรวมทุกกลุ่มทดลองของหนูที่ได้รับ/ไม่ได้รับ rIL-17A ค่าที่แสดงเป็นค่า mean  $\pm$  SE จากการทดลองจำนวน 3 ครั้ง โดยมีจำนวนหนู ( $n$ ) เท่ากับ 3-5 ตัว/กลุ่ม ทำการทดสอบทางสถิติโดยวิธี Student  $t$  test (A-D) หรือ one-way ANOVA (E)

### 8.4 การตรวจวัดปริมาณการสร้าง Neutrophil Extracellular Traps (NETs)

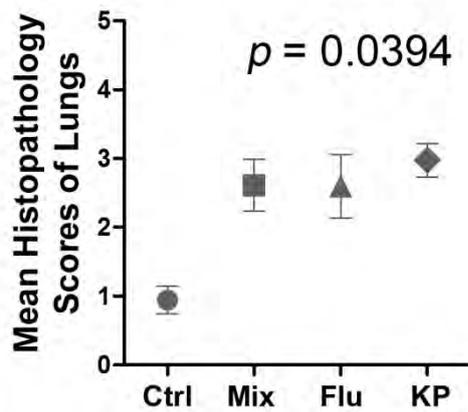
ผลการตรวจสอบโครงสร้าง NETs (รูปที่ 15) ภายหลังจากกระตุ้นนิวโทรฟิลเบื้องต้นด้วย rIL-17A หรือ PBS และกระตุ้นซ้ำด้วย PMA ในเซลล์จากหนูกลุ่มต่าง ๆ พบว่าเซลล์จากหนูทดลองกลุ่ม Control, Flu และ KP เมื่อได้รับการกระตุ้นเบื้องต้นด้วย rIL-17A มีปริมาณการสร้างโครงสร้าง NETs ลดลง (รูปที่ 15A, C, D) แต่พบว่าปริมาณการสร้าง NETs ของเซลล์จากหนูกลุ่ม Flu มีปริมาณการสร้างที่เพิ่มขึ้นและมีปริมาณสูงสุดซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากเซลล์ของหนูกลุ่ม Mix และ KP ( $p < 0.0001$  รูปที่ 15E)



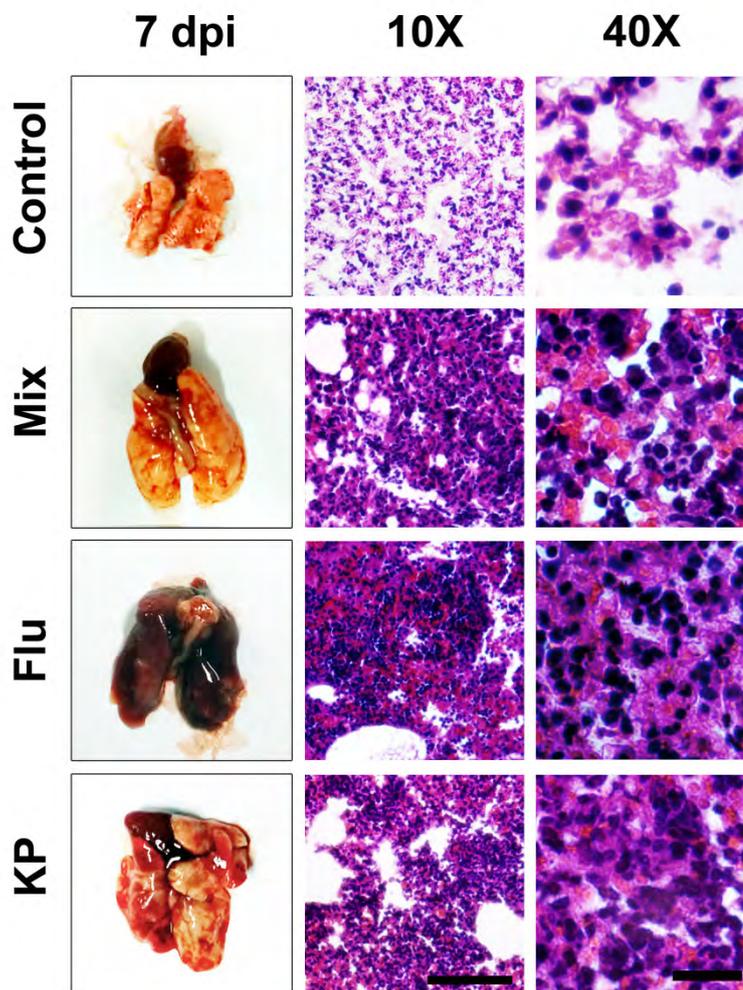
รูปที่ 15 แสดง Neutrophil Extracellular Traps (NETs) โดยเซลล์นิวโทรฟิล (A) แผนภูมิแท่งแสดง relative fluorescent units (RFUs) ของปริมาณ NETs ในกลุ่ม Control (B) Mix (C) Flu (D) KP และ (E) ข้อมูลรวมทุกกลุ่มทดลองของหนูที่ได้รับ/ไม่ได้รับ rIL-17A ค่าที่แสดง คือ mean RFUs  $\pm$  SE จาก 1 การทดลองซึ่งเป็นตัวแทนผลการทดลองจากจำนวน 3 ครั้ง ซึ่งให้ผลในลักษณะเดียวกัน โดยมีจำนวนหนู ( $n$ ) เท่ากับ 3-5 ตัว/กลุ่ม ทำการทดสอบทางสถิติโดยวิธี Student  $t$  test (A-D) หรือ one-way ANOVA (E) และตามด้วย Tukey-Kramer HSD multiple comparison test (ตัวอักษร A-C บนแผนภูมิที่ไม่เหมือนกันแสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ) (F) ภาพจากกล้องจุลทรรศน์แสงสว่างแสดงลักษณะโครงสร้าง NETs ที่ปล่อยออกจากเซลล์นิวโทรฟิล (ซ้าย) และภาพจากกล้องจุลทรรศน์เรสเซนส์แสดงโครงสร้าง NETs ที่ย้อมติดสี DAPI (ขวา)

### 9. จุลพยาธิวิทยา (Histology)

ผลทางจุลพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อปอดที่เก็บจากหนูในกลุ่มทดลองทั้ง 4 กลุ่ม พบรอยโรคในเนื้อเยื่อปอดของหนูกลุ่ม Mix, Flu และ KP (รูปที่ 17) เมื่อนำหลักเกณฑ์การให้คะแนนรอยโรคบริเวณปอด (lung histopathology score) เช่น การพบ perivascular cuff, peribronchiolar inflammation จากเซลล์อักเสบ หรือพบเลือดออก (hemorrhage) มาประเมินความรุนแรงและปริมาณนิวโทรฟิลที่เคลื่อนที่เข้าสู่ปอดพบว่าสามารถจำแนกคะแนนในหนูกลุ่ม Mix, Flu และ KP มีระดับคะแนนเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 2 ถึง 3 ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ( $p = 0.0394$  รูปที่ 16) จากหนูในกลุ่ม Control ซึ่งมีระดับคะแนนเฉลี่ยเท่ากับ 0.94



รูปที่ 16 แสดงระดับคะแนนรอยโรคบริเวณปอดของหนูในแต่ละกลุ่มทดลอง (ข้อมูลจากจำนวนหนูทั้งหมดของ 3 การทดลอง,  $n = 3-5$  ตัว/กลุ่ม ทดสอบสถิติโดยวิธี One-way ANOVA)

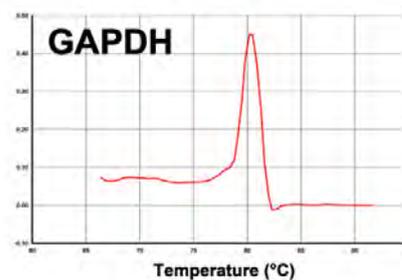
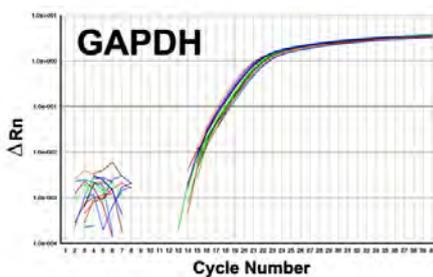
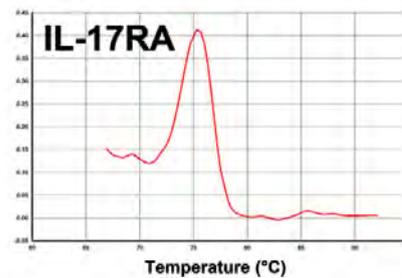
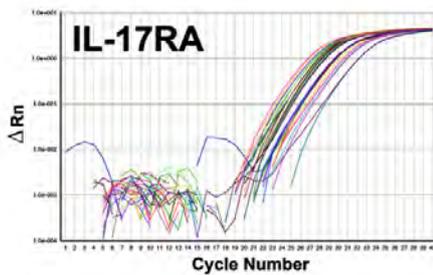
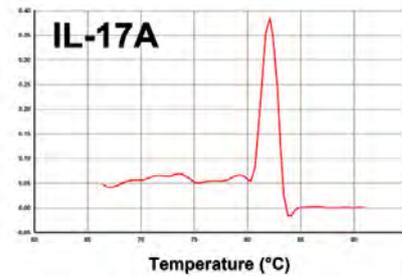
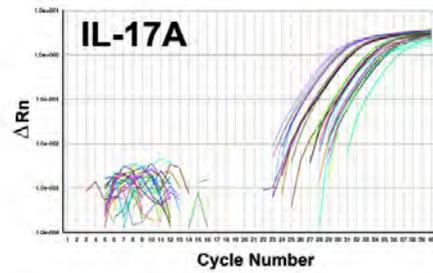
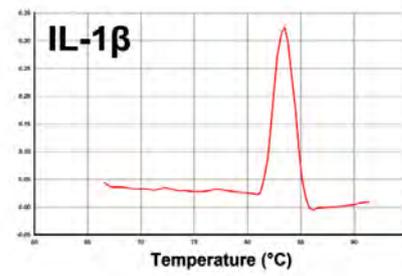
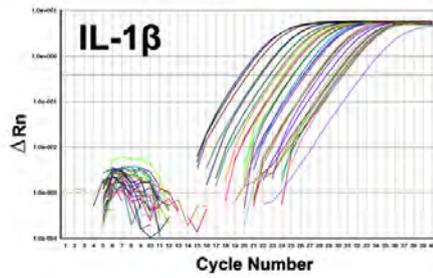


รูปที่ 17 รอยโรคบริเวณปอดของหนูทดลอง (คอลัมน์ซ้าย, จากบนลงล่าง) ในกลุ่ม Control, Mix, Flu และ KP (คอลัมน์กลางและขวา) แสดงจุลพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อปอดของหนูทดลองกลุ่มต่าง ๆ ดังกล่าวข้างต้นจากการเก็บตัวอย่างปอดของหนูภายหลังการติดเชื้อนาน 7 วัน (7 dpi) ถ่ายที่กำลังขยาย 10x และ 40x objective lens แถบมาตราวัดขนาดเท่ากับ 100  $\mu\text{m}$  (10x) และ 20  $\mu\text{m}$  (40x) ตามลำดับ ข้อมูลตัวแทนผลการทดลองจากจำนวน 3 ครั้ง ซึ่งให้ผลในลักษณะเดียวกัน โดยมีจำนวนหนู ( $n$ ) เท่ากับ 3-5 ตัว/กลุ่ม

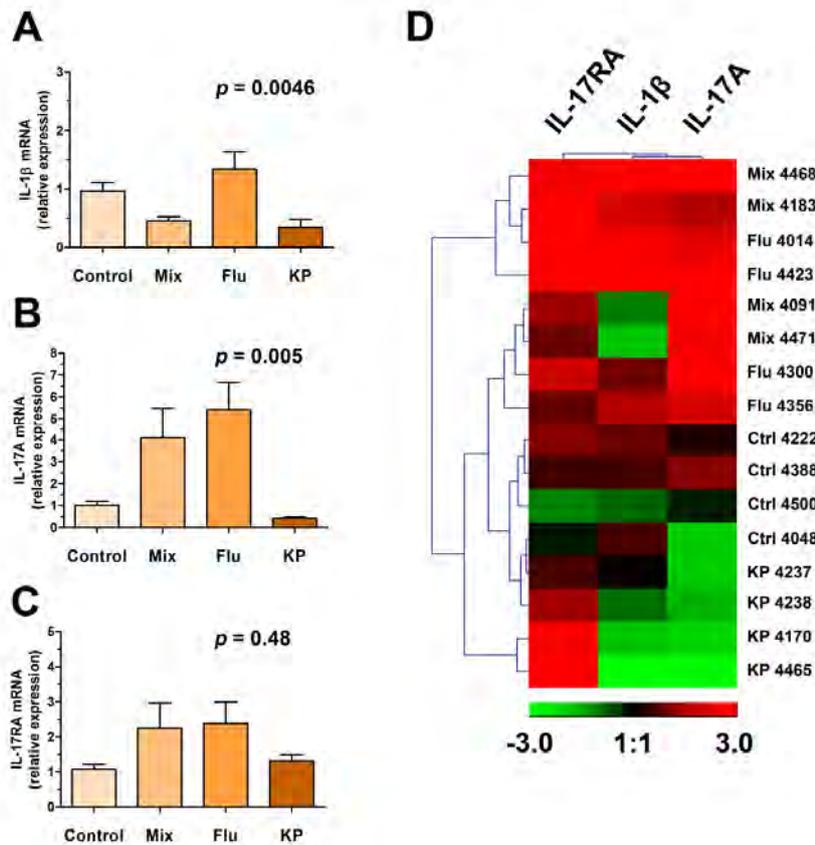
10. การตรวจสอบการแสดงออกของยีนในเซลล์นิวโทรฟิลที่ตอบสนองต่อการอักเสบบริเวณปอด ภายหลังจากติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ หรือแบคทีเรียชนิด *Klebsiella pneumoniae* โดยวิธี quantitative Real-time PCR (qPCR)

เซลล์นิวโทรฟิลที่แยกจากไขกระดูกของหนูทดลองทั้งสี่กลุ่มนำมาตรวจสอบระดับการแสดงออกของ messenger RNAs (mRNA) ของยีน IL-1 $\beta$ , IL-17A, IL-17RA โดยมี GAPDH เป็นยีนควบคุม ผลการทดลองพบระดับการแสดงออกของยีนทุกยีนที่ทดสอบโดย real-time PCR ดังปรากฏในรูป amplification plots และผลิตภัณฑ์จากยีนที่ได้มีความจำเพาะดังแสดงในรูป dissociation curves (รูปที่ 18 คอลัมน์ด้านขวา) โดยพบว่าค่า  $T_m$  จากการวิเคราะห์ dissociation curve ของยีน IL-1 $\beta$ , IL-17A, IL-17RA และ GAPDH มีค่าเท่ากับ 83.12, 82.27, 76.52 และ 80.26 องศาเซลเซียสตามลำดับ

ผลการวิเคราะห์ระดับการแสดงออกแบบสัมพัทธ์ (relative quantification หรือ RQ) ของยีน IL-1 $\beta$  พบการแสดงออกเพิ่มขึ้นจากเซลล์นิวโทรฟิลของหนูในกลุ่ม Flu แต่พบการแสดงออกที่ลดลงจากหนูในกลุ่ม Mix และ KP โดยเมื่อพิจารณาความแตกต่างของระดับการแสดงออกของยีน IL-1 $\beta$  จากหนูทั้งสี่กลุ่มพบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p = 0.0046$  รูปที่ 19) สำหรับยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการตอบสนองของเซลล์นิวโทรฟิลบริเวณเนื้อเยื่อปอด ได้แก่ IL-17A และยีนตัวรับ (IL-17RA) พบการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นจากนิวโทรฟิลของหนูทดลองในกลุ่ม Mix และ Flu และมีการแสดงออกที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ( $p = 0.0005$  รูปที่ 19) ในกลุ่ม KP และมีรูปแบบที่ใกล้เคียงกับการแสดงออกของยีน IL-1 $\beta$  ข้างต้น ยีนตัวรับ IL-17 หรือ IL-17RA พบรูปแบบการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นในนิวโทรฟิลของหนูทุกกลุ่มการทดลอง (รูปที่ 19) โดยมีการแสดงออกเพิ่มขึ้นในระดับที่ใกล้เคียงกันในกลุ่ม Mix และ Flu



รูปที่ 18 Real-time PCR plots ของยีน IL-1 $\beta$ , IL-17A, IL-17RA และ GAPDH (endogenous control) (คอลัมน์ด้านซ้าย) รูปร่างของ amplification plots แสดง dye fluorescence ( $\Delta Rn$ ) vs cycle number และเส้น threshold บริเวณตำแหน่ง geometric phase ของ amplification curve สำหรับการคำนวณค่า threshold cycle ( $C_T$ ) พบการเพิ่มจำนวนแบบปกติมีลักษณะเหมือนกันในแต่ละตัวอย่างของแต่ละยีนแสดงถึงประสิทธิภาพของ PCR ที่ไม่มีความแตกต่างกัน (คอลัมน์ด้านขวา) กราฟแสดงค่า Melting curve หรือ Dissociation curve



รูปที่ 19 ระดับการแสดงออกของยีนที่ทำการตรวจสอบโดย quantitative real-time PCR ในหนูทดลองกลุ่ม Control, Mix, Flu และ KP (A) ยีน IL-1 $\beta$  (B) ยีน IL-17A (C) ยีน IL-17RA ในเซลล์นิวโทรฟิล ข้อมูลแผนภูมิแท่งแสดงค่า Mean  $\pm$  SE ของ mRNA relative expression ข้อมูลตัวแทนผลการทดลองจากจำนวน 3 ครั้ง ซึ่งให้ผลในลักษณะเดียวกัน โดยมีจำนวนหนู ( $n$ ) เท่ากับ 3-5 ตัว/กลุ่ม ทำการทดสอบทางสถิติโดยวิธี one-way ANOVA (D) ข้อมูลแผนภาพความร้อน (heatmap) เปรียบเทียบระดับการแสดงออกของยีน IL-1 $\beta$ , IL-17A และ IL-17RA ในเซลล์นิวโทรฟิลของหนูทดลองทั้ง 4 กลุ่ม ข้อมูลนำเสนอค่า  $-\Delta\Delta C_T$  ซึ่งเทียบเท่ากับ  $\log_2$  relative fold change ของแต่ละ individual data points และนำมาการจัดกลุ่มลำดับชั้นแบบ unsupervised hierarchical clustering ของข้อมูลโดย average linkage method ด้วย Euclidean distance สีแดงบ่งบอกถึงระดับการแสดงออกที่เพิ่มขึ้น สีเขียวบ่งบอกถึงระดับการแสดงออกที่ลดลง สีดำบ่งบอกถึงระดับการแสดงออกที่ไม่เปลี่ยนแปลง

## สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย

เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ (influenza virus) ที่พบในคนร้อยละ 80-90 มีสาเหตุจาก influenza type A และมักก่อโรครุนแรงกว่าชนิดอื่น ไวรัสนี้เป็นสาเหตุของการระบาดใหญ่ทั่วโลกที่เกิดขึ้นในอดีตด้วย การระบาดของไวรัส influenza H1N1 (swine flu) pandemic ในปี ค.ศ. 2009 พบว่าผู้ป่วยมากกว่าร้อยละ 50 แสดงรอยโรคบริเวณปอดว่าเกิดจากการติดเชื้อแทรกซ้อนของแบคทีเรีย (bacterial pneumonia) (Metzger and Sun, 2013) การระบาดของไวรัสไข้หวัดใหญ่ที่พบในประเทศไทยส่วนใหญ่เป็น Clade 1 และอาจพบ Clade 2 ปะปนได้บ้างบริเวณภาคตะวันออกเฉียงเหนือของไทย การศึกษาในครั้งนี้จำลองเหตุการณ์การติดเชื้อร่วมกันระหว่างเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ pandemic H1N1 Influenza A/SW/Thailand/CU-RA29/2009 (Sreta *et al.*, 2010) ซึ่งเป็น type A โดยมี Hemagglutinin (H) subtype คือ H1 และ Neuraminidase (N) subtype คือ N1 โดยพบการติดเชื้อจากสุกรและอาจติดต่อกับคนและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมอื่น ๆ ได้ ทำการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ร่วมกับแบคทีเรียแกรมลบชนิด *Klebsiella pneumoniae* ซึ่งมักพบเสมอว่าเป็นสาเหตุร่วมของการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจของผู้ป่วย

การศึกษาในครั้งนี้ทำการทดลองติดเชื้อไวรัสฯ ในหนูทดลอง พบว่าไวรัสมีความสามารถในการติดเชื้อข้ามสายพันธุ์จากสุกรมายังหนูหรืออาจกล่าวได้ว่าไวรัสเมื่อติดเชื้อเข้าสู่ร่างกายของหนูทดลองมีลักษณะของการเกิด mouse-adapted influenza virus โดยไวรัสก่อให้เกิดรอยโรคในร่างกายหนูได้เช่นเดียวกับที่พบการติดเชื้อในสุกร หรือการรายงานรอยโรคที่พบใน mouse adapted H1N1 A/PR/8/34 (Metzger and Sun, 2013; Sun *et al.*, 2011) การติดเชื้อไวรัสฯ ชนิดเดียวหรือการติดเชื้อร่วมกับแบคทีเรีย (Narayana Moorthy *et al.*, 2013) ส่งผลให้หนูทดลองเกิดการป่วยและตายอันเป็นผลเนื่องมาจากการติดเชื้อไวรัสเป็นสำคัญซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Sun *et al.*, 2011 โดยการแสดงได้จาก survival curve ที่พบว่าหนูทดลองเริ่มตายลงในวันที่ 5 ภายหลังจากได้รับเชื้อไวรัสหรือแบคทีเรีย และพบรอยโรคที่สอดคล้องกับการได้รับเชื้อไวรัส (รูปที่ 17) เนื้อเยื่อปอดจากรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาพบลักษณะของบริเวณที่มีเลือดออก (hemorrhage) และการเข้าแทรกของนิวโทรฟิลที่สอดคล้องกับภาวะการเกิด ARDS และ ALI ด้วย โดยพบการเพิ่มขึ้นของ endothelial permeability ทำให้เกิด alveolar edema และทำให้การแลกเปลี่ยนก๊าซเสียไป ส่วน ARDS มักเกิดขึ้นตามมาจาก ALI ทำให้การแลกเปลี่ยนก๊าซทำได้ยากและเกิด fibroproliferation และเกิด lung remodeling ในท้ายที่สุด

เซลล์นิวโทรฟิลที่ใช้ในการศึกษาคั้งนี้แยกได้จากไขกระดูกของหนู (Southgate *et al.*, 2008) ซึ่งเซลล์ที่แยกได้มีความสามารถเช่นเดียวกับเซลล์ที่แยกได้จากช่องท้อง (intraperitoneum, i.p.) (Itou *et al.*, 2006) นิวโทรฟิลที่แยกได้จากไขกระดูกเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีที่แยกจากช่องท้อง ให้ผลการตอบสนองเกี่ยวกับ oxidative response ได้ดีกว่าประมาณ 2.5 ถึง 3 เท่าและยังตอบสนองต่อ degranulation ได้ดีกว่าอีกด้วย (Itou *et al.*, 2006) ในการศึกษาผลการตรวจวัดปริมาณ ROS ที่เซลล์ผลิตขึ้นภายหลังจากการได้รับการกระตุ้นด้วย rIL-17A ก็ให้ผลการทดลองเช่นเดียวกับที่พบในการศึกษาของ Itou *et al.*, 2006 และการศึกษาของ Schwarzenberger *et al.*, 1998 พบว่า IL-17 อาจช่วยให้เกิดการเพิ่มจำนวนของเซลล์นิวโทรฟิลในไขกระดูกและเพิ่มการเคลื่อนออกสู่ในกระแสเลือดได้ (Schwarzenberger *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2011)

IL-17A และ IL-17F มีการศึกษาที่แสดงว่าไซโตไคน์ทั้งสองมีบทบาทสำคัญในการช่วยเรียกให้นิวโทรฟิลเคลื่อนที่เข้าสู่บริเวณที่เกิดการอักเสบ (Holloway and Schwacha, 2012) ซึ่งจากการศึกษาของ Roussel *et al.*, 2010 แสดงให้เห็นว่า IL-17 กระตุ้นบริเวณเยื่อผนังหลอดเลือด (endothelial cells) ขนาดเล็กภายในปอดให้เกิดการสร้าง CXCL8 (IL-8) และอนุพันธ์ของ 5-lipoxygenase pathway ส่งผลในการเรียกให้นิวโทรฟิลเคลื่อนที่เข้าสู่ปอด (Roussel *et al.*, 2010) ในการศึกษาครั้งนี้แสดงผลทางอ้อมของ IL-17 ที่เกิดขึ้นบริเวณเนื้อเยื่อปอด เนื่องจากเซลล์นิวโทรฟิลมีการสะสมเป็นจำนวนมากและเป็นเซลล์ชนิดหลักในกลุ่ม Mix และ KP ที่ตรวจวัดได้ในน้ำล้างปอด (รูปที่ 11F) หรือในชั้นเนื้อที่ตัดจากปอด (รูปที่ 17) แต่ทั้งนี้อิทธิพลจาก cytokine หรือ chemokine ชนิดอื่นนอกเหนือจาก IL-17 ก็อาจส่งผลให้เกิดการเคลื่อนที่ของเซลล์นิวโทรฟิลเข้าสู่บริเวณเนื้อเยื่อปอดได้ด้วย

นิวโทรฟิลของหนู (mouse neutrophil) ทำหน้าที่เป็นเซลล์นำเสนอแอนติเจน (APC) ให้กับลิมโฟไซต์และช่วยให้เกิดการพัฒนามาเป็น Th1 และ Th17 cells ได้ (Abdallah *et al.*, 2011) ทั้งนี้ อาจเป็นเหตุผลเนื่องจากการที่เซลล์ชนิดนี้มีความสามารถในการเก็บกินชิ้นส่วนของแบคทีเรียหรืออนุภาคของไวรัสเข้าสู่เซลล์และเกิดกระบวนการแปรรูปและนำเสนอแอนติเจนให้กับลิมโฟไซต์ ณ บริเวณที่เหมาะสม ดังนั้นในการทดลองครั้งนี้การที่นิวโทรฟิลได้สัมผัสกับเชื้อไวรัสในช่วงต้นของการติดเชื้อ (ช่วงของการติดเชื้อไวรัส 3 วันแรก) จึงอาจเป็นโอกาสที่เซลล์ชนิดนี้จะได้แปรรูปแอนติเจนของเชื้อไวรัสและนำเสนอให้กับเซลล์ naïve และ/หรือ effector T lymphocytes ได้ และอาจเพิ่มโอกาสให้เซลล์ลิมโฟไซต์ได้เพิ่มจำนวนและเปลี่ยนแปลงรูปร่าง (clonal expansion /differentiation) เป็น Th17 cells ซึ่งเป็นการเกื้อกูลกันในการผลิต IL-17 ซึ่งช่วยดึงดูดนิวโทรฟิลให้เข้ามายังบริเวณที่ติดเชื้อเพิ่มมากขึ้นด้วย

IL-17 เป็น pro-inflammatory cytokine ที่สำคัญในระบบภูมิคุ้มกัน หน้าที่หนึ่งของ IL-17A และ IL-17F คือช่วยส่งเสริมให้เซลล์ทำหน้าที่ในการตอบสนองต่อการติดเชื้อแบคทีเรีย (antibacterial-) และการติดเชื้อรา (antifungal response) IL-17 และไซโตไคน์ในกลุ่มเดียวกันนี้ ยังมีบทบาทสำคัญในการควบคุมการตอบสนองของ innate epithelial cells (Pappu *et al.*, 2012) โดยที่ IL-17 มีส่วนในการกระตุ้น proinflammatory mediators อื่น ๆ เช่น IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-6, CXCL8, CCL20 และ G-CSF จาก myeloid และ non-myeloid cells ซึ่งช่วยให้เกิดการเคลื่อนที่เข้ามาของเซลล์นิวโทรฟิลได้ (Bosmann and Ward, 2012; Cua and Tato, 2010; Fossiez *et al.*, 1996; Nguyen Van Luu *et al.*, 2012) ซึ่งการทำหน้าที่ของ IL-17 นั้นจะทำหน้าที่ร่วมกับไซโตไคน์อื่น ๆ เช่น IL-1, IL-6 และ TNF- $\alpha$  ในการกระตุ้น tissue-infiltrating neutrophils ให้กำจัดเชื้อแบคทีเรียหรือเชื้อราที่อยู่บริเวณเนื้อเยื่อเหล่านั้น IL-17 อาจมีบทบาทในการกระตุ้น (activation) ให้เซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายให้สร้าง IL-1 $\beta$  ผ่านทางการกระตุ้นตัวรับ Toll-like receptor 4 (TLR-4) (Besnard *et al.*, 2012) และเซลล์ Gr-1<sup>+</sup> neutrophil สามารถผลิต IL-17A ได้และสื่อสัญญาณจาก IL-17A เป็นความต้องการของ IFN- $\gamma$  signaling (Li *et al.*, 2010) จากการทดลองในครั้งนี้ให้ผลการทดลองที่สอดคล้องว่า Gr-1<sup>+</sup> neutrophils ที่แยกได้จากไขกระดูกมีการแสดงออกของยีนสำหรับ IL-17A เพิ่มขึ้นเมื่อร่างกายอยู่ในภาวะการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ (Flu) หรือการติดเชื้อไวรัสฯ ร่วมกับการติดเชื้อแทรกซ้อนจากแบคทีเรีย (Mix) ตลอดจนการเพิ่มขึ้นของการแสดงออกของยีนตัวรับ IL-17RA ในหนูทุกกลุ่มทดลอง (รูปที่ 19)

จากการสืบค้นข้อมูล ยังไม่พบว่ามีรายงานถึงผลการกระตุ้นนิวโทรฟิลด้วย IL-17 และตรวจวัดการทำหน้าที่ของเซลล์ทั้งแบบการทำลายภายใน (intracellular functions) และภายนอกเซลล์ (extracellular function) การศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาแรกที่แสดงผลของ IL-17 ต่อการทำหน้าที่ของนิวโทรฟิลในหนูทดลอง นอกเหนือจากหน้าที่ในการดึงดูดให้เซลล์นิวโทรฟิลเคลื่อนที่เข้าสู่บริเวณที่เกิดการอักเสบ แต่จากผลการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าไซโตไคน์ชนิดนี้สามารถกระตุ้นการทำหน้าที่ของนิวโทรฟิลได้เพียงบางหน้าที่ได้เท่านั้น ในการศึกษาพบว่าผลจากการกระตุ้นเซลล์ด้วย rIL-17A ช่วยให้เกิดการสร้าง ROS เพิ่มขึ้นในเซลล์จากทุกกลุ่มหนูทดลอง ปริมาณการสร้าง ROS ที่เพิ่มมากขึ้นในบริเวณเนื้อเยื่ออาจส่งผลให้เซลล์นิวโทรฟิลเกิดการตายโดยเฉพาะจากกระบวนการ apoptosis และอาจกล่าวรวมถึงกระบวนการตายแบบ NETosis (Almyroudis *et al.*, 2013) และผลจากการตายของเซลล์อาจก่อให้เกิดการปลดปล่อยนำส่วนของ DNA โปรตีนฮีสโตน แกรนูโลโปรตีน และน้ำย่อยต่าง ๆ ซึ่งประกอบอยู่ภายในเซลล์นิวโทรฟิลให้ออกสู่บริเวณเนื้อเยื่อข้างเคียงและก่อให้เกิดการทำลายเนื้อเยื่อให้เสียหายได้ ลักษณะของความเสียหายของเนื้อเยื่อดังเหตุการณ์ข้างต้น

แสดงในแบบจำลองของการเกิดภาวะ acute phase ของ acute lung injury (ALI) (Ware and Matthay, 2000) แต่การตายลงของเซลล์นิวโทรฟิลก็อาจส่งผลต่อการลดการอักเสบในกระบวนการทุเลาอักเสบ (resolution) ของเนื้อเยื่อบริเวณปอดได้ เนื่องจากมีการกระตุ้นการเก็บกิน (phagocytosis) ของเซลล์นิวโทรฟิลที่ตายลงโดยเซลล์แมคโครฟาจ (Ware and Matthay, 2000) กระบวนการเก็บกินและทำลายแบคทีเรียจากการศึกษาในครั้งนี้ พบความสามารถดังกล่าวที่เพิ่มขึ้นในเซลล์นิวโทรฟิลที่ได้รับการกระตุ้นด้วย rIL-17A เพียงบางกลุ่มของเซลล์เท่านั้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งจากเซลล์ของกลุ่มที่ติดเชื้อไวรัส (Flu) เพียงอย่างเดียว จากการสืบค้นข้อมูลที่มีการศึกษาในการทดลองติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่พบว่า innate bacterial clearance ในปอดในภาวะที่ติดเชื้อไวรัสฯ มีความบกพร่องไปเปรียบเทียบกับภาวะปกติของร่างกาย เนื่องจาก alveolar macrophage เป็นเซลล์ชนิดหลักในเซลล์ของระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิดที่ทำหน้าที่ต่อต้านการติดเชื้อต่าง ๆ แต่จากการศึกษาในหลายการศึกษาพบว่ากระบวนการเก็บกินและทำลายเชื้อโรคอาจให้ผลในเชิงของการเปลี่ยนแปลงที่ลดลงหรือไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงเลยเมื่อเทียบกับภาวะที่ไม่มีการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ (McNamee and Harmsen, 2006; Metzger and Sun, 2013) จากการศึกษาในครั้งนี้เกี่ยวกับกระบวนการเก็บกินและทำลายแบคทีเรียในหนูทดลองที่ติดเชื้อไวรัสฯ ที่พบว่าให้ผลในกระบวนการเก็บกินที่ไม่เปลี่ยนแปลงหรือมีการเปลี่ยนแปลงแบบลดลงเล็กน้อยในนิวโทรฟิลจากกลุ่มทดลองส่วนใหญ่ ซึ่งอาจสอดคล้องกับผลการศึกษาของ (McNamee and Harmsen, 2006) ที่พบการลดลงของกิจกรรมดังกล่าว ในส่วนผลการศึกษาเกี่ยวกับปริมาณ ROS ที่เซลล์สร้างขึ้นนั้นกลับขัดแย้งกับผลการศึกษาของ (McNamee and Harmsen, 2006) ซึ่งการศึกษานี้พบว่านิวโทรฟิลภายหลังการกระตุ้นด้วย rIL-17A มีปริมาณการสร้าง ROS ที่เพิ่มขึ้นในทุกกลุ่มทดลอง แม้ว่าจะไม่มีการติดเชื้อไวรัส (Ctrl) ติดเชื้อไวรัส (Flu) หรือแบคทีเรียเพียงอย่างเดียว (KP) หรือมีการติดเชื้อร่วมกัน (Mix) ก็ตาม ทั้งนี้ผลการศึกษาในครั้งนี้ หรือผลการศึกษาที่มีรายงานที่แตกต่างกันนั้นอาจเกิดขึ้นเนื่องจากความแตกต่างของปัจจัยในระหว่างการทดลอง อาทิ จำนวนวันที่ทดลองติดเชื้อไวรัสหรือแบคทีเรีย ปริมาณไวรัส/แบคทีเรียที่ใช้ ชนิดหรือสายพันธุ์ของเชื้อที่ใช้ เป็นต้น

ผลการสร้างโครงสร้าง NETs ซึ่งเป็นกระบวนการทำลายภายนอกเซลล์จากการศึกษานี้พบว่าผลการศึกษาโดยรวมให้ผลในทำนองของการลดจำนวนการสร้าง NETs เมื่อเซลล์ได้รับการกระตุ้นด้วย rIL-17A อย่างไรก็ตาม นิวโทรฟิลในกลุ่มที่ติดเชื้อไวรัสฯ เพียงอย่างเดียว (Flu) มีปริมาณการผลิต NETs ในปริมาณสูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์จากกลุ่มอื่น ๆ การศึกษานี้สอดคล้องกับข้อมูลที่มีการรายงานโดย Narasaraju *et al.*, 2011 และ Narayana Moorthy *et al.*, 2013 ที่พบ

การปล่อยโครงสร้าง NETs ในเนื้อเยื่อปอด (*in vivo*) ของหนูที่ติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่หรือเซลล์นิวโทรฟิลที่ถูกกระตุ้นด้วย infected alveolar epithelial cells (IEP)

IL-17A ถูกสร้างขึ้นภายหลังการเหนี่ยวนำของ LPS หรือแบคทีเรีย เช่น *Klebsiella pneumoniae* หรือจาก *Staphylococcus aureus* (Bosmann and Ward, 2012; Cho *et al.*, 2010; Ferretti *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2011) และทำให้ระดับของ IL-17 เพิ่มขึ้นในซีรัม โดยที่ปริมาณของ IL-17 ที่เพิ่มขึ้นนั้นมีข้อสังเกตว่าอาจจำเป็นต้องได้รับการกระตุ้นผ่านทาง IL-1, TLR2 และ IL-23 ซึ่งจำเป็นสำหรับกลไกในการป้องกันตนเองของโฮสต์ (Cho *et al.*, 2010) ดังนั้นในการทดลองนี้พบว่าการแสดงออกของยีน IL-17A ที่เพิ่มขึ้นในนิวโทรฟิลของหนูทดลองจากกลุ่ม Mix และ Flu มีปริมาณเพิ่มขึ้นซึ่งอาจเป็นเหตุผลหนึ่งเนื่องจากเซลล์ได้รับการกระตุ้นผ่าน LPS หรือแบคทีเรียมีชีวิต ส่วนการเพิ่มขึ้นของ mRNA ของ IL-17A ในหนูกลุ่ม Flu แม้ว่าจะไม่มีเหตุผลสนับสนุนว่าเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่เพียงอย่างเดียวสามารถกระตุ้นการแสดงออกของ IL-17A ได้ตามลำพัง แต่จากการทดลองนี้อาจกล่าวได้ว่าหนูในกลุ่มที่ได้รับการติดเชื้อไวรัสเพียงอย่างเดียวอาจพบการติดเชื้อร่วมของแบคทีเรียร่วมด้วย นอกจากนี้ยังพบว่าระดับการแสดงออกของยีน IL-1 $\beta$  เพิ่มขึ้นในหนูกลุ่ม Flu ซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับกระบวนการตอบสนองของ IL-17 ผ่านทาง IL-1 จากการติดเชื้อไวรัส

ในหนูที่ถูกทำให้การแสดงออกของยีน IL-17RA ไม่สามารถเกิดขึ้นได้ (IL-17RA<sup>-/-</sup>) จะพบความบกพร่องของการสื่อสารสัญญาณผ่านทาง IL-17RA (Ye *et al.*, 2001) จากการกระตุ้นผ่าน IL-17A, IL-17F, IL-17A/F heterodimer และอาจรวมถึง IL-17E (IL-25) ด้วย (Gaffen *et al.*, 2011) นอกจากนี้หนูที่เป็น IL-17RA KO แล้ว การใช้แอนติบอดีต่อต้านบริเวณ IL-17RA เพื่อทำให้ตัวรับดังกล่าวหมดฤทธิ์ (neutralization) ส่งผลต่อการเรียกให้เซลล์นิวโทรฟิลเคลื่อนที่เข้าสู่บริเวณที่พบการติดเชื้อฯ ไม่สามารถเกิดขึ้นได้ ซึ่งตัวรับดังกล่าวมีความสำคัญและช่วยให้หนูทดลองมีชีวิตรอดได้ในระหว่างการติดเชื้อ *Bacillus anthracis* (Garraud *et al.*, 2012) และเชื้อ *Klebsiella pneumoniae* บริเวณทางเดินหายใจ (Ye *et al.*, 2001) แต่การขาดหายไปของ IL-17R ก็อาจส่งผลดีต่อการเข้าแทรกของนิวโทรฟิลในเนื้อเยื่อของไตในกรณีของ acute kidney ischemia-reperfusion injury (IRI) ในหนู (Li *et al.*, 2010)

การสื่อสารสัญญาณผ่าน IL-17R มีความสำคัญสำหรับการผลิต G-CSF และ CXC chemokine ที่มีความสำคัญต่อการเคลื่อนที่ของนิวโทรฟิลและกลไกการป้องกันตนเองบริเวณปอดของหนู เนื่องจากหนูที่ขาด IL-17R หรือหนูที่มีความผิดปกติของการแสดงออก เช่น การแสดงออกที่มากเกินไป (overexpression) ของตัวรับในแบบ soluble IL-17R (Ye *et al.*, 2001) พบว่าช่วยให้การเคลื่อนที่ของนิวโทรฟิลเร็วขึ้น ในขณะที่หนูในภาวะ IL-17R<sup>-/-</sup> ปรากฏลักษณะของการเคลื่อนที่ของนิว

โทรฟิลบริเวณถุงลมต่ำกว่าปกติ (Ye *et al.*, 2001) หรือในภาวะโรคของระบบทางเดินหายใจ เช่น โรคหอบหืด (asthma) พบการแสดงออกของ IL-17RA และ IL-17RC mRNA มีการแสดงออกเพิ่มมากขึ้นในเนื้อเยื่อทางเดินหายใจ และตัวรับดังกล่าวพบว่ามีแสดงออกทั้งบน epithelial และ inflammatory cells ต่าง ๆ รวมถึง endothelial cells ด้วย (Roussel *et al.*, 2010) และใน IL-17R-deficient mice จะแสดงอาการของโรคเช่นเดียวกับหนู  $\gamma\delta$  T cell-deficient mice ซึ่งเป็นเซลล์ที่สร้าง IL-17 (Cho *et al.*, 2010) ในการศึกษาหนึ่งพบว่านิวโทรฟิลที่อยู่ในกระแสเลือด ปรากฏ mRNA และตัวรับที่ผิวเซลล์ชนิด IL-17RA (Dragon *et al.*, 2008) และผลจากการกระตุ้นด้วย 100 ng/mL ของ IL-17 ไม่ส่งผลต่อกระบวนการตายแบบ apoptosis ของเซลล์นิวโทรฟิล (Dragon *et al.*, 2008)

กล่าวโดยสรุป การศึกษาในครั้งนี้ได้ทำการจำลองรูปแบบของการติดเชื้อร่วมระหว่างเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่และการติดเชื้อแทรกซ้อนจากแบคทีเรียที่พบได้เสมอในระบบทางเดินหายใจ และทำการศึกษาผลของการทำหน้าที่ของเซลล์นิวโทรฟิลเมื่อได้รับการกระตุ้นด้วย IL-17 ซึ่งในการศึกษานี้ได้ทำการกระตุ้นเซลล์นิวโทรฟิลในหลอดทดลองด้วย murine rIL-17A ผลการศึกษาทำให้ทราบว่า IL-17 น่าจะมีบทบาทให้การช่วยกระตุ้นให้นิวโทรฟิลทำหน้าที่ในการผลิต ROS เพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้ IL-17 ยังน่าจะมีบทบาทในการช่วยให้นิวโทรฟิลเคลื่อนที่เข้าสู่บริเวณที่พบการติดเชื้อไวรัสหรือแบคทีเรียและมีส่วนช่วยให้เกิดการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันบริเวณปอดที่เหมาะสม

## เอกสารอ้างอิง

- Abdallah, D.S.A., Egan, C.E., Butcher, B.A., Denkers, E.Y., 2011, Mouse neutrophils are professional antigen-presenting cells programmed to instruct Th1 and Th17 T-cell differentiation. *Int. Immunol.* 23, 317-326.
- Almyroudis, N.G., Grimm, M.J., Davidson, B.A., Röhm, M., Urban, C.F., Segal, B.H., 2013, NETosis and NADPH oxidase: at the intersection of host defense, inflammation, and injury. *Front. Immunol.* 4. 10.3389/fimmu.2013.00045.
- Bachoual, R., Talmoudi, W., Boussetta, T., Braut, F., El-Benna, J., 2011, An aqueous pomegranate peel extract inhibits neutrophil myeloperoxidase *in vitro* and attenuates lung inflammation in mice. *Food Chem. Toxicol.* 49, 1224-1228.
- Balloy, V., Sallenave, J.-M., Crestani, B., Dehoux, M., Chignard, M., 2003, Neutrophil DNA contributes to the antielastase barrier during acute lung inflammation. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 28, 746-753.
- Besnard, A.-G., Togbe, D., Couillin, I., Tan, Z., Zheng, S.G., Erard, F., Le Bert, M., Quesniaux, V., Ryffel, B., 2012, Inflammasome-IL-1-Th17 response in allergic lung inflammation. *J. Mol. Cell Biol.* 4, 3-10.
- Bosmann, M., Ward, P.A., 2012, Therapeutic potential of targeting IL-17 and IL-23 in sepsis. *Clin. Transl. Med.* 1, 1-5.
- Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D.S., Weinrauch, Y., Zychlinsky, A., 2004, Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 303, 1532-1535.
- Bruns, S., Kniemeyer, O., Hasenberg, M., Amanianda, V., Nietzsche, S., Thywißen, A., Jeron, A., Latgé, J.-P., Brakhage, A.A., Gunzer, M., 2010, Production of extracellular traps against *Aspergillus fumigatus* in vitro and in infected lung tissue is dependent on invading neutrophils and influenced by hydrophobin RodA. *PLoS pathog.* 6, e1000873.
- Cho, J.S., Pietras, E.M., Garcia, N.C., Ramos, R.I., Farzam, D.M., Monroe, H.R., Magorien, J.E., Blauvelt, A., Kolls, J.K., Cheung, A.L., 2010, IL-17 is essential for host defense against cutaneous *Staphylococcus aureus* infection in mice. *J. Clin. Invest.* 120, 1762-1773.

- Chuammitri, P., Ostojic, J., Andreasen, C.B., Redmond, S.B., Lamont, S.J., Palic, D., 2009, Chicken heterophil extracellular traps (HETs): Novel defense mechanism of chicken heterophils. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 129, 126-131.
- Chuammitri, P., Redmond, S.B., Kimura, K., Andreasen, C.B., Lamont, S.J., Palic, D., 2011, Heterophil functional responses to dietary immunomodulators vary in genetically distinct chicken lines. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 142, 219-227.
- Creed, T.J., Lee, R.W., Newcomb, P.V., di Mambro, A.J., Raju, M., Dayan, C.M., 2009, The effects of cytokines on suppression of lymphocyte proliferation by dexamethasone. *J. Immunol.* 183, 164-171.
- Crowe, C.R., Chen, K., Pociask, D.A., Alcorn, J.F., Krivich, C., Enelow, R.I., Ross, T.M., Witztum, J.L., Kolls, J.K., 2009, Critical role of IL-17RA in immunopathology of influenza infection. *J. Immunol.* 183, 5301-5310.
- Cua, D.J., Tato, C.M., 2010, Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 10, 479-489.
- Dragon, S., Saffar, A.S., Shan, L., Gounni, A.S., 2008, IL-17 attenuates the anti-apoptotic effects of GM-CSF in human neutrophils. *Mol. Immunol.* 45, 160-168.
- Eisen, M.B., Spellman, P.T., Brown, P.O., Botstein, D., 1998, Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 14863-14868.
- Ermert, D., Urban, C.F., Laube, B., Goosmann, C., Zychlinsky, A., Brinkmann, V., 2009, Mouse neutrophil extracellular traps in microbial infections. *J. Innate Immun.* 1, 181-193.
- Farrera, C., Fadeel, B., 2013, Macrophage clearance of neutrophil extracellular traps is a silent process. *J. Immunol.* 191, 2647-2656.
- Ferretti, S., Bonneau, O., Dubois, G.R., Jones, C.E., Trifilieff, A., 2003, IL-17, produced by lymphocytes and neutrophils, is necessary for lipopolysaccharide-induced airway neutrophilia: IL-15 as a possible trigger. *J. Immunol.* 170, 2106-2112.
- Fossiez, F., Djossou, O., Chomarat, P., Flores-Romo, L., Ait-Yahia, S., Maat, C., Pin, J.-J., Garrone, P., Garcia, E., Saeland, S., 1996, T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. *J. Exp. Med.* 183, 2593-2603.

- Freitas, A., Alves-Filho, J.C., Victoni, T., Secher, T., Lemos, H.P., Sônego, F., Cunha, F.Q., Ryffel, B., 2009, IL-17 receptor signaling is required to control polymicrobial sepsis. *J. Immunol.* 182, 7846-7854.
- Gaffen, S.L., Hernández-Santos, N., Peterson, A.C., 2011, IL-17 signaling in host defense against *Candida albicans*. *Immunol. Res.* 50, 181-187.
- Gargiulo, S., Greco, A., Gramanzini, M., Esposito, S., Affuso, A., Brunetti, A., Vesce, G., 2012, Mice anesthesia, analgesia, and care, part I: anesthetic considerations in preclinical research. *ILAR J.* 53, E55-E69.
- Garraud, K., Cleret, A., Mathieu, J., Fiole, D., Gauthier, Y., Quesnel-Hellmann, A., Tournier, J.-N., 2012, Differential role of the interleukin-17 axis and neutrophils in resolution of inhalational anthrax. *Infect. Immun.* 80, 131-142.
- Hakim, A., Fuchs, T.A., Martinez, N.E., Hess, S., Prinz, H., Zychlinsky, A., Waldmann, H., 2011, Activation of the Raf-MEK-ERK pathway is required for neutrophil extracellular trap formation. *Nat. Chem. Biol.* 7, 75-77.
- Hamada, H., Garcia-Hernandez, M.d.l.L., Reome, J.B., Misra, S.K., Strutt, T.M., McKinstry, K.K., Cooper, A.M., Swain, S.L., Dutton, R.W., 2009, T<sub>c</sub>17, a unique subset of CD8 T cells that can protect against lethal influenza challenge. *J. Immunol.* 182, 3469-3481.
- Holloway, T.L., Schwacha, M.G., 2012, The Th-17 response and its potential role in post-injury pulmonary complications. *Int. J. Burns Trauma* 2, 11-17.
- Hoshino, H., Laan, M., Sjöstrand, M., Lötvall, J., Skoogh, B.-E., Lindén, A., 2000, Increased elastase and myeloperoxidase activity associated with neutrophil recruitment by IL 17 in airways *in vivo*. *J. Allergy Clin. Immunol.* 105, 143-149.
- Hoshino, H., Lotvall, J., Skoogh, B.-E., Linden, A., 1999, Neutrophil recruitment by interleukin-17 into rat airways *in vivo* . Role of Tachykinins. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 159, 1423-1428.
- Itou, T., Collins, L.V., Thorén, F.B., Dahlgren, C., Karlsson, A., 2006, Changes in activation states of murine polymorphonuclear leukocytes (PMN) during inflammation: a comparison of bone marrow and peritoneal exudate PMN. *Clin. Vaccine Immunol.* 13, 575-583.
- Kolls, J.K., Lindén, A., 2004, Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity* 21, 467-476.

- Laan, M., Palmberg, L., Larsson, K., Lindén, A., 2002, Free, soluble interleukin-17 protein during severe inflammation in human airways. *Eur. Respir. J.* 19, 534-537.
- Lebaron, P., Joux, F., 1994, Flow cytometric analysis of the cellular DNA content of *Salmonella typhimurium* and *Alteromonas haloplanktis* during starvation and recovery in seawater. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 4345-4350.
- Li, L., Huang, L., Vergis, A.L., Ye, H., Bajwa, A., Narayan, V., Strieter, R.M., Rosin, D.L., Okusa, M.D., 2010, IL-17 produced by neutrophils regulates IFN- $\gamma$ -mediated neutrophil migration in mouse kidney ischemia-reperfusion injury. *J. Clin. Invest.* 120, 331-342.
- Liang, S.C., Long, A.J., Bennett, F., Whitters, M.J., Karim, R., Collins, M., Goldman, S.J., Dunussi-Joannopoulos, K., Williams, C.M.M., Wright, J.F., Fouser, L.A., 2007, An IL-17F/A heterodimer protein is produced by mouse Th17 cells and induces airway neutrophil recruitment. *J. Immunol.* 179, 7791-7799.
- Lim, M.B.H., Kuiper, J.W., Katchky, A., Goldberg, H., Glogauer, M., 2011, Rac2 is required for the formation of neutrophil extracellular traps. *J. Leukoc. Biol.* 90, 771-776.
- Lindén, A., Laan, M., Anderson, G.P., 2005, Neutrophils, interleukin-17A and lung disease. *Eur. Respir. J.* 25, 159-172.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  method. *Methods* 25, 402-408.
- Luo, Y., Dorf, M.E., 2001, Isolation of mouse neutrophils. *Curr. Protoc. Immunol.*, 3.20. 21-23.20. 26.
- McNamee, L.A., Harmsen, A.G., 2006, Both influenza-induced neutrophil dysfunction and neutrophil-independent mechanisms contribute to increased susceptibility to a secondary *Streptococcus pneumoniae* infection. *Infect. Immun.* 74, 6707-6721.
- Medina, E., 2009, Neutrophil extracellular traps: a strategic tactic to defeat pathogens with potential consequences for the host. *J. Innate Immun.* 1, 176-180.
- Metzger, D.W., Sun, K., 2013, Immune dysfunction and bacterial coinfections following influenza. *J. Immunol.* 191, 2047-2052.
- Miyamoto, M., Prause, O., Sjöstrand, M., Laan, M., Lötval, J., Lindén, A., 2003, Endogenous IL-17 as a mediator of neutrophil recruitment caused by endotoxin exposure in mouse airways. *J. Immunol.* 170, 4665-4672.

- Moore, S.I., Huffnagle, G.B., Chen, G.-H., White, E.S., Mancuso, P., 2003, Leptin modulates neutrophil phagocytosis of *Klebsiella pneumoniae*. *Infect. Immun.* 71, 4182-4185.
- Narasaraju, T., Yang, E., Samy, R.P., Ng, H.H., Poh, W.P., Liew, A.-A., Phoon, M.C., van Rooijen, N., Chow, V.T., 2011, Excessive neutrophils and neutrophil extracellular traps contribute to acute lung injury of influenza pneumonitis. *Am. J. Pathol.* 179, 199-210.
- Narayana Moorthy, A., Narasaraju, T., Rai, P., Perumalsamy, R., Tan, K.B., Wang, S., Engelward, B., Chow, V.T., 2013, *In vivo* and *in vitro* studies on the roles of neutrophil extracellular traps during secondary pneumococcal pneumonia after primary pulmonary influenza infection. *Front. Immunol.* 4. 10.3389/fimmu.2013.00056.
- Nguyen Van Luu, Y., Xue-ju, Q., Ming, G., Xin, W., Qiao-yang, X., Zhi-jiao, T., Zhi-xiang, H., Yong, W., 2012, Azithromycin inhibits neutrophil accumulation in airways by affecting interleukin-17 downstream signals. *Chin. Med. J.* 125, 491-495.
- Okonechnikov, K., Golosova, O., Fursov, M., 2012, Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics* 28, 1166-1167.
- Palic, D., Ostojic, J., Andreasen, C.B., Roth, J.A., 2007, Fish cast NETs: Neutrophil extracellular traps are released from fish neutrophils. *Dev. Comp. Immunol.* 31, 805-816.
- Pappu, R., Rutz, S., Ouyang, W., 2012, Regulation of epithelial immunity by IL-17 family cytokines. *Trends Immunol.* 33, 343-349.
- Pinheiro da Silva, F., Nizet, V., 2009, Cell death during sepsis: integration of disintegration in the inflammatory response to overwhelming infection. *Apoptosis* 14, 509-521.
- Reed, L.J., Muench, H., 1938, A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am. J. Epidemiol.* 27, 493-497.
- Remijsen, Q., Berghe, T.V., Wirawan, E., Asselbergh, B., Parthoens, E., De Rycke, R., Noppen, S., Delforge, M., Willems, J., Vandenabeele, P., 2010, Neutrophil extracellular trap cell death requires both autophagy and superoxide generation. *Cell Res.* 21, 290-304.
- Roussel, L., Houle, F., Chan, C., Yao, Y., Bérubé, J., Olivenstein, R., Martin, J.G., Huot, J., Hamid, Q., Ferri, L., Rousseau, S., 2010, IL-17 promotes p38 MAPK-dependent

- endothelial activation enhancing neutrophil recruitment to sites of inflammation. *J. Immunol.* 184, 4531-4537.
- Schmittgen, T.D., Livak, K.J., 2008, Analyzing real-time PCR data by the comparative  $C_T$  method. *Nat. Protoc.* 3, 1101-1108.
- Schwarzenberger, P., La Russa, V., Miller, A., Ye, P., Huang, W., Zieske, A., Nelson, S., Bagby, G.J., Stoltz, D., Mynatt, R.L., 1998, IL-17 stimulates granulopoiesis in mice: use of an alternate, novel gene therapy-derived method for *in vivo* evaluation of cytokines. *J. Immunol.* 161, 6383-6389.
- Southgate, E.L., He, R.L., Gao, J.-L., Murphy, P.M., Nanamori, M., Ye, R.D., 2008, Identification of formyl peptides from *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* as potent chemoattractants for mouse neutrophils. *J. Immunol.* 181, 1429-1437.
- Sreta, D., Tantawet, S., Ayudhya, S.N.N., Thontiravong, A., Wongphatcharachai, M., Lapkuntod, J., Bunpapong, N., Tuanudom, R., Suradhat, S., Vimolket, L., 2010, Pandemic (H1N1) 2009 virus on commercial swine farm, Thailand. *Emerging Infect. Dis.* 16, 1587.
- Sturn, A., Quackenbush, J., Trajanoski, Z., 2002, Genesis: cluster analysis of microarray data. *Bioinformatics* 18, 207-208.
- Sun, K., Ye, J., Perez, D.R., Metzger, D.W., 2011, Seasonal FluMist vaccination induces cross-reactive T cell immunity against H1N1 (2009) influenza and secondary bacterial infections. *J. Immunol.* 186, 987-993.
- Tate, M.D., Deng, Y.-M., Jones, J.E., Anderson, G.P., Brooks, A.G., Reading, P.C., 2009, Neutrophils ameliorate lung injury and the development of severe disease during influenza infection. *J. Immunol.* 183, 7441-7450.
- Van Ziffle, J.A., Lowell, C.A., 2009, Neutrophil-specific deletion of Syk kinase results in reduced host defense to bacterial infection. *Blood* 114, 4871-4882.
- Wang, F., Xu, J., Liao, Y., Wang, Y., Liu, C., Zhu, X., Chen, Z.K., Sun, Z., 2011, Tim-3 ligand galectin-9 reduces IL-17 level and accelerates *Klebsiella pneumoniae* infection. *Cell. Immunol.* 269, 22-28.
- Ware, L.B., Matthay, M.A., 2000, The acute respiratory distress syndrome. *N. Engl. J. Med.* 342, 1334-1349.
- Ye, P., Rodriguez, F.H., Kanaly, S., Stocking, K.L., Schurr, J., Schwarzenberger, P., Oliver, P., Huang, W., Zhang, P., Zhang, J., Shellito, J.E., Bagby, G.J., Nelson, S., Charrier,

K., Peschon, J.J., Kolls, J.K., 2001, Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense. *J. Exp. Med.* 194, 519-528.

Zhang, Y., Lin, X., Koga, K., Takahashi, K., Linge, H.M., Mello, A., Laragione, T., Gulko, P.S., Miller, E.J., 2011, Strain differences in alveolar neutrophil infiltration and macrophage phenotypes in an acute lung inflammation model. *Mol. Med.* 17, 780-789.

## Output ที่ได้จากโครงการ

1. ผู้วิจัยได้นำเสนอผลงานในชื่อเรื่อง “Effects of IL-17 on neutrophil functions in bacterial endotoxin-induced lung inflammation in mice” ในงานประชุมวิชาการ “วันวิชาการ ครั้งที่ 9 วิถีวิจัย: มช. ก้าวไกล ไร้ขีดจำกัด” 2-3 ธันวาคม 2556 หอประชุมมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ โดยส่วนหนึ่งของผลงานที่นำเสนอเป็นข้อมูลที่ได้จากโครงการวิจัยเรื่อง “ผลของอินเตอร์ลิวคิน 17 ต่อการทำงานของนิวโทรฟิลบริเวณปอดที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบ” ซึ่งได้รับการสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และมหาวิทยาลัยเชียงใหม่
2. ข้อมูลงานวิจัยเกี่ยวกับผลของอินเตอร์ลิวคิน 17 ต่อการทำงานของนิวโทรฟิลบริเวณปอดที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบจากการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H1N1 และการติดเชื้อร่วมของแบคทีเรีย *Klebsiella pneumoniae* ที่จะนำไปจัดเตรียมเป็นต้นฉบับงานวิจัย (manuscript) เรื่อง “Interleukin 17 (IL-17) Manipulates Mouse Bone Marrow-Derived Neutrophil Functions in Response to Acute Lung Inflammation.” ซึ่งขณะนี้อยู่ในระหว่างขั้นตอนของการเขียนบทความ

เอกสารประกอบการประชุม

วันวิชาการครั้งที่ ๙

วิทยากร: มช. ก้าวไกล ไร่ใช้แผ่นดิน



๒ - ๓ ธันวาคม ๒๕๕๖

ณ หอประชุมมหาวิทยาลัยเชียงใหม่

EFFECTS OF IL-17 ON NEUTROPHIL FUNCTIONS IN BACTERIAL  
ENDOTOXIN-INDUCED LUNG INFLAMMATION IN MICE  
ผลของอินโตลิคิน 17 ต่อการทำงานของนิวโทรฟิลบริเวณปอดที่ถูกเหนี่ยวนำ  
ให้เกิดการอักเสบ จากเอนโดท็อกซินของแบคทีเรียในหนูทดลอง

Phongsakorn Chuammitri<sup>1</sup>, Kanruethai Wongsawan<sup>1</sup>, Kidsadagon Pringproa<sup>1</sup>  
and Roongroje Thanawongnuwech<sup>2</sup>

พงศกร เชื้อมไมตรี<sup>1</sup>, กัญญ์ฤทัย วงศ์ยาวรณ<sup>1</sup>, กฤษฎาภรณ์ พริงเพราะ<sup>1</sup> และ รุ่งโรจน์ ธนาวงษ์นุเวช<sup>2</sup>

Neutrophils migrate to the lung tissues via signalings from IL-17 and other stimuli. In this study, we aimed to explore the effects of IL-17 on neutrophil functional activities. The results showed that priming of IL-17 recombinant protein (rIL-17) to neutrophils isolated from peripheral bloods of control and LPS-challenged mice at 12, 24, and 48-hour post challenge (p.c.) markedly increased the generation of ROS by flow cytometry ( $p = 0.0265$ ). Further investigation of rIL-17 primed neutrophil phagocytosis revealed higher level of activity in LPS-challenged mice at 12h p.c. ( $p = 0.0493$ ). No significant difference on neutrophil extracellular traps (NETs) formation from rIL-17 stimulated and non-stimulated groups in all indicated time points ( $p = 0.108$ ). Lung histopathological scores were higher in LPS-challenged group than control group. Furthermore, RT-PCR detection of IL-17R expression in isolated neutrophils at 12, 24, and 48h p.c. also confirmed the association of severity of lung lesions from neutrophil migration and its effector functions. To our knowledge, these observations provided the evidence that neutrophils could be readily triggered by cytokine, particularly IL-17 to perform their functions.

นิวโทรฟิลเคลื่อนที่เข้าสู่เนื้อเยื่อปอดโดยเป็นผลจากการดึงดูดของอินโตลิคิน 17 (IL-17) และสิ่งเร้าอื่น การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของ IL-17 ต่อการกระตุ้นการทำหน้าที่ของนิวโทรฟิล ผลการศึกษาพบว่านิวโทรฟิลที่แยกได้จากเลือดของหนูกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับ LPS ณ ชั่วโมงที่ 12, 24 และ 48 เมื่อนำมากระตุ้นด้วย IL-17 recombinant protein (rIL-17) และตรวจวัดจำนวนเซลล์ที่ปรากฏ ROS โดย flow cytometry พบว่าเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย rIL-17 ปรากฏ ROS เพิ่มขึ้นในเซลล์ ( $p = 0.0265$ ) ผลทดสอบกระบวนการเก็บกิน (phagocytosis) พบว่าเซลล์จากกลุ่มที่ได้รับ LPS และถูกกระตุ้นด้วย rIL-17 มีความสามารถในการเก็บกินเพิ่มขึ้น ณ เวลา 12 ชั่วโมง ( $p = 0.0493$ ) ผลการตรวจสอบโครงสร้าง neutrophil extracellular traps (NETs) ไม่พบความแตกต่างระหว่างเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย rIL-17 และเซลล์ที่ไม่ได้ถูกกระตุ้น ( $p = 0.108$ ) รอยโรคที่ปอดจากการทำหน้าที่ของนิวโทรฟิลพบค่าเฉลี่ยคะแนนรอยโรคในหนูกลุ่มที่ได้รับ LPS มีค่ามากกว่าหนูกลุ่มควบคุมทุกช่วงเวลา นอกจากนี้ยังตรวจพบการแสดงออกของยีนตัวรับ IL-17 (IL-17R) ของนิวโทรฟิลที่เวลา 12, 24 และ 48 ชั่วโมงภายหลังได้รับ LPS ซึ่งสอดคล้องกับรอยโรคที่ปอดจากการเคลื่อนที่เข้ามาของนิวโทรฟิลและการทำหน้าที่ของเซลล์ชนิดนี้ การศึกษานี้อาจสรุปได้ว่านิวโทรฟิลสามารถถูกกระตุ้นจาก IL-17 ที่ปรากฏบริเวณเนื้อเยื่อปอดและส่งผลต่อการทำหน้าที่ของเซลล์ชนิดนี้

**Keywords:** IL-17, mouse, neutrophil, endotoxin-induced lung inflammation

<sup>1</sup>Department of Veterinary Biosciences, Faculty of Veterinary Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai 50100, Thailand.

<sup>2</sup>Department of Veterinary Pathology, Faculty of Veterinary Sciences, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand.  
E-mail: phongsakorn.c@cmu.ac.th