

## Abstract (บทคัดย่อ)

---

**Project Code :** RSA58-เฟเบียน ลัวซอง - RSA5880021

(รหัสโครงการ)

**Project Title :** Neutrophil activation and NETosis in patients infected with dengue virus

(ชื่อโครงการ)

**Investigator :** **ชื่อนักวิจัย และสถาบัน**

(ชื่อนักวิจัย)

(ไทย) นายเฟเบียน ลัวซอง

(อังกฤษ) Mr. Fabien Loison

(ตำแหน่งวิชาการ) ผู้ช่วยศาสตราจารย์

**E-mail Address :** Fabien.loi@mahidol.ac.th

**Project Period :** July 2015-July 2019

(ระยะเวลาโครงการ)

**Abstract:** The involvement of the immune system in the protection and pathology of dengue virus (DENV) infection has been extensively explored. Several studies, mostly whole blood transcriptomic, have hinted at the activation of neutrophils during DENV infections. However, the exact contribution of neutrophils during infection remains elusive. In this work, we explored the phenotype of neutrophils as well as their function *ex vivo* using cells isolated from a cohort of Thai adult dengue patients. We have shown that during acute DENV infection, neutrophils were characterized with the upregulation of CD66b expression on the plasma membrane. These cells also released higher levels of reactive oxygen species compared to convalescent or healthy individuals. These observations confirmed neutrophil activation during DENV infection. Interestingly, we also observed that the CD66<sup>high</sup> phenotype was positively correlated with the spontaneous decondensation of nuclei from DENV-infected patients compared to convalescent or healthy patients. The nuclei decondensation is an early event of the formation and release of neutrophil extracellular traps (NETs), a mesh of DNA release from PMN in order to trap and inactivate or kill microorganisms. Consequently, we tested the ability of NETs to inactivate DENV-2 and observed a marked and fast decrease of infectivity of the virus after incubation with NETs. Using ELISA, we also tested for the presence of marker of NETs in the serum of healthy volunteers, acute and convalescent dengue patients. Larger amounts of NET components were detected in the serum of for dengue hemorrhagic fever (DHF) compared to uncomplicated dengue fever. We also measured increased levels of the pro-inflammatory cytokines IL-8 and TNF $\alpha$  in DHF patients compared to healthy and uncomplicated Dengue Fever subjects. This suggested that NETs may play dual roles during DENV infection. The increased ability for NET formation during acute DENV infection appeared to be independent of PAD4-mediated histone H3 hyper-citrullination. Our study suggests that neutrophils are involved in immunological responses to DENV infection.

**บทคัดย่อ:** บทบาทของระบบภูมิคุ้มกันในการป้องกันการติดเชื้อและพยาธิวิทยาของเชื้อไวรัสเด็งกีได้รับการศึกษาอย่างแพร่หลาย จากการศึกษาด้านทรานสคริปโตมิกส์ชี้ว่าการติดเชื้อไวรัสเด็งกีสามารถกระตุ้นการทำงานของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิลได้ อย่างไรก็ตามความรู้เกี่ยวกับบทบาทที่แท้จริงของนิวโทรฟิลต่อการติดเชื้อยังคงไม่ชัดเจน ในการศึกษานี้ได้ศึกษาคุณลักษณะและหน้าที่ของนิวโทรฟิล โดยนิวโทรฟิลถูกสกัดแยกจากเลือดผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสเด็งกีชาวไทย พบว่าขณะที่เกิดการติดเชื้อ การแสดงออกของ CD66b ที่ผิวเซลล์เพิ่มสูงขึ้น ขณะเดียวกันพบว่าเซลล์เหล่านี้สร้างและปล่อยสารอนุพันธ์ออกซิเจนอิสระสูงกว่าเซลล์ผู้ป่วยจากระยะฟื้นไข้และกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดี ซึ่งคุณลักษณะเหล่านี้สนับสนุนว่านิวโทรฟิลถูกกระตุ้นขณะที่เกิดการติดเชื้อไวรัสเด็งกี นอกจากนี้ เราพบว่าการเพิ่มสูงขึ้นของ CD66 มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับการตายตัวของนิวเคลียสของนิวโทรฟิลจากผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสเด็งกีเมื่อเปรียบเทียบกับผู้ป่วยระยะฟื้นไข้และกลุ่มควบคุม เราพบว่านิวเคลียสของนิวโทรฟิลเกิดการตายตัวในระยะเริ่มต้นของการสร้างและปล่อย NETs ซึ่งมีลักษณะเป็นเส้นใยดีเอ็นเอที่ใช้ในการยับยั้งหรือกำจัดเชื้อจุลชีพ คณะผู้วิจัยได้ศึกษาปริมาณของส่วนประกอบของ NETs ใน Serum ของผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสเด็งกีในระยะเฉียบพลัน เทียบกับระยะหายจากโรคและในกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดี โดยวิธี ELISA ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่ามีปริมาณของโมเลกุลที่เป็นส่วนประกอบสำคัญของ NETs ในผู้ป่วยที่มีภาวะเลือดออก (Dengue hemorrhagic fever, DHF) มากกว่าในกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่มีอาการรุนแรง (Dengue fever, DF) นอกจากนี้เรายังพบปริมาณของสารอักเสบชนิด IL-8 และ TNF- $\alpha$  สูงขึ้นในกลุ่มผู้ป่วยที่มีอาการรุนแรง เมื่อเทียบกับกลุ่มที่อาการไม่รุนแรงและกลุ่มควบคุม แสดงให้เห็นว่า NETs อาจมีบทบาทสองอย่าง ทั้งในการป้องกัน และทำให้เกิดอาการรุนแรงขึ้นในผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสเด็งกี ในการศึกษาของเราการเพิ่มสูงขึ้นของ NETs ในช่วงติดเชื้อไวรัสเด็งกีเฉียบพลันนั้นไม่ขึ้นกับการเกิด histone H3 hypercitrullination โดยเอนไซม์ PAD4 การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่านิวโทรฟิลมีบทบาทในการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อไวรัสเด็งกี